



## **PROYECTO MARCO-MINCIENCIAS**

Asociación entre cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* portadoras de la deleción RD174 y/o con deleción en el gen *kdpD*, con la severidad de la tuberculosis pulmonar y respuesta inmune al tratamiento

## **TRABAJO DE GRADO**

Asociación entre las variantes genómicas de *Mycobacterium tuberculosis*, obtenidas de una cohorte de personas con tuberculosis pulmonar activa del Área Metropolitana del Valle de Aburrá, con la severidad de la enfermedad, y la respuesta inmune al tratamiento

Juan Camilo Ocampo Martínez

**Universidad de Antioquia**  
**Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas**  
**Medellín**  
**2022**

Asociación entre las variantes genómicas de *Mycobacterium tuberculosis*, obtenidas de una cohorte de personas con tuberculosis pulmonar activa del Área Metropolitana del Valle de Aburrá, con la severidad de la enfermedad, y la respuesta inmune al tratamiento

Juan Camilo Ocampo Martínez

Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar el título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, énfasis en Inmunología.

**Investigador principal**

Andrés Baena García, M.Sc, Ph.D.

**Co-director**

Luís Fernando Barrera Robledo, M.Sc, Ph.D.

**Comité asesor:**

Mauricio Rojas López, M.Sc, Ph.D. Universidad de Antioquia, Medellín  
Hanna Marisol Henao Vanegas, M.D., Ph.D. Universidad de Antioquia, Medellín

**Universidad de Antioquia**  
**Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas**  
**Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG)**  
**Medellín**  
**2022**

## Agradecimientos

A Dios, porque Él da la sabiduría; de sus labios brotan conocimiento e inteligencia.

A mi familia, especialmente a mis padres, que son un apoyo incondicional, fuente de amor que me impulsan a avanzar, a mi hermana Daniela que siempre está disponible, me acompañó un mes en la parte de la escritura y también a mi novia Karoll quien me acompañó en momentos de dificultad.

A mi tutor, el profesor Andrés Baena, quien fue paciente durante mi formación y gran parte de sus enseñanzas fueron con su ejemplo.

Al profesor Luis Fernando Barrera, el cual compartió en diferentes momentos su conocimiento adquirido durante su carrera conmigo y leyó de forma minuciosa el trabajo escrito.

A la médica antropóloga Hanna Marisol Henao Vanegas, por la pasión con que realiza su trabajo y enseñanzas impartidas.

Al profesor Luis Fernando García, el cual fue participe de mi proceso de formación.

Al profesor Mauricio Rojas, por su disponibilidad siempre a enseñar.

A mi compañera Karen Álvarez por su ayuda desde el ingreso al grupo GICIG.

Al grupo GICIG, por ser el ambiente propicio para el crecimiento personal.

A la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas y a la Universidad de Antioquia por darme la oportunidad de ser estudiante, el *Alma Mater* en el que soñé estar.

## Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b> .....	<b>16</b>
1.1 Espectro clínico de gravedad en TB .....	17
1.2 Disfunción pulmonar post-tratamiento .....	20
1.3 Clasificación de gravedad por medio de medidas clínicas y paraclínicas .....	23
1.3.1. Escalas clínicas .....	23
1.3.2 Radiografía de tórax y otras imágenes diagnósticas.....	26
1.3.3. Pruebas microbiológicas.....	29
1.4 Respuesta inmune en TB y papel de las citoquinas.....	30
1.4.1. Niveles de citoquinas y moléculas asociadas con inflamación en suero de pacientes con TB y asociación con gravedad .....	34
1.4.2. Familia IL-1 (IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33).....	35
1.4.3. Los interferones tipo I (IFN- $\alpha$ 2 e IFN- $\beta$ ) .....	37
1.4.4. IFN- $\gamma$ .....	38
1.4.5. TNF- $\alpha$ .....	39
1.4.6. MCP-1 .....	40
1.4.7. IL-6 .....	42
1.4.8. IL-8 .....	43
1.4.9. IL-10 .....	44
1.4.10. IL-17A .....	45
1.4.11. Familia de interleucina IL-12 (IL-12p70 e IL-23).....	46
1.4.12. Lipoxina A4 (LXA <sub>4</sub> ).....	47
1.4.13. Quitotriosidasa (CHIT-1) .....	48
1.5 Polimorfismos en <i>Mtb</i> asociados a un fenotipo de TB más severa .....	52
<b>2. Pregunta de investigación</b> .....	<b>59</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>60</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>61</b>

4.1	Objetivo general .....	61
4.2	Objetivos específicos .....	61
<b>5.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>62</b>
5.1	Objetivos metodológicos .....	62
5.2	Diseño del estudio .....	62
5.3	Ingreso de los pacientes a la cohorte de estudio KdpDE.....	62
5.4	Criterios de inclusión.....	63
5.5	Criterios de exclusión .....	63
5.6	Almacenamiento de muestras de suero .....	64
5.7	Almacenamiento y estudio microscópico del esputo .....	64
5.8	Cultivo de <i>Mtb</i> .....	65
5.9	Medición de analitos en suero .....	65
5.10	Secuenciación de genoma completo de <i>Mtb</i> .....	66
5.11	Ensamblaje de genomas de <i>Mtb</i> .....	66
5.12	Análisis estadístico .....	67
5.13	Resultados metodológicos .....	68
5.13.1.	Caracterización clínico-radiológica de los pacientes con TB pulmonar al inicio del tratamiento.....	68
5.13.2.	Extracción de ADN para secuenciación de genoma.....	72
5.13.3.	Observaciones finales sobre la metodología .....	74
<b>6.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>76</b>
6.1	Descripción general de la población de estudio .....	76
6.2	Georreferenciación de los casos de la cohorte KdpDE 2020-2022 de pacientes con TB pulmonar del Área Metropolitana del Valle de Aburrá.....	80
6.3	Comportamiento de los niveles séricos de citoquinas y una molécula asociada a inflamación en pacientes con TB pulmonar activa durante el tratamiento .....	83
6.4	Clasificación clínico-radiológica de severidad para pacientes con TB pulmonar en el momento del diagnóstico de la enfermedad.....	85

6.5	Niveles séricos de citoquinas y una proteína asociada a inflamación en pacientes con TB pulmonar activa respecto a la severidad de la enfermedad .....	89
6.6	Correlación entre los niveles séricos de citoquinas elevadas en pacientes con TB severa después de 8 semanas desde el inicio del tratamiento.....	92
6.7	Biomarcadores proinflamatorios al final del tratamiento .....	95
6.8	Citoquinas séricas y CHIT-1 para distinguir entre una TB leve y severa después de 8 semanas de tratamiento .....	98
6.9	Análisis de los genomas completos de <i>Mtb</i> aislados de los pacientes de la cohorte KdpDE .....	101
6.10	Polimorfismos comunes en grupos de aislamientos clínicos de <i>Mtb</i> presentes en pacientes con TB severa.....	103
6.11	Polimorfismos comunes en grupos de aislamientos clínicos de <i>Mtb</i> inductores de altos niveles séricos de CHIT-1 en pacientes con TB pulmonar después de 2 meses de tratamiento..	105
6.12	Análisis de enriquecimiento funcional para los genes con polimorfismos asociados con la severidad de la TB.....	108
<b>7.</b>	<b>Discusión y perspectivas.....</b>	<b>113</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>129</b>
<b>9.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>170</b>
9.1	Anexo 1. Consentimiento informado.....	170
9.2	Anexo 2. Formulario.....	174
9.3	Anexo 3. Análisis de los datos de citometría.....	179
9.3.1.	Análisis de los datos de ELISA para cuantificar los niveles séricos de CHIT-1.....	179
9.4	Anexo 4. Protocolo de extracción de ADN de <i>Mtb</i> para genoma total. ....	183
9.5	Anexo 5. Figuras suplementarias.....	186

## Lista de figuras

**Figura 1.** Parámetros utilizados para el Bandim TB-score

**Figura 2.** Representación esquemática del método de clasificación clínico-radiológico

**Figura 3.** TB-score GICIG

**Figura 4.** Electroforesis de ADN extraído de aislados clínicos de personas de la cohorte KdpDE para secuenciación del genoma completo

**Figura 5.** Distribución de pacientes según la puntuación del TB- score GICIG estratificados por la severidad de la enfermedad

**Figura 6.** Visión general de la población de estudio

**Figura 7.** Georreferenciación de los casos de la cohorte de pacientes con TB pulmonar del Área Metropolitana del Valle de Aburrá de la cohorte KdpDE 2020-2022

**Figura 8.** Comportamiento de los niveles séricos de citoquinas y moléculas asociadas a inflamación en pacientes con TB pulmonar activa durante el tratamiento

**Figura 9.** Cohorte de pacientes KdpDE 2020-2022 clasificados por la severidad de la TB pulmonar

**Figura 10.** Los pacientes con TB pulmonar severa presentan concentraciones séricas elevadas de citoquinas inflamatorias y de una proteína asociada a inflamación a las 8 semanas desde el inicio del tratamiento antibiótico

**Figura 11.** Los pacientes con TB pulmonar severa presentan concentraciones séricas elevadas de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 e IL-23 en comparación con los pacientes con TB moderada a las 8 semanas desde el inicio del tratamiento antibiótico

**Figura 12.** Correlación entre los niveles séricos de citoquinas en pacientes con TB pulmonar después de 8 semanas desde el inicio del tratamiento

**Figura 13.** Los individuos con TB pulmonar severa no presentan disminución de los niveles séricos de IFN- $\gamma$  después de finalizar el tratamiento

**Figura 14.** Curvas ROC para estimar la capacidad de biomarcadores séricos de distinguir entre una TB leve y severa

**Figura 15.** Linaje 4 y sus diferentes sublinajes en pacientes del Área Metropolitana del Valle de Aburrá

**Figura 16.** Diagrama de Venn que agrupa el recuento de delecciones/inserciones únicas y compartidas, presentes en los aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB pulmonar leve y severa

**Figura 17.** Polimorfismos comunes en grupos de aislamientos clínicos de *Mtb* inductores de altos niveles séricos de CHIT-1 en pacientes con TB pulmonar después de 2 meses de tratamiento

**Figura 18.** Análisis de enriquecimiento funcional de genes asociados a los polimorfismos presentes en aislados clínicos de *Mtb*, de pacientes con TB severa

**Figura 19.** Modelo integrador del papel potencial de los biomarcadores clínicos, radiológicos, moleculares y serológicos en la toma de decisiones clínicas en relación con el seguimiento, pronóstico y tratamiento de la TB pulmonar

**Figura 20.** Modelo de la inmunopatología de pacientes con TB leve vs TB severa



## Lista de tablas

**Tabla 1.** Citoquinas y severidad clínica de la TB

**Tabla 2.** Citoquinas y respuesta inmune al tratamiento

**Tabla 3.** Características de los participantes del estudio

**Tabla 4.** Comparación de variables independientes clasificadas por la severidad de la TB pulmonar

**Tabla 5.** Correlación de citoquinas en pacientes con TB a las 8 semanas después del inicio de tratamiento

**Tabla 6.** Valores de curvas ROC para discriminar TB leve vs severa

**Tabla 7.** Análisis estadístico del patrón de inserciones/deleciones presentes en aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB pulmonar severa

**Tabla 8.** Enriqueciendo funcional para los polimorfismos presentes en aislados de *Mtb* de pacientes con TB severa (entregada por la herramienta STRING)

## **Lista de anexos**

**Anexo 1.** Consentimiento informado

**Anexo 2.** Formulario

**Anexo 3.** Análisis de los datos de citometría

**Anexo 4.** Protocolo de extracción de ADN de *Mtb* para genoma total

**Anexo 5.** Figuras suplementarias

## **Siglas, acrónimos y abreviaturas**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AUC:** Área bajo la curva

**AMTB:** Macrófagos alveolares de personas con Tuberculosis pulmonar activa

**BAAR:** Bacilos ácido alcohol resistentes

**BCG:** Bacillus Calmette-Guerin

**CD:** Células dendríticas

**CHI3L1:** Chitinase-3like1

**CHIT-1:** Quitinasa-1

**COVID-19:** Enfermedad por coronavirus 2019

**COX<sub>2</sub>:** Ciclooxygenasa 2

**CXR:** Radiografía de tórax

**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**EPS:** Entidad promotora de salud

**ESX-1:** Sistema de secreción 1 de diana antigénica secretora temprana de 6 kDa

**FDA:** Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU.

**FDG-PET:** Tomografía por emisión de positrones- fluoro-desoxiglucosa

**FEV<sub>1</sub>:** Volumen espiratorio forzado en el primer segundo

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IGRAs:** Ensayo de liberación de interferón Gama

**IL-12:** Interleucina 12

**IL-12p70:** Interleucina12p70

**IL-18:** Interleucina 18

**IL-18R $\alpha$ :** Receptor alfa de IL-18

**IL-18R $\beta$ :** Receptor beta de IL-18

**IL-1R:** Familia de receptores de IL-1

**IL-1 $\alpha$ :** Interleucina 1 alfa

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta

**IL-21:** Interleucina 21

**IL-22:** Interleucina 22

**IL-23:** Interleucina 23  
**IL-27:** Interleucina 27  
**IL-33:** Interleucina 33  
**IL-33R:** Receptor de IL-33  
**IL-35:** Interleucina 35  
**IL-6:** Interleucina 6  
**IL-8:** Interleucina-8  
**IMC:** Índice de masa corporal  
**INS:** Instituto Nacional de Salud  
**ISG:** Factor génico estimulado por IFN  
**ISRE:** Elementos de respuesta estimulados por IFN  
**JAK1:** Janus quinasa 1  
**KPS:** Índice de Karnofsky  
**LN:** Ganglios linfáticos mediastínicos  
**LTBI:** Infección latente de tuberculosis  
**LTB4:** Leucotrieno B4  
**LXA4:** Lipoxina A4  
**Man-LAM:** Lipoarabinomanano cubierto de manosa  
**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos  
**MCP-1:** Proteína quimio atrayente de monocitos  
**MDR-TB:** TB multirresistente  
**MMPs:** Metaloproteinasas de la matriz extracelular  
**MSMD:** Susceptibilidad mendeliana a la enfermedad micobacteriana  
**Mtb:** Mycobacterium tuberculosis  
**MTBC:** Complejo Mycobacterium tuberculosis  
**MUAC:** Circunferencia del brazo medio superior  
**MyD88:** Respuesta primaria de diferenciación mielóide 88  
**NET:** Trampas extracelulares de neutrófilos  
**OMS:** Organización mundial de la salud  
**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E2  
**PI3K:** Fosfoinositido-3-quinasa

**PKC:** Proteína quinasa C PKC

**PMN:** Polimorfonuclear

**RIC:** Rango intercuartilico

**RM:** Resonancia magnética

**ROS:** Reactivas del oxígeno

**SAHOS:** Síndrome de apnea e hipo-apnea del sueño

**SNP:** Polimorfismos de un solo nucleótido

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**TB:** Tuberculosis

**TC:** Tomografía computarizada

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**Th1:** Células auxiliares de tipo 1

**Th17:** Células auxiliares de tipo 17

**Th2:** Células auxiliares de tipo 2

**TIMP1:** Inhibidor de metalopeptidasa 1

**TLRs:** Receptores tipo Toll

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TPE:** Tuberculosis pleural

**Treg:** Células T reguladoras

**TYK:** Tirosina quinasa

**UCI:** Unidad de cuidados intensivos

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana adquirida

**WGS:** Secuenciación del genoma completo

## Resumen

Actualmente, la Tuberculosis (TB) se mantiene como un problema de salud pública a nivel mundial. Después de haber terminado el tratamiento y lograr la curación clínica de la enfermedad, más del 50 % de los pacientes tratados por TB desarrollan una disfunción pulmonar permanente. En el manejo de los pacientes con TB no existe un sistema de estratificación, ni la implementación de biomarcadores que permitan identificar a los pacientes con mayor riesgo de padecer daño pulmonar extenso e irreversible. El objetivo de este trabajo es determinar si existe asociación entre la variabilidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), la severidad clínica de la enfermedad, y los niveles séricos de citoquinas en pacientes con TB pulmonar activa (APTB). Con este objetivo, realizamos el seguimiento clínico y paraclínico de 108 pacientes con APTB durante los 6 meses posteriores al inicio del tratamiento, los clasificamos según la severidad de la enfermedad basándonos en una adaptación del (TB-score), previamente descrita, y una clasificación de la radiografía de tórax, cuantificamos los niveles séricos de analitos al momento del diagnóstico, a 2 meses y a 6 meses desde el inicio del tratamiento, y secuenciamos el genoma completo de 81 aislados de *Mtb* obtenidos a partir de los esputos de los pacientes. Encontramos que los niveles séricos de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 y Quitinasa-1 (CHIT-1) podrían utilizarse como biomarcadores para identificar pacientes con TB severa y evidenciamos un grupo de polimorfismos en los aislados clínicos secuenciados de *Mtb* de pacientes identificados con una forma severa de la enfermedad, que se asociaron con altos niveles séricos de CHIT-1. También proponemos un biomarcador temprano de severidad (IL-6) y marcadores proinflamatorios al final del tratamiento (MCP-1, IL-18, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , CHIT-1). En un estudio posterior estos biomarcadores deben ser validados para su aplicación en pacientes colombianos con TB pulmonar sin otras comorbilidades.

**Palabras clave:** Biomarcadores, Citoquinas, Variación genética, Polimorfismo, Índice de Severidad de la Enfermedad, Daño pulmonar, Tuberculosis.

## Abstract

Currently, Tuberculosis (TB) remains a public health issue worldwide. After finishing treatment and achieving clinical cure of the disease, more than 50% of patients treated with TB develop permanent lung dysfunction. In the management of patients with TB, there is no stratification system, nor the implementation of biomarkers to identify patients at higher risk of extensive and irreversible lung damage. The objective of this work is to determine if there is an association between the genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), the clinical severity of the disease, and the plasma levels of cytokines in patients with active pulmonary TB (APT<sub>B</sub>). With this objective, we performed the clinical and paraclinical follow-up of 108 patients with APT<sub>B</sub> during the 6 months after the start of treatment, classified them according to the severity of the disease based on an adaptation of the (TB-score), previously described, and a classification of chest X-ray, quantified the plasma levels of analytes at the moment of diagnosis, 2 months and 6 months from the beginning of the treatment, and sequenced the entire genome of 81 *Mtb* isolates. We found that plasma levels of IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 and Chitinase-1 (CHIT-1) could be used as biomarkers to identify patients with severe APT<sub>B</sub> and we evidenced a panel of polymorphisms in the sequenced clinical isolates of *Mtb* from identified patients with a severe form of the disease that were associated with high plasma levels of CHIT-1. As well, we are proposing an early biomarker of severity (IL-6) and pro-inflammatory markers at the end of treatment (MCP-1, IL-18, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , CHIT-1). In a subsequent study these biomarkers must be validated for application in Colombian patients with pulmonary TB without other comorbidities.

**Keywords:** Biomarkers, Cytokines, Genetic Variation, Polymorphism, Severity of Illness Index, Lung Injury, Tuberculosis.

## 1. Introducción

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es el agente etiológico que causa la tuberculosis (TB) humana y es una de las principales causas infecciosas de muertes en adultos en todo el mundo (1). La incidencia mundial para el año 2021 según la OMS fue de 10,6 millones de personas y hubo aproximadamente 1,6 millones de muertes (2). La actual pandemia de COVID-19 ha revertido años de progreso mundial en la reducción de mortalidad por TB y el diagnóstico de nuevos casos (2). En Colombia según datos del Instituto Nacional de Salud (INS) para el año 2021 se presentaron 14.091 casos nuevos (25,8 casos por cada 100 mil habitantes y un incremento del 11,2% comparativo con el año inmediatamente anterior) y el 12% de las personas afectadas con TB tenían coinfección con VIH. Antioquia 2.609 (18,4%) y Medellín 1713 (12,9%) fueron el departamento y municipio respectivamente con mayor número de casos por encima del Valle del Cauca, Cundinamarca, Cali y Bogotá (3,4).

La Tuberculosis pulmonar activa (APT) es una enfermedad respiratoria que junto a la infección de tuberculosis latente (LTBI), inician por transmisión del bacilo a través de aerosoles que son expectorados por una persona bacilífera durante el proceso de toser, gritar, estornudar, cantar o cualquier maniobra espiratoria enérgica que corte las secreciones respiratorias (5–8). Esta enfermedad, afecta principalmente a los pulmones (aproximadamente 85%) (9) causando síntomas como tos crónica, fiebre, hemoptisis, sudores nocturnos, pérdida de peso y malestar (10,11). Además de los pulmones, *Mtb* puede diseminarse a cualquier órgano o tejido y las localizaciones más frecuentes son la ganglionar, pleural y osteo-articular (12,13). Estos síntomas ocurren en el 5-10% de las personas infectadas que desarrollan APT, mientras que la mayoría de las personas son capaces de contener la micobacteria y desarrollar LTBI (14). Se estima que hasta una cuarta parte de la población mundial está infectada por *Mtb* (15) y se considera que el riesgo de que evolucionen hacia una TB activa y volverse infecciosas en algún momento de su vida es de 5 a 10% (16). Parte de las prioridades para el control y eventual eliminación de la TB es la identificación y el tratamiento de personas con LTBI, reduciendo el riesgo de desarrollar la APT hasta en un 90 % (17) y, por lo tanto, tiene el potencial de proteger la salud de las personas al reducir la cantidad de posibles fuentes futuras de infección (18).



La TB activa se caracteriza por ser una enfermedad heterogénea mostrando variaciones en el curso de la enfermedad, con compromiso pulmonar de mayor o menor extensión, formas extrapulmonares o diseminadas de TB y una respuesta variable al tratamiento (19–21); esa heterogeneidad se ha asociado principalmente con la variabilidad genética de la población humana y del bacilo mismo, además de factores sociodemográficos, como malnutrición, entre otros factores asociados como pobreza. Los elementos antes mencionados determinan la condición inmune de los huéspedes durante la infección y posiblemente median el resultado de la enfermedad (22,23). Los niveles de inflamación muy bajos y altos a menudo se asocian con la TB activa grave, mientras que las respuestas inmunitarias equilibradas se asocian con la TB activa leve, la TB latente y posiblemente la eliminación de la TB (22). El estudio de estos factores, nos permitiría eventualmente, proponer un modelo de las interacciones biológicas subyacente a la respuesta inmune en TB, y de esa forma poder llegar a intervenir clínicamente con éxito la inflamación, mejorando el resultado de la enfermedad y asegurando una respuesta inmunitaria protectora (22).

## 1.1 Espectro clínico de gravedad en TB

No se conocen, de manera precisa, los mecanismos moleculares que dirigen el espectro continuo de la infección por *Mtb* desde diferentes etapas de la LTBI incluyendo formas subclínicas de TB, hasta una enfermedad activa y sus diferentes presentaciones clínicas, sin embargo, se sabe que la presentación clínica de la enfermedad está determinada por la respuesta inmune del paciente en respuesta a la infección (24). El estado inmune del huésped infectado está definido por la genética del huésped, los factores extrínsecos y la heterogeneidad de la micobacteria (22).

Para ilustrar lo anterior, durante los últimos 20 años, más de 100 estudios han buscado posibles asociaciones entre los polimorfismos de genes humanos y la susceptibilidad a la TB (25). Se conoce la asociación de errores congénitos de genes relacionados con la inmunidad al interferón tipo II (IFN- $\gamma$ ) con la TB infantil, y se les ha denominado Susceptibilidad Mendeliana a la Enfermedad Micobacteriana (MSMD) (26–28), la cual está relacionada con la TB primaria, sin embargo el estudio de la susceptibilidad genética a la APTB en la edad adulta ha resultado más difícil y apunta a una heterogeneidad subyacente entre *Mtb* y el huésped (28). La mayoría de los estudios de asociación genética que investigan la APTB se han centrado en genes candidatos, y se

han informado varias variantes de riesgo comunes, en particular en genes relacionados con la inmunidad (26).

Del lado de los factores extrínsecos, muchos casos nuevos de TB son atribuibles a cinco factores de riesgo: desnutrición, infección por VIH, trastornos por consumo de alcohol, tabaquismo y la diabetes mellitus (2,9). En ese mismo sentido, se ha establecido categóricamente que el retraso en el tratamiento de los pacientes con TB se asocia con una mayor mortalidad, transmisión de la enfermedad y con una presentación clínica más grave (29).

Por parte del patógeno, se conoce que las cepas de TB multirresistentes (MDR-TB) inducen una mayor gravedad de la enfermedad (30). Sin embargo, hoy se sabe que niveles de diversidad genética en el complejo *Mtb* van desde 25 a 2000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), y su variación depende si se evalúan los aislados dentro de un mismo huésped, si se comparan dentro del mismo linaje, o dentro de diferentes linajes del complejo *Mtb* (MTBC) (31). La importancia creciente del estudio de esta variación genética dentro del MTBC es que tiene importantes consecuencias fenotípicas y se ha demostrado que independientemente de la resistencia a los medicamentos, los SNP no sinónimos (cambian el contenido de aminoácidos de la proteína correspondiente) tienen un impacto en la presentación clínica de la TB (32). También se evidencian diferencias en término de las tasas de crecimiento en cultivo líquido (33), en macrófagos derivados de monocitos (34) y en el modelo murino (35). Adicionalmente, se observan diferencias en términos de expresión génica (36), perfiles metabólicos (37), cambios epigenéticos y modificaciones pos-traduccionales (38). Recientemente se hallaron diferencias significativas en los perfiles de ácido micólico entre diferentes cepas y linajes de MTBC (39), estos son un tipo de ácidos grasos que constituyen el componente de la pared celular más abundante en la micobacteria, desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria del huésped (40) y ayudan a resistir el estrés oxidativo (41).

Actualmente, el Acto Médico no implementa el uso de biomarcadores que clasifiquen la APTB según la severidad y que mejoren la atención de las personas (42). Se han propuesto Reglas de Predicción Clínica (RPC) (43) para la atención de pacientes con APTB. El primero en proponer una RPC (Bandim TB-score) fue Wejse y colegas en el 2008 (44), Sin embargo, esta se limita a una evaluación clínica que puede no correlacionarse con el compromiso del parénquima pulmonar, por lo cual la clasificación no es representativa del padecimiento del paciente con TB. Otro sistema

de puntuación pronóstica fue desarrollado en Japón y publicada el 2012 por Horita y colegas (45), para predecir la muerte intrahospitalaria en pacientes con TB recién diagnosticada no MDR-TB y/o infección por VIH. El sistema de puntuación se compone de cuatro factores de riesgo: edad, nivel de albúmina sérica, requerimiento de oxígeno y actividad de la vida diaria. Este sistema de puntuación tenía un Área bajo la curva (AUC) ROC de 0,875 ( $p < 0,001$ ). A pesar de ser una buena herramienta solo es de aplicación intrahospitalaria (45). Más adelante se propuso y validó una RPC para estratificar el riesgo de mortalidad de los pacientes con APTB en entornos hospitalarios y ambulatorios. Este sistema puntuación se elaboró de forma retrospectiva en una cohorte de 681 casos con APTB basado en análisis de regresión logística múltiple y se probó con una cohorte de validación de 103 pacientes. Se seleccionaron cinco características de riesgo para el modelo de predicción: insuficiencia respiratoria hipoxémica, edad  $\geq 50$  años, afectación pulmonar bilateral,  $\geq 1$  comorbilidad (infección por VIH, diabetes mellitus, insuficiencia hepática o cirrosis, insuficiencia cardíaca congestiva y enfermedad respiratoria crónica), y hemoglobina  $< 12$  g/dL. Esta herramienta permite estratificar a los pacientes con riesgo de mortalidad de bajo a alto según la calificación obtenida (46). Este sistema de puntuación aún no ha sido evaluado en una cohorte prospectiva, aunque algunos datos provienen de pacientes ambulatorios, algunas variables requieren del uso de exámenes especializados, lo cual dificulta su aplicación de forma generalizada. También, Valade y colegas (47) propusieron un sistema de puntuación pronóstico para pacientes con APTB admitidos en la unidad de cuidados intensivos (UCI). Tres factores independientes fueron predictivos de mortalidad con un AUC de 0,92: Tuberculosis pulmonar miliar, ventilación mecánica y requerimiento de vasopresores(47). Posteriormente se propuso un sistema de puntuación mediante la identificación retrospectiva de cuatro predictores de mortalidad (coinfección por VIH con un recuento de células CD4  $< 200/\mu\text{L}$ , un nivel elevado de creatinina; una radiografía de tórax que muestra infiltrados parenquimatosos difusos/patrón miliar; y ausencia de tratamiento antituberculoso al ingreso) en una cohorte de 83 pacientes que ingresaron a la UCI. Una puntuación  $\geq 3$  se asoció con una mortalidad significativamente mayor que una puntuación  $< 3$  (OR 7,29; IC del 95 %: 2,64 - 20,18;  $p < 0,01$ ) (48). Recientemente en un hospital de tercer nivel en Ciudad del Cabo fue validado un sistema de puntuación de 4 variables (choque séptico, cualquier inmunosupresión, lesión renal aguda y una radiografía de tórax que demostró infiltración difusa del parénquima), en una cohorte prospectiva de 78 pacientes con APTB hospitalizados en la UCI. Este sistema de puntuación identificó a los pacientes con mayor riesgo de muerte (48) . Sin duda,

estas herramientas son valiosas en la práctica médica de cuidado crítico, sin embargo, la aplicación de estas es para estadios avanzados de la enfermedad con el objetivo de identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de muerte, aunque, creemos que antes de la muerte hay otros desenlaces que se deben evitar, dado que tienen gran repercusión en la vida de los pacientes con APTB, estos serán discutidos en la próxima sección.

## **1.2 Disfunción pulmonar post-tratamiento**

El tratamiento de la APTB sensible a los medicamentos es muy eficaz (9), la mayoría de las personas que desarrollan TB pueden curarse, según el reciente reporte global de la OMS para el año 2021 la tasa de éxito de las personas tratadas por TB fue del 86 % (2). En Colombia según un informe preliminar del año 2021 el 75 % de casos nuevos fue tratado de forma exitosa (3). La cobertura del tratamiento de la TB es uno de los indicadores prioritarios para monitorear el progreso en la implementación de la Estrategia Fin de la TB, con una meta recomendada de al menos 90% para 2025 a más tardar (9). Sin embargo, hasta la mitad de los sobrevivientes de TB tienen alguna forma de disfunción pulmonar persistente a pesar de la cura microbiológica prueba de un tratamiento exitoso (49–51). La disfunción pulmonar, con presencia de anomalías menores hasta disnea grave, puede aumentar el riesgo de muerte por causas respiratorias (52–55). Después de un largo tratamiento y tras padecer los efectos sistémicos y locales de la TB, los pacientes curados contribuyen sustancialmente a la creciente carga mundial de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (56,57).

El deterioro pulmonar después de la TB se puede presentar en dos formas que no son excluyentes: la primera implica obstrucción del flujo de aire y la segunda defectos ventilatorios restrictivos, ambas alteran el intercambio gaseoso (58,59). Los síntomas asociados con la obstrucción del flujo de aire incluyen disnea, reducción de la capacidad de ejercicio y bronquitis crónica (60). La forma de cuantificar la magnitud de la obstrucción de las vías respiratorias es midiendo el Volumen Espiratorio Forzado en 1 segundo ( $FEV_1$ ) (61). Los mecanismos patológicos que se presentan durante la TB y están implicados en la disminución del  $FEV_1$  son: la presencia de cavitación pulmonar debido a que esta puede obliterar o distorsionar las vías respiratorias, lo que conduce a la obstrucción del flujo de aire (59). También, la propagación broncogénica es un sello

distintivo de la TB, que consiste en liberación del material caseoso durante la desintegración cavitaria, con el posterior paso a través de las paredes bronquiales (62). Además, la bronquiectasia también se asocia con la obstrucción del flujo de aire (63), esta se caracteriza por ensanchamiento permanente de las vías respiratorias, debido a la destrucción de los componentes elásticos y musculares de las paredes bronquiales, detectada con más frecuencia en pacientes con cavitaciones en comparación de los que no tenían (59). Los pacientes con bronquiectasias presentan episodios recurrentes de producción de esputo purulento, hemoptisis y tienen un riesgo mayor de presentar neumonías bacterianas (64).

Por otra parte, los pacientes que sufren de flujo de aire restringido, presentan síntomas como dolor en el pecho, tos y dificultad para respirar (65,66). En estos pacientes la restricción se define como una disminución de la Capacidad Vital Forzada (CVF) y/o un aumento de la relación  $FEV_1/CVF$  (61). Los cambios estructurales en el pulmón son resultado de la remodelación aberrante del tejido pulmonar, como distorsión bronco-vascular, bandas fibróticas y engrosamiento pleural, los cuales pueden explicar la restricción del flujo de aire (58,67).

Además de las pruebas de función pulmonar evaluadas por medio de espirometría, se ha seguido la evolución las lesiones pulmonares durante el tratamiento utilizando la Tomografía por Emisión de Positrones con 18F-fluorodeoxiglucosa (FDG-PET), una técnica que combina imágenes anatómicas con imágenes de la actividad metabólica de las lesiones (68). En un estudio que incluyó 96 pacientes sudafricanos con APTB (69), se realizó un seguimiento de los cambios en las imágenes de PET y la Tomografía Computarizada (PET-CT) al inicio, durante y después del tratamiento con antibióticos. Todos los pacientes tenían la prueba de imagen de pulmón el 1 y el 6 mes de tratamiento. Al comparar las imágenes del 6 mes con el 1 mes de tratamiento, identificaron 3 patrones distintos de respuesta: 1) Resuelto, 2) Mejorado y 3) Mixto. El primero se refiere a una captación de FDG mínima o nula en comparación con el tejido sano circundante. Las imágenes mejoradas mostraron una disminución de la intensidad de todas las lesiones en comparación con la exploración inicial, pero tenían una o más lesiones con mayor captación en comparación con las estructuras de referencia. Las respuestas mixtas mostraron al menos una nueva lesión ávida de FDG o al menos una lesión con mayor captación de FDG (intensificada) en comparación con la exploración inicial. De interés, solo el 14% de los pacientes tenían un patrón resuelto en la prueba del 6 mes, el 52% presentó una respuesta mejorada y una respuesta mixta se observó en el 34 % de

los pacientes. Cincuenta pacientes fueron evaluados 1 año después de finalizar el tratamiento, solo el 32 % de los pacientes tenían imágenes que se resolvieron por completo. El 68% restante tenían lesión(es) residual(es) significativa(s), la mitad de las cuales tenía una mejoría de todas las lesiones y el otro 34 % una respuesta de lesión mixta en comparación con la exploración del 6 mes (69). Como se mencionó previamente, aparte de la disfunción pulmonar crónica que padece gran parte de los pacientes con TB después de ser curados; incluso un año después de haber finalizado el tratamiento antituberculoso, algunos pacientes curados persisten con focos activos de inflamación en el parénquima pulmonar, reflejo de la actividad metabólica evidenciada por la captación de FDG. Estos hechos revelan la necesidad de biomarcadores que permitan identificar pacientes con APTB candidatos a terapias dirigidas al huésped debido al alto riesgo de presentar un daño pulmonar extenso y persistente. Además, se requieren biomarcadores que determinen de forma fiable no solo cuando los antibióticos han inducido la curación esterilizante de la micobacteria, sino también el restablecimiento de la respuesta inmune del huésped.

La remodelación pulmonar que se presenta en la TB (cavitación, fibrosis y arquitectura distorsionada) es la causa principal de discapacidad pulmonar (70). La formación de granulomas protectores puede desregularse, lo que da como resultado una respuesta inflamatoria desfavorable, necrosis licuefactiva, un daño tisular extenso subsiguiente y cicatrización patológica (70,71). Una mejor comprensión de los mecanismos y las vías inmunológicas que conducen a la remodelación pulmonar aberrante en TB podrían conducir a estrategias para la identificación de pacientes que la presentaran, además, ayudará en el descubrimiento de nuevos objetivos inmunoterapéuticos, así como la identificación de medicamentos aprobados que pueden reutilizarse para mejorar el tratamiento y el control de la TB (70,71).

A continuación, mencionaremos aspectos relacionados con medidas clínicas, paraclínicas y moleculares que determinan la gravedad de la APTB en el paciente.

## **1.3 Clasificación de gravedad por medio de medidas clínicas y paraclínicas**

### **1.3.1. Escalas clínicas**

Se han desarrollados puntuaciones clínicas para el seguimiento de los pacientes con TB, una de esta es el TB-score, la cual utiliza signos y síntomas, como tos, hemoptisis, disnea, dolor torácico, sudoración nocturna, anemia, taquicardia, hallazgos en la auscultación pulmonar, fiebre, índice de masa corporal (IMC) bajo, perímetro braquial bajo, con una asignación de un punto por la presencia de cada síntoma o signo, dando a los pacientes un TB-score de 0 a 13 (Figura 1). El TB-score, se basa en el percentil 33 y 66, el cual agrupa a los pacientes en 3 clases de gravedad (sc):SC-I, una puntuación de TB-score de 0-5; SC-II, un TB-score de 6-7; y SC-III cuando el TB-score fue mayor o igual a 8 puntos. Fue validado con datos de una cohorte de 698 pacientes con APTB pertenecientes a un estudio epidemiológico en Guinea Bissau en 1996- 2001 (44), la predicción de mortalidad evaluada al inicio y al final del tratamiento fue más fuerte para los pacientes con un TB-score  $>8$  y la puntuación de TB baja o la caída en la puntuación de TB al finalizar el tratamiento se pueden usar como una medida de mejora. Por lo cual el TB-score es una herramienta simple y de bajo costo para el seguimiento clínico de pacientes con TB (44).

**Figura 1.** Parámetros utilizados para el Bandim TB-score

Parameters	Points assigned
Self-reported	
Cough	1
Haemoptysis	1
Dyspnoea	1
Chest pain	1
Night sweating	1
Anaemic conjunctivae	1
Tachycardia	1
Positive finding at lung auscultation	1
Axillary temperature >37.0°C	1
BMI* <18	1
BMI <16	1
MUAC* <220	1
MUAC <200	1

\*BMI: Body Mass Index; MUAC: Middle Upper Arm Circumference.

*Nota.* \*IMC, índice de masa corporal; \*MUAC, circunferencia del brazo medio superior.

La hemoptisis es una manifestación de la APTB, se ha asociado con secuelas (bronquiectasias y cavidades pulmonares) de TB causadas por la destrucción y remodelación estructural del parénquima pulmonar y su vasculatura. En un estudio prospectivo de casos y controles, la hemoptisis se presentó entre los pacientes con APTB recurrente dos veces más en comparación con pacientes con TB de reciente diagnóstico (72). Lo cual sugiere que la presencia de la hemoptisis puede estar en el contexto de un paciente con APTB de mayor gravedad. El IMC y el MUAC ambos reflejan el estado nutricional. El primero refleja la composición corporal total, el MUAC es un indicador de la reserva muscular. Se ha evidenciado en pacientes con APTB que el IMC disminuye incluso en el periodo prodrómico de la enfermedad, la disminución del MUAC es un signo de mayor emaciación debido a la progresión de la enfermedad. Por lo cual, el IMC aumenta más rápidamente durante el tratamiento en comparación con MUAC, siendo más sensible al cambio. Dado que el TB-score es un predictor de respuesta al tratamiento antituberculoso y de mortalidad, el IMC y el MUAC ambos son signos determinantes en este puntaje porque son marcadores de enfermedad más avanzada (73).



Cinco años posterior al TB-score propuesto en el 2008, fue necesario un sistema de puntuación más simple dada la variación entre observadores y que los trabajadores de salud que en los países de Guinea-Bissau y en Etiopía donde fue validado no están capacitados en auscultación pulmonar. Por lo cual se propuso un TB-score II, el cual fue validado en pacientes con APTB, se analizaron datos de 1070 guineanos (Bissau, Guinea-Bissau, 2003-2012) y 432 etíopes (Gondar, Etiopía, 2007-2012). Los pacientes de Gondar eran pacientes ambulatorios, mientras que el grupo de pacientes de Bissau estaba formado por pacientes hospitalizados y ambulatorios. El TB-score II al igual que su predecesor utiliza signos y síntomas, como tos, disnea, dolor torácico, anemia, IMC  $< 18 \text{ kg/m}^2$ , IMC  $< 16 \text{ kg/m}^2$ , medición de la circunferencia del brazo superior (MUAC)  $< 220 \text{ mm}$  y MUAC  $< 200 \text{ mm}$ , dejando fuera 5 variables del sistema de puntuación original: sudores nocturnos, auscultación pulmonar positiva, pulso, temperatura y hemoptisis; estos se descartaron por baja concordancia inter-observador. Cuando se compararon ambas puntuaciones el TB-score se desempeñó ligeramente mejor que el TB-score II, ambos respondieron al efecto del tratamiento y predijeron el fracaso en ambos entornos. La concordancia entre observadores del TB-score II fue mayor en comparación con el TB-score, y menos elementos simplifican la evaluación del TB-score II en entornos con limitación de personal médico (73,74).

El TB-score también se ha comparado con la escala o índice de Karnofsky (KPS), una herramienta subjetiva que califica el desempeño del paciente del 0% al 100% y expresa el estado general de salud y la calidad de vida de un paciente, se evidenció que el TB-score tuvo una menor variabilidad entre observadores, debido a esto se constituye en una herramienta adecuada y reproducible para clasificar la gravedad de los pacientes con APTB (75).

Recientemente por medio del uso del TB-score se examinó si la variación genética humana como la de MTBC interactúan y afectan los resultados de la enfermedad. Se identificó la interacción entre un SNP en *PPIAP2* (pseudogen 2 de peptidilprolil isomerasa A) y el linaje de Uganda, proporcionando evidencia de que las interacciones huésped-patógeno afectan la presentación clínica, explicando los patrones de gravedad de la enfermedad (76).

### 1.3.2 Radiografía de tórax y otras imágenes diagnósticas

En Colombia según la resolución número 227 de 2020, la presunción de TB se basa en las manifestaciones clínicas y en los estudios radiológicos, el diagnóstico centrado en estos dos aspectos es aceptable, cuando se han agotado los esfuerzos para realizar la confirmación bacteriológica y no hay diagnóstico alternativo más probable (77).

La Radiografía de tórax (CXR) es un examen diagnóstico sencillo, de fácil acceso y que permite identificar rápidamente anomalías pulmonares. Históricamente, la CXR ha sido una de las principales herramientas para detectar la APTB. CXR tiene una alta sensibilidad para la APTB (sensibilidad 98%- especificidad 75%), por lo cual es una herramienta eficaz de diagnóstico. Sin embargo, la CXR tiene baja especificidad, evidenciándose muchas anomalías compatibles con APTB en otras patologías pulmonares. En consecuencia, la OMS recomienda la confirmación bacteriológica (78).

Dentro de las principales limitaciones del uso de la radiografía de tórax se encuentran: produce representaciones bidimensionales de una estructura tridimensional, hay variabilidad intra-lector e inter-lector, los pacientes están expuestos a radiaciones ionizantes, se necesita equipo especial, se requiere personal capacitado para operar la máquina e interpretar los resultados, suele haber un acceso limitado en las zonas rurales. En cuanto a las ventajas se incluyen: menores costos operativos, calidad de imagen mejorada y más reproducible con capacidad de ampliación, una dosis de radiación reducida, sistemas portátiles mejorados que pueden utilizarse para unidades móviles, esfuerzos para armonizar la interpretación y la presentación de informes, el potencial de las herramientas objetivas para la interpretación de imágenes digitales, como la detección asistida por computadora y la posibilidad de transmitir imágenes electrónicamente como para telemedicina (79).

Una CXR normal tiene un alto valor predictivo negativo para la presencia de TB activa. Por otra parte, la evidencia de hallazgos radiográficos característicos sumado a un cuadro clínico sugestivo puede ser suficiente para el diagnóstico de TB. Los siguientes son los hallazgos de imagen que sugieren TB activa (80):

- **Consolidación:** Consiste en un aumento de la atenuación pulmonar que borra los vasos y las paredes de la vía aérea (81), en APTB por lo general se ubica en los vértices pulmonares o en los segmentos superiores de los lóbulos inferiores. La presencia de consolidación no es específica de la etiología de la infección; sin embargo, la consolidación con agrandamiento del nódulo linfático hiliar/paratraqueal ipsilateral es fuertemente sugestiva de TB, igualmente las consolidaciones lobulillares, mientras que otras infecciones bacterianas son más probables de presentarse con consolidación segmentaria.
- **Cavidad de paredes gruesas:** Se produce cuando el material caseoso licuefaccionado es expulsado desde el centro de la lesión hacia el interior del árbol bronquial (82). Se observan con frecuencia en pacientes con TB activa pos-primaria, es una manifestación rara de la TB primaria. Las cavidades, consolidaciones y nódulos en los campos pulmonares superiores sugieren TB activa en varios modelos de predicción.
- **Cavidad con niveles hidroaéreos:** Se ha documentado que los niveles hidroaéreos en cavidades tuberculosas son un indicador de coinfección bacteriana o fúngica. En conjunto las cavidades, consolidaciones y nódulos en los campos pulmonares superiores sugieren TB activa en varios modelos de predicción (83–85).
- **Nódulos acinares/centrolobulillares:** Las opacidades nodulares del espacio aéreo esponjosas mal definidas (5-10 mm) son indicadores de enfermedad activa en las radiografías de tórax.
- **Nódulos agrupados:** Pueden producirse grandes opacidades nodulares (1-4 cm). Estos pueden aparecer como parches o masas nodulares en la CXR. En una distribución peribronquial, son un indicador de enfermedad activa.
- **Derrame pleural o empiema:** El derrame libre unilateral y el empiema sugieren enfermedad activa, mientras que el engrosamiento pleural aislado con o sin calcificación indica TB curada.

Existen otras modalidades de imágenes como: la TC del tórax, la ecografía, la resonancia magnética (RM) y la FDG-PET. La ecografía es muy útil para la detección, caracterización, guía del drenaje y seguimiento del derrame pleural; la TC de tórax permite el diagnóstico diferencial de

lesiones parenquimatosas, la evaluación de los ganglios linfáticos mediastínicos (LN), la evaluación de la actividad de la enfermedad y la evaluación de las complicaciones; la RM se utiliza para evaluar mejor los ganglios mediastínicos, incluso siendo superior a la TC sin contraste. Debido a que no contiene radiación ionizante, la RM se puede emplear para el seguimiento de la enfermedad de los ganglios mediastínicos en pacientes jóvenes y la evaluación del parénquima pulmonar en pacientes embarazadas. La FDG-PET puede guiar la biopsia de los sitios activos, evaluar la extensión completa de la enfermedad y detectar afectación distante oculta. Sin embargo, el uso de PET-CT está limitado debido a las altas exposiciones a la radiación (80).

Debido a la necesidad de establecer una clasificación de gravedad radiológica en pacientes con APTB, se ha intentado validar un sistema de puntuación numérica de los hallazgos en la CXR que clasifique la gravedad de la enfermedad y prediga la respuesta al tratamiento en adultos con APTB. Este sistema de puntuación consiste en la proporción estimada de pulmón afectado y la suma de 40 puntos si hay cavitación. El punto de corte óptimo para el sistema de puntuación de CXR ponderada fue 71, este valor predijo el estado de frotis de esputo positivo a los 2 meses de tratamiento con una sensibilidad de un 80%, este sistema de puntuación también se asoció con un índice de masa corporal bajo, un FEV<sub>1</sub> menor del 60%, una hemoglobina menor de 10 g/dL. Además, en dos cohortes de pacientes independientes las puntuaciones de CXR disminuyeron con el tiempo. En conclusión, se pudo validar un método simple para clasificar la gravedad de la CXR en adultos con APTB con baciloscopia positiva que predice la gravedad clínica y microbiológica inicial y la respuesta al tratamiento (86). En otro estudio este mismo puntaje denominado “Timika score”, se asoció significativamente con una mayor duración de los síntomas, puntuaciones clínicas más altas (TB-score I, II y KPS), un IMC más bajo en el momento del diagnóstico de PTB y el 65,2 % de los pacientes con un sistema de puntuación de CXR > 71 tenían una carga bacilar mayor en la baciloscopia antes del tratamiento. En ambos estudios la evaluación en conjunto de la extensión del pulmón afectado y la presencia de cavitación fueron superiores para la clasificación adecuada de la gravedad que cuando fueron evaluados de forma independiente (87).

### 1.3.3. Pruebas microbiológicas

La prueba estándar de oro para el diagnóstico de TB es el aislamiento de *Mtb* en medio de cultivo líquido, permitiendo identificar entre 10 a 100 bacilos/mm<sup>3</sup> en una muestra de esputo, con una sensibilidad entre el 90-96%, con un tiempo de detección entre 2 a 3 semanas. Hay tres plataformas comerciales aprobadas por la FDA para el cultivo semiautomático de micobacterias en caldo: el sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Microbiology Systems), el sistema VersaTREK (Trek Diagnostic Systems) y MB/BacT Alert 3D (Biomérieux) (88). A los cultivos positivos se le realizan pruebas de sensibilidad fenotípica para detectar si los medicamentos antituberculosos afectan o no el crecimiento de *Mtb*. También pruebas de sensibilidad genotípica en las cuales a través de métodos moleculares se detecta ADN de *Mtb* y se identifican mutaciones que le confieren resistencia a medicamentos antituberculosos (77).

En el caso de APTB el examen microbiológico se realiza a partir del esputo. Si la persona no expectora se puede realizar una inducción del esputo o una broncoscopia para tomar muestras bronquiales y alveolares. La evaluación microscópica de frotis con tinción ha sido el método que por más de 100 años se ha utilizado para el diagnóstico de TB, dado la detección rápida y económica de la micobacteria. La OMS recomienda la eliminación global de la microscopía óptica y de la tinción Ziehl Neelsen a favor de la tinción AFB fluorescente y la implementación de microscopía LED, aumentando la sensibilidad de la prueba. El resultado de la baciloscopia se da en cruces. Cuando se aprecian menos de 10 bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en 100 campos se reporta el número de bacilos, si son entre 10 y 99 BAAR en 100 campos se reporta grado 1+, si son entre 1 y 10 BAAR por campo se reporta grado 2+ y para más de 10 BAAR por campo se reporta grado 3+ (89).

La carga bacilar más alta se ha asociado con TB resistente a los medicamentos (DR-TB), mayor extensión del compromiso pulmonar, presencia de cavitaciones, un riesgo relativo más alto de transmisión, una tasa de conversión de frotis más baja al final de la fase intensiva de tratamiento. Lo cual puede sugerir una enfermedad más grave, sin embargo no existe una correlación clara (87,90,91), eventualmente podría servir como un indicador que dirija el tratamiento en etapas tempranas de la enfermedad (92).

## 1.4 Respuesta inmune en TB y papel de las citoquinas

El patrón de eventos que se presentan en la infección por *Mtb* se ha establecido a través de modelos animales, así como observaciones de TB humana (93,94). Los bacilos infecciosos se inhalan como núcleos de gotitas que se han exhalado a la atmósfera por un individuo enfermo con TB (95); generalmente se cree que las bacterias son fagocitadas principalmente por macrófagos alveolares, que luego invaden la capa epitelial subyacente (96), se ha descrito por medio del estudio de la respuesta transcriptómica *ex vivo* de macrófagos alveolares de personas con APTB (AMTB), el dominio de vías de señalización de IFN y genes regulados al alza *CHI3L1*, *CCL5*, *CCL22*, *CCL8*, *CXCL9*, *MMP9*, *MMP7* y *MMP12*, asociados con una respuesta pro-inflamatoria robusta, reclutamiento celular y daño tisular, y genes de la familia de las ciclinas (*CCND1*, *CCND2* y *CCNA1*) asociados con la proliferación celular (97,98). Esto induce una respuesta inflamatoria localizada que conduce al reclutamiento de células mononucleares de los vasos sanguíneos vecinos, las cuales ayudan a controlar la infección, pero alternativamente, proveen de nuevos nichos de persistencia y replicación bacilar. Estas células constituyen los componentes básicos del granuloma, que es la característica patológica definitoria de la APTB (99). Con el desarrollo de una respuesta inmune adquirida y la llegada de linfocitos, el granuloma adquiere una estructura estratificada más organizada (96). El centro rico en macrófagos infectados queda rodeado por un manto de linfocitos, macrófagos no infectados y monocitos reclutados que pueden estar encerrados dentro de un manguito fibroso que marca la periferia de la estructura (100).

En el modelo murino, la aparición de linfocitos específicos de *Mtb* aproximadamente 2 a 3 semanas después de la infección marca el final de la fase de replicación bacteriana rápida y el inicio de un estado de "contención" (101). En estas etapas "tardías", la porción caseosa del granuloma la cual podría estar relacionada con el aumento del número de macrófagos ricos en lípidos (espumosos), se vuelve hipóxica (102), condición que puede inducir un estado de persistencia no replicativa en *Mtb*. La histología de tejidos infectados de pacientes inmunocompetentes con TB activa revela granulomas en todos los estados de desarrollo desde la contención hasta la enfermedad activa, lo que implica que el destino de cada granuloma se determina localmente, no sistémicamente (100). Los granulomas activos exhiben una patología extensa y, en última instancia, el granuloma se rompe y derrama miles de bacilos infecciosos viables en las vías

respiratorias (103), lo que da como resultado el desarrollo de una tos productiva que facilita la propagación de bacilos infecciosos en forma de aerosol.

El paradigma establecido posiciona al granuloma caseificante como la lesión característica de la TB (71). El granuloma contiene las micobacterias, evitando su propagación, pero al mismo tiempo sirve como sitio de replicación y persistencia para *Mtb* (72). Recientemente Gideon y colegas dilucidaron el mecanismo celular a través del cual los granulomas pulmonares de paciente con TB controlan la *Mtb* o, alternativamente, sobrevive y se multiplica (102). Para esto utilizaron el modelo de granulomas pulmonares de Macacos *Cynomolgus* mediante el registro conjunto de PET-CT, secuenciación de ARN unicelular (scRNA-seq) y medidas de eliminación bacteriana por medio del recuento de la carga bacteriana de granulomas. Encontraron que la persistencia bacteriana se produjo en granulomas enriquecidos por mastocitos, células endoteliales, fibroblastos y células plasmáticas, dirigidas localmente por la inmunidad de tipo 2 (Th2) y vías de cicatrización de daño tisular que buscan mantener la funcionalidad esencial de los tejidos a expensas de crear un nicho para la persistencia bacteriana. El correlato celular más fuerte del control bacteriano se caracterizó por ecosistemas celulares enriquecidos con células T ayudadoras de tipo 1 (Th1), tipo 17 (Th17), y de respuestas citotóxicas, en el contexto de una respuesta inmunitaria adaptativa (104). A continuación, se revisan algunos mecanismos inmunológicos relacionados con el daño pulmonar en la APTB.

La necrosis caseosa ocurre cuando las células dentro del granuloma sufren necrosis, junto con la destrucción de la matriz extracelular (MEC) (24). La destrucción tisular ocurre como resultado de la necrosis caseosa, en el prototipo clásico (24). Sin embargo, alternativamente se plantea que la destrucción del colágeno precede a la caseificación y, por lo tanto, la destrucción de la MEC es el evento patológico inicial (105).

La MEC está compuesta principalmente de colágeno tipo I y elastina. El colágeno tipo III y IV son componentes importantes de la pared alveolar y la membrana basal (106). La MEC conforma el tejido conjuntivo intersticial, que forma el parénquima del pulmón, proporciona un andamiaje estructural, y la membrana basal, que separa el epitelio alveolar del estroma circundante (106). La diseminación de micobacterias desde el parénquima pulmonar hacia las vías respiratorias, así como la formación de cavidades, requiere la destrucción de la MEC a través de la escisión de fibrillas pequeñas y fibras grandes (106). El material necrótico rico en lípidos en los granulomas

no tiene la actividad enzimática para degradar el colágeno y, en consecuencia, su acumulación es solo un componente de la formación de cavidades; solo las metaloproteinasas de matriz (MMP) son capaces de degradar completamente la MEC (106). A propósito, se han encontrado mayores concentraciones de MMP en cavidades de TB en conejos (107) y en humanos (108).

Hay 23 MMP en humanos. Pueden ser secretadas por una variedad de células, incluidas las macrófagos/monocitos, neutrófilos y células epiteliales pulmonares (109). No se almacenan y requieren la transcripción de genes inmediatamente antes de la secreción; las excepciones son MMP-8 y MMP-9 almacenadas en neutrófilos (109). La expresión de MMP aumenta con la prostaglandina PGE<sub>2</sub> y varias citoquinas (incluidas IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) (110,111); las condiciones hipóxicas, presentes en las lesiones de TB, también aumentan la expresión y secreción de MMP-1 (112).

Los niveles elevados de MMP se correlacionan con el daño pulmonar: los niveles de MMP-1, MMP-2 y MMP-8 en esputo se elevaron en pacientes con cavitaciones y se correlacionaron positivamente con la extensión de los infiltrados en la radiografía de tórax (CXR) (113,114). También los niveles de MMP-3, MMP-7 y MMP-8 en líquido bronco-alveolar, y las concentraciones séricas de MMP-1, MMP-8 y MMP-9, se correlacionaron con anomalías más extensas de CXR en pacientes con TB de varios países diferentes (115–118). Estos hallazgos sugieren un papel central para las MMP y la degradación de la matriz extracelular en el desarrollo del daño pulmonar en la TB.

Observaciones recientes en pacientes humanos con TB indican que la entrada de neutrófilos en la etapa tardía de la enfermedad también puede contribuir al daño tisular y la diseminación de bacterias infecciosas en las vías respiratorias (119). Los neutrófilos son el tipo más abundante de glóbulos blancos y desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria a los patógenos bacterianos (120). En la TB la actividad protectora de los neutrófilos se observa durante la formación de granulomas donde las micobacterias liberadas de los macrófagos necróticos infectados son destruidas por los neutrófilos a través de mecanismos dependientes de la NADPH oxidasa (121). Varios mediadores solubles (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-17, PGE<sub>2</sub>, leucotrieno B4 (LTB4) y factor estimulante de colonias de granulocitos) promueven el reclutamiento de neutrófilos (122). Se ha demostrado que la neutrofilia se asocia con un mayor riesgo de formación de cavidades y daño del tejido pulmonar (123), también con la mortalidad en pacientes que reciben tratamiento



para la TB (124). Una de esas funciones fagocíticas es el estallido respiratorio, que es la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por los neutrófilos durante la fagocitosis (125). Se ha informado que las ROS producidas por los neutrófilos durante el estallido oxidativo impulsan la necrosis inducida por *Mtb*; que a su vez promueve el crecimiento de *Mtb* (126). La liberación de componentes celulares, que forman una matriz de fibrillas extracelulares llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET), es uno de los mecanismos de repuesta inflamatoria contra *Mtb* (127). Un estudio ha reveló altos niveles de histona 3 citrulinada, un marcador NET común, en muestras de suero de pacientes con tuberculosis y daño pulmonar extenso (123). Además, una investigación reveló que la reducción del reclutamiento de neutrófilos en el tejido infectado promueve la resolución de la inflamación (128). Teniendo en cuenta lo anterior es probable que los pacientes con TB que expresan una forma específica de respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos durante la enfermedad sean más susceptibles de desarrollar daño pulmonar residual (129).

Por otra parte, el equilibrio entre los eicosanoides PGE<sub>2</sub> y LXA<sub>4</sub> influye en el mecanismo de muerte de los macrófagos (130). La apoptosis de macrófagos conduce a una respuesta inmune temprana con mejor control de la infección y mínima inmunopatología, mientras que la necrosis de macrófagos conduce a una respuesta inmune retardada, control inadecuado de la infección y daño pulmonar (131). Cepas virulentas de *Mtb* promueven la producción de LXA<sub>4</sub>, estimulando así la necrosis y la propagación de micobacterias (130).

Dos citoquinas importantes para coordinar la formación de granulomas protectores son el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (132). La ausencia de TNF- $\alpha$  conduce a una respuesta inflamatoria no regulada y al crecimiento bacteriano descontrolado, mientras que se ha demostrado que el exceso de TNF- $\alpha$  compromete la función pulmonar (133). El TNF- $\alpha$  se asocia con fiebre y emaciación (134,135) y se correlaciona con la actividad de la enfermedad y la inmunopatología (136,137). La respuesta Th2 puede exacerbar el daño tisular al potenciar el efecto patológico del TNF- $\alpha$  (138). En ratones infectados con *Mtb*, la susceptibilidad a los efectos tóxicos del TNF- $\alpha$  inyectado en las almohadillas de las patas coincidió temporalmente con la aparición de citoquinas Th2 en los pulmones (138). También se ha descrito en el modelo murino, una ausencia de toxicidad mediada por TNF- $\alpha$  después del desafío con TNF- $\alpha$  en ausencia de IL-4 (139). Esto datos en murinos sugieren que bajo

la influencia de citoquinas Th2 superpuestas, el TNF- $\alpha$  es tóxico en lesiones mediadas predominantemente por Th1.

En humanos se ha evidenciado por medio del análisis de lavado bronco-alveolar, la presencia de subconjuntos de linfocitos Th2 productores de IL-4 en aquellos con TB cavitaria (140) y la presencia de un perfil de citoquinas Th1 en aquellos con enfermedad no cavitaria (137). También la expresión de IL-4 en linfocitos de sangre periférica se correlaciona con la enfermedad cavitaria (141). Es interesante que las cepas particularmente virulentas de Beijing de *Mtb* hagan que los monocitos humanos expresen IL-4 e IL-13. Por lo anterior se podría sugerir que *Mtb* ha desarrollado componentes que utilizan las respuestas protectoras del huésped que dañan los tejidos al impulsar una respuesta Th2 y necrosis.

La expresión del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) se ha estudiado ampliamente como un importante modulador inmunitario en la TB activa (142). Es un importante factor de crecimiento de fibroblastos y es fundamental para estimular las proteínas de la matriz extracelular necesarias para reparar el tejido dañado por la infección por *Mtb* (143). Se ha evidenciado en pacientes con TB activa altos niveles de TGF- $\beta$  que están directamente asociados con etapas graves de la enfermedad (144). El TGF- $\beta$  puede contribuir a la desregulación del recambio de la MEC en la TB (70). Se sabe que el TGF- $\beta$  puede perpetuar la fibrogénesis al inhibir la apoptosis de los fibroblastos (145) y mediar la producción localizada de inhibidores de TIMP (146).

#### **1.4.1. Niveles de citoquinas y moléculas asociadas con inflamación en suero de pacientes con TB y asociación con gravedad**

Las citoquinas actúan como mensajeros que ayudan a integrar los componentes del sistema inmunitario durante el combate contra los patógenos invasores (147). Las funciones de las citoquinas durante el proceso de la APTB son complejas, heterogéneas y están influenciadas por diferentes variables del huésped (148,149). Aunque la TB es una enfermedad localizada principalmente en el pulmón (150), la mayoría de estudios de personas con APTB se han centrado en los niveles de citoquinas en suero que se pueden obtener fácilmente a partir de muestras de

sangre (151–153). A continuación, se presenta una descripción sucinta de los analitos incluidos en nuestro estudio y su relación con la severidad de la APTB.

### **1.4.2. Familia IL-1 (IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33)**

La familia de citoquinas interleucina IL-1, comprende once miembros. A continuación, mencionaremos tres de estos (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33) (154).

La señalización de esta familia de citoquinas se da a través de 11 complejos de moléculas receptoras pertenecientes a la familia de receptores de IL-1 (IL-1R). Se pueden dividir en el complejo receptor de IL-1 (IL-1R1 e IL-1R3), el complejo receptor de IL-33 (IL-1R4 e IL-1R3) y el complejo receptor IL-18 (IL-1R5 e IL-1R7) (154).

Anteriormente la IL-1 se había asociado exclusivamente con la inflamación y la inmunidad innata, sin embargo, se ha evidenciado que el papel que desempeña es más amplio. La diferenciación y polarización de las células mieloides y las células linfoides innatas o adaptativas está impulsada por IL-1, IL-33 e IL-18 (155).

La IL-1 $\beta$  no se expresa constitutivamente, y junto a la IL-18 requiere de la activación del inflamósoma y la caspasa-1 para la escisión del precursor para procesar y liberar la citoquina activa. Se ha probado que IL-1 $\beta$  impulsa una reprogramación epigenética en monocitos, similar a la adquirida por monocitos entrenados por  $\beta$ -glucano y bacillus Calmette-Guerin (BCG) (156,157). La IL-1 $\beta$  se produce durante la infección con *Mtb* por monocitos, macrófagos inflamatorios, células dendríticas (DC) inflamatorias, y neutrófilos (158,159). Los ratones con deficiencia de IL-1 $\beta$  son más susceptibles a la infección por *Mtb* y muestran una mayor carga bacteriana en el pulmón en comparación con los ratones que carecen de las citoquinas individuales (158,160,161).

Los niveles séricos de IL-1 $\beta$  disminuyen después del tratamiento antituberculoso en comparación con el tiempo antes del tratamiento (162). En pacientes con APTB se ha encontrado una correlación negativa entre los niveles elevados de IL-1 $\beta$  y el IMC, además, se correlacionó con la severidad radiológica de la enfermedad (163).

La IL-1 $\beta$  se induce durante la infección y es producida principalmente por monocitos, neutrófilos, macrófagos, y células dendríticas. La IL-18 es un potente inductor de respuestas de tipo 1 en linfocitos innatos y adaptativos. Se expresa constitutivamente en el citosol como un precursor y es activada junto a la IL-1 $\beta$  como se mencionó previamente, para que esto suceda se requiere la estimulación bacteriana, la estimulación por neutrófilos o por IL-4 o IFN- $\gamma$  (137 - 139). La actividad de IL-18 resulta de la co-localización del receptor alfa de IL-18 (IL-18R $\alpha$ ) y el receptor beta de IL-18 (IL-18R $\beta$ ) en las células huésped, incluidos los monocitos y las células epiteliales. Esta citoquina es esencial para la producción de IFN- $\gamma$  a partir de células T (164–168). En ratones deficientes en IL-18 infectados con *Mtb*, se observa una mayor frecuencia de células T en el parénquima pulmonar, a pesar de esto, cuando se cuantifica la producción total de IFN- $\gamma$  proveniente de células T, se encuentra disminuida, este hecho sugiere que la IL-18 podría contribuir a la inducción óptima de IFN- $\gamma$  durante la TB. En contravía del papel de inducción de respuesta Th1, los ratones deficientes para IL-18 no son susceptibles a la infección por *Mtb* y su papel decisivo podría ser el de regular la acumulación de fagocitos en el pulmón. Cuantificado en pacientes con TB, se ha evidenciado niveles elevados de IL-18 en pacientes con TB moderadamente avanzada y muy avanzada en comparación con sujetos de control antes del tratamiento, los casos de mayor severidad eran sujetos con TB miliar y linfadenitis cervical tuberculosa (169).

La interleucina 33 (IL-33) es una citoquina de la superfamilia IL-1 (170); actúa intracelularmente como factor nuclear y extracelularmente como citoquina. Se expresa en una variedad de células, incluidas las células epiteliales alveolares, las células endoteliales, los fibroblastos y las células eosinofílicas (171,172). Recientemente se describió que la IL-33 podría amplificar la respuesta inmunitaria de células auxiliares de tipo 2 (Th2) y estaba involucrada en la inflamación alérgica y el asma (170,173,174), por esta razón, se inferiría que tuviera un papel limitado en la defensa del huésped en contra de *Mtb*. Al respecto, se encontró que los ratones infectados con *Mtb* deficientes en la cadena de señalización del IL-33R, no se distinguían de los animales de control de tipo salvaje (WT) en sus cargas bacterianas e histopatología pulmonar (175), sin embargo, en un metaanálisis que incluyó 639 pacientes de 6 estudios, cuando se detecta la IL-33 sola en el derrame pleural puede servir como un biomarcador para diferenciar entre Tuberculosis pleural (TPE) y derrame pleural maligno (164). Cuando se le mide junto a la adenosina desaminasa

(ADA), se ha correlacionado con el nivel del derrame pleural y mejora la eficiencia del diagnóstico de TPE (165,166). No se ha descrito la relación de IL-33 y la gravedad de la APTB.

### **1.4.3. Los interferones tipo I (IFN- $\alpha$ 2 e IFN- $\beta$ )**

Los IFN tipo I representan el grupo más grande de interferones descritos hace más de medio siglo (167). IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  son los que mejor han sido descritos. Ambos se acoplan a un receptor común heterodimérico expresado de forma ubicua compuesto por cadenas IFNAR1 e IFNAR2 en la superficie celular, que luego activan los dímeros de las tirosina quinasas JAK1 y la tirosina quinasa (TYK) (168). Finalmente se da la activación del factor génico estimulado por IFN (ISG) que luego se transloca en el núcleo para unirse con los elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) en los promotores de los genes regulados por IFN $\alpha/\beta$  (168,176).

No se pensó que los IFN de tipo I desempeñaran un papel importante en la infección por *Mtb*, sin embargo, por medio del uso de cepas con mayor virulencia, como la cepa HN878 de W-Beijing, se develó un papel importante para el IFN de tipo I (177,178). La patogénesis de la cepa HN878 se asocia con una reducción dependiente de IFN $\alpha/\beta$  en la actividad de las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (178,179). La aplicación intranasal de IFN $\alpha/\beta$  en ratones, evidenció un aumento de la carga bacteriana y una reducción de la supervivencia en contraste con los ratones tratados con IFN de tipo II (178). Se ha postulado que durante la infección crónica por *Mtb*, se acumulan células dendríticas plasmocitoides en el pulmón proporcionando una fuente excesiva de IFN tipo I que luego inhibe la acumulación de células T CD4 + y CD8 + en el sitio de la infección (179). Por medio de estudios transcripcionales de sangre periférica de pacientes con APTB se evidenció una firma de IFN tipo I que se asocia predominantemente con los neutrófilos (180).

Por otra parte, se conoce mediante el análisis de ratones que carecen de receptores de IFN tipo I o tipo II, que en ausencia de señalización de IFN tipo I no se produce el reclutamiento inicial de fagocitos al pulmón y la inmunidad es comprometida (181), pero, también se ha descrito que con niveles elevados de IFN $\alpha/\beta$  durante la infección por *Mtb* (182), se induce el reclutamiento de un fenotipo de células int CD11b + GR1 que son fagocitos permisivos que no puede activarse eficazmente (182). También alta concentración de IFN tipo I puede limitar el estado de activación

de los fagocitos infectados y potencialmente limitar la acumulación y función de las células T requeridas para regular la estructura mononuclear del granuloma (182). El IFN tipo I asimismo induce la producción por parte de macrófagos de IL-10, que inhibe a su vez la producción de IL-12 y TNF- $\alpha$  secretada por el macrófago. Es importante destacar que el IFN tipo I también es capaz de bloquear la activación de los macrófagos por parte de las células Th1 al alterar la capacidad de respuesta al IFN- $\gamma$  (24).

#### 1.4.4. IFN- $\gamma$

El interferón tipo II (IFN- $\gamma$ ) es una de las citoquinas más relevantes en la respuesta inmune contra *Mtb* debido a que se requiere para la fagocitosis y posterior destrucción de la misma (24). Aunque estructuralmente está relacionado con los interferones de tipo I IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ , estas citoquinas usan diferentes receptores y tienen ubicaciones cromosómicas distintas (183). El IFN- $\gamma$  es producido principalmente por las células T CD4+ y CD8+ activadas, en menor medida, por las células T  $\gamma\delta$ , las células NKTs y las células NK (47). El IFN- $\gamma$  se une al receptor de IFN $\gamma$  (IFNGR) que se compone de dos cadenas de IFNGR1 que se unen a ligandos y que se asocian con dos cadenas de IFNGR2 que transducen señales (183).

La unión de IFN- $\gamma$ -IFNGR induce la señalización dentro de la célula principalmente a través de las vías Janus quinasa/transductores de señales y activadores de la transcripción (JAK-STAT) y da como resultado cambios tanto en la capacidad migratoria como funcional de múltiples tipos de células, como macrófagos, células NK y T (184).

La producción innata de IFN- $\gamma$  por los fagocitos estimulados a través de sus receptores de reconocimiento de patrones permite el establecimiento de respuestas proinflamatorias tempranas a la infección, a pesar de ello, no es suficiente para la contención del bacilo (185,186). Posteriormente la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos activados con un perfil Th1 estimula la activación de macrófagos, lo cual es la función clásica del IFN- $\gamma$ , esto permite la inducción de mecanismos efectores (la producción de radicales como las especies reactivas del oxígeno), aumentan la actividad citotóxica de otras células, regulan la expresión de MHC de clase I y II proteínas y presentación de antígenos (48). También el IFN- $\gamma$  puede actuar sobre células distintas a los macrófagos (187); en realidad, su función más crítica en la TB puede ser limitar la inflamación

polimorfonuclear (PMN) (187). La mayoría de las cepas de ratones susceptibles exhiben una alta infiltración de PMN en los pulmones una vez infectados y la inhibición de esta infiltración mejora la supervivencia (187,188). El IFN- $\gamma$  es regulado por citoquinas como la IL-12 e IL-18 (189).

Deficiencias en el IFN- $\gamma$  está asociado en humanos a las enfermedades MSMD (190). La producción de IFN- $\gamma$  es una herramienta diagnóstica (IGRAs) más específica que los antiguos test de tuberculina para el diagnóstico de infección latente de TB (191). Se ha mostrado que aquellos individuos infectados con *Mtb* que producen mayores cantidades de IFN- $\gamma$ , tienen una mayor probabilidad de progresar a la enfermedad activa (192).

Cuando se comparan las concentraciones plasmáticas de IFN- $\gamma$  en pacientes con APTB activa se encuentran significativamente elevadas comparada con sujetos sanos, por otra parte las concentraciones eran más altas si los pacientes presentaban una enfermedad más grave clasificada por el grado de extensión pulmonar (193). Después del tratamiento antituberculoso se observa como los niveles de IFN- $\gamma$  regresan a valores normales (194,195).

### **1.4.5. TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  es el miembro principal de la familia de factores de necrosis tumoral y a su vez es el más importante de esta familia para la defensa contra las infecciones intracelulares. Esta citoquina es producida predominantemente por macrófagos en respuesta a estímulos que se activan a través de receptores tipo Toll (TLRs) y también puede ser expresado por células T, B, y NK activadas. Es producido en 2 formas, una de ellas en forma de proteína transmembrana y otra en forma soluble, aunque ambas formas actúan al unirse a los receptores TNFRp55 y TNFRp75 (196).

Durante la respuesta inmune en contra de *Mtb*, el TNF- $\alpha$  está involucrado en la diferenciación de las células T que secretan citoquinas Th1, la formación de granulomas tuberculosos con activación de macrófagos fagocíticos y células epitelioides, matando micobacterias en cooperación con IFN- $\gamma$ , estimulación de la apoptosis de macrófagos que contienen micobacterias, estimulación de la producción de quimioquinas y expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (CD54), lo que conduce a la acumulación de células en focos inflamatorios (197–199). Es interesante, como *Mtb* a través de cepas virulentas induce menor

cantidad de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-12) y mayor cantidad de IL-10 que las cepas de *Mtb* menos virulentas, este hallazgo fue reiterativo en un estudio de cohorte de pacientes con APTB, con un aislado clínico colombiano denominado UT205 (200,201). La acción del TNF- $\alpha$  es regulada por el interferón tipo I y la IL-10, y se ha visto que algunas cepas hipervirulentas de *Mtb* inhiben la respuesta de los macrófagos activados tras la inducción de altos niveles de IFN de tipo I (24).

Parte del conocimiento previamente mencionado se ha establecido a través del uso de ratones endogámicos con deleciones genéticas en el gen que codifica (202,203) el TNF- $\alpha$  (197), los cuales muestran como el TNF- $\alpha$  es crítico para controlar la infección por *Mtb* en el ratón. Estos hallazgos fueron confirmados en pacientes con enfermedades autoinmunes que recibían terapia neutralizante con anti-TNF- $\alpha$  (infliximab, adalimumab y etanercept), en los cuales se observaba una reactivación de la TB latente (136,196,204).

El TNF- $\alpha$  se ha propuesto como un biomarcador para distinguir entre la TB activa y la latente (205). Los niveles séricos de TNF- $\alpha$  disminuyen después del tratamiento, lo cual se ha descrito en sujetos con una terapia exitosa. Por lo tanto, se propone como un biomarcador de la eficacia del tratamiento de la TB (206,207). En otro estudio se evidenció una asociación importante con el grado de patología en la TB así como con la extensión de la enfermedad, además con las cargas bacterianas (195).

#### **1.4.6. MCP-1**

La proteína quimio atrayente de monocitos -1 (MCP-1) /ligando de quimiocina CC-2 (CCL2) pertenece a la familia CC que tiene cisteínas unidas estrechamente al extremo N-terminal. Es parte de la familia de quimiocinas que son secretadas por las células del sistema inmunitario, para la regulación del movimiento de otras células en respuesta a un estímulo químico (quimiotaxis), y de ahí su nombre como quimiocinas. Hay siete receptores de quimiocinas acoplados a proteína G transmembrana. El MCP-1 puede unirse a varios receptores, pero su efecto biológico es más fuerte al unirse a la región extracelular de CCR2 (208).



Las fuentes principales de MCP-1 son las células epiteliales, las células endoteliales, las células del músculo liso, los monocitos/macrófagos, los fibroblastos, los astrocitos y las células microgliales. Dirigen la migración y la infiltración de monocitos, microglía, linfocitos T de memoria en el lugar de la lesión y la infección en diversos trastornos. El papel de MCP-1 se ha implicado en la patogénesis de varias enfermedades en las que contribuye a través de numerosos mecanismos (208).

En comparación con sujetos de control, el líquido de lavado bronco-alveolar de pacientes con APTB contenía niveles elevados de MCP-1, además de RANTES e IL-8, lo que indica que múltiples quimioquinas pueden participar en el reclutamiento de células para la formación de granulomas en la TB (209). Recientemente se ha descrito la utilidad diagnóstica para identificar pacientes con TB activa de pacientes con TB latente utilizando los valores séricos de esta quimioquina (210). En cuanto a la respuesta al tratamiento, en las etapas agudas de la enfermedad se evidencian niveles sistémicos inicialmente bajos de MCP-1, los cuales se incrementan durante el tratamiento antituberculoso a los niveles observados en sujetos sanos, lo que puede sugerir cierta restauración de la función inmune del huésped después de la reducción de la carga bacteriana inducida por la quimioterapia (211,212). Sin embargo, los estudios también han demostrado que los niveles elevados de MCP-1 se asocian con un mayor riesgo de resultados desfavorables como falla del tratamiento, recurrencia de la enfermedad o muerte (213). Además, se ha sugerido que MCP-1 es un marcador útil de la gravedad de la TB (214). Cuando se administra de manera exógena demostró el efecto profiláctico tanto *in vitro* como en un modelo murino, provocando la generación de anión superóxido a través de la restauración de la señalización de proteína quinasa C (PKC) alterada en macrófagos tratados con Man-LAM, así como ratones C57BL/6 infectados con H37Rv. También se observó que MCP-1 indujo una reducción significativa del número de bacilos tuberculosos viables en los pulmones y el bazo de los ratones infectados. Todo esto sugiere fuertemente la efectividad de MCP-1 como una potente herramienta inmuno-profiláctica para controlar el establecimiento de micobacterias dentro del huésped (215).

### 1.4.7. IL-6

La IL-6 es una citoquina importante en la TB, sin embargo, en el contexto de la respuesta inmune frente a *Mtb*, su papel puede ser contradictorio, lo cual refleja la característica pleiotrópica y multifuncional de esta citoquina (216). Durante la TB experimental se ha implicado con la inmunidad innata y adaptativa; además, media en las respuestas efectoras proinflamatorias e inmunosupresoras (217–219). Estas funciones parecen depender de las condiciones experimentales, como la vía y dosis de infección. Se conoce que de forma fisiológica, después de un proceso infeccioso, en enfermedades sistémicas o en respuestas inflamatorias sistémicas, la IL-6 se produce en células de origen linfoide y no linfoide, de las cuales las más importantes son los monocitos y macrófagos (220). No obstante, no se ha investigado a cabalidad las fuentes celulares de IL-6 en ratones infectados con *Mtb* ni en pacientes con TB (221).

Se ha descrito la inducción de producción diferencial de IL-6 por linajes de *Mtb*, para esto en un estudio se seleccionaron 26 aislados clínicos representativos de la diversidad global de MTBC humano, y se midió la producción de citoquinas inflamatorias por macrófagos humanos derivados de monocitos en sobrenadantes de cultivos; se evidenció que el grupo de cepas de linajes modernos indujo consistentemente una respuesta de IL-6 más baja en comparación con linajes más antiguos de *Mtb* (222). Más recientemente se ha descrito que en comparación con los linajes antiguos 1 y 5, las cepas de MTBC pertenecientes al linaje moderno 4 muestran una mayor tasa de replicación, asociada a una producción significativa de citoquinas pro inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) e inducción de un proceso de autofagia funcional (223). Sin embargo, como se planteó anteriormente es complejo el entendimiento del papel que desempeña esta citoquina, porque se ha demostrado que en macrófagos infectados con aislamientos de alta virulencia (linaje de Asia oriental/Beijing) produjeron concentraciones más bajas de TNF- $\alpha$  e IL-6 en comparación con los infectados con aislados de baja virulencia (200).

En humanos, se ha evidenciado una mayor concentración de niveles séricos de IL-6 en pacientes con APTB en comparación con sujetos sanos (224). En pacientes con TB cavitaria, una forma grave de la enfermedad pulmonar, se evidenció una concentración reducida de IL-6 en el lavado bronco-alveolar en comparación con los pacientes con TB sin cavitaciones. Lo cual sugiere que la IL-6 es un biomarcador potencial contra la destrucción de tejido durante la TB severa (225).

Cuando la cuantificación se realiza en plasma se evidencia un incremento de las concentraciones conforme aumenta la severidad de la enfermedad. Con respecto a la respuesta al tratamiento antituberculoso, se ha evidenciado descenso en las concentraciones plasmáticas de IL-6 (211).

#### **1.4.8. IL-8**

La interleucina-8 (IL-8, CXCL8) es una citoquinas de la familia de las quimioquinas, de naturaleza pro-inflamatoria, se expresa en múltiples tipos de células, incluidas las células epiteliales alveolares, los monocitos, los macrófagos y los fibroblastos tras la infección por *Mtb in vitro* (226); sus ligandos son CXCR1/2 los cuales se expresan más considerablemente en neutrófilos de pacientes con TB, ambos también se pueden expresar en células NK, células T y monocitos (227,228). Además de ser un factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de moléculas de adhesión, la formación de lípidos bioactivos, amplifica la inflamación local, y estimula la angiogénesis (206).

Después de la infección *in vivo* por *Mtb*, los granulomas pulmonares que contienen fibroblastos también son capaces de secretar CXCL8 (226), además, está presente en niveles altos en los sitios de reacción cutánea positiva a la tuberculina y se asocia con niveles altos de neutrófilos en este sitio (229). Los niveles séricos de CXCL8 de pacientes con APTB disminuyen después del tratamiento antibiótico, sugiriendo que CXCL8 podría ser un marcador de la eficacia del tratamiento, este resultado no fue consistente en otro estudio en el cual no hubo cambios significativos en los niveles séricos de IL-8 con relación al tratamiento (230,231). Referente a la severidad de la TB se ha reportado que los niveles séricos de esta citoquina se correlacionan significativamente con la carga micobacteriana, el grado de consolidación radiográfica, puntuaciones elevadas en el TB score y la duración de la fiebre y la hospitalización. Además, es un predictor independiente del desarrollo de insuficiencia respiratoria. También se observaron asociaciones con resultados adversos de ingreso/muerte en la UCI (232).

### 1.4.9. IL-10

La interleucina-10 (IL-10) es una citoquina reguladora multifuncional de las respuestas inflamatorias. La IL-10 actúa como un inhibidor general de las respuestas proliferativas de las células T auxiliares Th1 y Th2 (233). Es producida por la mayoría, de los subconjuntos de células T CD4+, incluidas las células Th1, Th2 y Th17, las células B, los neutrófilos, los macrófagos, algunos subconjuntos de DC y en el contexto de las enfermedades infecciosas, también las células T reguladoras (Treg) son una fuente importante de IL-10 (234). La inducción de la producción de IL-10 se da por las vías de señalización de TLR/MyD88, en respuesta al reconocimiento de patógenos y se ha relacionado con la fuerza relativa de la activación de las quinasas 1 y 2 relacionadas con señales extracelulares (ERK1/2) (235).

La IL-10 ejerce sus funciones a través de un complejo receptor que consta de dos subunidades: IL10R1, inducida en células hematopoyéticas estimuladas, e IL10R2, expresada constitutivamente en la mayoría de las células y tejidos (233). Estas subunidades receptoras transducen señales a través de la vía Janus quinasa (Jak)-STAT a través de Jak1 y tirosina quinasa 2 (Tyk2), culminando en la activación de STAT3, STAT1, y STAT5 (234).

La IL-10 regula la inflamación a través de la supresión de la producción de citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-12 producidas por macrófagos alveolares y DC pulmonares activadas. Una vez fagocitado por macrófagos, el bacilo *Mtb* sobrevive y persiste mediante la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma (236–238). La producción de IL-10 después de la fagocitosis puede ocurrir como una respuesta antimicrobiana natural del huésped, o puede ser inducida por el bacilo como un mecanismo de evasión. La IL-10 bloquea la maduración del fagosoma mediante un mecanismo dependiente de STAT3, que facilita la supervivencia y el crecimiento de *Mtb* (239). Por medio de la inhibición del IFN- $\gamma$  se bloquea uno de los mecanismos claves para la eliminación de *Mtb*, dado que es requerido para la activación de macrófagos y posterior incremento de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (240,241). También bloquea la presentación de antígenos a través de la regulación a la baja de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (233). Otros efectos de la regulación de la inflamación se ejercen al inhibir la acción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (242). Todo lo anterior conduce a la progresión de la enfermedad, esto se ha comprobado en modelos animales en donde

durante las infecciones micobacterianas por *Mycobacterium avium* y BCG en ratones II10 –/– exhiben una mayor protección sin mostrar signos de patología aberrante mediada por el huésped (243,244).

Cuando se miden los niveles séricos de IL-10 en pacientes con APTB al inicio de la enfermedad se encuentran más elevados en estos en comparación con controles (163). Aunque hay evidencia contradictoria (231,245) con respecto al comportamiento de esta citoquina al finalizar la terapia antibiótica, la evidencia más reciente e iterativa apuntan hacia la hablan disminución de las concentraciones séricas después de 6 meses de tratamiento (163,194,246,247). Además, se ha relacionado los niveles séricos de IL-10 con cargas altas de *Mtb* (3 cruces en el esputo) (163); también con la gravedad clínica de la TB sobre la base de los resultados de la radiografía de tórax (246).

#### **1.4.10. IL-17A**

Las células Th17 producen IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 como sus citoquinas características (248–250). El receptor de IL-17 (IL-17RA) se expresa en DCs y macrófagos, linfocitos, células epiteliales, queratinocitos y fibroblastos. Además la IL-17, se encuentra de forma ubicua en diferentes órganos, incluidos los pulmones, el hígado y el bazo (251). La IL-17 induce el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), quimiocinas CXC: CXCL1, CXCL2, CXCL5 y CXCL8 en células epiteliales humanas y proteínas antimicrobianas como defensinas, además la IL-17 induce la granulopoyesis, y el reclutamiento de neutrófilos (252).

Luego de la migración de las DC a los ganglios linfáticos de drenaje, se inducen células T productoras de IFN- $\gamma$  e IL-17. Para el desarrollo de las células Th17 se requiere de la presencia de IL-6 o IL-21 en presencia de bajas cantidades de TGF- $\beta$ ; la IL-1 $\beta$  también pueden actuar como cofactor para la diferenciación Th17 (253–255). Posteriormente se requiere la señalización de IL-23 para estabilizar el fenotipo Th17 y para mantener la expresión de IL-17 en el compartimiento pulmonar (256).

Promover el reclutamiento y la supervivencia de neutrófilos es probablemente uno de los mecanismos por los cuales el eje IL-23/Th17 se asocia con la formación temprana de granulomas,

sin embargo, esta respuesta necesita regulación ya que la acumulación de grandes cantidades de neutrófilos en el pulmón generalmente se asocia con un mal pronóstico y aumento de la patología pulmonar (257). Se ha demostrado con solidez que otro miembro de la familia de IL-12, la IL-27 antagoniza la respuesta Th17 (258). La IL-10 es otra citoquina que también involucrada en la inhibición de la IL-17, la cual es a su vez inducida por parte de la IL-27. Ambas citoquinas contrarreguladoras previene una inmunopatología extensa al mantener bajo control las respuestas celulares (259).

En un estudio de cohorte de pacientes con APTB se reportó que los niveles séricos de IL-17A se encuentran significativamente elevados en estos pacientes en comparación con individuos sanos y sujetos con TB latente, además es un marcador de gravedad dado que se relaciona con un compromiso pulmonar bilateral, presencia de cavitaciones y mayor carga bacteriana. También puede ser útil como un marcador del tiempo de conversión del cultivo y de eficacia del tratamiento dado que después de 6 meses de este, los niveles séricos disminuyen significativamente (195).

#### **1.4.11. Familia de interleucina IL-12 (IL-12p70 e IL-23)**

La familia de la interleucina IL-12 está representada por cuatro miembros heterodiméricos: IL-12p70, IL-23, IL-27 e IL-35. Estas citoquinas tienen suficiente homología en la estructura de las subunidades y la interacción con los receptores, pero juegan un papel diferente en la generación y mantenimiento de las reacciones de la inmunidad adquirida (242).

La IL-12p70 (IL-12p40 unida covalentemente con la subunidad IL-12p35), se producen predominantemente y funcionan en varios compartimentos inmunológicos (IL-12p40 e IL-12p35 en focos de inflamación e IL-12p70 en ganglios linfáticos) al unirse a receptores apropiados (IL-12R $\beta$ 1 y/o IL-12R $\beta$ 2 o el IL-23R) (256).

La inducción de respuestas protectoras de células T de IFN- $\gamma$  contra la infección primaria por *Mtb* depende de la IL-12 (p40/p35) (198,202), que es secretada principalmente por las DCs activadas (177), en parte a través de mecanismos dependientes de TLRs (260). La IL-12 no solo es esencial para la activación inicial de las respuestas de células T de IFN- $\gamma$  a *Mtb*, sino que también se requiere la producción continua de IL-12p70 para las respuestas Th1 expandidas y sostenidas de

IFN- $\gamma$  en los pulmones que se requieren para mantener control de la infección crónica (260). Se ha evidenciado en modelos murinos de la subunidad p40 eran más susceptibles a la infección por *Mtb* que los ratones deficientes en p35 (IL-12a $^{-/-}$ ) (261). Más recientemente, se descubrió que se requería IL-12p40 para la migración de DC y el cebado de células T durante la infección por *Mtb* (262).

La IL-23p19 se une a IL-12p40 para formar IL-23 funcional, y IL-23p19 se expresa temprano durante la infección por *Mtb* (263). En ausencia de IL-12p70, IL-23 podría compensar la generación de células productoras de IFN- $\gamma$  durante la infección por *Mtb* (264), aunque esta respuesta compensatoria es insuficiente para controlar la infección (261,264). En consecuencia, aunque la IL-23 puede compensar parcialmente la deficiencia de IL-12p70 para estimular una respuesta Th1, esta citoquina no es esencial para controlar la infección por micobacterias (256).

Cuando se cuantifican las concentraciones plasmáticas de IL-12p70 en cohortes de pacientes con APTB se evidencian cifras elevadas con respecto a sujetos sanos, después de 6 meses de tratamiento con antibióticos se evidencia un incremento significativo de las mismas (231).

Con respecto a los niveles séricos de IL-23 en pacientes con APTB se han descrito significativamente más bajos en comparación con controles, en este mismo estudio encontraron al hacer un análisis por estratificación de gravedad de la enfermedad, que los pacientes con TB severa presentaban niveles séricos más bajos de IL-23 en comparación con pacientes con TB leve (265).

#### **1.4.12. Lipoxina A4 (LXA<sub>4</sub>)**

El ácido araquidónico es el precursor de un grupo de mediadores lipídicos comunes denominados eicosanoides, que incluyen prostanoides y lipoxinas (LX) (266).

Las cepas virulentas de *Mtb* induce la producción de LXA<sub>4</sub> por los macrófagos (267), debido las funciones pronecróticas de LXA<sub>4</sub> también incluyen la inhibición de la apoptosis inducida por lipopolisacárido/IFN- $\gamma$ , la inhibición de la liberación de mediadores pro-apoptóticos de las mitocondrias y la inhibición de la activación de la caspasa y la síntesis de especies reactivas del oxígeno (ROS) (268). Estos datos adicionales establecen a LXA<sub>4</sub> como un mediador importante de la necrosis.

Se ha reportado que en el momento de cuantificar niveles séricos de LXA<sub>4</sub> en pacientes con APTB muestran niveles más elevados de esta en comparación con sujetos sanos. Más aun, después de una antibioticoterapia exitosa la concentración plasmática se reduce significativamente, y se han evidenciado correlaciones positivas entre la LXA<sub>4</sub> y citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ . También se encontró una correlación directa de los niveles de LXA<sub>4</sub> con la carga bacteriana y con la extensión de la enfermedad evidenciado en la radiografía de tórax (269).

### 1.4.13. Quitotriosidasa (CHIT-1)

La enzima quitotriosidasa (CHIT-1, quitinasa-1 o EC: 3.2.1.14), perteneciente a la familia de las 18 glicosil-hidrolasas, fue la primera quitinasa activa descubierta en el plasma humano y muestra actividad de transglicosilación hacia la quitina (270). Esta enzima se secreta en 2 formas, una quitotriosidasa de 39 kD la cual se encuentra predominantemente en los tejidos y la forma de 50 kD que se encuentra secretada en el torrente sanguíneo. Esta última es la forma predominante de secreción, se acumula en los lisosomas de las células inmunológicamente activas, principalmente dentro de las que se incluyen macrófagos, monocitos, neutrófilos, células NK y otras células secretoras (271). Se ha informado que la producción de CHIT-1 es un marcador de enfermedades de depósito lisosomal como la enfermedad de Gaucher, Niemann-Pick A/B y C, cistinosis, entre otras (272–274); también se ha descrito como marcador de gravedad y pronóstico en enfermedades neurológicas como la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple (274–276). En las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la enfermedad arterial coronaria y el infarto se ha descrito de igual manera como marcador de gravedad y pronóstico (277–279). Con relación a las enfermedades relacionadas con los pulmones existe amplia evidencia que relaciona a CHIT-1 con enfermedades pulmonares intersticiales, enfermedades inflamatorias pulmonares y otras enfermedades pulmonares como el síndrome de apnea e hipo-apnea del sueño (SAHOS) y de forma especial aumenta en la inflamación relacionada con las células Th2 (ejemplo, asma bronquial, rinitis, inflamación inducida por alérgenos) (271,280). Por último, en las enfermedades infecciosas también se ha informado la utilidad como marcador pronóstico y de seguimiento terapéutico; dentro de estas las infecciones fúngicas sistémicas: *Candida albicans*, *Madurella mycetomatis* y *Cryptococcus neoformans*. También se ha



encontrado en la Malaria, la Filariasis y la TB (281–285). Todo esto indica que CHIT-1 está altamente regulado en condiciones inflamatorias agudas y/o crónicas.

El gen de la CHIT-1, se encuentra altamente conservado a lo largo de la evolución. Se ha reportado que este gen está regulado por componentes de transducción de señalización de proteína tirosina quinasa (PTK), fosfoinositido-3-quinasa (PI3K) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), lo que evidencia que existe un efecto acumulativo sobre la regulación de la expresión y la actividad de la CHIT-1 (286).

En cuanto a los efectos inmunológicos la CHIT-1 media en muchos procesos inflamatorios a través de la estimulación directa de diferentes mediadores inflamatorios como IL-8, MMP9, MCP-1, RANTES y eotaxina, aumentando así la capacidad migratoria de muchas células inmunológicas, incluidos los linfocitos T, los macrófagos y los eosinófilos (287,288). Evidencia derivada de cultivos de monocitos de sangre periférica reveló que la expresión de la enzima quitotriosidasa aumenta exponencialmente durante el proceso normal de maduración de monocitos a macrófagos y además se detectó que se expresa en ambas formas de polarización de macrófagos (M1 y M2) (289,290).

El conocimiento sobre la actividad de CHIT1 en la APTB es limitado. Sin embargo, se conoce que por medio del análisis de perfiles transcripcionales de micromatrices de genoma completo, en ARN aislado de macrófagos alveolares (AMs) de pacientes con APTB (AMsTB), exhibían un perfil de expresión génica de 51 genes, incluidos CHIT1 y CHI3L1 (chitinase-3like1), los cuales estaban altamente regulados, asociados con una fuerte respuesta pro-inflamatoria (98). También se sabe que los niveles en plasma están más incrementados en pacientes con APTB en comparación con controles, luego de 6 meses de tratamiento los niveles disminuyen cercano a la concentración de sujetos sanos y también se sabe que las concentraciones elevadas en plasma se correlacionan con la extensión radiológica de la enfermedad y un mayor grado de carga bacilar (285,291). Se considera que las quitinasas liberadas por macrófagos alveolares pueden contribuir a la destrucción del tejido pulmonar y potencialmente estar involucrada en la severidad de la TB activa.

En la tabla 1 y 2 se resume parte de la evidencia proveniente de pacientes con APTB sobre la asociación con severidad y el comportamiento de los diferentes analitos descritos en esta sección.

**Tabla 1.** Citoquinas y severidad clínica de la TB

Citoquina	Concentración sérica	Método de medición	año	Ref.
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	r <sub>s</sub> (IMC $\downarrow$ , E Rx,)	ELISA	2014	(163)
<b>IL-18</b>	$\uparrow$ leve, $\uparrow$ +moderada, $\uparrow$ ++severa	ELISA	2000	(169)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	$\uparrow$ leve, $\uparrow$ +moderada, $\uparrow$ ++severa	ELISA	2020	(193)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	$\uparrow$ CB, EB, C	Luminex	2019	(195)
<b>MCP-1</b>	$\downarrow$ leve, $\uparrow$ ++severa	ELISA	2009	(214)
<b>IL-6</b>	$\uparrow$ Ls avanzada, $\neq$ Ls moderada, leve	ELISA	1997	(224)
	$\uparrow$ C, $\downarrow$ no C	Luminex	2013	(225)
	$\uparrow$ leve, $\uparrow$ +moderada, $\uparrow$ ++severa	ELISA	2020	(193)
<b>IL-8</b>	r <sub>s</sub> ( $\uparrow$ CB, $\uparrow$ E Rx, $\uparrow$ TB score, F, H, IR)	CBA	2016	(232)
<b>IL-10</b>	r <sub>s</sub> (IMC $\downarrow$ )	ELISA	2014	(163)
<b>IL-17</b>	$\uparrow$ CB, EB, C	Luminex	2019	(195)
<b>IL-23</b>	$\downarrow$ severa	ELISA	2021	(265)
<b>LXA<sub>4</sub></b>	r <sub>s</sub> (CB, E Rx,)	ELISA	2019	(269)
<b>CHIT-1</b>	$\uparrow$ leve, $\uparrow$ +moderada, $\uparrow$ ++severa y $\uparrow$ CB	Método fluorométrico	2012	(291)

*Nota.* r<sub>s</sub>: correlación; IMC: índice de masa corporal; E Rx: extensión radiológica de la enfermedad pulmonar; leve, moderada, severa: severidad de la TB pulmonar; CB: carga bacilar; EB: enfermedad bilateral; C: presencia de cavitaciones en la radiografía pulmonar; no C: sin cavitaciones; Ls avanzada, modera, leve: lesiones pulmonares clasificadas por el compromiso del parénquima pulmonar; TB score: escala de clasificación de severidad clínica; F: fiebre; H: hospitalización; IR: insuficiencia respiratoria;  $\downarrow$ : bajo;  $\uparrow$ : alto; +: más;  $\neq$ : no hay diferencia.

**Tabla 2.** Citoquinas y respuesta inmune al tratamiento

<b>Citoquina</b>	<b>Concentración sérica</b>	<b>Método de medición</b>	<b>año</b>	<b>Ref.</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	↑PT, ↓S24	Luminex	2019	(162)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	↑PT, +↓S8, ++↓S16, ↓+++S24	ELISA	2020, 2005	(193,194 )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	↑PT, ↓S24	ELISA	2020	(207)
<b>MCP-1</b>	↓PT, ↑+S1, ↑++S5, ↑+S24	ELISA	2009	(292)
<b>IL-6</b>	↑PT, ↓S24	ELISA	2009	(292)
<b>IL-8</b>	↑PT, ↓S24	CBA	2009	(230)
<b>IL-10</b>	↓PT, ↑S1, ≠ S24	ELISA	2009	(292)
<b>IL-17</b>	↑PT, ↓S24	Luminex	2019	(195)
<b>IL-12p70</b>	↑PT, ↑++S24	CBA	2018	(231)
<b>IL-23</b>		ELISA	2021	(265)
<b>LXA<sub>4</sub></b>	↑PT, ↓S24	ELISA	2019	(269)
<b>CHIT-1</b>	↑PT, ↓S24	Método fluorométrico	2012	(291)

*Nota.* PT: pretratamiento; S1, S5, S8, S24: números de semanas desde el inicio de tratamiento; ↓: bajo; ↑: alto; +: más; ≠: no hay diferencia.

## 1.5 Polimorfismos en *Mtb* asociados a un fenotipo de TB más severa

Esta sección tiene como objetivo presentar la evidencia de varias fuentes que proponen la asociación de cepas de *Mtb* con la severidad de la enfermedad durante los últimos 20 años y no a un linaje específico. Para esto se presentará brevemente como se han clasificado las diferentes especies del MTBC.

El MTBC comprende varias especies y subespecies bacterianas que comparten una identidad de secuencia de ADN del 99,9 % (293,294), ahora conocemos que abarcan al menos 9 linajes (L1-L9), siendo L8 y L9 los últimos en ser descritos (295,296). Dentro de estos linajes algunos se han denominado *Mtb sensu stricto* (L1-4 y L7) responsables de la gran mayoría de casos de TB en humanos, otros como *Mycobacterium africanum* (L5-L6) en África occidental, (L8-L9) restringidas al este de África, generalmente son raras y al menos 9 ecotipos adaptados a animales como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium pinnipedii* o *Mycobacterium microti* entre otros. El único continente con todos los linajes del MTBC presentes es África, donde hace unos 70.000 años surgió un ancestro común y luego se expandió al resto del mundo como consecuencia del aumento de la densidad de población humana durante el período Neolítico (295,297-301).

Debido al modo de reproducción clonal, la baja tasa de mutación y la diversidad genética limitada, anteriormente se pensaba que los genomas de MTBC estaban altamente conservados, por lo cual la aparición de cualquier variante no tendría relevancia clínica (293,302,303). Además, las diferencias evidenciadas en la infección y el espectro clínico de la TB se han atribuido principalmente a factores ambientales y del huésped más que a la variación bacteriana (304). Se ha demostrado la participación de distintas fuerzas evolutivas en la generación de diversidad genética en MTBC, una posible explicación es la deriva genética en forma de cuellos de botella, también se destaca la selección positiva y negativa teniendo un papel más significativo en términos de virulencia; esta diversidad puede vincularse a cambios en la demografía humana y a migraciones humanas tanto antiguas como recientes (303,305,306). En consonancia con lo anterior, existe evidencia mayor a medio siglo que describe cepas de *Mtb* más virulentas que otras (307). En modelos de infección animal, se evidenció que las cepas de *Mtb* del sur de la India eran menos virulentas en el cobayo que las cepas del Reino Unido (35). Esto último fue consistente en ratones

y en conejos (308–310), sugiriendo que la variación en las cepas tiene importancia en los diferentes fenotipos de la enfermedad.

Un estudio que analizó 107 cepas de *Mtb*, el cual tenía como objetivo entender el alcance de la diversidad genética de MTBC y comprender las fuerzas evolutivas que dan forma a esta diversidad, identificaron 89 genes de especial interés como genes de reparación del ADN, genes involucrados en latencia y reactivación, entre otros (303). Adicionalmente, se estimó el papel de la selección purificadora en la evolución y diversidad genética de (MTBC) por medio del cálculo de la proporción de la tasa de cambios no sinónimos y sinónimos (dN/dS). De 370 SNP que se segregaron, la relación media dN/dS por pares para las cepas de MTBC fue de 0,57, lo cual es fundamentalmente mayor comparado con la mayoría de otras bacterias y es probable que sea resultado de una reducción de la restricción selectiva. Finalmente concluyeron que los miembros de MTBC adaptados a humanos son genéticamente más diversos de lo que generalmente se reconoce. También demostraron que gran parte de la diversidad genética tiene consecuencias funcionales en *Mtb* (303).

Por medio del secuenciamiento del genoma de *Mtb*, se evidenció la presencia de dos nuevas familias de genes denominados *pe* y *ppe* ricos en glicina y prolina (311,312). La función de las proteínas PE/PPE no se ha esclarecido completamente, pero los estudios plantean que se secretan o se asocian a la superficie celular y están involucradas en la virulencia bacteriana (313). Hay buena evidencia de que los genes *PE* son una fuente potencialmente rica de antígenos para una respuesta Th1, y varios de ellos han sido considerados para su probable inclusión en nuevas vacunas (312). Es interesante que los SNPs no sinónimos ocurren con mayor frecuencia en los genes *pe* y *ppe* en comparación con otras regiones, lo que sugiere gran plasticidad dentro del genoma y una mayor capacidad de adaptación (313).

Desde la designación por van Soolingen y colegas (314), “la familia Beijing” de cepas de *Mtb* se han asociado suficientemente con una serie de fenotipos clínicos, epidemiológicos y experimentales, con evidencia de una mayor capacidad de transmisión, presentaciones extra-pulmonares, alto riesgo de recaída, mayor tendencia para adquirir resistencia a los medicamentos, mayor carga bacteriana y compromiso histopatológico grave, dado por una mayor manifestación de cavitación pulmonar (315). Durante las últimas dos décadas, el sublinaje moderno de Beijing se ha extendido a lo largo de varias ubicaciones geográficas en el mundo (316). Se ha sugerido que la

acumulación de deleciones cromosómicas contribuye a una virulencia acrecentada en la familia de cepas Beijing (315,317).

Un estudio tenía como objetivo identificar los determinantes genéticos potenciales de la virulencia micobacteriana que eran comunes a la cepa H112 (una cepa hipervirulenta de *Mtb* aislada de un paciente VIH negativo con una progresión agresiva de la enfermedad de APTB a meningitis tuberculosa) y las cepas hipervirulentas de *Mtb* del mismo clado filogenético aisladas en otras regiones del mundo. Secuenciaron el genoma completo de la cepa H112 y H54 de baja virulencia, ambas pertenecían al mismo linaje y compararon los genomas para identificar mutaciones presentes en la cepa H112, pero ausentes en la cepa H54. Posteriormente, se llevó a cabo un extenso análisis filogenético incluyendo todos los genomas disponibles públicamente de *Mtb* y seleccionaron los SNPs y las variaciones estructurales (SV) comunes a las cepas hipervirulentas. Encontraron que tanto H112 como H54 se identificaron como miembros del mismo sublinaje L2.2.1. Identificaron un nuevo clado filogenético en el que se agruparon cuatro cepas hipervirulentas aisladas de regiones geográficamente diversas. Todas las cepas hipervirulentas del clado compartían 12 SNP y 5 SV con H112, incluidos a loci claves asociados a virulencia, un SNP perjudicial (*Rv0178* D150E) dentro del operón *mce1* y una deleción intergénica (*Rv0759c-Rv0760c*) en proximidad de *phoP* (318). En otro estudio se encontraron seis SNPs de factores de virulencia específicos de linaje, las mutaciones no sinónimas en las cepas del L2 (*sigG*, *pks5*, *pks7*) y las cepas del L4 (*mce-Ib*, *Fad26*, *virS*) que afectan la virulencia y la transmisión (319). Otra evidencia que tenía como objetivo dilucidar la relación entre genotipo y fenotipo, encontró 15 SNPs en factores de virulencia (*eccD3a* S76N, *eccD3* A95T, *mmpL10* T408A, *plcA* T446A, *mbtB* V674L, *ppsA* L1194R, más T2005P, *Rv2952* G176R, *kefB* T102A, *lipF* R233C, *papA2* P466L, *fadD23* E422Q, *espK* D44N, *espK* E660A, *eccC2* D650G), incluidos cinco SNPs en tres proteínas de secreción ESX, además genes relacionados con la invasión de células huésped, evasión de respuesta inmunitarias y proliferación bacteriana, todos en cepas de L2, ausentes en linajes 3,4,6 y 8, lo cual podría estar relacionado con su fenotipo más virulento (320). En este mismo estudio, al comparar los epítomos entre las cepas de (MTBC), se exhibió la pérdida de cuatro epítomos de células T (0579, 0591, 1737, 1829) en las cepas de Beijing, lo cual les confiere la capacidad de evasión del sistema inmunológico, conllevando una mayor virulencia (320). Por medio de otro abordaje experimental se encontró que las cepas de Beijing exhiben un perfil de lípidos inusitado, con acumulación de variantes estructurales de DIM y PGL, debido a la mutación puntual de

(*Rv2950 G526A*); este perfil de lípidos particular no impide la función estructural en la envoltura celular de *Mtb*, sin embargo, no tuvo impacto importante en la virulencia de las cepas de Beijing en el modelo murino (321).

En un estudio que analizó más de 5000 cepas que representan la diversidad global de MTBC, se determinó las fuerzas selectivas que han dado forma a la variabilidad en las regiones del genoma relevantes para la interacción huésped-patógeno, y se identificó en particular, los sistemas de dos componentes (2CS), sugiriendo un papel en la adaptación del huésped (306). Los datos establecieron signos sólidos de selección positiva en dos proteínas sensoras: KdpD y NarS. La acumulación de mutaciones no sinónimas en las proteínas sensoras puede representar una estrategia común utilizada por las micobacterias para adaptarse al entorno cambiante durante la infección (306).

Los 2CS consiste en una proteína histidina quinasa (HK) como sensor y un regulador de respuesta (RR) como efector, en donde los diferentes estímulos extracelulares permiten la fosfo-transferencia de la HK al RR y promueve la transcripción génica, generalmente a través de la unión al ADN (322,323).

El gen *kdpD* codifica el componente sensor de KdpDE, muestra un valor de pN/pS que alcanzó aproximadamente dos en algunos puntos durante la evolución de MTBC. Por medio de un modelo murino se observó, que los ratones infectados con cuatro mutantes (*devR*  $\Delta$ , *trcS*  $\Delta$ , *tcrXY*  $\Delta$  y *kdpDE*  $\Delta$ ) sucumbieron a la infección más rápidamente que los infectados con *Mtb* de tipo salvaje. Específicamente los ratones infectados con la cepa de *Mtb* mutante para KdpDE (2CS) presentó una supervivencia de 35 días comparado con 40,5 días, tiempo de supervivencia medio de la cepa de tipo salvaje (324).

A partir del secuenciamiento de un aislado clínico de un paciente con APTB en la ciudad de Medellín, Antioquia, denominado UT205 se evidenció una deleción de 13 pares de bases en el gen *rv2028c*, lo cual causa la codificación de un codón de parada prematuro, lo que implica la deleción de 407 aminoácidos y la pérdida del dominio histidina quinasa de la proteína KdpD, el cual contiene el sitio putativo de fosforilación de la proteína reguladora transcripcional *kdpE* (325).

El gen *phoR* codifica el componente sensor de PhoPR, y está descrito como un actor importante en la evolución de MTBC (326). PhoP está en el eje del bucle regulador PhoP-EspR-EspA. Hallazgos recientes han informado que PhoP regula la expresión de *whiB6* al interactuar con su región promotora (327). El gen *whiB6* está ubicado junto a la región ESX-1, la cual codifica el aparato secretor ESAT-6, el cual es un factor de virulencia, por lo cual PhoPR estaría regulando el fenotipo patógeno de *Mtb* (328).

Según la presencia o ausencia de una delección específica de *Mtb* (TbD1), las cepas del MTBC se pueden dividir en cepas “ancestrales” y “modernas”, y estas últimas representan cepas de *Mtb* epidémicas, como consecuencia de la expansión mundial de la epidemia de TB (329). En las cepas  $\Delta$ TbD1, el gen *mmpS6* se elimina y el gen *mmpL6* se trunca, en una investigación mediante la construcción y el uso de cepas de *Mtb* pertenecientes a diferentes linajes y sus correspondientes construcciones derivadas “knock-in” y “knock-out”, así como estudios de virulencia en conejillos de Indias, ratones y células. Se pudo atribuir a la pérdida de la región TbD1 con la capacidad de las cepas para tener un aumento en la resistencia al estrés oxidativo y condiciones hipóxicas, generando así una importante ventaja para la bacteria durante la interacción huésped-patógeno. Proporcionando una hipótesis atractiva para explicar, el predominio global de las cepas L2/L3/L4 *Mtb* (330).

En 2007, Lazzarini y colegas (331). Descubrieron un nuevo polimorfismo de secuencia larga (LSP) de 26,3 kb que provoca la pérdida y modificación de 10 genes, incluidos dos genes PPE (PPE55 y PPE56). Este LSP unifica una gran cantidad de cepas diversas, en un solo clado principal de la familia LAM, el genotipo se denominó RDRio, se asoció con APTB en Río de Janeiro, Brasil (331). En un estudio realizado en el estado de Minas Gerais, Brasil se analizaron 235 aislados clínicos de *Mtb* sensibles a medicamentos y MDR. Los pacientes con APTB fueron diagnosticados entre enero de 2007 y diciembre de 2011. El ADN extraído de estos aislados se analizó mediante PCR-RFLP para caracterizar *fbpC103/Ag85C103*, multiplex PCR para detectar RDRio y RD174, y MIRU-VNTR 24 loci adicionales. Entre los 63 aislamientos MDR, 41(65,1%) fueron RD Rio y 28 (44,4%) RD174. Los aislamientos de *Mtb* RDRio y RD174 se correlacionaron positivamente con la TB multirresistente MDR-TB (332). Anteriormente en diferentes regiones del mundo se describió que los aislamientos de LAM que tienen la delección RD174 también presentan la delección RDRio dado que se segregan conjuntamente (333–336). Sin embargo, tanto por



“spoligotyping” como por MIRU-VNTR 24 loci en una muestra de 218 aislados de pacientes con APTB diagnosticados entre enero de 2008 y diciembre de 2009 en Rio de Janeiro, Brasil. La frecuencia de RDRio y RD174 en las cepas LAM, fueron respectivamente 11 % y 15,4 %, lo que demuestra que RD174 no siempre es un marcador para las cepas LAM/RDRio (337).

En un estudio de cohorte realizado en Gambia, fueron reclutados 317 casos índices de pacientes con TB con frotis de esputo positivo en adultos y 2381 contactos domésticos reclutados entre 2002 y 2004. Se encontró que los contactos de un caso índice con el linaje dentro de *Mtb* sensu stricto definido por RD174, fueron los segundos con más probabilidades de progresar a una APTB activa (3,9 % en dos años, HR 4,4, IC del 95 % 1,4-14) (338). También en la ciudad de San Francisco, se evidenció que las cepas que poseen la delección RD174 tenían una tasa de casos secundaria elevada (338). Es importante mencionar que las cepas RDRio no solo se han asociado a mayor progresión a una enfermedad activa sino también con una mayor transmisión, resultados extraídos a partir del análisis de 3847 aislamientos de *Mtb* de los casos de APTB de la ciudad de Nueva York (2001–2005) (334).

Una interesante investigación que tenía como objetivo estudiar la relación entre la variación de los genes de virulencia en las regiones de diferencia (RD) de *Mtb* y la recaída de la TB, analizó los genomas completos de 155 cepas clínicas de *Mtb* de pacientes con TB en la prefectura de Kashgar, Xinjiang, recolectados durante el 2019 (339). Veinticuatro pacientes del total presentaban recaída de la enfermedad. Se construyó un árbol filogenético el cual estaba compuesto por 3 linajes: L2 representaba el 45,80 % (71/155), L3 representaba el 32,90 % (51/155) y L4 representaba el 21,30 % (33/155). L2 se correlacionó significativamente con la recaída (OR) = 3,505; p=0,011. Además, los resultados revelaron variaciones genéticas, entre ellas, 3 SNPs descritos por primera vez en los genes de virulencia de la región RD (*espK* T4357804G, *espK* C4359653T y *pIcC* C2627618A). Estos SNPs tenían una alta frecuencia de mutación en L2 y se asociaron significativamente con la recaída del paciente. EspK es una proteína asociada a la secreción de ESX-1 que se requiere para la virulencia, el crecimiento dentro de los macrófagos y la supresión de la respuesta inflamatoria e inmunitaria de los macrófagos (320,340). *pIcC* es uno de los tres genes que codifica la enzima fosfolipasa C y es posible que esta actividad le confiera a *Mtb* la capacidad de sobrevivir intracelularmente en macrófagos y, por lo tanto, de crecer y propagarse a otras células o tejidos (341–343). Por lo tanto, estos 3 SNPs recientemente descritos pudieron haber

cambiado la inmunogenicidad de la cepa L2 de *Mtb*, lo que dificulta que el sistema inmune humano la elimine (339).

En general, aunque (MTBC) carece de los factores de virulencia clásicos, es importante el análisis de la historia evolutiva del genoma, con la idea de poder identificar genes implicados en virulencia y polimorfismos que contribuyen a la patogenicidad y le confieran un fenotipo clínico más severo a ciertos clados.

## 2. Pregunta de investigación

A pesar de los esfuerzos en salud pública de los dos últimos siglos, se ha propuesto que centrarse solo en el tratamiento no eliminará la TB (344), porque seguimos obstaculizados por lagunas significativas en nuestro conocimiento de la biología de *Mtb* (100), se requiere mejor comprensión de la inmunopatología de la enfermedad (345), como se mencionó previamente esta se encuentra determinada por múltiples factores, por lo cual, se debe prestar atención a otros aspectos que impulsan la alta incidencia de TB, incluida la pobreza, el hacinamiento, la desnutrición, la transmisión continua y los sistemas de salud débiles (38). La investigación se ha ampliado entonces a otros aspectos como la virulencia de las cepas de *Mtb* causantes de la TB. Por medio de la secuenciación del genoma completo y tipificación molecular de *Mtb* se ha evidenciado una alta heterogeneidad entre las cepas, exhibiéndose algunas con mayor virulencia afectando directamente la efectividad del tratamiento para la TB (346–350). Se ha propuesto que ciertos clados particulares de *Mtb* tienen mayor éxito y distribución en algunas poblaciones humanas específicas (351,352).

Por otra parte, el biomarcador mejor estudiado para el éxito del tratamiento de la TB es la conversión a un cultivo de esputo negativo en el segundo mes de tratamiento (353,354). Sin embargo, tiene una pobre capacidad predictiva individual, con una sensibilidad de sólo del 40% (355). Para los clínicos, la decisión de acortar el tratamiento de la TB en función de la conversión de cultivos del segundo mes y de la ausencia de enfermedad cavitaria en la radiología de tórax por sí solo es insuficiente y da como resultado un mayor riesgo de recaída (356). Además, actualmente no se implementan el uso de biomarcadores que clasifiquen la severidad de la enfermedad dado que las secuelas posteriores al tratamiento antituberculoso podrían estar relacionadas con una enfermedad mas severa. Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos biomarcadores para la respuesta y el resultado del tratamiento de la TB. Es imprescindible evaluar combinaciones de marcadores predictivos inmunológicos, microbiológicos y clínicos. Todo lo anterior nos lleva a plantearnos la siguiente pregunta:

¿Existe una asociación entre el genotipo de cepas de *Mtb* aisladas de pacientes con APTB, con la severidad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, producción de citoquinas y

marcadores séricos de inflamación, en una población de pacientes del Área Metropolitana del Valle de Aburrá?

### **3. Hipótesis**

La APTB severa se asocia con cepas de *Mtb* que presentan polimorfismos específicos relacionados con virulencia y un perfil sérico alterado de citoquinas/moléculas pro- inflamatorias.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la asociación entre los polimorfismos presentes en cepas circulantes de *Mtb* aisladas de pacientes con TB pulmonar activa, con la severidad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, niveles de citoquinas y marcadores séricos de inflamación, en una población de pacientes del Área Metropolitana del Valle de Aburrá.

### **4.2 Objetivos específicos**

Identificar nuevos polimorfismos en los genomas de las cepas de *Mtb* aisladas de los pacientes con TB pulmonar, y determinar la asociación con los niveles de citoquinas inflamatorias y moléculas asociadas a inflamación presentes en el suero de los pacientes con TB pulmonar con respecto a la severidad de la enfermedad.

Identificar nuevos polimorfismos en los genomas de las cepas de *Mtb* aisladas de los pacientes con TB pulmonar, y determinar la asociación con los niveles de citoquinas inflamatorias y moléculas asociadas a inflamación presentes en el suero de los pacientes con TB pulmonar, al momento del diagnóstico (t0), dos (t2) y seis (t6) meses después del inicio del tratamiento.

## **5. Metodología**

### **5.1 Objetivos metodológicos**

Establecer un algoritmo de clasificación de severidad clínica y radiográfica en pacientes con TB pulmonar activa.

Implementar un protocolo de extracción de ADN de los aislados clínicos de *Mtb* a partir de cultivos solidos de muestras de esputo de pacientes con APTB que cumpla con los criterios de calidad para poder hacer un secuenciamiento de genoma completo.

### **5.2 Diseño del estudio**

Nuestro estudio se basó en una cohorte prospectiva longitudinal que incluyó pacientes con un diagnóstico de APTB, seleccionados dentro de las dos primeras semanas de tratamiento antituberculoso. Los pacientes fueron reclutados de las Entidades Administradoras de Planes de Beneficios de Salud (EAPB): Savia Salud Entidad Promotora de Salud (EPS) y EPS Sura, ambas localizadas en el Área Metropolitana del Valle de Aburrá (Colombia) durante el periodo de diciembre 2020 hasta el mes de julio del 2022, todos con un seguimiento clínico y paraclínico de 6 meses. A este grupo de pacientes se les denominó cohorte KdpDE debido a que fueron reclutados dentro del proyecto marco con el título antes mencionado.

### **5.3 Ingreso de los pacientes a la cohorte de estudio KdpDE**

Un auxiliar de enfermería dentro del Programa de Control de la TB de ambas EAPB, se encargó de revisar los criterios de inclusión de los pacientes que ingresan al Programa, después de haber verificado que la muestra de esputo se encontraba en el laboratorio de microbiología de dichas entidades de salud, un profesional especializado, con amplia experiencia en TB (Hanna Marisol Henao, MD., PhD), contactó a las personas referidas para explicarles el objetivo de la investigación e invitarles a participar del estudio. Todos los pacientes que de forma voluntaria aceptaron participar, firmaron el consentimiento informado según la Declaración de Helsinki, y

posteriormente se obtuvo la información clínica, paraclínica y epidemiológica consignándola en un cuestionario estructurado (Anexo 2.), además de la anamnesis se realizó el examen físico compuesto de, examen físico general con detalle de la constitución individual, facies, piel, mucosas, talla, peso, temperatura axilar y la medición de la circunferencia del brazo; también se realizó, un examen físico dirigido al sistema cardiovascular y respiratorio, y se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica por cada tiempo y por cada paciente. El seguimiento de los pacientes se realizó a los dos meses desde el inicio del tratamiento y la cita de egreso se realizó a los seis meses posteriores al inicio de tratamiento.

Desde el primer encuentro se ofreció a cada persona afectada información sobre la enfermedad, su etiología, forma de transmisión, importancia del diagnóstico oportuno, adherencia al tratamiento, prevención del desarrollo de cepas farmaco-resistentes, valor del estudio y seguimiento de contactos. Se ofreció apoyo durante su tratamiento para asegurar el éxito terapéutico a partir de la identificación de necesidades de cada persona. El apoyo brindado a las personas afectadas fue desde la ayuda con la gestión de la terapia o las evaluaciones médicas, hasta el soporte nutricional mensual o apoyo económico y emocional.

## **5.4 Criterios de inclusión**

Pacientes mayores de 18 años y menores de 60 años, diagnóstico de APTB mediante baciloscopia de esputo, cultivo o biopsia positiva. Firma de consentimiento informado (Anexo 1.).

## **5.5 Criterios de exclusión**

Personas que viven con VIH, personas en tratamiento con medicamentos inmunosupresores o comorbilidad con otras enfermedades que puedan afectar la respuesta inmune (neoplasia maligna, enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus, enfermedad renal crónica y en etapa terminal), personas en condición de indigencia, farmacoresistencia evidenciada en el antibiograma del cultivo de ingreso y/o mutaciones asociadas con resistencia a los antibióticos obtenidas de los genomas completos de las cepas de *Mtb*.

## **5.6 Almacenamiento de muestras de suero**

Durante la cita de ingreso, en el control de 2 meses y en la cita de egreso de 6 meses se recolectó una muestra de sangre total (6 mL) de los pacientes por punción venosa periférica en la fosa antecubital, en un tubo tapa roja de 6 mL Vacutainer® con activador de la coagulación. Las muestras fueron transportadas desde el sitio de recolección hasta la Sede de Investigación Universitaria (SIU) en una nevera plástica portátil de 4,7 litros con paquetes fríos con soluciones eutécticas para mantener una temperatura entre 0 y 8°C. Las muestras fueron procesadas en un tiempo máximo de 2 horas posterior a su extracción. La muestra recolectada en los tubos tapa roja de 6 mL Vacutainer® fue centrifugada a 1500 x g durante 10 minutos a 20°C, y luego el sobrenadante se pasó a un tubo Falcón de 50 mL (Corning™) y después de mezclar por pipeteo y agitación fue alicuotada y almacenada a -70°C hasta su posterior uso.

## **5.7 Almacenamiento y estudio microscópico del esputo**

Semanalmente se hizo la recolección de las muestras de esputo de las personas ingresadas a la cohorte los siete días anteriores, en los laboratorios de microbiología de ambas instituciones de salud con las cuales se hicieron los diagnósticos microbiológicos de cada persona incluida en el estudio. Se almacenó una alícuota de 300-500 µL en tubos de microcentrífuga de polipropileno (Axygen™) y se almacenó en ultra congeladores a -70°C hasta la extracción de ADN, el resto de la muestra se embalgó y se llevó a un laboratorio de microbiología (se describe más adelante) para el crecimiento de la micobacteria en medio sólido o líquido.

El resultado del frotis de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) x campos fueron cuantificados de la siguiente manera: cuando se aprecian menos de 10 BAAR en 100 campos se reporta el número de bacilos, si son entre 10 y 99 BAAR en 100 campos se reporta grado 1+, si son entre 1 y 10 BAAR por campo se reporta grado 2+ y para más de 10 BAAR por campo se reporta grado 3+



## 5.8 Cultivo de *Mtb*

Para el cultivo, las muestras de esputos fueron llevadas al Laboratorio de microbiología del Hospital Alma Máter de Antioquia y fueron tratadas cumpliendo las reglamentaciones de bioseguridad requeridas para patógenos tipo *Mtb*. Las muestras se colocaron en fosfato trisódico al 10% por 2 horas, luego se centrifugaron a 4 °C por 1,5 horas a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante y se tomó parte del sedimento con un hisopo, este se puso en NaOH al 4% por 2 minutos y finalmente se sembró en medio Ogawa-kudoh y se incubó a 37°C durante un periodo de al menos 4 semanas. Los aislamientos obtenidos se confirmaron para *Mtb* por la prueba rápida de TB SD BIOLINE TB Ag MPT64 (BioSystems S.A.S, Colombia).

Se realizaron cultivos para evaluar el crecimiento de la micobacteria en medio líquido tomando un pequeño inóculo del medio sólido con un asa de siembra y se cultivaron en el medio líquido Middlebrook 7H9 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) [suplementado con glicerol (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA), OADC (Merck Millipore, EE. UU.) y Tyloxapol (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) en un volumen total de 5 mL, se incubó a 37°C y se dejó crecer el cultivo hasta la mitad de la fase logarítmica durante al menos 7 días, tiempo que permitió obtener células competentes, logrando una turbidez que alcanzara una absorbancia media de 0,5 medida a una densidad óptica (D.O) de 600 nm por espectrofotometría (357). Se realizaron subcultivos del medio líquido inicial, 1 mL del inóculo más 12 mL del medio líquido Middlebrook 7H9, se incubó a 37°C durante al menos 10 días y posteriormente se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante por inversión y se almacenó el pellet bacteriano a -20° C hasta su posterior uso. Parte del cultivo líquido inicial se almacenó en crioviales (Corning™) con glicerol al 10% a -70°C como parte del cepario general de *Mtb* del GICG, y hasta su posterior uso.

## 5.9 Medición de analitos en suero

La determinación de los niveles de citoquinas en suero de pacientes se realizó con el sistema de inmunoensayos basados en perlas LEGENDplex™ (BioLegend, San Diego, CA, USA). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de fondo en U de 96 pocillos (Corning®, EE. UU) utilizando

el kit “Human Inflammation Panel 1(13-plex)”. Las citoquinas y quimioquinas medidas incluyeron: IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 (CCL2), IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33. Se utilizaron 4 kits de LEGENDplex con muestras de suero almacenada a -70°C descongeladas por primera vez en hielo, después de seguir el protocolo del fabricante se realizó la medición en el Citómetro de flujo CytoFLEX-Beckman Coulter Model No: AOO-1-1102 con detectores para FITC 488 nm, PE 565 nm y APC 640 nm.

Las concentraciones séricas de CHIT-1, LXA<sub>4</sub> e IFN- $\beta$  fueron cuantificadas utilizando kits de ELISA tipo sándwich. Human Chitotriosidase (Invitrogen|Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Human Lipoxin A4 (MyBioSource, San Diego,CA, USA) y Human IFN- $\beta$  Quantikine (R&D Systems™, EE. UU. Número del catálogo: DIFNB0). Para la CHIT-1, LXA<sub>4</sub> e IFN- $\beta$  se utilizaron muestras de suero almacenadas a -70 °C descongeladas por primera vez en hielo después de seguir el protocolo del fabricante se realizó la medición por espectrofotometría (Fotómetro de Microplacas Multiskan™ FC, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). El análisis de los datos de citometría, de ELISA y las curvas estándar de los diferentes analitos cuantificado se encuentra en el Anexo 3.

En el texto nos referiremos a citoquinas (IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL- 10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33), quimioquinas (MCP-1 e IL-8) y marcadores plasmáticos de inflamación (CHIT-1y LXA<sub>4</sub>).

## **5.10 Secuenciación de genoma completo de *Mtb***

Los genomas fueron secuenciados utilizando la plataforma Illumina Novaseq 6000 en la compañía Novogene (Sacramento,CA, USA). Para este fin, se prepararon librerías tipo whole-genome shotgun (WGS) y se generaron lecturas pareadas de 150 bases.

## **5.11 Ensamblaje de genomas de *Mtb***

Las lecturas genómicas de cada experimento se ensamblaron de forma independiente utilizando SPADES v3.14.1. (358) Primero, los extremos de las lecturas se limpiaron con CUTADAPT para generar un umbral mínimo de calidad de Q30 y solo se conservaron las lecturas

con un mínimo de 70 bases. El ensamblaje se realizó utilizando los parámetros SPADES: --careful -t 40 -m 160 -k 33,55,77,99.

Las estadísticas del genoma (Longitud total de la secuencia, Mayor contig, Estadísticas N50, Número total de secuencias) se obtuvieron utilizando un script propio de Python. Los "AltSNPs" (polimorfismos de nucleótidos alternativos) y "Cobertura" del ensamblaje, se obtuvieron mapeando las lecturas limpias de cada experimento contra el genoma ensamblado, usando Bowtie2 (359) (versión 2.4.1) con parámetros predeterminados y usando samtools (v1.10) view. Dado que el genoma de *Mtb* es haploide, la detección de cualquier alelo alternativo indica una mezcla de genomas. Los recuentos bajos de alelos alternativos son normales incluso en cepas clonales, pero un número más significativo ( $> 100$ ) podría indicar una mezcla de cepas distantes (360).

## 5.12 Análisis estadístico

Para evaluar la normalidad y homocedasticidad de nuestros datos se utilizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Levene, respectivamente. Los valores de la mediana con rangos intercuartílicos (RIC) se utilizaron como medidas de tendencia central y dispersión. Los niveles de citoquinas se compararon entre los grupos de estudio utilizando la U de Mann-Whitney (cuando se compararon 2 grupos) o la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn (cuando se compararon más de 2 grupos), para identificar los biomarcadores estadísticamente significativos entre grupos, o post-test de tendencia lineal no paramétrica, para evaluar la tendencia de aumento o disminución lineal en los valores de biomarcadores de acuerdo con severidad de la TB. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar las correlaciones entre citoquinas durante el seguimiento de los casos. Las variables categóricas se compararon mediante el test exacto de Fisher o el test Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates. Los diagramas de Venn se obtuvieron usando Venny 2.0.2 BioinfoGP, y se utilizaron para ilustrar los polimorfismos que se presentaron en aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB severa o leve. Para calcular sensibilidad y especificidad y puntos de corte para citoquinas que predigan severidad, se utilizó el análisis de curvas ROC y el índice de Youden empleando la herramienta web Epitools Epidemiological Calculators (361). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism, versión 8 (Dotmatics, Bishop's

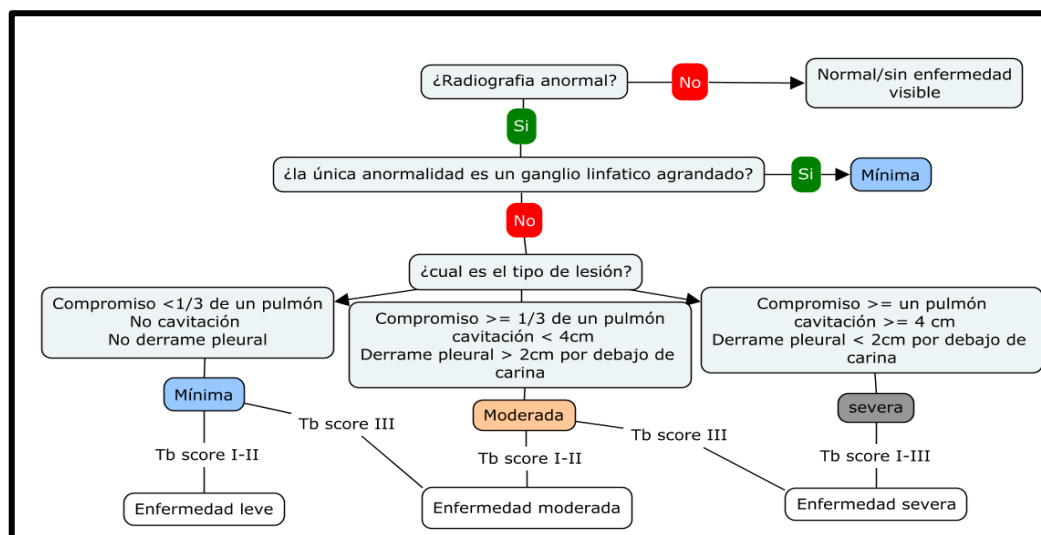
Storford, Reino Unido). Utilizamos la base de datos STRING, Versión 11.5 (STRING CONSORTIUM 2022 SIB, CPR y EMBL; <https://string-db.org>) (362). Seleccionamos la lista de genes asociados a los polimorfismos presentes en aislados clínicos de *Mtb*, de pacientes con TB severa y leve. Las fuentes activas para interacciones conocidas fueron bases de datos (STRING, Gene Ontology (GO), Uniprot, Vías KEGG) y experimentos. Para interacciones previstas se utilizó vecindario, fusiones y coocurrencia de genes; otras como extracción de textos y coexpresión. El puntaje de interacción mínimo requerido fue 0,400.

## **5.13 Resultados metodológicos**

### **5.13.1. Caracterización clínico-radiológica de los pacientes con TB pulmonar al inicio del tratamiento.**

La severidad de la enfermedad fue cuantificada al inicio del tratamiento. Primeramente, se interpretaron las imágenes digitales de radiografías de tórax, utilizando un árbol de decisiones adaptado de un estudio previo (355), a ciegas por dos médicos independientes. Un médico especialista en el área de neumología (Héctor Ortega Jaramillo, MD) y un radiólogo (David Quintero Valencia, MD) (Figura 2), en función de la extensión de las lesiones, la presencia de cavitación pulmonar y el tamaño del derrame pleural.

**Figura 2.** Representación esquemática del método de clasificación clínico-radiológico



*Nota.* El método es una modificación del algoritmo de clasificación de radiografías de tórax utilizado previamente por Saraiva y colegas (363), en función de la extensión de las lesiones, la presencia de cavitación pulmonar y derrame pleural. Se adicionó una adaptación de un sistema de puntuación clínico propuesto por Wejse y colegas (44), esta se describe en la (Figura 3).

Las lesiones mínimas fueron definidas como casos de agrandamiento hiliar único o infiltrados pulmonares mínimos. Las lesiones moderadas consistían en derrame pleural que se extendía a más de 2 cm de la Carina traqueal, o compromiso pulmonar de extensión mayor o igual a un tercio y la presencia de cavitaciones menores de 4 cm. Las lesiones severas fueron caracterizadas por la presencia de cavitaciones mayor de 4 cm, extensión del compromiso pulmonar mayor a un pulmón o derrame pleural que se extendía a menos de 2 cm de la Carina traqueal. Para tener una visión más íntegra de la gravedad de la enfermedad, se adicionó una adaptación de la medición propuesta por Wejse y colegas (44) (Figura 2).

**Figura 3.** TB-score GICIG

<i>Parámetros</i>	<i>Puntos asignados</i>
<i>Autoinformado</i>	
<i>Tos</i>	1
<i>Hemoptisis</i>	3
<i>Disnea</i>	1
<i>Dolor pleurítico</i>	1
<i>Sudores nocturnos</i>	1
<i>Anemia conjuntival</i>	1
<i>Taquicardia</i>	1
<i>Hallazgos positivos a la auscultación</i>	1
<i>Temperatura axilar &gt; 37.0 °c</i>	1
<i>IMC* &lt; 18</i>	2
<i>IMC &lt; 16</i>	2
<i>MUAC* &lt; 220</i>	2
<i>MUAC &lt; 200</i>	2

\***IMC:** Índice de masa corporal; \***MUAC:** Medición de la circunferencia del brazo superior.

**TB score I** 0-4 puntos

**TB score II** 5-8 puntos

**TB score III**  $\geq$  9 puntos

*Nota.* Modificación del sistema de puntuación clínica propuesto por Wejse y colegas(44), a la presencia de hemoptisis se le asignó una puntuación de 3 y a las variables de IMC y MUAC se les asignó un valor de 2 puntos.

Este instrumento tiene como base los parámetros definidos por la OMS (364), e incluye signos y síntomas como tos, sudoración nocturna, dolor torácico, disnea, hemoptisis, taquicardia: frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto, temperatura axilar mayor a 37°C, palidez conjuntival, hallazgos positivos a la auscultación (ronquidos y crepitaciones); IMC, determinada por la razón entre el peso (kg) y la estatura en metros ( $m^2$ ); y la circunferencia de la parte media del brazo no dominante (MUAC, mm). A todos los signos y síntomas se les proporciona el valor de 1 punto, excepto para hemoptisis a la cual se le asigna un valor de 3 puntos, IMC <18, <16 MUAC<220 y MUAC<200 a los cuales se les proporciona un valor de 2 puntos, para un total de 15 puntos. Con base a esta puntuación (TB-score GICIG), la severidad clínica de la TB se subdivide en 3 clases: Clase I (0-4), clase II (5- 8), y clase III ( $\geq$ 9) (Figura 3).

La medición del TB score GICIG se hizo antes del inicio del tratamiento con toda la información clínica sintomática previamente descrita.

Nuestra clasificación de severidad toma en cuenta dos tipos de variables, la clínica y la radiológica. Con respecto al Bandim TB-score de wejse y colegas hemos realizado 2 modificaciones teniendo en cuenta lo siguiente (44). Durante la TB activa, la respuesta inflamatoria excesiva promueve el daño pulmonar a través de la liberación elevada de mediadores inmunitarios (365). Esto se refleja con signos y síntomas locales (366). Uno de estos signos es la hemoptisis, la cual, en nuestro sistema de puntuación clínica modificada, le hemos asignado un mayor peso (Figura 3), dado que la hemoptisis apunta a la presencia de una enfermedad subyacente grave (367). La hemoptisis ha sido definida como el esputo con sangre (368), esta es una complicación grave de la APTB en pacientes tratados o no. Aparte de las manifestaciones clínicas locales, la TB también se asocia con varios síntomas sistémicos, uno de estos es la pérdida de peso (368). La caquexia es característica de la TB y aproximadamente dos tercios de los pacientes presentan una pérdida de peso (369). La mayoría de los pacientes mejoran clínicamente y aumentan de peso a las pocas semanas de iniciar el tratamiento adecuado (369). La caquexia puede estar relacionada con la respuesta inflamatoria aguda del huésped asociada con la infección por *Mtb*, lo que da como resultado la secreción de citoquinas como IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (370). El TNF- $\alpha$  puede actuar directamente sobre las células musculares, estimulando la pérdida de proteínas, facilitada por el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (371). Las citoquinas también activan en la vía de la ubiquitina/proteasoma, que está principalmente involucrada en la degradación de proteínas musculares relacionadas con la enfermedad (372). Teniendo en cuenta, lo anterior descrito consideramos que la pérdida de peso debía tener mayor peso en la aplicación del TB-score.

Otras de las herramientas utilizadas para la clasificación de la severidad pulmonar se basan en la interpretación de imágenes radiográficas del tórax. En un estudio realizado en Alemania propusieron un método basado exclusivamente en tomografías computarizadas con una clasificación automatizada, basada en un algoritmo computacional que tiene en cuenta tres variables: el derramen pleural, la presencia de cavitaciones y la tasa de afección pulmonar. A pesar de reducir al 100% la variabilidad entre observadores, en algunas ocasiones el algoritmo automático no reconoce lesiones grandes, como consecuencia la extracción de las variables no es fidedigna (373). Este hecho también se reprodujo en un estudio más reciente, en el que, a través de aprendizaje profundo, clasificaban de forma automatizada un conjunto de radiografías de tórax específicas de APTB en una población de entrenamiento, el modelo exhibió un AUC de 0,9845 y 0,8502 para detectar TB, sin embargo, cuando se probó con un conjunto de datos no específicos de

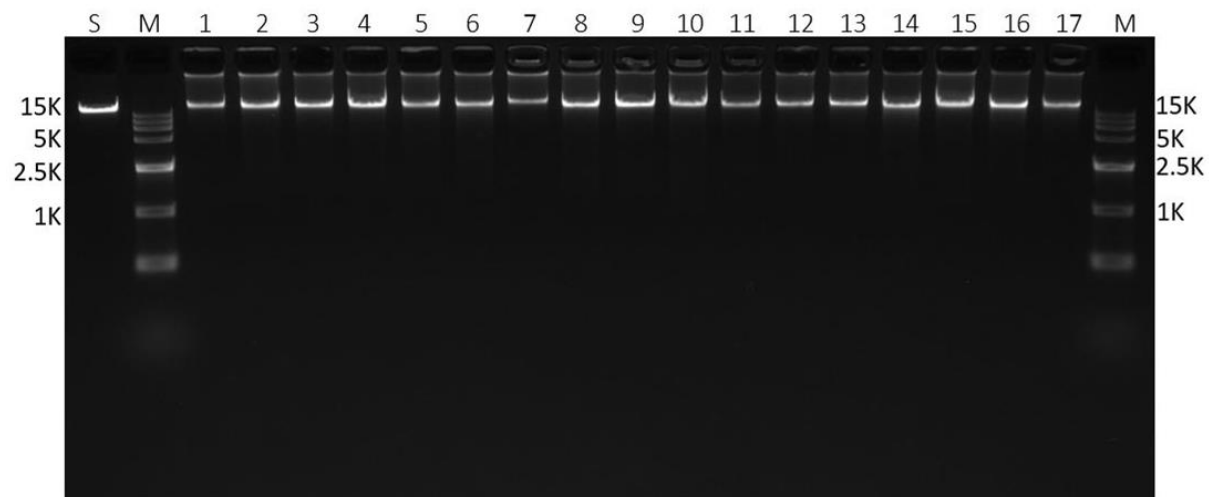
APTB de otra población de validación, solo estimó el 36,51% de las radiografías anormales, las cuales estaban relacionadas con TB. Aunque en esta investigación no clasificaron severidad, se evidenció la necesidad de supervisión por parte de los clínicos de los modelos de aprendizaje profundo antes de una implementación generalizada (374). Sin desestimar el uso de las herramientas computacionales y las técnicas de aprendizaje profundo para la interpretación de imágenes diagnósticas, que es un campo de gran crecimiento y a futuro muy promisorio, consideramos para nuestro sistema de clasificación la interpretación convencional de las radiografías de tórax, teniendo en cuenta tres criterios (extensión de las lesiones, presencia de cavitaciones y presencia de derrame pleural) que han sido asociados con severidad y no requieren el uso de pruebas imagenológicas de mayor sensibilidad para su identificación (87,180). Además, la CXR sigue siendo la modalidad inicial para la sospecha de APTB y para fines de detección masiva (375). Lo que con lleva menor carga económica para el sistema de salud en países donde los recursos son limitados en comparación con nuevos métodos de imagen (375).

### **5.13.2. Extracción de ADN para secuenciación de genoma.**

Para la extracción de ADN genómico, las micobacterias se digirieron con lisozima toda la noche, se sometieron a cinco ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido y se incubaron 1h con SDS al 10% a 60 °C. El ADN genómico se extrajo con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25 : 24 : 1, v/v), se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en TE pH 8,0 (Anexo 4). La concentración de ADN, las proporciones 260/230 y 260/280 se midieron por medio del Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA. número del catálogo: ND2000CLAPTOP) y la integridad del ADN se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 4).



**Figura 4.** Electroforesis de ADN extraído de aislados clínicos de personas de la cohorte KdpDE para secuenciación del genoma completo



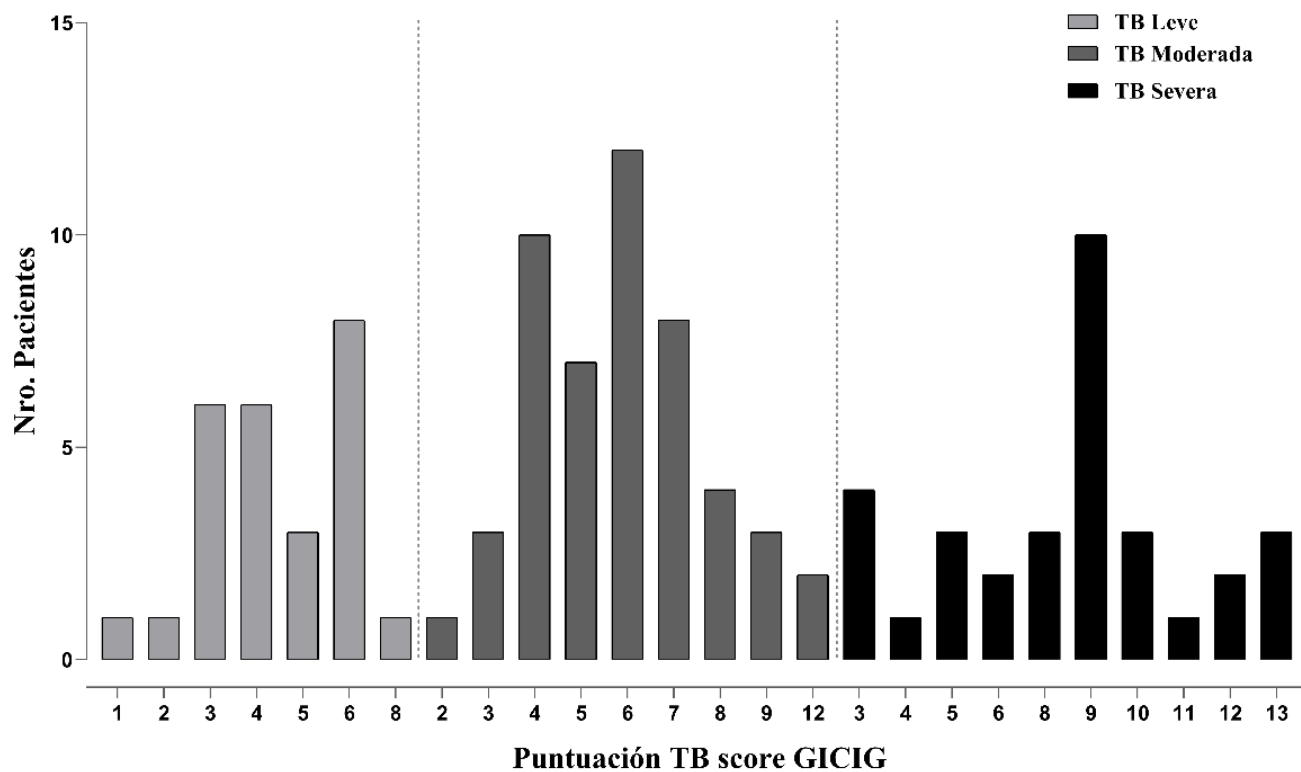
*Nota.* Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN de *Mtb* mediante fenol/cloroformo; 1-17 fueron muestras enviadas a la compañía Novogene para secuenciación. M representa el marcador de pares de base (pb), K kilobase y S una muestra control.

### 5.13.3. Observaciones finales sobre la metodología

El diagnóstico oportuno de la enfermedad y conocer su gravedad son dos de las grandes preocupaciones en el campo médico (376). En APTB conocer la severidad de la enfermedad no es tema que se tenga resuelto (42). Por lo cual fue un reto encontrar una herramienta para la clasificación de severidad de la APTB en la cohorte de estudio. Decidimos implementar un algoritmo que reúne dos variables que se complementan para mejorar la precisión de nuestro sistema de clasificación: la clínica y las imágenes diagnósticas. Implementamos una herramienta previamente validada, que ha sido utilizada en múltiples investigaciones (73,377–379), el TB score (44) y una versión modificada del sistema de clasificación de la Asociación Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias de EE.UU, que clasifica las radiografías de tórax en función de la extensión de las lesiones, la presencia de cavitaciones pulmonares y derrame pleural. Este sistema fue utilizado por Saraiva y colegas, además, en el 2010 fue aplicado por O'Garra y colegas, en una investigación referente en TB (180,363) .

Con estas dos variables juntas, evaluamos síntomas sistémicos y locales que causan la TB, además evaluamos los patrones radiológicos del compromiso pulmonar que se presenta tras la respuesta inmune en contra de la micobacteria. Realizamos un análisis sencillo de la distribución de los casos según el sistema de puntuación clínico y lo comparamos con nuestro método clínico radiológico (Figura 5). Evidenciamos como ambas variables se complementan dado que pacientes con puntuaciones de TB score entre 3 y 8, lo cual hace que se cataloguen con un TB score I y II, fueron clasificados con una TB severa dado los hallazgos radiográficos, del mismo modo, aunque el número de casos en ese sentido fue menor, individuos con puntuaciones de TB score superiores a 9 fueron clasificados con una TB moderada. Lo cual nos lleva a concluir que nuestro sistema de clasificación es confiable y se encuentra acorde con los cambios ocurridos durante la enfermedad.

**Figura 5.** Distribución de pacientes según la puntuación del TB- score GICIG estratificados por la severidad de la enfermedad



*Nota:* en el eje x los pacientes se distribuyen según la puntuación del TB score GICIG, se diferencian por colores 3 grupos que corresponde a la clasificación clínico-radiológica.

## 6. Resultados

### 6.1 Descripción general de la población de estudio

Para investigar si los determinantes asociados a *Mtb* pueden contribuir a la patogenia de la TB pulmonar a través de la modulación del estado inmunitario del huésped, realizamos un estudio de cohorte prospectivo de pacientes con APTB.

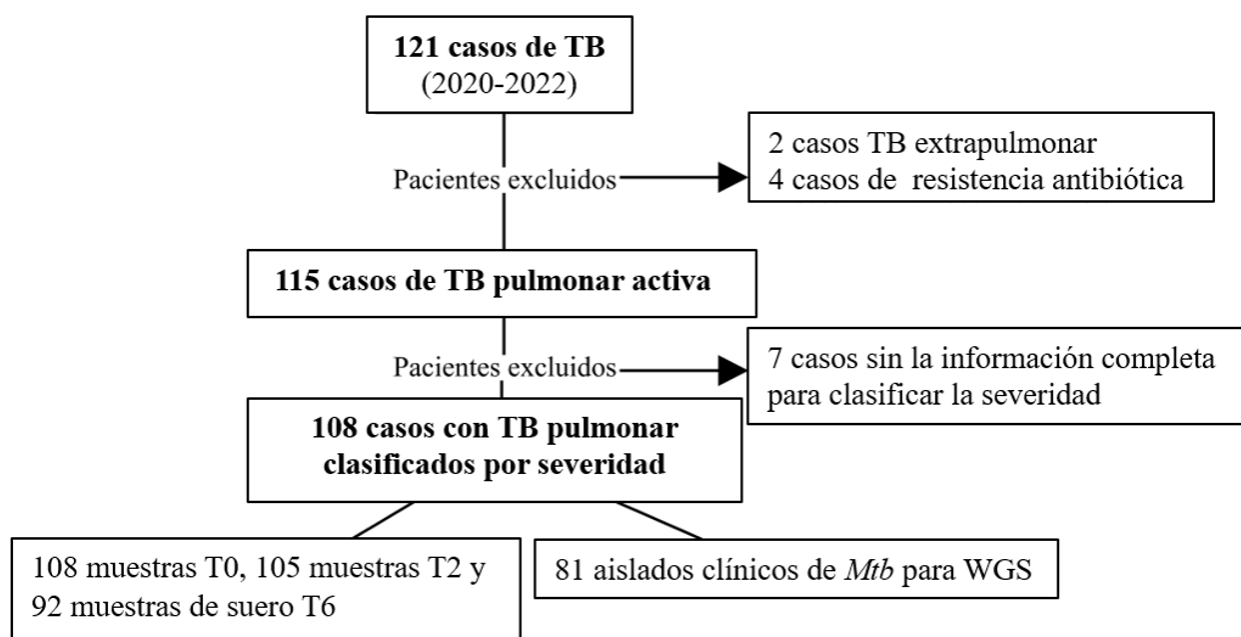
Entre diciembre de 2020 y julio de 2022, se incluyeron 121 casos de APTB dado el reporte positivo de una baciloscopia seriada en las EPS Savia Salud y SURA del Área Metropolitana del Valle de Aburrá (Figura 6), de los cuales se excluyeron 6 casos (2 casos de TB extrapulmonar y 4 casos de resistencia antibiótica) con el resultado confirmatorio del cultivo y la historia clínica. También se excluyeron del estudio los pacientes con falta de información general (7 casos). El seguimiento completo de la cohorte de este estudio se realizó hasta el mes de julio del 2022.

Las características generales de la cohorte de estudio se presentan en la (Tabla 3). Se seleccionaron 108 pacientes adultos con TB pulmonar (Figura 6). La mediana de edad de nuestra población de estudio es de 26,5 años, la frecuencia de mujeres del 53,7 %. Con relación a los factores clínicos, la mediana del IMC es 19.7 Kg/m<sup>2</sup> y dentro de la clasificación de la OMS el 36,1% de los pacientes se encuentra en bajo peso, sin embargo, teniendo en cuenta que la pérdida de peso hace parte del pródromo de la TB (11), la mayoría (63.8 %) de los casos presentan un peso normal o sobrepeso.

El retraso en el diagnóstico entendiendo este como el tiempo que transcurre desde el inicio de síntomas típicos de TB auto reportados hasta el inicio del tratamiento antituberculoso (29), fue de 17,4 semanas con un amplio rango inter-cuartílico; el diagnóstico oportuno en nuestro país continua siendo motivo de preocupación para el Ministerio de Salud, dado que más del 50% de los diagnósticos de APTB se llevan a cabo en los servicios de hospitalización (3), lo que sugiere deterioro indirectamente de las estrategias de atención primaria en salud. El resultado de la baciloscopia al momento del diagnóstico reportado fue de 1 cruz en el 36% de los casos, siendo este el grupo de mayor predominio, en cuanto al grupo con mayor carga bacilar constituyó el 25,2 % de los casos. Uno de los datos más importantes de nuestra población teniendo en cuenta que

puede ser un factor de confusión son los antecedentes patológicos, en nuestra población el 79,6% de los casos no presenta antecedentes patológicos y el 17,5% presentó consumo de alcohol o tabaco.

**Figura 6.** Visión general de la población de estudio



*Nota.* Se registra el número de casos en cada fase del estudio. *Mtb*, *Mycobacterium tuberculosis*; WGS, Secuenciación del genoma completo; T0, antes del tratamiento; T2, 8 semanas posterior al tratamiento; T6, 24 semanas posterior al tratamiento.

**Tabla 3.** Características de los participantes del estudio

Variable	Descriptor	Casos	
<b>Factores sociodemográficos</b>			
Edad	Mediana (RIC)	26,5	(22-34,7)
Sexo	Masculino n (%)	50	(46,2%)
	Femenino	58	(53,7%)
EAPB	Savia Salud n (%)	25	(23,1%)
	Sura	83	(76,8%)
<b>Factores clínicos-biológicos</b>			
Peso (kg)	Mediana (RIC)	53,9	(49,5-60,4)
Talla (m)		1,64	(1,5-1,7)
IMC (kg / m <sup>2</sup> )		19,7	(17,8-22,05)
<b>Clasificación de IMC según OMS</b>	Bajo peso IMC < 18,5 n (%)	39	(36,1%)
	Normal IMC 18,5- 24,9	57	(52,7%)
	Sobrepeso IMC 25- 29,9	12	(11,1%)
<b>Episodio previo de TB</b>	No n (%)	107	(99,07%)
	Si	1	(0,9%)
<b>Contacto con paciente bacilífero</b>	No n (%)	94	(87,03%)
	Si	14	(12,9%)
<b>Hallazgos radiológicos positivos</b>	No n (%)	2	(1,85%)
	Si	106	(98,14%)
	Extensión del compromiso parenquimatoso		
	< 1/3 de un pulmón n (%)	33	(31,1%)
	< 1 pulmón completo	47	(44,3%)
	2 pulmones	26	(24,5%)
	Presencia de cavitaciones		
	Si n (%)	38	(35,18%)
	No	70	(64,81%)
	Presencia de derrame pleural		
	Si n (%)	2	(1,85%)
	No	106	(98,14%)
<b>Retraso en el diagnóstico total en semanas</b>	Mediana (RIC)	17,4	(9,14-41,6)
<b>Baciloscopia</b>	Muestras totales	99	
	1 a 10 BAAR en 100 campos n (%)	11	(11,1%)
	10 a 99 BAAR en 100 campos (1 +)	36	(36,36%)
	1 a 10 BAAR por campo (2 +)	27	(27,27%)
	>10 BAAR por campo (3 +)	25	(25,25%)
<b>TB score-GICIG</b>	SC I 1-4 n (%)	33	(30,5%)
	SC II 5-8	51	(47,2%)
	SC III >=9	24	(22,2%)

<b>Antecedentes patológicos</b>	Consumo de alcohol n (%)	10	(9,2%)
	Tabaquismo	9	(8,3%)
	Respiratorios	3	(2,7%)
	Ninguno	86	(79,6%)
<b>Control del segundo mes</b>	Resultados de baciloscopia		
	Negativo n (%)	97	(98,9%)
	positivo	1	(1,02%)

*Nota.* RIC, rango intercuartílico; n (%), número absoluto y porcentaje; kg, kilogramos; m, metros; IMC, índice de masa corporal; kg/m<sup>2</sup>, kilogramos entre metros al cuadrado; SC, score.

## **6.2 Georreferenciación de los casos de la cohorte KdpDE 2020-2022 de pacientes con TB pulmonar del Área Metropolitana del Valle de Aburrá**

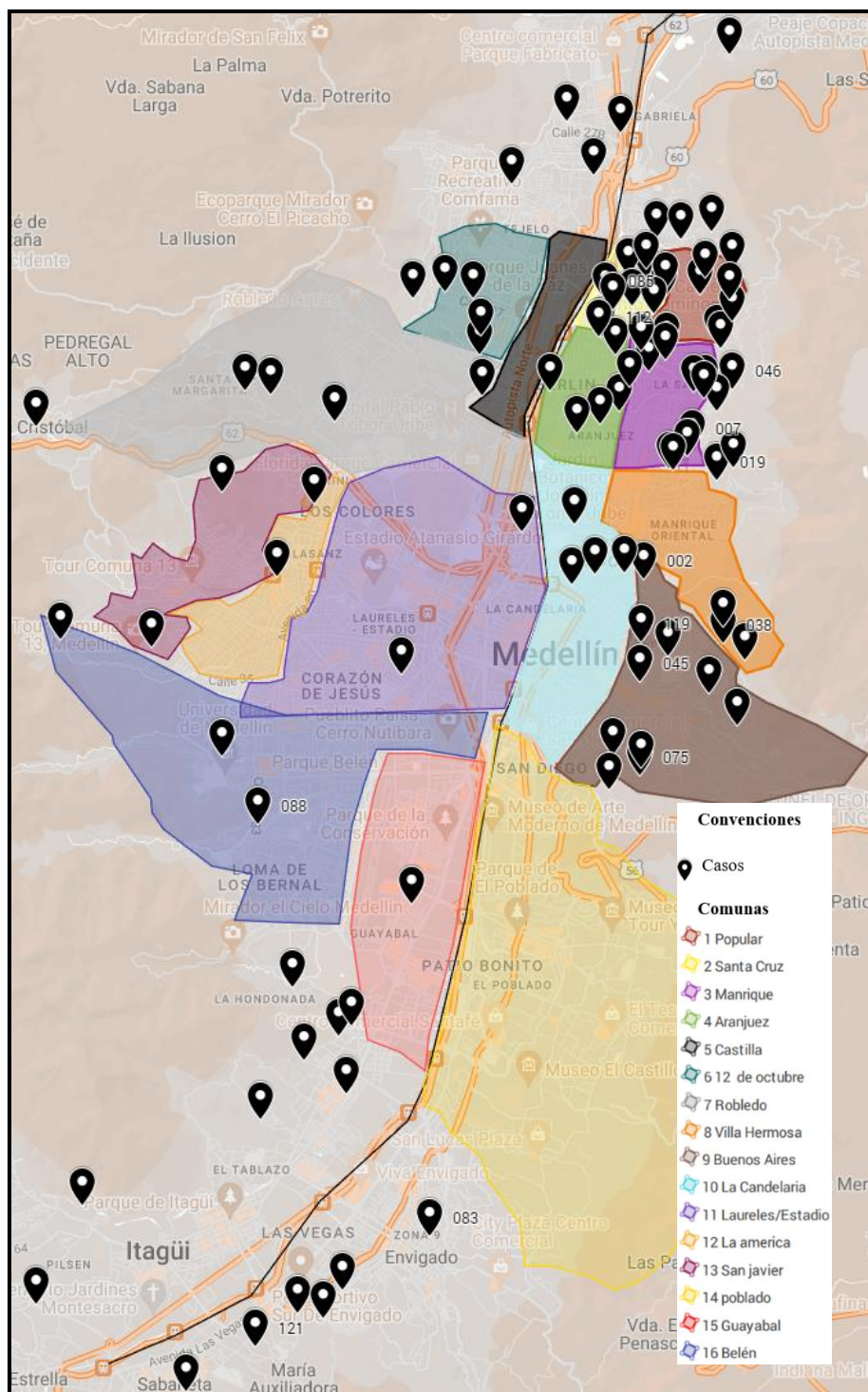
En el mapa de la Figura 7A se puede observar la localización de cada uno de los casos de la cohorte de estudio y es evidente una gran agrupación de casos hacia la Zona Nororiental de la ciudad de Medellín acumulándose el 53,4 % de casos en las comunas Popular, Santa Cruz, Manrique, Aranjuez y Villa Hermosa; según datos del Informe de Calidad de Vida de Medellín del 2021 presentaron los mayores índices de pobreza multidimensional de la ciudad y corresponden a los 3 primeros estratos (380). Este resultado fue similar al que se encontró en un estudio de contactos domésticos de pacientes con TB pulmonar realizado en el área metropolitana de Medellín en Colombia, entre marzo de 2005 y diciembre de 2006, en el cual los casos se encontraban en los 3 niveles socioeconómicos más bajos (63,4%) (381). Por lo anterior no desconocemos los factores externos al huésped y la bacteria que pueden determinar el curso de la TB.

Dentro del grupo de municipios fuera de Medellín se encuentran Bello, Caldas, Copacabana, Envigado, Girardota, Itagüí, La Estrella y Sabaneta y albergan el 19,4% de los casos. Como dato de interés no reclutamos ningún paciente de la comuna 14, el resto de casos se distribuyen en las comunas mencionadas en la Figura 7B.

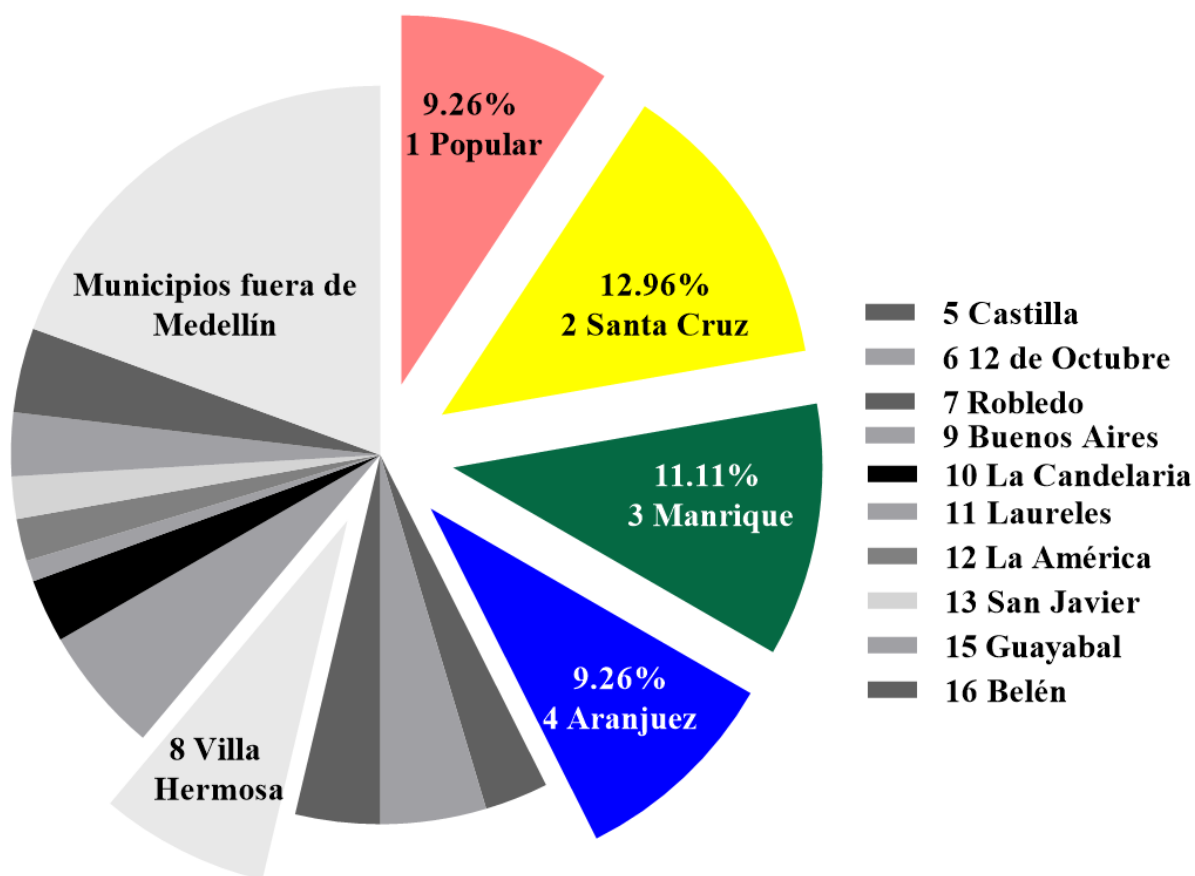


**Figura 7.** Georreferenciación de los casos de la cohorte de pacientes con TB pulmonar del Área Metropolitana del Valle de Aburrá de la cohorte KdpDE 2020-2022

A



B



*Nota.* A. Realizado con Google Maps/Google Earth última modificación: 12 de enero del 2022. B. Distribución de los pacientes con TB pulmonar activa del Área Metropolitana del Valle de Aburrá de la cohorte KdpDE 2020-2022, diagrama de torta que representa el número de casos distribuidos por comunas dentro del municipio de Medellín y fuera de este, dentro del grupo de Municipios fuera de Medellín se incluyen: Envigado, Girardota, Itagüí, Bello, Caldas, Copacabana, La estrella y Sabaneta.

### 6.3 Comportamiento de los niveles séricos de citoquinas y una molécula asociada a inflamación en pacientes con TB pulmonar activa durante el tratamiento

Como se discutió ampliamente en la sección 1.4, las citoquinas, quimioquinas y moléculas asociadas a la inflamación pueden servir como biomarcadores de seguimiento y eficacia del tratamiento en pacientes con TB pulmonar. Para entender el comportamiento en respuesta al tratamiento antituberculoso de los analitos seleccionados, estos se midieron en el plasma de los individuos de la cohorte en las primeras dos semanas después del diagnóstico (T0), 2 meses (T2) y 6 meses (T6) posterior al inicio del tratamiento.

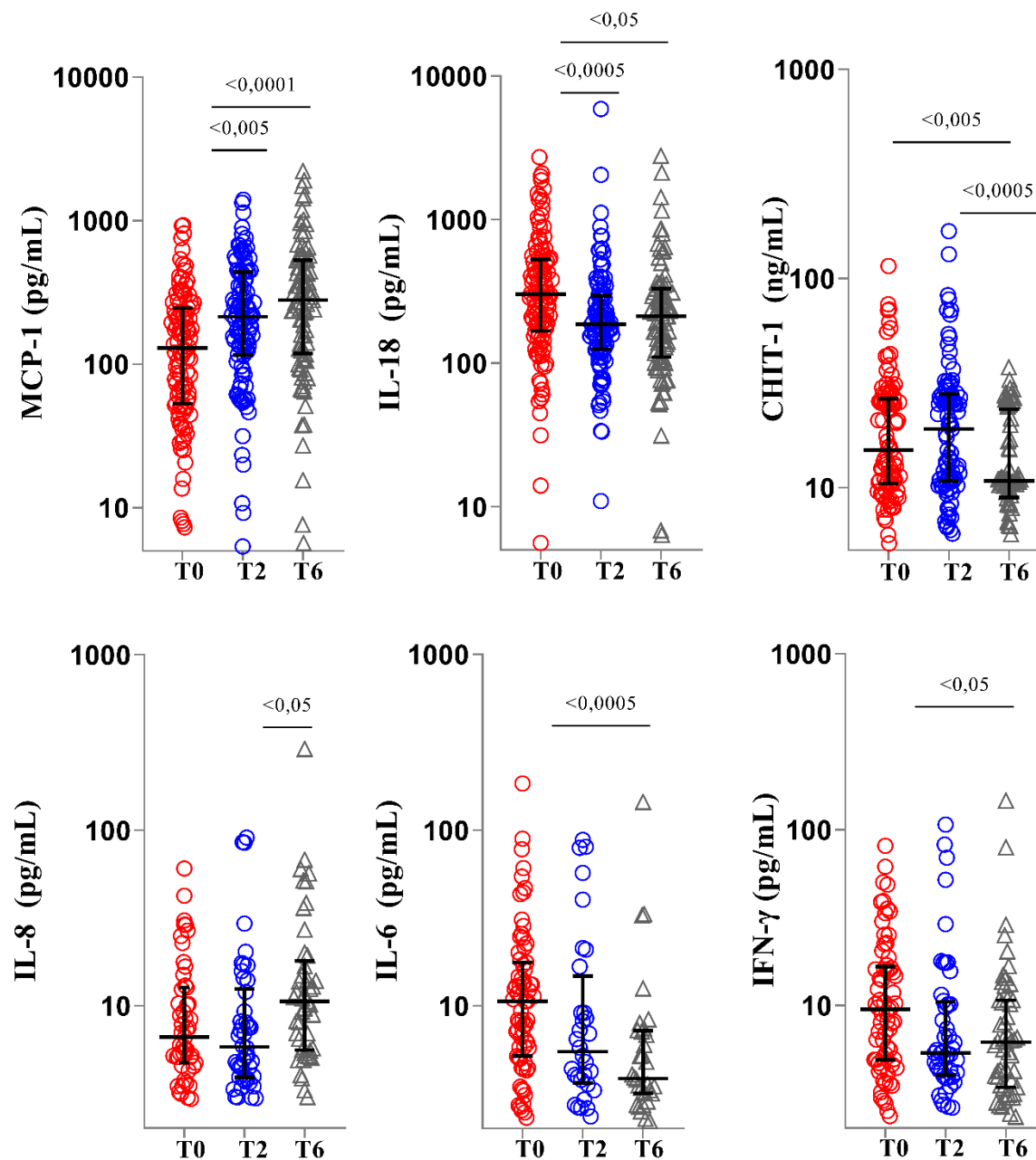
Evidenciamos un incremento en los niveles séricos de MCP-1 a los 2 meses (214 pg/ mL;  $P < 0,005$ ) y 6 meses (279,7 pg/ mL;  $P < 0,0001$ ) de tratamiento en comparación con el tiempo 0 (129,5 pg/ mL) (Figura 8).

Los niveles de IL-18 (213,3 pg/ mL;  $P < 0,05$ ), CHIT-1 (10,75 ng/ mL;  $P < 0,005$ ), IL-6 (3,85 pg/ mL;  $P < 0,0005$ ) e IFN- $\gamma$  (6,16 pg/ mL;  $P < 0,05$ ) descendieron al finalizar la quimioterapia con relación al T0 (IL-18: 303 pg/ mL; CHIT-1: 15,08 ng/ mL; IL-6: 10,62 pg/ mL; IFN- $\gamma$ : 9,49 pg/ mL). En el caso de la IL-18 el descenso fue significativo ( $P < 0,0005$ ) después 8 semanas de tratamiento, además, observamos disminución ( $P < 0,0005$ ) de los niveles de CHIT-1 a los 6 meses de tratamiento con relación a los 2 meses (Figura 8).

De forma interesante percibimos una tendencia al descenso de los niveles séricos de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  al finalizar el tratamiento antibiótico; para las citoquinas IFN- $\alpha$ 2, IL-10, IL-23, IL-33, (Anexo 5, Figura Suplementaria 2) IL-12p70 e IL-17A (resultados no mostrados) no se evidenció diferencias significativas.

Con respecto a la LXA<sub>4</sub> y al IFN- $\beta$  dado que los valores encontrados fueron en su mayoría por debajo del límite de detección no se tuvieron en cuenta para los análisis.

**Figura 8.** Comportamiento de los niveles séricos de citoquinas y moléculas asociadas a inflamación en pacientes con TB pulmonar activa durante el tratamiento



*Nota.* Se evaluaron los niveles séricos de las citoquinas MCP-1 (T0, n=106; T2, n=104 y T6, n=91), IL-18 (T0, n=106; T2, n=104 y T6, n=91), CHIT-1 (T0, n=97; T2, n=95 y T6, n=84), IL-8 (T0, n=51; T2, n=46 y T6, n=45), IL-6 (T0, n=71; T2, n=32 y T6, n=32) e IFN- $\gamma$  (T0, n=69; T2, n=48 y T6, n=51) en muestras de pacientes con TB pulmonar a las 0, 8 y 24 semanas desde el inicio de tratamiento, respectivamente. Los datos representan medianas, rangos intercuartílicos, valor máximo y mínimo. Se utilizaron el test de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para comparar las distribuciones de los analitos séricos según el tiempo de tratamiento. Las diferencias que alcanzaron significancia estadística después del ajuste por comparaciones múltiples se describen en cada figura.

## 6.4 Clasificación clínico-radiológica de severidad para pacientes con TB pulmonar en el momento del diagnóstico de la enfermedad

En dirección de nuestro objetivo de identificar los determinantes asociados a *Mtb* que pueden contribuir a la patogenia de la TB pulmonar, estratificamos la gravedad de la TB pulmonar. Para esto, decidimos construir un algoritmo descrito en el título (5.13.1).

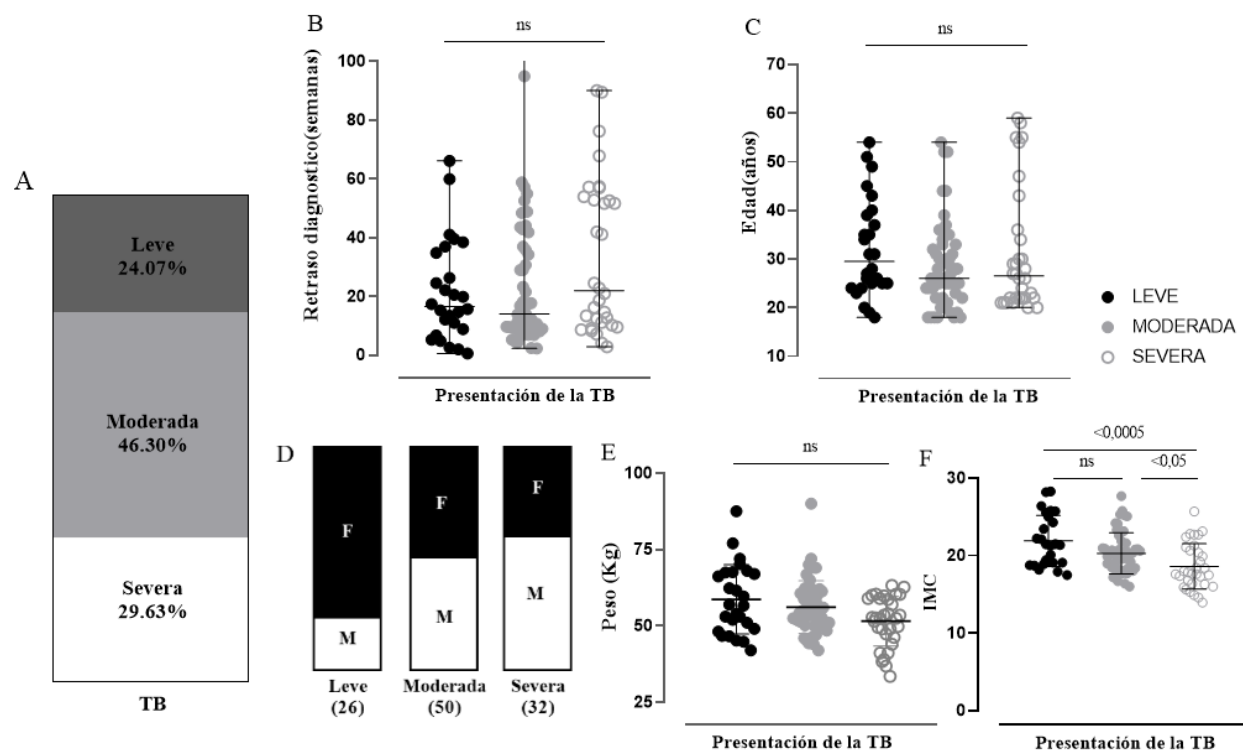
Clasificamos 108 pacientes con nuestro algoritmo clínico-radiológico, de los cuales 32 (29,63%) presentaban una TB pulmonar severa, 50 (46,3%) un cuadro clínico moderado, y 26 (24,07%) con una TB leve (Figura 9A). Una observación similar, con un grupo central asociado a una TB moderada, también fue descrito por Saraiva y colegas (363). Un estudio de cohorte prospectiva de pacientes con APTB llevado a cabo en Oporto, Portugal. El cual tuvo un objetivo similar a este trabajo, entender cómo la diversidad natural de los aislamientos de *Mtb* determinan la respuesta inmunitaria del huésped hacia una presentación de TB severa, para esto clasificaron la severidad de la APTB con aspectos clínicos, paraclínicos y radiológicos. Demostraron que los aislados de *Mtb* que inducen bajos niveles de producción de IL-1 $\beta$  pueden evadir los sistemas de vigilancia citosólica de macrófagos, incluidos cGAS y el inflammasoma (363).

Observamos un mayor número de mujeres y hombres en el grupo de pacientes con TB leve y severa respectivamente, al respecto en un país con características similares a Colombia se publicó un estudio poblacional que indican tasas más altas de APTB y consecuencias clínicas más graves entre los hombres que entre las mujeres (382). Esto podría estar relacionado con que el género masculino está asociado con más comorbilidades y mayor probabilidad de tener el hábito de fumar (383). Sin embargo, tanto el retraso diagnóstico y la edad del paciente se distribuyeron de manera similar dentro los tres grupos de gravedad de la TB (Figura 9 B-D) (Tabla 4). Estos resultados son importantes dado que previamente describimos la asociación entre severidad de la APTB con el retraso diagnóstico, por lo cual esta variable no sesga nuestro interés en la comprensión del papel de *Mtb* en la patogenia de la TB. Previamente se describió como la desnutrición es un factor de riesgo para padecer una APTB, en este trabajo hemos encontrado que un IMC por debajo de 18,5 kg/m<sup>2</sup> se asocia con una APTB severa (Figura 9F), no encontramos diferencias en la severidad en relación al peso (Figura 9E). Dos puntuaciones de CXR, que tienen en cuenta el porcentaje de

pulmón afectado y la presencia de cavitaciones también se asociaron anteriormente con un IMC más bajo al momento del diagnóstico de la APTB (86,87). Lo cual pone de manifiesto la necesidad de una atención integral a las personas con APTB, que además de la enfermedad se encuentran en condición de pobreza.

Con relación a la georreferenciación de los pacientes con TB clasificados por la severidad no encontramos diferencias en la distribución de casos por comunas (Anexo 5, Figura suplementaria 1).

**Figura 9.** Cohorte de pacientes KdpDE 2020-2022 clasificados por la severidad de la TB pulmonar



*Nota.* **A** Los pacientes con APTB de los cuales teníamos toda la información completa ( $n = 108$ ) se clasificaron por severidad utilizando el método propuesto en la figura 2 en Leve= 26, Moderada=50 y Severa=32 **B** Distribución de los grupos de paciente por severidad y retraso diagnóstico. **C** edad, **D** genero (masculino, M; femenino, F), **E** peso e **F** IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). **B**, **C**, **E** y **F** se representa la mediana, el valor máximo y mínimo. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas, la prueba de Dunn para comparaciones por pares entre cada grupo independiente y valor  $P$ .

**Tabla 4.** Comparación de variables independientes clasificadas por la severidad de la TB pulmonar

<b>Características</b>	<b>Enfermedad leve</b>	<b>Enfermedad moderada</b>	<b>Enfermedad severa</b>	<b>Valor- P</b>
<b>N</b>	26	50	32	
<b>Edad - años</b>	29,5 (24,75-39,25)	26 (22-32,2)	26,5 (22-35,5)	0,2827
<b>Femenino n (%)</b>	20 (79,9)	25 (50) *	13 (40,6) **	0,0173
<b>Retraso en el diagnóstico- semanas</b>	16,5 (8,32-35,3)	14 (8,8-38,21)	21,9 (10,5-53,7)	0,1812

*Nota.* Los datos representan medianas y rangos intercuartílicos para (edad y retraso diagnóstico), frecuencia y porcentaje para (género femenino). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas, la prueba de Dunn para comparaciones por pares entre cada grupo independiente y la prueba Chi-cuadrado con Corrección de Yates para comparar frecuencias de género en los 3 grupos de severidad y para comparar entre 2 grupos de paciente por severidad Leve vs Moderada \* P< 0,04; Leve vs Severa \*\* P= 0,012



## 6.5 Niveles séricos de citoquinas y una proteína asociada a inflamación en pacientes con TB pulmonar activa respecto a la severidad de la enfermedad

Después de clasificar a los individuos de nuestra cohorte de estudio por la severidad de la TB pulmonar, comparamos los niveles séricos de las citoquinas antes descritas y CHIT-1 una proteína asociada a inflamación con el fin de identificar biomarcadores que pudiesen asociarse con la severidad (L, Leve; M, Moderada; S, Severa) de la TB en cada uno de los tiempos estudiados (T0, T2 y T6). Encontramos resultados estadísticamente significativos entre los niveles de varias citoquinas y CHIT-1 en el T0 y T2, pero no en T6 (resultados no mostrados).

Adicionalmente, no se encontraron diferencias entre los niveles de citoquinas entre pacientes con TB leve y moderada, por ello, enfocamos nuestros análisis en el grupo de pacientes con TB leve y severa

Los pacientes clasificados con TB severa, presentaron niveles significativamente mayores de IL-6 (14,7 pg/ mL; <0,05), que aquellos con TB leve (7,7 pg/ mL), en el T0. También, los pacientes con TB severa, mostraron niveles significativamente mayores de IL-6 (8,16 pg/ mL; <0,05), IFN- $\gamma$  (10,15 pg/ mL; <0,05), IL-33 (118,4 pg/ mL; <0,05), y de CHIT-1 (23,96 ng/ mL; <0,05), en comparación con los de TB leve (IL-6:3 pg/ mL; IFN- $\gamma$ :4,8 pg/ mL; IL-33:56,89 pg/ mL y de CHIT-1:11,04 ng/ mL) en el T2 (Figura 10 A, B).

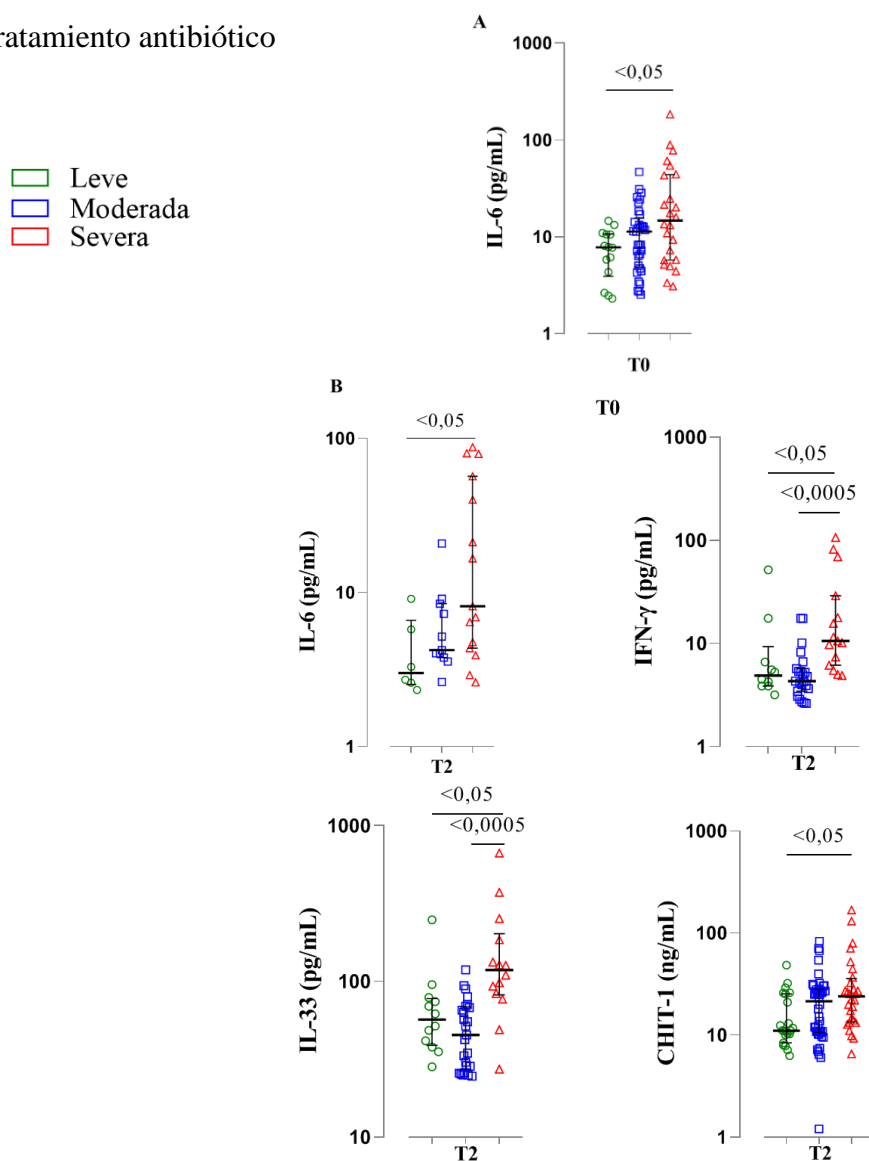
En conclusión, los niveles plasmáticos de las citoquinas IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 y de la enzima CHIT-1, permiten diferenciar la TB severa y la TB leve durante los primeros 2 meses de tratamiento antituberculoso.

Los niveles de IL-1 $\beta$  (7,1 pg/ mL,  $P<0,005$ ), IL-8 (11,9 pg/ mL,  $P<0,05$ ), IL-10 (8,6 pg/ mL,  $P<0,005$ ) e IL-23 (9,2 pg/ mL,  $P<0,005$ ) también fueron significativamente mayores en los pacientes con TB severa, en comparación con los de TB moderada (IL-1 $\beta$ :4,57 pg/ mL, IL-8:4,77 pg/ mL, IL-10:3,79 pg/ mL e IL-23:3,6 pg/ mL), en T2 (Figura 11)

El reclutamiento temporal y espacial de células inmunitarias para la formación de granulomas está orquestado por una serie de citoquinas y quimiocinas del huésped y sus receptores

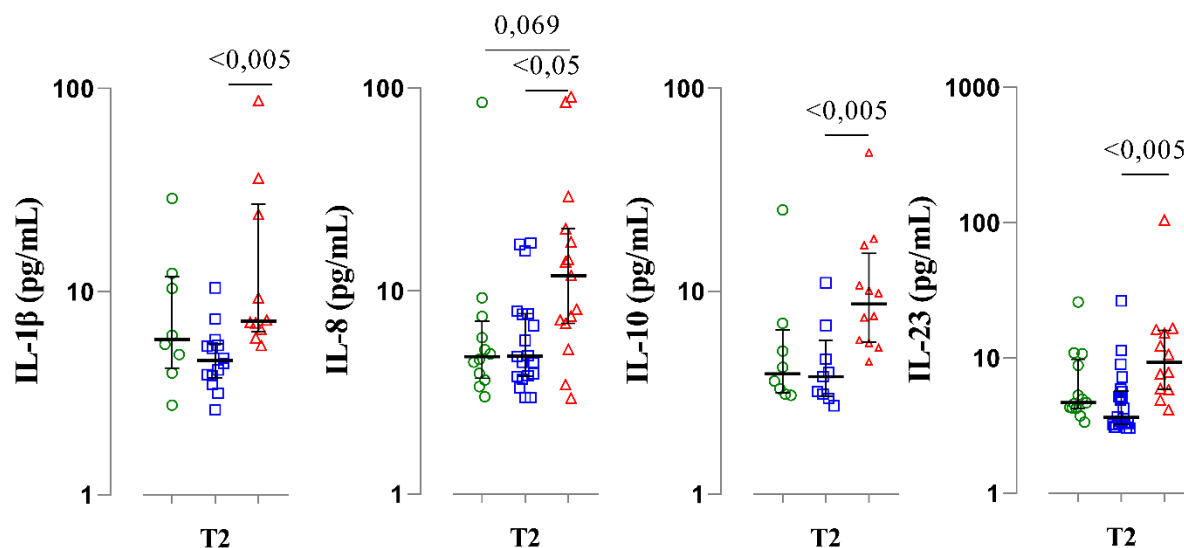
afines (384,385). A continuación, exploraremos como se correlacionaron los diferentes analitos asociados con una APTB severa.

**Figura 10.** Los pacientes con TB pulmonar severa presentan concentraciones séricas elevadas de citoquinas inflamatorias y de una proteína asociada a inflamación a las 8 semanas desde el inicio del tratamiento antibiótico



*Nota.* Los pacientes se distribuyeron según la severidad de la TB pulmonar en leve (L) (verde), moderada (M) (azul) y severa (S) (rojo). Se cuantificaron los niveles séricos de diferentes analitos, **A** pretratamiento, IL-6 (L, n=14; M, n=33; S, n=24) y **B** a las 8 semanas de tratamiento, IL-6 (L, n=6; M, n=11; S, n=15); IFN- $\gamma$  (L, n=10; M, n=23; S, n=15); IL-33 (L, n=12; M, n=25; S, n=14); CHIT-1 (L, n=23; M, n=44; S, n=28). Los datos representan medianas y rangos intercuartílicos. Se utilizaron el test de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn para comparar las distribuciones de las citoquinas séricas entre los grupos de estudio. Los valores de *P* significativos se presentan en las figuras y la línea horizontal representa los grupos en que se evidenció la diferencia.

**Figura 11.** Los pacientes con TB pulmonar severa presentan concentraciones séricas elevadas de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 e IL-23 en comparación con los pacientes con TB moderada a las 8 semanas desde el inicio del tratamiento antibiótico



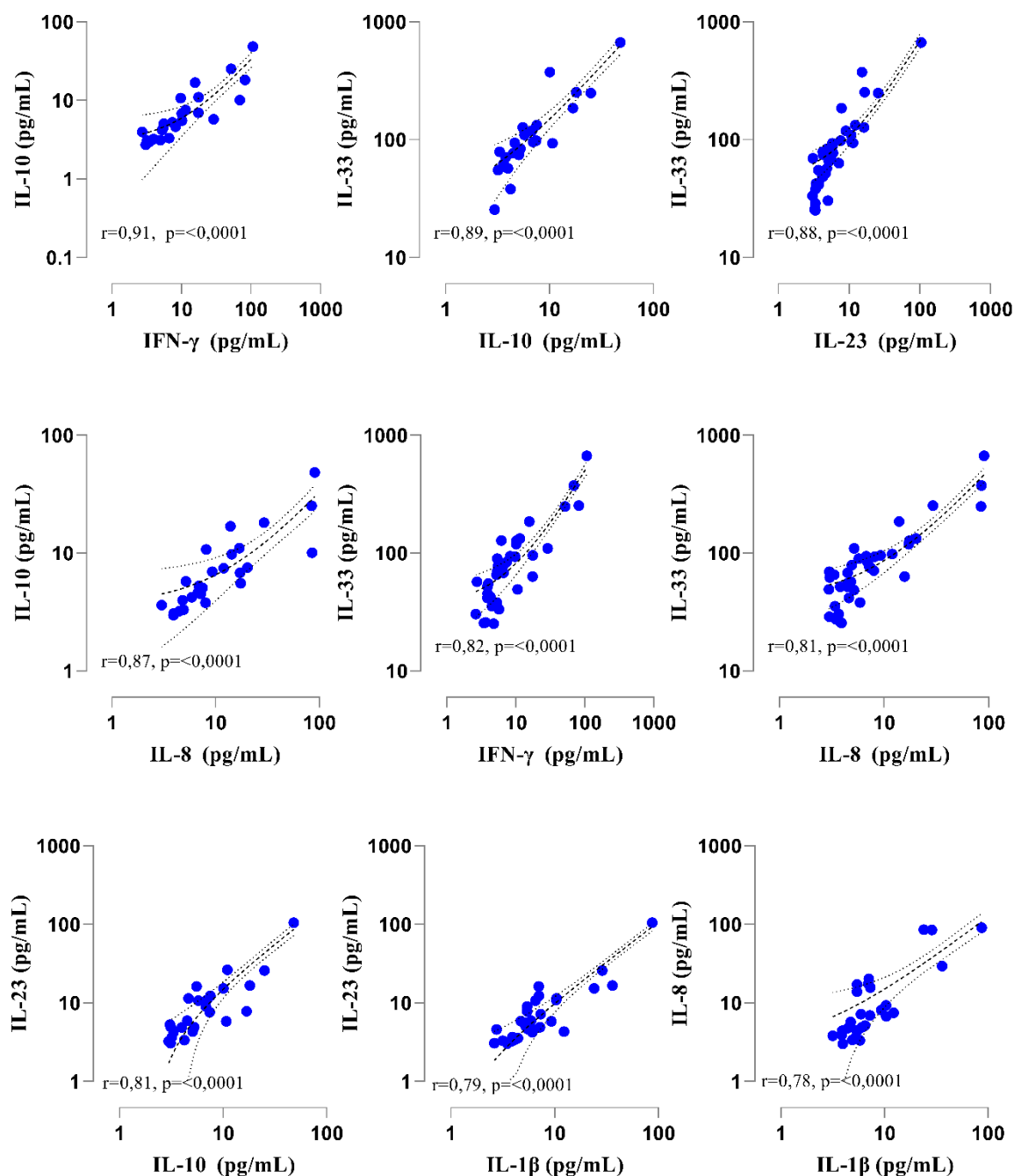
*Nota.* Los pacientes se distribuyeron según la gravedad de la TB pulmonar en leve (L) (verde), moderada (M) (azul) y severa (S) (rojo). Se cuantificaron los niveles séricos de diferentes analitos, a las 8 semanas de tratamiento, IL-1 $\beta$  (L, n=8; M, n=14; S, n=10); IL-8 (L, n=12; M, n=19; S, n=15); IL-10 (L, n=8; M, n=9; S, n=12) e IL-23 (L, n=13; M, n=22; S, n=12). Se utilizaron el test de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn para comparar las distribuciones de las citoquinas séricas entre los grupos de estudio. Los valores de P significativos se presentan en las figuras y la línea horizontal representa los grupos en que se evidenció la diferencia.

## **6.6 Correlación entre los niveles séricos de citoquinas elevadas en pacientes con TB severa después de 8 semanas desde el inicio del tratamiento**

Después de haber identificado algunos biomarcadores en pacientes con APTB severa tras 8 semanas desde el inicio del tratamiento (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , Il-6, IL-8, IL-10, IL-23, IL-33 y CHIT-1), nos propusimos examinar la interacción coordinada entre las citoquinas y quimioquinas halladas. Analizamos los niveles de estos analitos mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman, las interacciones se clasificaron según el valor del coeficiente de correlación (r) en correlaciones fuertes, moderadas, débiles y negativas.

Los resultados de las correlaciones se encuentran en la (Figura 12) y (Tabla 5). De forma interesante encontramos que con excepción de la CHIT-1, el resto de analitos presentaba correlaciones significativas y fuertes, dentro de las citoquinas que se destacan con el mayor número de correlaciones fuertes fueron la IL-1 $\beta$  y la IL-33.

**Figura 12.** Correlación entre los niveles séricos de citoquinas en pacientes con TB pulmonar después de 8 semanas desde el inicio del tratamiento



*Nota.* Citoquinas séricas asociadas a severidad de la TB después de 8 semanas desde el inicio del tratamiento, se graficaron las correlaciones con el valor de coeficiente de correlación de Spearman (r) estadísticamente significativo y con el valor r más alto de la (Tabla 5). Las líneas con un intervalo del 95% de confianza y la curva de regresión lineal de mejor ajuste se muestran como líneas continuas. Los valores de P y r se especifican en cada gráfico.

**Tabla 5.** Correlación de citoquinas en pacientes con TB a las 8 semanas después del inicio de tratamiento

Spearman r (P)	IL-1 $\beta$	IFN- $\gamma$	IL-6	IL-8	IL-10	IL-23	IL-33
<b>Tiempo 2</b>							
IL-1 $\beta$	-	0,77 <sup>d</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,78 <sup>d</sup>	0,72 <sup>c</sup>	0,79 <sup>d</sup>	0,77 <sup>d</sup>
IFN- $\gamma$	0,77 <sup>d</sup>	-	0,59 <sup>c</sup>	0,72 <sup>d</sup>	0,91 <sup>d</sup>	0,74 <sup>d</sup>	0,82 <sup>d</sup>
IL-6	0,61 <sup>a</sup>	0,59 <sup>c</sup>	-	0,52 <sup>a</sup>	0,77 <sup>d</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>
IL-8	0,78 <sup>d</sup>	0,72 <sup>d</sup>	0,52 <sup>a</sup>	-	0,87 <sup>d</sup>	0,76 <sup>d</sup>	0,81 <sup>d</sup>
IL-10	0,72 <sup>c</sup>	0,91 <sup>d</sup>	0,77 <sup>d</sup>	0,87 <sup>d</sup>	-	0,81 <sup>d</sup>	0,89 <sup>d</sup>
IL-23	0,79 <sup>d</sup>	0,74 <sup>d</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,76 <sup>d</sup>	0,81 <sup>d</sup>	-	0,88 <sup>d</sup>
IL-33	0,77 <sup>d</sup>	0,82 <sup>d</sup>	0,47 <sup>a</sup>	0,81 <sup>d</sup>	0,89 <sup>d</sup>	0,88 <sup>d</sup>	-

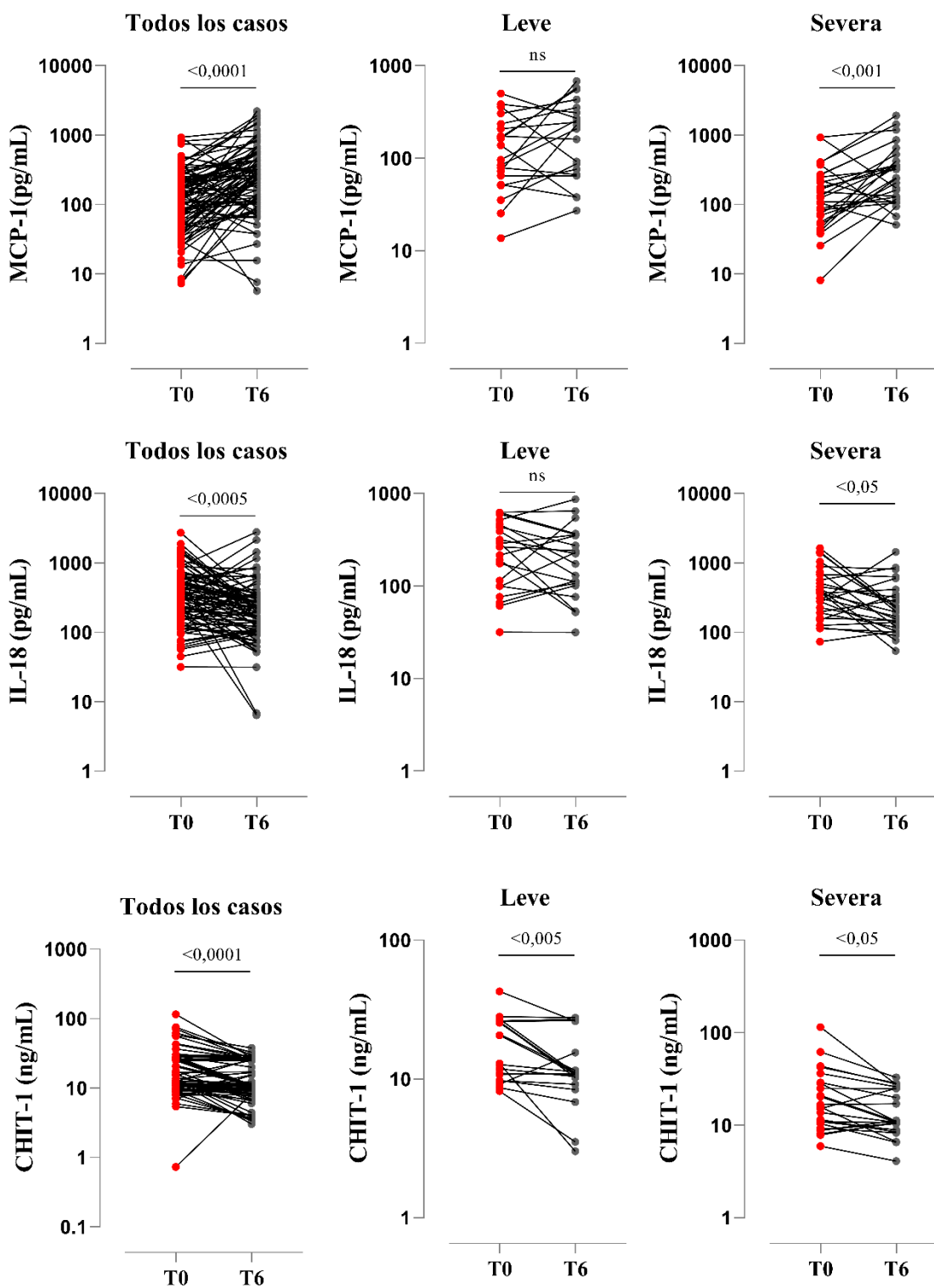
*Nota.* Se registran los valores de coeficiente de correlación de Spearman (r) estadísticamente significativos. Representación de valores de P: <sup>a</sup>P < 0,05; <sup>b</sup>P < 0,005; <sup>c</sup>P < 0,0005; <sup>d</sup>P < 0,0001. Cada valor se clasificó por color según la fuerza de correlación de la siguiente manera: negativa (r < 0-blanco), débil (r ≤ 0,35-rojo), moderada (0,36 ≥ r ≤ 0,67-amarillo) y fuerte (r ≥ 0,68-turquesa), como se propuso anteriormente (386).

## 6.7 Biomarcadores proinflamatorios al final del tratamiento

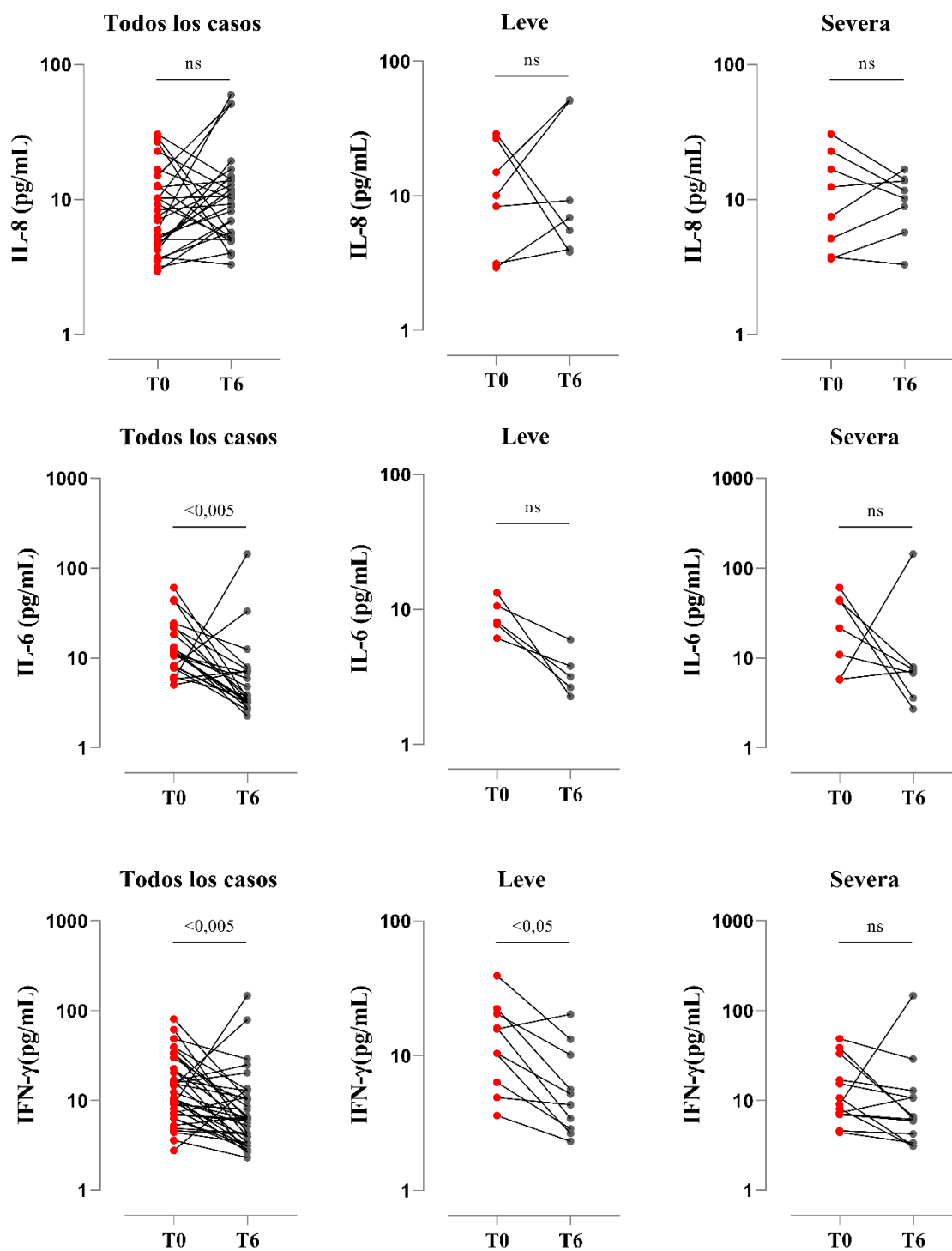
Con el objetivo de indagar si la severidad de la APTB tiene relación con el comportamiento de los analitos séricos en las personas al finalizar el tratamiento antibiótico; tomamos en consideración los resultados de la Figura 8 en donde se evidencia como los niveles séricos de IL-18, CHIT-1, IL-6 e IFN- $\gamma$  descienden y aumentan los de MCP-1 e IL-8 tras 6 meses de terapia. Aplicamos la Prueba de Rangos de Wilcoxon y comparamos los niveles plasmáticos de los analitos antes descritos en el T0 y T6, además realizamos la comparación entre los grupos de personas con APTB leve y severa, previamente observamos que estos 2 grupos presentan un comportamiento diferente.

Confirmamos el resultado para todas las citoquinas descritas excepto para la IL-8 y especialmente destacamos que MCP-1 se encuentra elevada al final del tratamiento de forma significativa en los pacientes con TB severa, no se encontraron diferencias con los casos leves, además, el IFN- $\gamma$  y la CHIT-1 descienden de forma significativa hacia el final del tratamiento, este resultado se reprodujo en ambos grupos de severidad en el caso de la CHIT-1 (Figura 13). Las diferencias en el resultado no pueden ser explicadas por los pacientes con TB severa en el caso del IFN- $\gamma$ .

**Figura 13.** Los individuos con TB pulmonar severa no presentan disminución de los niveles séricos de IFN- $\gamma$  después de finalizar el tratamiento





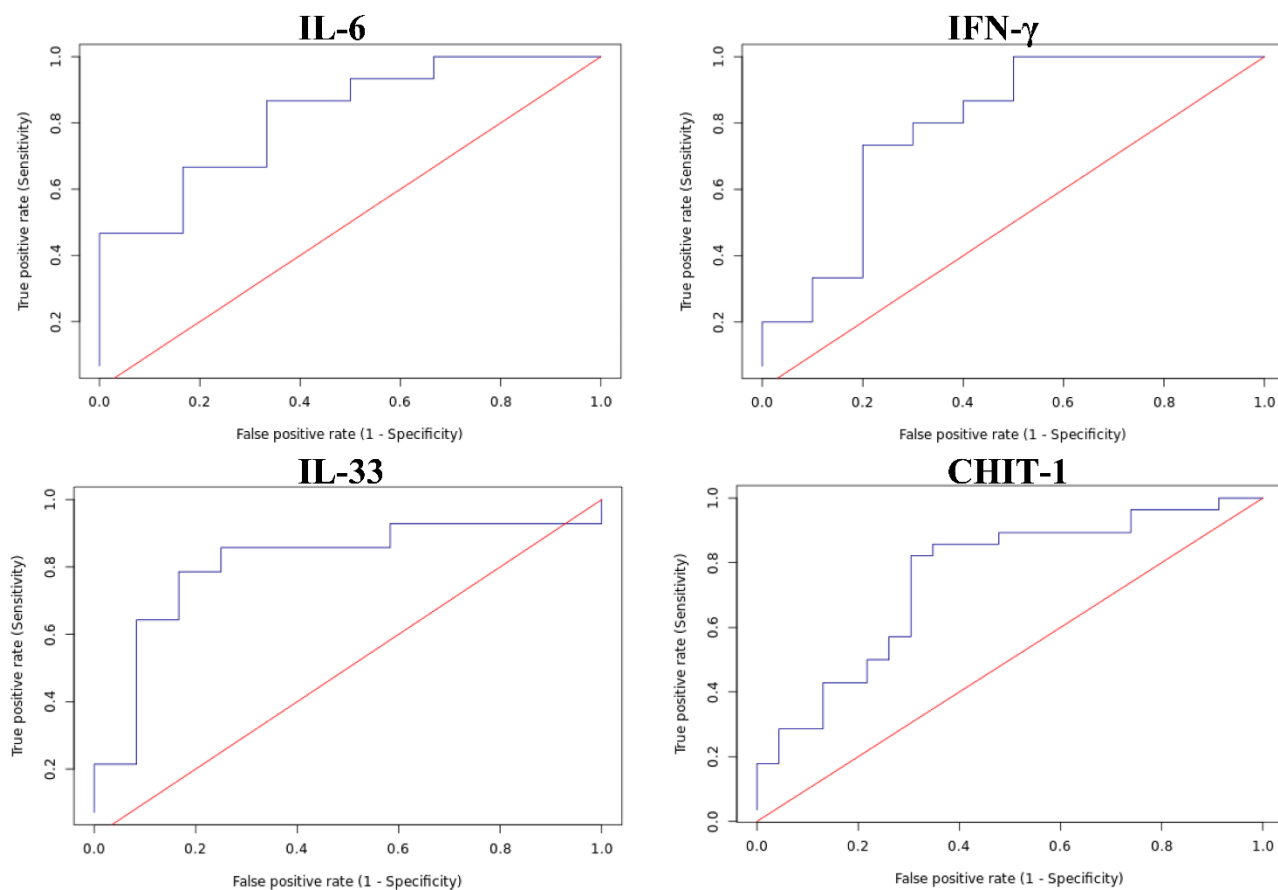


*Nota.* Se compararon los niveles séricos de analitos en individuos con APTB en el T0 (n=108) vs al finalizar el tratamiento (n=92). Se utilizó la prueba de rangos de Wilcoxon con una prueba de hipótesis a dos colas. Los valores de *P* significativos se representan en las figuras.

## **6.8 Citoquinas séricas y CHIT-1 para distinguir entre una TB leve y severa después de 8 semanas de tratamiento**

Como muestran los resultados en la Figura 10 los niveles séricos de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 y CHIT-1 en el grupo de personas con TB severa fueron significativamente más altos que en el grupo de TB leve. De acuerdo con esto realizamos un análisis mediante curvas ROC para determinar la exactitud diagnóstica de los niveles de citoquinas y CHIT-1, en relación con la severidad de la APTB. Las AUC fueron 0,82 (IL-6), 0,79 (IFN- $\gamma$ ), 0,81 (IL-33) y 0,75 (CHIT-1) (Figura 14). En la Tabla 6 se describe en detalle los valores de sensibilidad, especificidad y el mejor punto de corte, según el método de Youden.

**Figura 14.** Curvas ROC para estimar la capacidad de biomarcadores séricos de distinguir entre una TB leve y severa



*Nota.* ROC, Característica Operativa del Receptor; CHIT-1, Quitinasa 1

**Tabla 6.** Valores de curvas ROC para discriminar TB leve vs severa

Citoquinas	TB leve vs severa			
	Punto de corte	AUC (IC 95%)	Sensibilidad	Especificidad
<b>IL-6</b>	3,92 (pg/ mL)	0,82 (0,62-1)	0,86	0,66
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	7,36 (pg/ mL)	0,79 (0,59-0,99)	0,73	0,80
<b>IL-33</b>	83,79 (pg/ mL)	0,81 (0,62-0,99)	0,78	0,83
<b>CHIT-1</b>	13,25 (ng/ mL)	0,75 (0,61-0,89)	0,82	0,69

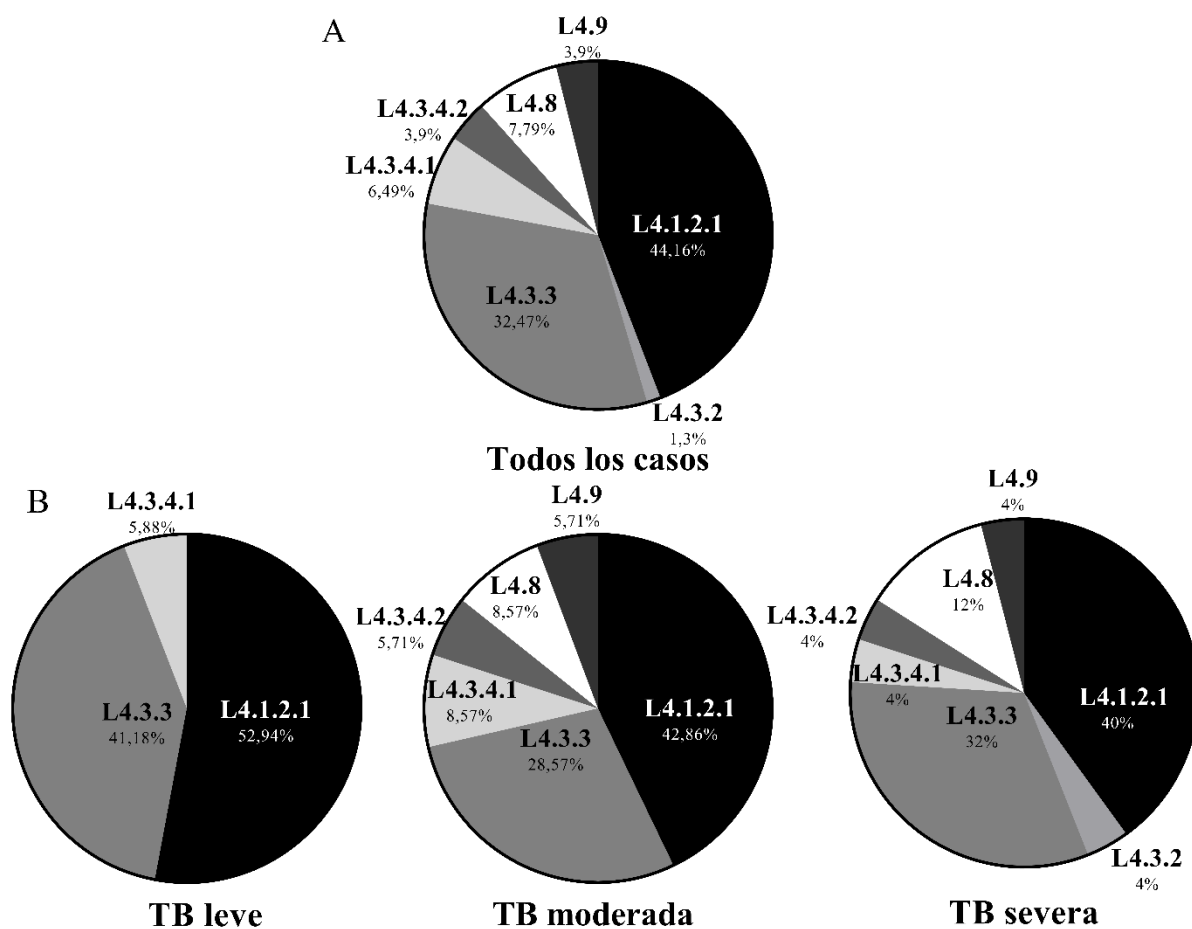
*Nota.* El punto de corte fue calculado utilizando el índice de Youden. AUC, Área Bajo la Curva

## 6.9 Análisis de los genomas completos de *Mtb* aislados de los pacientes de la cohorte KdpDE

Mientras hacíamos el seguimiento de los pacientes, recuperamos el bacilo de muestras de esputos para cultivo y posterior extracción de ADN siguiendo el protocolo descrito en la sección de metodología. Luego de la secuenciación completa de 81 genomas, se excluyeron 4 debido a una alta frecuencia de AltSNPs. El linaje y sublinaje fueron predichos mediante TB-Profiler (<https://tbdr.lshtm.ac.uk/>) (387); todos los aislados fueron clasificados dentro del linaje del MTBC, L4. Dentro de la clasificación por sublinajes, L4.1.2.1 es el sublinaje predominante presentando una frecuencia de 44,1%, seguidamente el sublinaje L4.3.3 con una frecuencia de 32,4% el resto de sublinajes están descritos en la Figura 15.

En Latinoamérica predomina el linaje 4 o Euroamericano, con variaciones considerables entre y dentro de los países (388). Algunos reportes publicados en Colombia durante los últimos 10 años en poblaciones diversas, incluyendo personas privadas de la libertad, población indígena, personas con aislados MDR, personas que viven con VIH y provenientes de 31 departamentos de Colombia, gran parte de estos estudios han sido liderados por el INS, máximo órgano encargado de la vigilancia de la salud pública en Colombia, todos estos estudios de carácter descriptivo han tenido como objetivo especificar los genotipos de *Mtb* en nuestro país (388–398). Estos concuerdan, que en Colombia predominan dos familias (Haarlem y LAM) de aislados que pertenecen al L4. La mayoría de estos estudios utilizaron métodos de genotipificación como IS6110-RFLP, spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 loci. Dadas las ventajas ofrecidas por la secuenciación del genoma completo (WGS) (399). En el presente estudio se utilizó este último método para secuenciar un total de 81 aislados clínicos de *Mtb*, obtenidos de la misma región geográfica. El método WGS, gracias a su mayor resolución, en comparación con los previamente utilizados, permite definir con mayor precisión los AltSNPs.

**Figura 15.** Linaje 4 y sus diferentes sublinajes en pacientes del Área Metropolitana del Valle de Aburrá

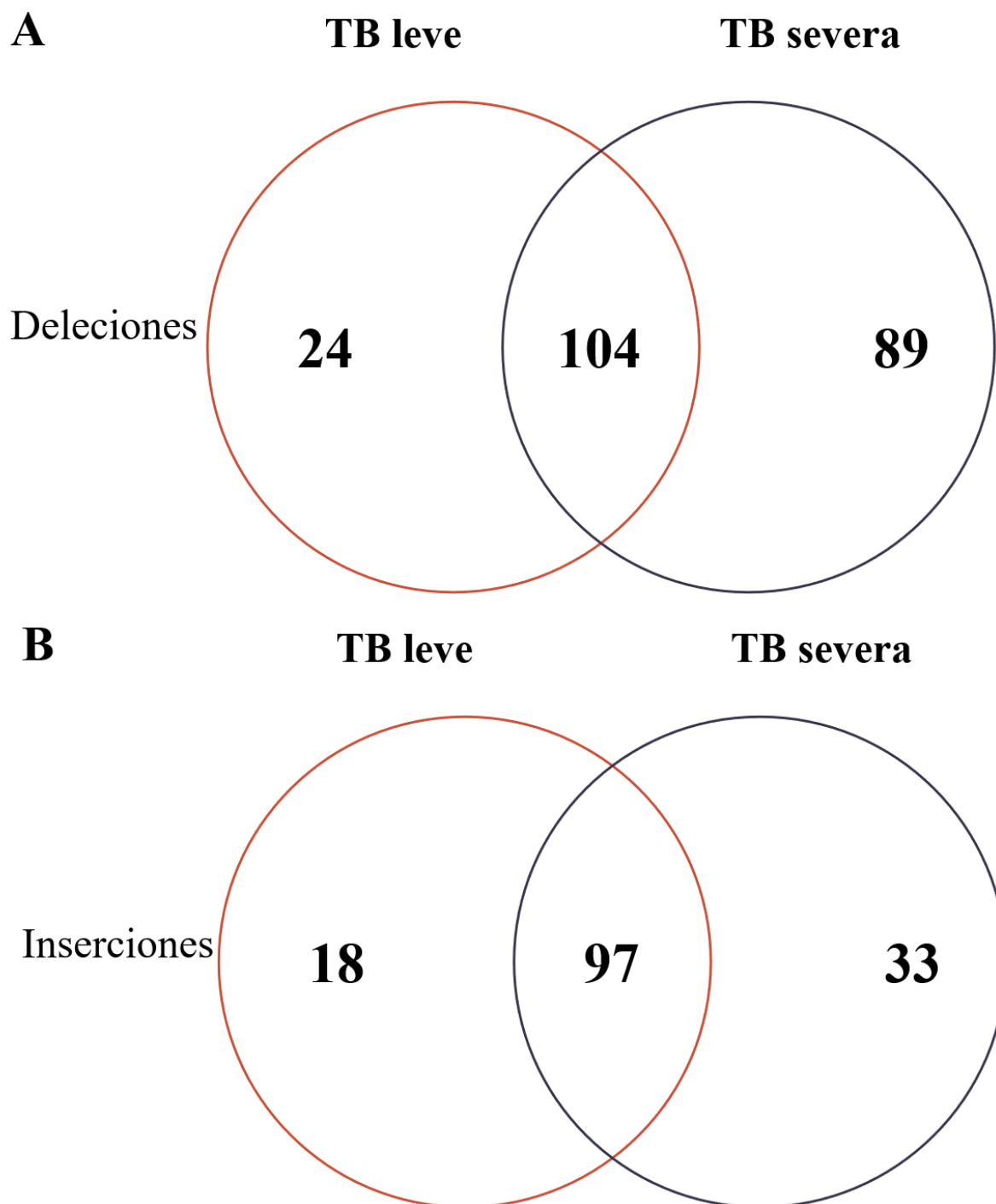


*Nota:* Se muestra la distribución de los sublinajes que fueron asignados a cada aislado de *Mtb* usando el servidor web TB-profiler. **A.** 77 aislados de *Mtb* de pacientes con TB. **B.** TB leve: 17 aislados de *Mtb* de pacientes con TB leve, TB moderada: 35 aislados de *Mtb* de pacientes con TB moderada y TB severa: 25 aislados de *Mtb* de pacientes con TB severa.

## **6.10 Polimorfismos comunes en grupos de aislamientos clínicos de *Mtb* presentes en pacientes con TB severa**

Para buscar determinantes genómicos bacterianos que pudiesen explicar respuestas diferenciales de citoquinas en los pacientes con TB severa, secuenciamos el genoma completo de 81 aislados clínicos de *Mtb*, se excluyeron 4 debido a la razón antes mencionada. Realizamos un primer análisis con el fin de encontrar diferencias en los grupos con severidades extremas (TB leve y severa). Encontramos un total de 365 inserciones y deleciones (indels) en las regiones codificantes en comparación con el genoma de referencia de *Mtb* H37Rv. Del total de deleciones mapeadas (n=217), 104 de ellas fueron comunes a los pacientes con TB leve y TB severa, mientras 24 fueron únicas para pacientes con TB leve, y 89 para TB severa (Figura 16A); con respecto al total de inserciones mapeadas (n=148), 97 de ellas fueron comunes a los pacientes con TB leve y TB severa, mientras 18 fueron únicas para pacientes con TB leve, y 33 para TB severa (Figura 16B)

**Figura 16.** Diagrama de Venn que agrupa el recuento de deleciones/inserciones únicas y compartidas, presentes en los aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB pulmonar leve y severa



*Nota.* Para realizar los conjuntos excluimos las regiones intergénicas, las regiones repetitivas y para los genes *ppe* y *pe\_pgrs* solo dejamos una variante en caso de presentarse múltiples polimorfismos en el mismo gen (Anexo 5, Tabla suplementaria 2).

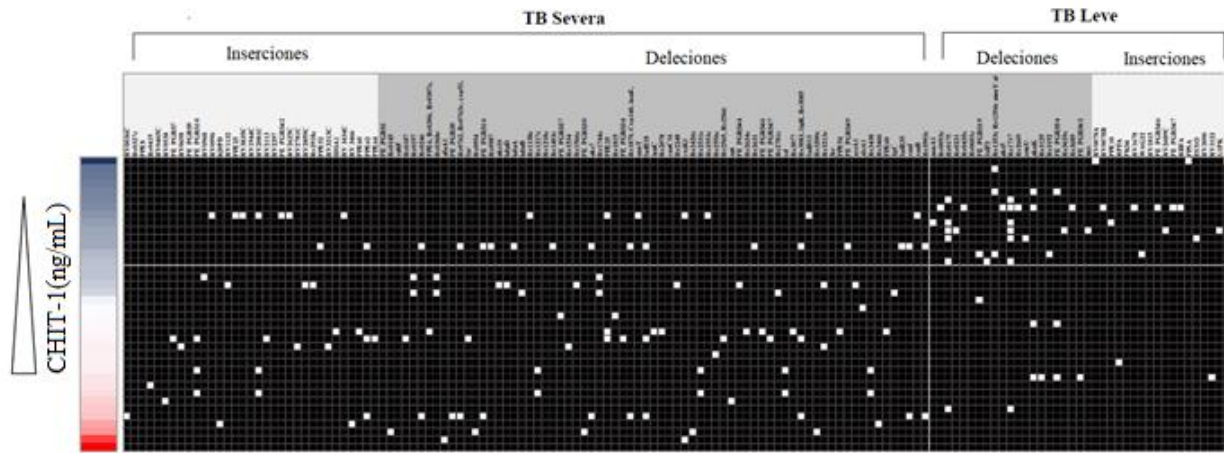


## **6.11 Polimorfismos comunes en grupos de aislamientos clínicos de *Mtb* inductores de altos niveles séricos de CHIT-1 en pacientes con TB pulmonar después de 2 meses de tratamiento**

Para determinar si existe una asociación entre la presencia/ausencia de Indels únicos con TB severa y los niveles de analitos cuantificados en plasma, realizamos una tabla de concordancias entre los niveles séricos de los analitos medidos organizados de menor a mayor concentración en T0, T2 y T6, tomando como punto de corte lo indicado por el índice de Youden y lo comparamos con la presencia o ausencia de genes (Anexo 5, Tabla suplementaria 2) con polimorfismos en los aislados de *Mtb* de pacientes con APTB leve o severa; para generar la lista de genes y conocer su función excluimos las regiones intergénicas, las regiones repetitivas y para los genes *ppe* y *pe\_pgrs* solo dejamos una variante en caso de presentarse múltiples polimorfismos en el mismo gen (Figura 17). Este análisis fue realizado previamente por Saraiva y colegas (363). No se encontró un patrón claro de asociación entre severidad de la TB, los niveles de citoquina/enzima y polimorfismos, en T0 y T6; solo se encontró un patrón de asociación con CHIT-1 (Figura 17) e IFN- $\gamma$  (Anexo 5, Figura suplementaria 3). Puesto que solo los niveles de CHIT-1 se pudieron medir en la mayoría de muestras séricas de los pacientes, el análisis posterior de contingencia se centró en examinar la significación de la asociación de los polimorfismos con esta enzima

Teniendo en cuenta el punto de corte, se encontraron 2 grupos de polimorfismos enriquecidos. El primero en la esquina inferior izquierda de la figura 17, que corresponde a los polimorfismos que se asociaron con TB severa y altos niveles séricos de CHIT-1 (n=91). El otro grupo, asocio 43 polimorfismos con TB leve y bajos séricos niveles de CHIT-1. Realizamos un análisis de tablas de contingencia que permite conocer si dos clasificaciones están asociadas, para esto realizamos una tabla de 2x2 (Anexo 5, Tabla suplementaria 1), que mostro diferencias significativas entre los grupos de genes con polimorfismos y los niveles séricos de CHIT-1 (Tabla 7). Además, este patrón de polimorfismos descritos, dado el cálculo de OR para cuantificar la fuerza de la asociación entre dos eventos, incrementa 11,48 veces la probabilidad de que un paciente con altos niveles séricos de CHIT-1 en el T2 padezca una TB severa, con una sensibilidad de un 79 % y una especificidad de un 74%. Sugiriendo que estos polimorfismos podrían ser candidatos de pruebas moleculares pronósticas de gravedad en pacientes con TB.

**Figura 17.** Polimorfismos comunes en grupos de aislamientos clínicos de *Mtb* inductores de altos niveles séricos de CHIT-1 en pacientes con TB pulmonar después de 2 meses de tratamiento



*Nota.* El punto de corte es de 13,25 ng/ mL y separa los niveles séricos bajos y altos de CHIT-1; fue calculado utilizando el índice de Youden. El color gris claro representa las inserciones unicas por grupo de severidad, el color gris oscuro representa las deleciones unicas por grupo de severidad; la parte izquierda de la figura representa los polimorfismos encontrados en los aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB severa y la parte derecha representa los polimorfismos encontrados en los aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB leve; genes con (cuadrados blancos) o sin polimorfismos (cuadrados negros).

**Tabla 7.** Análisis estadístico del patrón de inserciones/deleciones presentes en aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB pulmonar severa

<b>ANALISIS</b>	<b>TOTAL</b>	
<b>Valor de P y significación estadística</b>	Prueba exacta de Fisher	
<b>Prueba</b>		
<b>Valor de P</b>	<0,0001	
<b>Tamaño del efecto</b>	valor	95% CI
<b>OR</b>	11,48	5,28-23,83
<b>Sensibilidad</b>	0,79	0,67-0,88
<b>Especificidad</b>	0,74	0,66-0,81
<b>Valor predictivo positivo</b>	0,58	0,46-0,68
<b>Valor predictivo negativo</b>	0,89	0,81-0,93

*Nota.* Los datos para realizar la prueba exacta de Fisher se registran en la (Anexo 5, Tabla suplementaria 1). OR: razón de probabilidades

## 6.12 Análisis de enriquecimiento funcional para los genes con polimorfismos asociados con la severidad de la TB

En la Figura 18 encontramos los genes asociados a los polimorfismos presentes en aislados clínicos de *Mtb*, de pacientes con TB severa.

**Región 1:** Dentro de esta región encontramos polimorfismos que están presentes en un sistema regulador de dos componentes KdpD/KdpE implicado en la regulación del operón *kdp* (*rv1028c*) y otros relacionados con una ATPasa transportadora de potasio (*kdpB- kdpA*).

Este sistema de dos componentes responde frente a señales ambientales como niveles bajos de iones de potasio, desequilibrio osmótico, estrés por ácidos y nutriente (400). Además, se presentó un polimorfismo en la proteína Rv3200c, un canal de potasio putativo (401).

**Región 2:** Esta región corresponde a la familia de proteínas PPE y PE\_PGRS. Evidenciamos un polimorfismo en *rv3881c*, *espB* una proteína secretada por ESX-1, su secreción es co-dependiente de CFP-10 y ESAT-6. Este gen inhibe la autofagia inducida por IFN- $\gamma$  en macrófagos murinos (240). *pe\_pgrs30* presentaba otro polimorfismo, este interviene en la supresión de la respuesta inmunitaria proinflamatoria en los macrófagos a través de la modulación de la respuesta de las citoquinas del huésped, además, está relacionada con la latencia de la micobacteria (402). Datos interesantes se han obtenido por medio de la inactivación de PE\_PGRS30, que evidenció un fenotipo atenuado en macrófagos murinos y humanos debido a la incapacidad del mutante *Mtb* para inhibir la fusión del fago-lisosoma (403). Por otra parte, evidenciamos un polimorfismo en el gen que codifica la proteína de canal con toxina inductora de necrosis *Rv3903c*, (CpnT), la cual tiene una doble función en la absorción de nutrientes y la inducción de la muerte de la célula huésped. Ambas funciones son necesarias para la supervivencia, replicación y citotoxicidad de *Mtb* en macrófagos (404). Otros polimorfismos se presentaron en *ppe54*, *pe\_pgrs44* y *rv0538*.

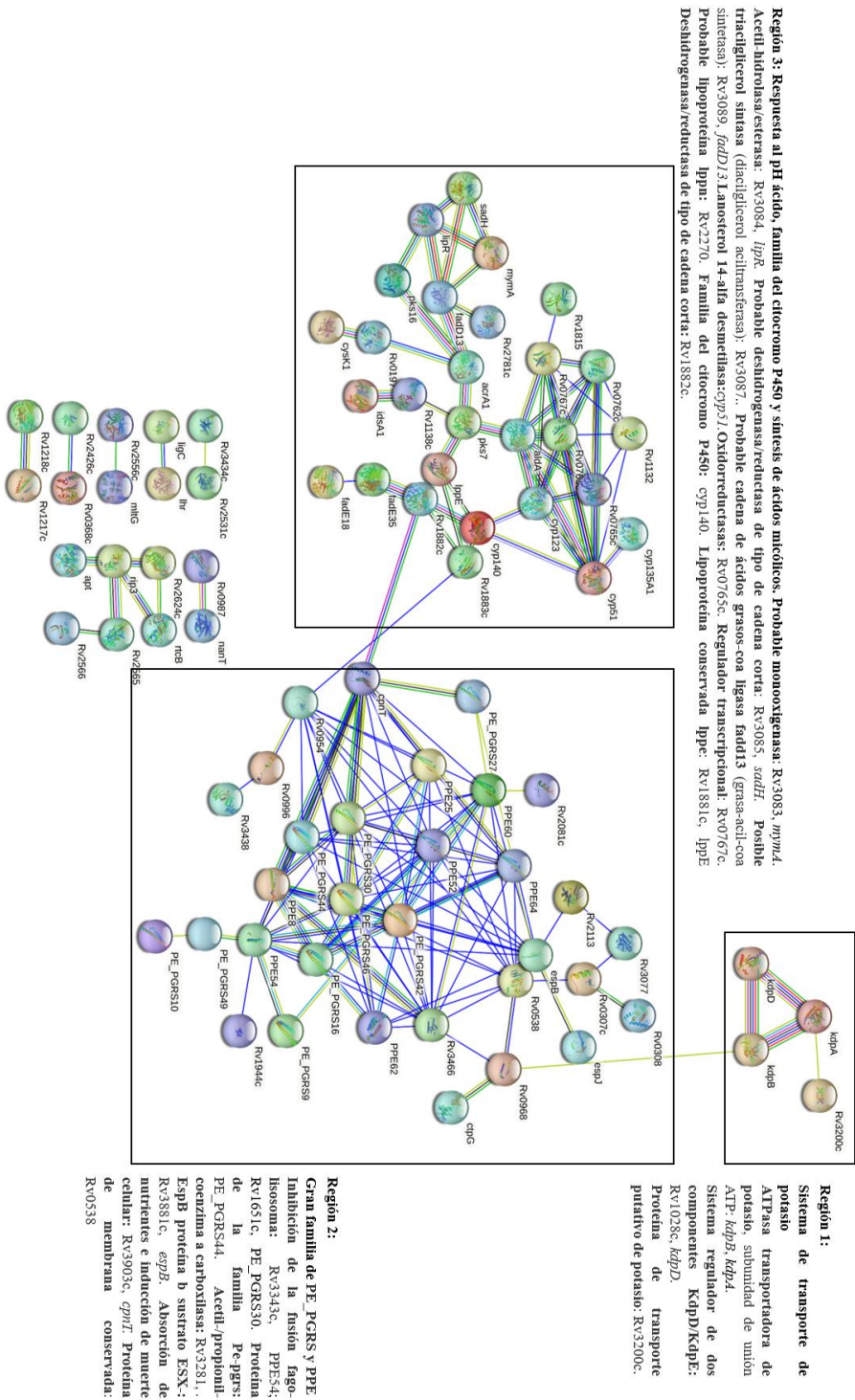
**Región 3:** En esta región se observan polimorfismos en un gen que pertenece a la familia del citocromo P450 *rv2268c*, el cual es particularmente importante debido a su participación en la síntesis de moléculas de transporte de electrones como la menaquinona-9 (MK9) (405).

En una lipoproteína LppN codificada por el gen *rv2270* involucrada en el reconocimiento bacteriano y la absorción por parte de su huésped (406). Entre otras proteínas no caracterizadas Rv2273 y Rv2272 (407). Destacamos en esta región polimorfismos presentes en genes que codifican para proteínas que participan en la vía de biosíntesis de ácidos micólicos (monooxigenasa- *mymA*, tioesterasa- *lipR*, deshidrogenasa- *sadH*, acyl coA sintasa-*rv3087*, *rv3088* y *fadD13*) (408). Además del gen que codifica para la proteína MymA es necesaria para mantener la permeabilidad de la envoltura de la micobacteria en su exposición a pH ácido (408,409). La proteína Rv3083 actúa como un agonista de TLR2 y activa a los macrófagos para producir una respuesta inmunitaria Th1 (408). De forma interesante evidenciamos un polimorfismo en la esterasa LipR codificada por el gen *rv3084*, la cual ayuda a *Mtb* a resistir el entorno hostil dentro del huésped y, al mismo tiempo, actúa como un modulador inmunitario para inhibir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y, en consecuencia, afectar el efecto letal del sistema inmunitario del huésped contra *Mtb*(410). Encontramos un polimorfismo en el gen que codifica para una proteína que pertenece a la familia del citocromo P450 *rv1880c*, *cyp140* (411). Además, en una lipoproteína de membrana que contiene una secuencia señal para un sitio de unión de lípidos LppE; *rv1881c* (412). El ácido pimélico es precursor de la síntesis de biotina en las micobacterias, es un micronutriente esencial necesario para la supervivencia del organismo, encontramos un polimorfismo en una deshidrogenasa/reductasa que pertenece a esa vía de biosíntesis, *rv1882c* (413). También evidenciamos un polimorfismo en el gen *rpfC* implicado en la reactivación de micobacterias latentes (414). Finalmente evidenciamos un polimorfismo en el gen que codifica para una proteína puede inducir efectivamente una fuerte respuesta inmune de tendencia Th1 y una respuesta humoral, la proteína FbpB, Rv1886c (415). En esta región encontramos un polimorfismo en una la proteína Fdx (Rv0763c), además, en *cyp51* que codifica la esterol-14 alfa-desmetilasa la cual hace parte de la familia del citocromo P-450 (416,417). Además, se presentó un polimorfismo en una proteína reguladora transcripcional Rv0767c (418).

En el anexo 5, figura suplementaria 4 se representan los genes asociados a los polimorfismos presentes en aislados clínicos de *Mtb*, de pacientes con TB leve. Por otro lado, el análisis de enriquecimiento funcional para los genes asociados a polimorfismos presentes en aislados clínicos de *Mtb*, de pacientes con TB severa mostró una gran red en la cual se resaltan las categorías de Gene Ontology (GO) las cuales se presentan en la tabla 8 según la fuerza, esta describe qué tan grande es el efecto de enriquecimiento y es la relación entre 1) la cantidad de proteínas en su red

que están anotadas con un término y 2) la cantidad de proteínas que esperamos que estén anotadas con este término en una red aleatoria del mismo tamaño. También mostramos el valor de la tasa de falso descubrimiento (FDR, por sus siglas en inglés), esta medida describe qué tan significativo es el enriquecimiento. Para función molecular se evidenció la actividad de la ATPasa transportadora de K<sup>+</sup> (FDR= 1,45e-05), en procesos biológicos se evidenció: 1) Respuesta al pH ácido (FDR= 2,13e-11); 2) Proceso biosintético de triglicéridos (FDR= 0,0482); 3) Respuesta al óxido nítrico (FDR= 0,0482); 4) Proceso metabólico del glicerol (FDR= 0,0482). Con respecto al componente celular, mostraron: 1) Componente integral de la membrana plasmática (FDR= 0,0371) y 2) Componente integral de la membrana (FDR= 0,0371). Además, entre las Palabras Claves UniProt destaca sistema regulador de dos componentes (FDR=1,30e-05). Dentro de las Vías KEGG se destaca el sistema de dos componentes (FDR=1,58e-05). Finalmente describimos los Dominios y características de proteína (InterPRO) se encontró la Familia PE-PGRS, terminal N (FDR=0,0192).

**Figura 18.** Análisis de enriquecimiento funcional de genes asociados a los polimorfismos presentes en aislados clínicos de *Mtb*, de pacientes con TB severa



*Nota.* Se representan los genes asociados a los polimorfismos presentes en aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB severa.

**Tabla 8.** Enriqueciendo funcional para los polimorfismos presentes en aislados de *Mtb* de pacientes con TB severa (entregada por la herramienta STRING)

	Termino GO	Descripción	Genes incluidos en el grupo	Fuerza	False Discovery Rate (FDR)
<b>Función molecular</b>	GO:0008556	Actividad de la ATPasa transportadora de K <sup>+</sup>	3 de 3	2,91	1,45e-05
<b>Proceso biológico</b>	GO:0010447	Respuesta al pH ácido	6 de 16	2,4	2,13e-11
<b>Proceso biológico</b>	GO:0019432	Proceso biosintético de triglicéridos.	2 de 17	1,9	0,0482
<b>Proceso biológico</b>	GO:0071731	Respuesta al óxido nítrico	2 de 19	1,85	0,0482
<b>Proceso biológico</b>	GO:0006071	Proceso metabólico del glicerol	2 de 22	1,79	0,0482
<b>Componente celular</b>	GO:0005887	Componente integral de la membrana plasmática	3 de 110	1,34	0,0371
<b>Componente celular</b>	GO:0016021	Componente integral de la membrana	4 de 388	0,92	0,0371
<b>Palabras clave Uniprot</b>		<b>Descripción</b>	<b>Genes incluidos en el grupo</b>	<b>Fuerza</b>	<b>False Discovery Rate (FDR)</b>
<b>KW-0633</b>		Transporte de potasio	3 de 5	2,68	1,30e-05
<b>KW-0902</b>		Sistema regulador de dos componentes	2 de 29	1,74	0,0286
<b>KW-0597</b>		Fosfoproteína	3 de 87	1,44	0,0066
<b>KW-1003</b>		Membrana celular	4 de 462	0,84	0,0338
<b>Vías KEGG</b>		<b>Descripción</b>	<b>Genes incluidos en el grupo</b>	<b>Fuerza</b>	<b>False Discovery Rate (FDR)</b>
<b>mtv02020</b>		Sistema de dos componentes	5 de 162	1,4	1,58e-05
<b>Dominios y características de proteínas (InterPRO)</b>		<b>Descripción</b>	<b>Genes incluidos en el grupo</b>	<b>Fuerza</b>	<b>False Discovery Rate (FDR)</b>
<b>IPR000084</b>		Familia PE-PGRS, terminal N	12 de 88	0,69	0,0192



## 7. Discusión y perspectivas

El espectro de la severidad de la APTB aún no está definido, para lo cual se necesitan biomarcadores moleculares, séricos y clínicos asociados con la severidad y respuesta al tratamiento de la TB (162). Este estudio propone una serie de biomarcadores proinflamatorios al final del tratamiento, identificamos que MCP-1 e IL-8 aumenta con respecto el momento del diagnóstico al final del tratamiento e IL-18, IL-6, IFN- $\gamma$  y CHIT-1 disminuyen al final del tratamiento. En estudios de pacientes con APTB se ha descrito que antes del tratamiento hay una disminución significativa de los niveles séricos de MCP-1 con respecto a sujetos sanos y con LTBI (211,419). Este hecho es consecuente con nuestros resultados y podría ser explicado por la monocitosis que se presenta en las etapas agudas de la enfermedad; con el posterior requerimiento de MCP-1 para el desplazamiento de estos al sitio de infección (420). Después del inicio del tratamiento los pacientes con TB presentan un incremento significativo de MCP-1 alcanzando niveles iguales a los sujetos sanos con LTBI hacia la quinta semana de tratamiento (197), este incremento se mantiene hasta completar el tratamiento y se ha reportado que no hay diferencias con respecto a individuos sanos (230,421). El comportamiento de MCP-1 durante la TB puede sugerir cierta restauración de la función inmune del huésped y de la medula ósea generando niveles fisiológicos de monocitos con función normal, una vez se tiene control de la carga bacteriana inducida por la quimioterapia (211,212,422). Sin embargo, se requieren estudios con tamaño de muestra mucho mayor y con un seguimiento más largo después de terminar la terapia antibiótica para tener más claridad de estos hechos. De forma interesante los niveles elevados de MCP-1 pueden estar relacionados con el desarrollo de una memoria efectiva de células T al final del tratamiento, esto se ha evidenciado en ratones *CCR2*<sup>-/-</sup>, los cuales presentan retraso en el cebado de linfocitos T en el ganglio linfático mediastinal (MLN) y acumulación deficiente de células T CD4 + y CD8 + en los pulmones (423). Esto conlleva a la incapacidad de controlar el crecimiento de *Mtb* (423).

La IL-6 junto a la IL-18 son citoquinas pro-inflamatorias y después de una terapia medica eficaz, se ha evidenciado en individuos con APTB disminuyen las concentraciones séricas, lo cual podría sugerir la inducción de mecanismos inmunitarios reguladores que conducen a la restauración de la homeostasis inmunitaria. Por esta razón pueden ser un biomarcador del efecto del tratamiento. En este mismo sentido CHIT-1 un marcador de inflamación en múltiples enfermedades, se encontró que disminuía después del tratamiento en 54 pacientes con APTB, lo cual es consistente con

nuestros resultados (82,145,289). Con respecto a la IL-8 la evidencia reportada es ambigua cuando se ha medido en pacientes con TB (145,290), sin embargo, siendo una quimioquina proinflamatoria observamos como aumenta al final del tratamiento y es llamativo que junto con MCP-1 son producidas por células endoteliales (424), lo cual podría sugerir una homeostasis del endotelio afectado por la inflamación durante la TB. El IFN- $\gamma$  ampliamente conocido por su papel de activación de macrófagos alveolares potenciando su capacidad de destruir al patógeno, se ha demostrado en pacientes con TB que disminuyen al completar el tratamiento (291).

Aunque no encontramos diferencias significativas es interesante destacar como observamos una tendencia al descenso de los niveles séricos de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  al finalizar el tratamiento antibiótico. El descenso de la IL-1 $\beta$ , una citoquina que participa en la respuesta innata inducida por el reconocimiento de receptores de vigilancia citosólicos, ha sido descrito en pacientes con TB (157,162,425). El TNF- $\alpha$  es crucial para la protección contra la infección por *Mtb*, en especial para la formación del granuloma (197), contiene la infección persistente y previene la reactivación (196). Sin embargo, también se ha demostrado que los niveles altos de TNF- $\alpha$  pueden promover la diseminación del granuloma, la progresión de la infección y el aumento de la patología (426). Se ha evidenciado el descenso del TNF- $\alpha$  con el tratamiento antibiótico en TB (207,425,427).

Otro de los hallazgos importantes en este trabajo fue encontrado hacia la semana 8 después de haber iniciado el tratamiento antibiótico, los niveles séricos de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 y CHIT-1 podrían utilizarse como biomarcadores para identificar pacientes con TB severa. Los niveles séricos de IFN- $\gamma$  medidos después de 8 semanas de tratamiento en una cohorte de 102 pacientes con APTB en la ciudad de Calcuta se correlacionaron de forma significativa con IMCs bajos, este hecho se presentó igualmente antes del tratamiento, adicionalmente en este mismo estudio, el IFN- $\gamma$  se correlaciono de forma positiva con la carga bacilar (163), como lo mencionamos anteriormente el peso y la carga bacilar son características de una TB más severa, estas variables fueron aplicadas en nuestro sistema de clasificación.

En un estudio de cohorte realizado en Hong Kong en el año 2016, el cual tenía criterios de inclusión similares a los nuestros, pacientes adultos con APTB sin comorbilidades, con la diferencia que estos pacientes fueron reclutados durante un episodio de hospitalización en el que fueron diagnosticados (232). En este estudio se documentaron de forma fiable dado la disposición de los datos, diferentes desenlaces relacionados con severidad; se demostró que los niveles séricos

de IL-6 se correlacionan significativamente con la carga micobacteriana, el grado de consolidación radiográfica, la puntuación de gravedad de la TB y la duración de la fiebre y la hospitalización (232).

La IL-33 no ha sido relacionada con la severidad de la APTB. Sin embargo, se sabe que es una citoquina clave involucrada en la respuesta Th2 (371). Lo cual puede ser permisivo para el crecimiento, replicación de *Mtb* y progresión de la TB. Por otra parte, la IL-33 puede estar implicada en la patogenia y el desarrollo de la pleuresía tuberculosa, y tiene un valor diagnóstico importante para esta patología (429).

Inicialmente la enzima CHIT-1 se asoció con la inmunidad innata, en relación a los patógenos recubiertos de quitina. Por lo tanto, se identificó como un importante marcador no específico de la activación de los macrófagos, dado que es uno de las principales proteínas producidas por estas células cuando son activadas (430). Hoy se sabe que también media muchos procesos inflamatorios, dado que aumenta la capacidad migratoria de muchas células inmunológicas, incluidos los linfocitos T, los macrófagos y los eosinófilos (287,288).

Actualmente CHIT-1 es un marcador de cribado, marcador de gravedad establecido o propuesto para más de 40 enfermedades diferentes (270). Como mencionamos previamente, Lavalett y colegas encontraron por medio de perfiles transcripcionales de micromatrices de AMsTB en muestras de lavado bronco alveolar (BAL), un perfil de expresión génica único de 51 genes, incluidos los genes regulados al alza CHIT1 y CHI3L1 (98). En TB el conocimiento aún es escaso, a pesar de esto, hay registros de pacientes con APTB en los que se ha evidenciado que los niveles séricos se correlacionan de forma positiva y significativa con la extensión de la enfermedad, evidenciado en la radiografía de tórax (291), hecho que se reprodujo en nuestros resultados y por lo cual sugerimos que los niveles séricos de CHIT-1 podrían constituirse en un marcador clínico de la severidad de la enfermedad.

Posteriormente determinamos la exactitud diagnóstica de estos analitos encontrados elevados en los pacientes con TB severa mediante curvas ROC. Aunque hay bastante evidencia publicada en relación a la medición de citoquinas séricas y la asociación con severidad clínica, estos registros no implementan un sistema de clasificación de severidad, sino que la asociación se realiza por variables independientes como: extensión del compromiso pulmonar, presencia de

cavitaciones, carga bacilar, disminución del IMC, días de fiebre, días de hospitalización, negativización del cultivo a las 8 semanas entre otras. El uso de citoquinas como prueba clínica se ha descrito en relación al diagnóstico de pacientes con TB activa versus control o sujetos con TB latente (431–433).

Las pruebas clínicas como TB score- I y II aunque se ha relacionado con severidad de la enfermedad su aplicación en la investigación ha sido para predecir resultados fallidos en pacientes con TB en tratamiento, con respecto a la predicción de falla de tratamiento el AUC para predecir falla del tratamiento es de 0,67 y 0,71 para el TB score- I y II respectivamente y para predecir mortalidad el AUC es de 0,7 y 0,72 para el TB score- I y II (73). En el 2019 fue propuesto y validado un modelo predictivo de curación basado en parámetros clínicos, microbiológicos e inmunológicos, dicho modelo presento un AUC en el conjunto de entrenamiento de 0,81 y un AUC en el conjunto de validación de 0,71 (434). Teniendo en cuenta lo anterior, dado los resultados de la tabla 6 consideramos que la propuesta de los niveles séricos de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 y CHIT-1 para distinguir pacientes con TB severa vs leve a las 8 semanas desde el inicio de tratamiento podría ser una prueba promisoría que requiere validación en una segunda cohorte de pacientes con APTB.

Con respecto a la severidad de la enfermedad nos parece importante mencionar que no observamos diferencias entre los niveles de citoquinas entre pacientes con TB leve y moderada, como si se tratara de un espectro continuo de gravedad que se diferencia finalmente cuando el compromiso es mucho mayor. Aquí resaltamos los hallazgos en los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 e IL-23 también incrementados en los pacientes con TB severa en comparación con el grupo de personas con TB moderada.

Los niveles elevados de IL-1 $\beta$  e IL-10 medidos después de 8 semanas se han correlacionado de forma significativa con IMCs bajos, adicionalmente la IL-1 $\beta$  se ha correlacionado con la severidad radiológica de la enfermedad (163). Previamente en pacientes con APTB hospitalizados se demostró que los niveles séricos de IL-8/CXCL8 se correlacionan significativamente con la carga micobacteriana, el grado de consolidación radiográfica, la puntuación de gravedad de la TB y la duración de la fiebre y la hospitalización. Además, los análisis multivariados mostraron que la concentración de IL-8/CXCL8 fue un predictor independiente del desarrollo de insuficiencia respiratoria (232). Aunque nuestros resultados provienen de pacientes ambulatorios, la IL-8 también se encontró elevada en pacientes con TB severa lo cual directamente está relacionado con

mayor compromiso del parénquima pulmonar y de las variables clínicas, nuestros datos apoyan lo ya reportado en la literatura y sugieren la utilidad clínica para el pronóstico y seguimiento de la respuesta al tratamiento (232).

Con el fin de examinar la interacción coordinada entre las citoquinas y quimioquinas halladas en pacientes con APTB severa. Realizamos análisis de correlación, evidenciando el mayor número de correlaciones fuertes y significativas con las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-33 entre otras. La fuerte interacción de la IL-1 $\beta$  con otras citoquinas pro-inflamatorias en pacientes con APTB ha sido descrita, hecho que fue evidenciado en nuestros resultados (386). La correlación positiva y fuerte de la IL-33 y la IL-10 es explicada por el efecto inmunomodulador que se ha demostrado en estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*. En donde la IL-33 induce citoquinas Th2 a partir de mastocitos y células T polarizadas de ratón y conduce a inflamación pulmonar y de mucosa cuando se administra *in vivo* (435–437). Por otro lado, los basófilos derivados de la sangre humana responden a la IL-33 mediante la producción de varias citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 (435). Este hecho se relaciona con nuestros resultados al observar una correlación positiva y fuerte de la IL-33 y la IL-8. También se ha demostrado que la IL-33 puede mediar e incluso mejorar las respuestas inmunitarias celulares Th1 al aumentar el IFN- $\gamma$  (437). Algunos estudios también encontraron que la expresión de IL-33 está regulada por IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  (438,439). IFN- $\gamma$  no es sólo un regulador aguas arriba de IL-33, sino también un producto aguas abajo de la señalización de IL-33 (436,440). Este hecho concuerda con los resultados que evidenciamos.

En un estudio realizado en un municipio de Brasil con 17 pacientes con APTB se evidenció las múltiples correlaciones entre IFN- $\gamma$  y otras citoquinas pro-inflamatorias (386). El estado inmunitario de los macrófagos, las células T del huésped y la activación de IFN- $\gamma$ , controlan la estructura del granuloma, el cual tiene un papel central en la infección por *Mtb*, tratando de contener la infección por micobacterias (441). La correlación entre IL-1 $\beta$  e IL-8 se evidenció positiva y significativa en una cohorte de 34 pacientes con APTB (442). Dentro de las correlaciones con IFN- $\gamma$  se evidenció una interacción moderada con IL-18, la cual se ha evidenciado previamente (169). Se ha descrito en la respuesta inmune contra *Mtb*, que la IL-18 juega un papel importante en la activación de las células NK y la respuesta Th1, sin embargo, se conoce que la IL-18 no puede inducir el desarrollo de células Th1 y que la activación de células Th1 para producir IFN- $\gamma$  lo realiza

en presencia de IL-12, de esta forma se considera que la IL-18 aumenta la producción de IFN- $\gamma$  y nuestros resultados están en concordancia con este hecho (443–445).

La IL-10 conocida por hacer parte de la respuesta Th2, es una potente citoquinas inmunomoduladora que afecta las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas (446); la IL-10 puede ser producida tanto por células de la respuesta inmunitaria innata (macrófagos, monocitos, neutrófilos, DCs, células NK) como adaptativa (células T y B) (234). En el modelo murino, se ha demostrado que la sobreexpresión de IL-10 por macrófagos y monocitos altera la función de los macrófagos durante la infección por *Mtb*, lo que aumenta la susceptibilidad del huésped a la TB (447), sin embargo, por medio del análisis de células T CD4+ que provienen de muestras de BALF de pacientes con TB, se ha informado la producción tanto de IFN- $\gamma$  como IL-10 en respuesta a antígenos micobacterianos (448). Con respecto al rol de la IL-10 en diferentes momentos de la infección, se sabe que juega un papel central durante la etapa crónica/latente de la APTB, con un papel potencialmente importante en la promoción de la reactivación de la TB (449,450). Después que la enfermedad se ha establecido, se evidencia la producción de IL-10 por las células Th1 IFN- $\gamma$  + para regular a la baja la respuesta inmunitaria protectora del huésped (451). Esta evidencia en modelos animales es acorde con nuestros resultados en una cohorte de pacientes con TB.

En resumen, individuos con mayor severidad muestran niveles elevados de citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-8 o MCP-1) y a la vez presentan incremento de IL-10 una citoquina reguladora e inmunosupresora, además, un efecto marcado de citoquinas y factores inflamatorios tendientes a producir un perfil Th2 y M2 (MCP-1, IL-33 y CHIT-1).

Es decir, una elevada inflamación lleva a una inmunosupresión que causa parálisis de la respuesta inmune y permite la progresión de la TB con una marcada patología esto es mayor severidad.

Conocer si el comportamiento de las citoquinas al finalizar el tratamiento es diferente en pacientes según la severidad de la enfermedad fue la pregunta que se abordó en los resultados de la Figura 13, destacamos que en todos los pacientes el IFN- $\gamma$  disminuye al finalizar el tratamiento antituberculoso, sin embargo, en pacientes con TB severa no hay diferencias significativas cuando se compara el T6 vs T0. Los participantes con TB severa en nuestro estudio egresaron como

curados del programa nacional de TB según los criterios clínicos y microbiológicos, a pesar de ello, no hay una recuperación completa de la homeostasis inmunológica en estos pacientes al finalizar el tratamiento, lo cual va en consonancia con lo reportado por Berry y colegas, al evidenciar por medio de firmas transcripcionales en células purificadas de pacientes con TB que incluso un año posterior al inicio del tratamiento persiste la alteración en vías de señalización tanto de IFN- $\gamma$  como de IFN- $\alpha$  (99).

Históricamente, los esfuerzos de investigación en TB se han centrado principalmente en la fase aguda de la tuberculosis, en el tratamiento de la misma y en la prevención de su aparición. Desafortunadamente, se ha dedicado mucha menos atención a las secuelas de la tuberculosis pulmonar y la mayoría de estudios publicados han evaluado la función respiratoria solo mediante el uso de espirometría simple (452,453). La TB es una enfermedad crónica y las secuelas posteriores a la TB están presentes hasta en el 60-90% de los pacientes, que experimentan limitaciones para el ejercicio y tienen una calidad de vida comprometida (452). La finalización del tratamiento de la tuberculosis podría marcar el comienzo de una enfermedad respiratoria crónica (453). Además de esto a pesar de un fuerte régimen de medicamentos por 6 meses, aproximadamente el 5% de los pacientes con TB recaen en dos años (454), y esto es debido en parte a que la toma de decisiones para finalizar el tratamiento se basa en criterios de mejoría clínicos tales como disminución de la tos, la expectoración, ausencia de fiebre, aumento de peso y en la ausencia de micobacterias en las muestras analizadas, idealmente por cultivo, aunque en la mayoría de los casos es la baciloscopia la prueba que informa al clínico para la toma de decisiones, pero no son prueba de que las bacterias hayan sido eliminadas. Algunos de los fármacos que se usan tienen mucha toxicidad y se emplean múltiples medicamentos durante mucho tiempo (Terapia estándar: 1. Fase intensiva: 56 dosis diaria por 2 meses de rifampicina R, isoniacida H, pirazinamida Z y etambutol E; 2. Fase de continuación: 112 dosis diaria por 4 meses de R y H). Probablemente el tratamiento es excesivo en muchas personas, pero no podemos distinguir aquellos que podrían beneficiarse de futuros regímenes cortos (actualmente en desarrollo (455)) de quienes necesitarían tratamientos alargados o estándar para favorecer la curación con erradicación de la micobacteria y disminuir el riesgo de recaídas.(454).

Finalmente, por medio de esta investigación proponemos un modelo de atención médica y de seguimiento en ensayos clínicos, que proporcione un conjunto de biomarcadores para facilitar

la toma de decisiones en relación con el manejo, pronóstico y tratamiento de la APTB (Figura 19). Nuestro modelo se centra en un paciente con diagnóstico de APTB, quien, durante la primera consulta del programa de TB, se le clasifica la severidad de la enfermedad por medio de la implementación de un sistema de puntuación clínica denominada TB score GICIG, junto a los hallazgos encontrados en la radiografía de tórax, interpretada idealmente (radiólogo, neumólogo o un médico entrenado en interpretación de imágenes) por el mismo médico que realiza el diagnóstico de TB. En paralelo, a partir del esputo del paciente o por medio de cultivo, se realiza la extracción de ADN bacteriano para la secuenciación del genoma completo y así identificar las deleciones e inserciones descritas en el anexo 5, tabla suplementaria 2, aspectos que en conjunto contribuirían a identificar una TB severa con mayor especificidad y sensibilidad. El estudio inicial se completaría con la cuantificación de los niveles séricos de IL-6. Lo que les permitiría a los médicos identificar un grupo de pacientes con alto riesgo de desarrollar daño pulmonar residual, y de esta forma implementar una intervención temprana. Por otro lado, es posible seleccionar un grupo de pacientes con TB leve para futuros regímenes cortos de tratamiento los cuales vienen en desarrollo. Los pacientes pueden ser evaluados en las primeras semanas de tratamiento y verificar si están respondiendo a la terapia por medio de la medición de los niveles séricos de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 y CHIT-1. Esto nos permitiría saber de manera temprana, si un paciente puede desarrollar una enfermedad severa con posibles consecuencias post-tratamiento. Y con esto, plantear una posible intervención farmacológica con la finalidad de reducir los procesos inflamatorios severos. Luego de 24 semanas de tratamiento cuando se valora si el paciente presenta una cura clínica, además del estudio microbiológico, se podría medir un conjunto de citoquinas candidatas como lo son MCP-1, IL-18, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  y una proteína asociada a inflamación CHIT-1.

En relación a las citoquinas y la molécula asociada a inflamación encontradas alteradas en los pacientes con TB severa, ya expusimos la evidencia relacionada con estudios de cohortes de pacientes con APTB, en adelante presentaremos como se integran estos resultados en un modelo de la inmunopatología de pacientes con TB severa. Modelo de la inmunopatología de pacientes con La IL-6 la principal citoquina que induce la síntesis de proteínas fase aguda en el hígado (456) (proteína C reactiva, componentes del complemento, proteínas de coagulación, proteínas de unión a LPS, proteínas de transporte, inhibidores de proteasa y proteínas de adherencia), a través de las vías Janus quinasa (JAK) y STAT3, así como miembros de la familia C/EBP, proteínas Rel y NF- $\kappa$ B (457). En un estudio realizado con pacientes de APTB, se ha presentado como un biomarcador



adecuado para distinguir el estado activo del latente (458). En este trabajo proponemos la IL-6 como un biomarcador que permite identificar los pacientes con APTB severa al momento del diagnóstico, lo cual está en relación con la inflamación aguda, la fiebre, anorexia, somnolencia, cambios metabólicos y producción de proteínas (456).

Después de 8 semanas de tratamiento proponemos 4 biomarcadores que permiten distinguir la inmunopatología de los pacientes con TB severa de los pacientes con TB leve, lo cual está representado en la (Figura 20). En la etapa crónica de la TB, el cese del crecimiento bacteriano se correlaciona con la llegada de linfocitos CD4+, linfocitos T CD8+ con actividad citotóxica y células NK productoras IFN- $\gamma$  (459). Además de ser un potente activador de la actividad anti microbiana en células de la respuesta innata como los macrófagos (158,460,461), el IFN- $\gamma$  participa en la síntesis de IgG2a, inhibe el fenotipo Th2, activa las células NK y aumenta el MHC clase I y II (462,463). Sin embargo, los niveles elevados de IFN- $\gamma$  en el líquido de lavado bronco alveolar de pacientes con APTB se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, sugiriendo un papel pro patológico durante el estadio crónico de la enfermedad (464). Diferentes tipos de evidencias sustentan el papel pro-patológico del IFN- $\gamma$ . Berry y colegas (180) mostraron un aumento en la expresión del gen IFN- $\gamma$  inducible en pacientes con APTB en comparación con sujetos sanos y con infección latente. Por otro lado, la estimulación con IFN- $\gamma$  de macrófagos infectados con *Mtb* da como resultado un aumento de células con daño de membrana y depende de la cepa micobacteriana y la población de macrófagos (201). También se ha informado que altos niveles de IFN- $\gamma$  inducidos por la inmunización con proteínas de filtrado de cultivo (CFP) de *Mtb* más oligodesoxinucleótidos CpG están asociados con una inflamación pulmonar extensa y no confieren protección en ratones previamente infectados con *Mtb*, en comparación con animales no inmunizados (465). Estas evidencias clínicas y experimentales muestran que la inflamación, estrechamente relacionada con la respuesta inmune protectora, es un arma de doble filo en la patogenia de la tuberculosis y que el IFN- $\gamma$  desempeña un papel fundamental en este proceso (466). Por lo anterior, proponemos el IFN- $\gamma$  como un biomarcador plasmático de severidad.

La IL-33 es uno de los miembros clásicos de la familia de la IL-1, secretada por múltiples células hematopoyéticas y no células hematopoyéticas (467). Durante la respuesta inmune en TB, la IL-33 aumenta el número de células Treg, estimula la producción de citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-10, así como la supresión de IFN- $\gamma$  e IL-2 en células Th2, incrementa la producción de TGF-

$\beta$  e IL-4 en células Th9, mejorar la producción de IL-12 en CTL, la producción de IL-13, IL-5 e IgM en células B1 y también aumentar la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  en células NK y células T asesinas naturales invariantes (iNKT) (170,468,469). No encontramos reportes que relacionen un incremento en los niveles séricos de IL-33 y la severidad de la APTB, proponemos la IL-33 como un biomarcador de severidad cuantificado en plasma a las 8 semanas de tratamiento, al promover la respuesta Th2 y reprimir la inducción de IFN- $\gamma$  en células polarizadas Th1, lo cual es permisivo para la micobacteria y detrimental para el huésped (470).

Con relación a la IL-6 cuantificada a las 8 semanas desde el inicio del tratamiento, se ha informado que la regulación a la baja de la expresión de IL-6R en células T CD4 de pacientes con APTB se asocia con una respuesta disminuida de las células Th17 (471), en consecuencia, el papel de la IL-6 no se limita a la fase aguda de la TB sino que tiene un papel importante en la fase crónica de la enfermedad, al regular las funciones efectoras de las células T. Los niveles de IL-6 se han correlacionado con la gravedad de la TB (472), esto se infiere ya que la IL-6 podría participar en la incapacidad de la respuesta inmune celular para la erradicación de la infección (473). Lo anterior fue demostrado en el modelo murino, en el que se describió que la IL-6 secretada por macrófagos infectados con *Mtb* inhibe las respuestas de macrófagos no infectados a IFN- $\gamma$  (473). Adicionalmente, se ha mostrado que la IL-6 afecta la diferenciación de las células dendríticas afectando su capacidad para presentar antígenos y alterando la capacidad inmune de la respuesta adaptativa (474). También, se ha descrito que los niveles elevados de IL-6 se asocian a recambio de macrófagos alveolares residentes a macrófagos derivados de monocitos productores de IL-6, que se encuentran en muestras de lavado bronco-alveolar de pacientes con APTB grave (475). Además, la desregulación inmunitaria inducida por IL-6 es un contribuyente clave a la patogenia de la TB caracterizada por la producción de citoquinas proinflamatorias aguas abajo de IL-6 por parte de los monocitos (476). Y también por desregulación linfocítica con linfopenia de CD 4+ (477). Previamente se ha asociado la IL-6 con el grado del frotis y la extensión radiográfica de la enfermedad (212), este último hecho fue reproducido en nuestro estudio dado que una de las variables de nuestro sistema de clasificación de severidad de la TB, es la extensión de la enfermedad.

Otro biomarcador asociado a la severidad de la APTB que encontramos en nuestro trabajo es la CHIT-1. Esta tiene efectos pleiotrópicos en respuestas inmunes a patógenos sin quitina como

*Mtb* (478). Un mecanismo de activación de la CHIT-1 por parte de *Mtb* es a través del muramil dipéptido (MDP), que activa la vía de señalización NOD2 que está implicada en la expresión de la enzima CHIT-1 dentro de los macrófagos (479,480). De igual forma el reconocimiento por TLR4 de lipoarabinomanano (LAM) y el lipomanano (LM) micobacterianos, estimula la transcripción de CHIT-1 a través de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (481–483), que también es responsable de ejercer los efectos de TNF- $\alpha$  (461); por otra parte el IFN- $\gamma$  también está implicado en la expresión de la enzima CHIT-1 mediante la estimulación de la vía de señalización Jak-Stat (183). Uno de los efectos inmunológicos que induce la CHIT-1 es la fibrosis pulmonar, este efecto puede ser explicado por la activación de fibroblastos a través del aumento de la señalización de TGF- $\beta$  y el incremento de la expresión de los receptores 1 y 2 de TGF- $\beta$ , lo que lleva a la activación de las vías de señalización Smad y MAPK/ERK (484). También CHIT-1 ejerce sus efectos inmunológicos a través de la estimulación directa de diferentes mediadores inflamatorios como IL-8, MMP9, MCP-1, RANTES y eotaxina, aumentando así la capacidad migratoria de muchas células inmunológicas, incluidos los linfocitos T, los macrófagos y los eosinófilos (287,288). Estudios en pacientes con APTB han demostrado que los niveles de CHIT-1 aumentan en el suero de los pacientes y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (285,485). En la búsqueda de biomarcadores de severidad en TB, la CHIT-1 es un biomarcador ideal debido a que es la quitinasa más prominente en el pulmón y la circulación en humanos (486,487), este hecho fue evidenciado en nuestro estudio dado que fue posible su medición en el 90% de las muestras analizadas.

Con respecto a los biomarcadores proinflamatorios al final del tratamiento identificamos que MCP-1 e IL-8 aumenta con respecto al tiempo 0 al final del tratamiento e IL-18, IL-6, IFN- $\gamma$  y CHIT-1 disminuyen al final del tratamiento. En el caso de MCP-1 (292), IL-6 (226), IFN- $\gamma$  (193) y CHIT-1 (485) los resultados publicados en la literatura están en concordancia con nuestros hallazgos. Con respecto a la IL-8 la evidencia es controvertida, hay informes que reportan niveles más elevados al finalizar el tratamiento médico IL-8 (488), otros informan el hecho contrario (230,425). En relación a la IL-18 no encontramos reporte de los niveles de esta citoquina al final del tratamiento, sin embargo, una vez es erradicada la *Mtb* no hay estímulo que desencadene su secreción y tampoco se requiere su función al inducir la producción de IFN- $\gamma$  en contra de la *Mtb* (489).

Integrar las observaciones experimentales y datos clínicos con variantes obtenidas mediante la secuenciación del genoma completo puede brindar información significativa sobre la biología del patógeno, mejorando el pronóstico del paciente y señalando los determinantes genómicos del patógeno de transmisibilidad, gravedad o nuevos objetivos farmacológicos con el objetivo de mejorar el diagnóstico y el tratamiento y vigilancia (490). Recientemente fue publicado el trabajo de Boeck y colegas (491), en el que combinaron enfoques genómicos, fenotípicos y GWAS para caracterizar fenotípicamente una gran colección de 331 aislamientos clínicos de *M. abscessus* (491). Los autores implementaron un modelo estructural computacional de todo el proteoma para evaluar el impacto de las variantes no sinónimas, y encontraron que la predicción de un SNP en el gen *MbtD* (policetido sintetasa de la micobactina), afectaría el acceso al hierro durante la infección fue probada experimentalmente a través de un mutante, el cual mostro un crecimiento reducido en macrófagos infectados, mostrando este gen como un objetivo terapéutico potencial (491).

MTBC se ha dividido en varios linajes adaptados a humanos (293) y la evidencia colectada hasta la fecha indica que la diversidad genotípica puede determinar la virulencia y la transmisibilidad de aislados clínicos de MTBC e influir en el resultado de la enfermedad de TB (293,307). Para analizar la compleja interacción microorganismo-hospedero, ratones fueron infectados con 2 cepas de *Mtb* obtenidas de casos índices Brasileños (492), una caracterizada como de alta (HT) trasmisión (L4.1.2.1, HT), y otra de baja trasmisión (L4.3.4.2, LT) (493). Los resultados mostraron que la cepa HT indujo una rápida migración de macrófagos alveolares, dependiente de IL-1R, desde el espacio alveolar hacia el intersticio, y que esta acción es clave para la diseminación temprana de bacterias a los ganglios linfáticos, estimulación de la respuesta Th1, respuesta granulomatosa, y control bacteriano. Por el contrario, la cepa LT indujo una respuesta asociada con una diseminación retardada a los ganglios linfáticos e inducción de una respuesta Th17, fomentando la inflamación neutrofílica y el aumento de la replicación bacteriana. Estos hallazgos implican a la heterogeneidad bacteriana como un importante modificador de la transmisión y severidad de la TB (493).

En este trabajo hemos identificado por medio de la secuenciación del genoma completo un grupo de 113 polimorfismos exclusivos de aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB severa que se asocian con altos niveles de CHIT-1 en plasma de pacientes con TB después de 8 semanas de tratamiento antibiótico. Nueve de estos polimorfismos se han asociado con factores de virulencia

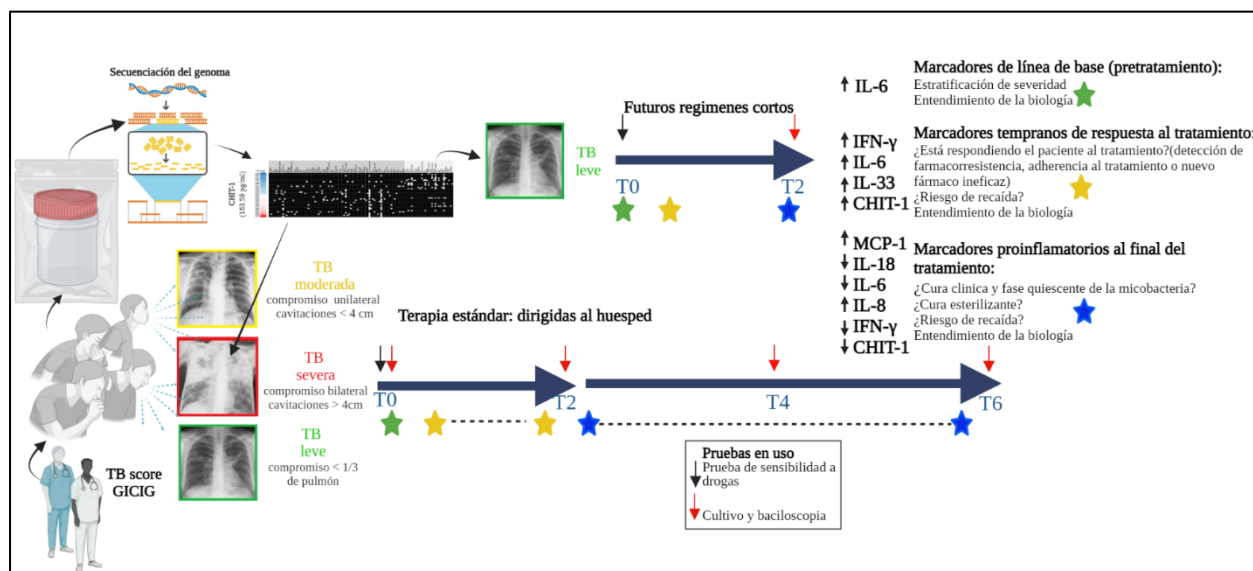
de la micobacteria. El primero está relacionado con un complejo de transporte de  $K^+$  denominado KdpFABC y consiste en una delección en el sistema de 2 componentes *kdpD*, anteriormente se describió que los ratones infectados con el mutante *kdpDE* murieron más rápidamente que los infectados con bacterias de tipo salvaje (324). El entendimiento de esta aparente ganancia de virulencia no está esclarecido. Un reciente estudio que intentaba entender el papel del operón regulador *kdpDE* de *Mtb* en la modulación del crecimiento bacteriano *in vitro*, concluyó que en ausencia del sistema KdpDE, tanto el sistema KdpFABC como el transportador de potasio Trk se activan de forma constitutiva, resultando en una afluencia excesiva de  $K^+$ , que es perjudicial para la micobacteria y conduce a la atenuación del crecimiento bacteriano (494). Sin embargo, este mecanismo no ha sido evidenciado *in vivo*. También encontramos la presencia de 4 polimorfismos en los genes (*Rv3083*, *Rv3084*, *Rv3085*, *Rv3089*) que componen el operón *mymA* (495). Se ha reportado que la transcripción del operón *mymA* depende de la presencia de la proteína VirS y se induce específicamente a pH ácido (496). La inducción del operón *mymA* puede desempeñar un papel importante en la remodelación de la envoltura de *Mtb* en condiciones ácidas en los macrófagos (495). Se sugiere que *mymA*, una monooxigenasa codificada por *Rv3083*, podría potencialmente oxigenar los ácidos grasos micobacterianos. Los ácidos grasos oxigenados podrían ser modificados adicionalmente por la acetil hidrolasa/esterasa *Rv3084*, la alcohol deshidrogenasa de cadena corta *Rv3085* y la alcohol deshidrogenasa que contiene zinc *Rv3086*. Finalmente, el homólogo de acil-CoA sintasa *Rv3089* podría entonces activar los ácidos grasos que posteriormente podrían ser transferidos a un aceptor en la pared celular de las micobacterias por las aciltransferasas *Rv3087* y *Rv3088* (497). Otro de los polimorfismos presente en los aislados de *Mtb* de pacientes con TB severa es en el gen *pe\_pgrs30*, este se encuentra regulado positivamente durante el crecimiento en macrófagos infectados y en tejidos del huésped murino durante la fase persistente crónica de la infección (498). Se ha evidenciado un fenotipo atenuado en ratones infectados con el mutante de *pe\_pgrs30* y una vez es completado se restaura completamente la virulencia del mutante (403). Experimentos *in vitro* en macrófagos confirmaron que se requiere PE\_PGRS30 para bloquear la maduración del fagosoma por *Mtb* (403). Por lo tanto, se requiere PE\_PGRS30 para la virulencia completa de *Mtb* y puede considerarse un factor de virulencia. Finalmente encontramos 2 polimorfismos en el gen *Rv1787* que codifica la proteína PPE25 que es secretada por ESX-5 (499). Se ha descrito en macrófagos derivados de la médula ósea y en ratones SCID que el mutante de *PPE25* se encuentra atenuado (499). PPE25 expresado por *M.smegmatis*

induce un nivel significativamente más alto de TNF- $\alpha$  y una cantidad ligeramente más alta de IL-1 $\beta$ , mediado por las vías NF- $\kappa$ B, ERK y p38 en los macrófagos (500). También se ha informado que PPE25 aumenta la supervivencia de *M. smegmatis* en PMN, induce necrosis celular, inhibe las expresiones de ROS y NO y cambia la secreción de citoquinas, lo que ayuda a la propagación del patógeno al evadir la inmunidad del huésped (501). Finalmente, se ha descrito que la interrupción dirigida del gen *pe\_pgrs47* (Rv2741) condujo a un crecimiento atenuado de *Mtb* *in vitro* e *in vivo*. El análisis de los efectos de la eliminación o sobreexpresión de PE\_PGRS47 implicó a esta proteína en la inhibición de la autofagia en los fagocitos del huésped infectado (502).

Las limitaciones en este estudio incluyen: se requiere una cohorte de validación del modelo predictivo de severidad con una muestra mayor y que incluya diferentes regiones del país; el muestreo se realizó durante el transcurso de la pandemia por COVID-19; sería recomendable un método de medición de analitos con mayor capacidad de detección en toda la población de estudio y dado el poco conocimiento acerca del funcionamiento de los genes de *Mtb*, se requieren estudios mecanísticos para conocer el efecto potencial de los polimorfismos encontrados.

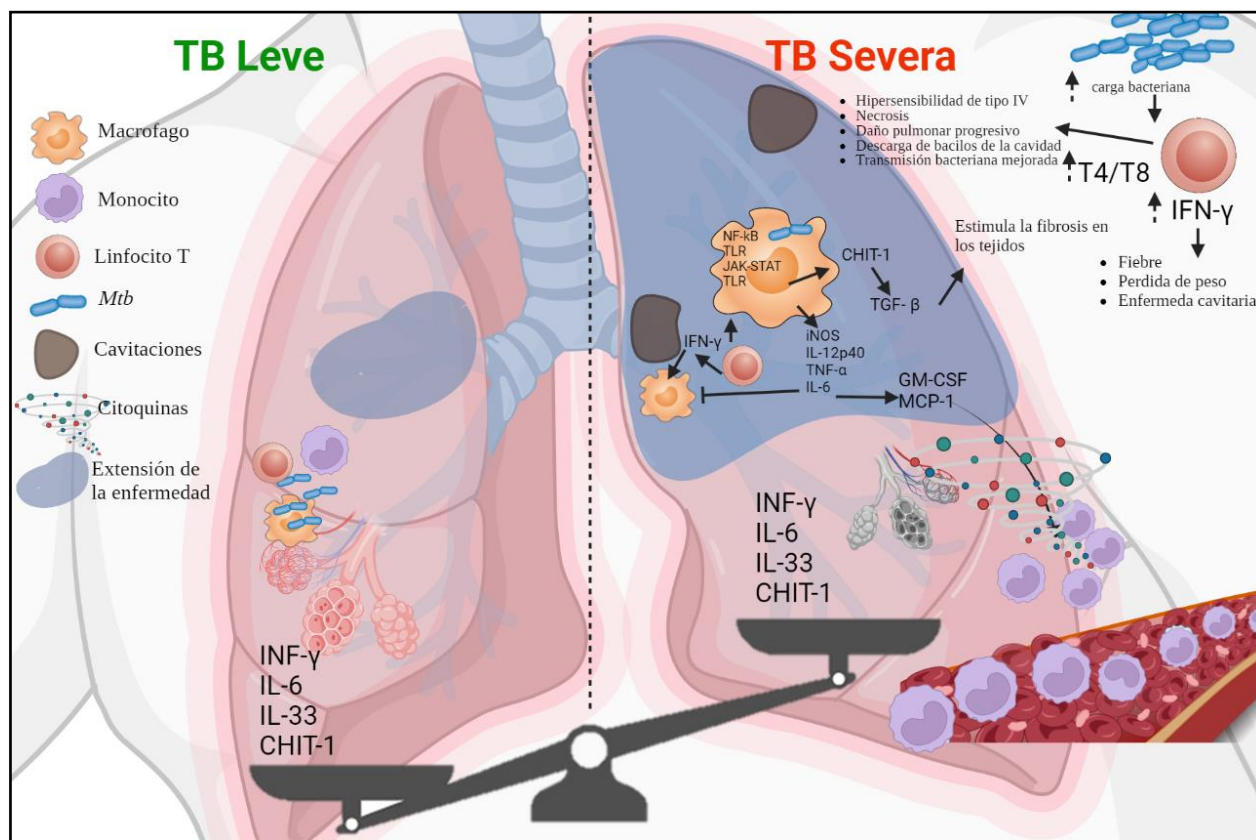
En este estudio, proponemos variantes de *Mtb* asociadas con un fenotipo clínico de mayor severidad correlacionadas con altos niveles séricos de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 y CHIT-1 en comparación con pacientes con TB leve después de 8 semanas de tratamiento antibiótico, este bioperfil permitiría la identificación de un grupo con mayor riesgo para desarrollar daño pulmonar y eventualmente, disfunción pulmonar permanente, estos pacientes serian el objeto de terapias dirigidas al huésped en búsqueda de una respuesta inmune modulada. También proponemos un biomarcador temprano de severidad y marcadores proinflamatorios al final del tratamiento. Sería interesante continuar con el seguimiento de los pacientes con TB severa y evaluar los resultados del tratamiento, como la presencia de secuelas, recaída y reinfección.

**Figura 19.** Modelo integrador del papel potencial de los biomarcadores clínicos, radiológicos, moleculares y serológicos en la toma de decisiones clínicas en relación con el seguimiento, pronóstico y tratamiento de la TB pulmonar



*Nota.* Creado con BioRender.com. Se representa la estratificación de severidad en el momento del diagnóstico por medio de una escala clínica modificada y los hallazgos radiográficos, que podría ser correlacionado con marcadores de línea de base (estrella verde) y la presencia de polimorfismos en el aislado clínico de *Mtb* asociado con severidad, los pacientes con TB leve serían candidatos a futuros regímenes cortos, los pacientes con TB severa pueden ser seguidos con marcadores tempranos de respuesta al tratamiento (estrella amarilla) y marcadores proinflamatorios al final del tratamiento (estrella azul). Las flechas rojas y la negra indican los tiempos que se aplican las pruebas actuales.

**Figura 20.** Modelo de la inmunopatología de pacientes con TB leve vs TB severa



*Nota.* Creado con BioRender.com. Las flechas indican inducción, la flecha en t indica inhibición, flechas incompletas indican incremento. Se distinguen 2 fenotipos clínicos de severidad, los pacientes con TB leve se presentan con niveles más bajos de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-33 y CHIT-1 a las 8 semanas desde el inicio del tratamiento. Los pacientes con TB severa presentan niveles elevados de citoquinas proinflamatorias y la proteína asociada a la inflamación antes mencionada, lo que con lleva a síntomas más severos, mayor extensión de la enfermedad, presencia de cavitaciones, presencia de cicatrización aberrante con fibrosis, reclutamiento de monocitos lo que desencadena una tormenta de citoquinas, todo lo anterior contribuye a la presencia de daño pulmonar en el paciente con TB severa.



## 8. Bibliografía

1. The top 10 causes of death [Internet]. [citado 2 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Global Tuberculosis Report 2022 [Internet]. [citado 31 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>
3. Cruz Martinez OA. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis sensible, resistente e infección latente. 2022.
4. Minsalud asignó más de \$ 7 mil ochocientos millones a programas de tuberculosis [Internet]. [citado 2 de agosto de 2022]. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Minsalud-asignó-más-de-\\$-7-mil-ochocientos-millones-a-programas-de-tuberculosis.aspx](https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Minsalud-asignó-más-de-$-7-mil-ochocientos-millones-a-programas-de-tuberculosis.aspx)
5. Cardona PJ. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica Engl* Ed. 1 de enero de 2018;36(1):38-46.
6. Churchyard G, Kim P, Shah NS, Rustomjee R, Gandhi N, Mathema B, et al. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. *J Infect Dis*. 2017;216(Suppl 6):S629.
7. RD T. Cough in pulmonary tuberculosis: Existing knowledge and general insights. *Pulm Pharmacol Ther*. 1 de abril de 2019;55:89-94.
8. RD T, GH B. Cough and the transmission of tuberculosis. *J Infect Dis*. 1 de mayo de 2015;211(9):1367-72.
9. World Health Organization. Global tuberculosis report. 2021.
10. SD L, AI Z. Tuberculosis. *Lancet Lond Engl*. 2011;378(9785):57-72.
11. Knechel NA. Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. *Crit Care Nurse*. 1 de abril de 2009;29(2):34-43.
12. Pasipanodya MD J, Hall PharmD, MSCS R, Gumbo MD T. Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases. En: Kellerman MD RD, Rakel MD DP, editores. 2021. p. 905-11.
13. Ramírez-Lapausa M, Menéndez-Saldaña A, Noguerado-Asensio A. Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. *Rev Esp Sanid Penit*. 2015;17(1):3-11.
14. Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M. Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. <http://dx.doi.org/101056/NEJMra1405427>. 27 de mayo de 2015;372(22):2127-35.
15. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 1: prevention: tuberculosis preventive treatment [Internet]. Geneva: World Health Organization;

2020 [citado 14 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331170>

16. Organizat WH. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 1: Prevention. Tuberculosis preventive treatment. *Tuberc Lung Dis HIV Infect*. 29 de junio de 2021;(2):86-92.
17. Comstock GW. How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults? *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. octubre de 1999;3(10):847-50.
18. Horsburgh CR. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med*. 13 de mayo de 2004;350(20):2060-7.
19. Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL. Heterogeneity in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 27 de octubre de 2017;17(11):691.
20. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *The Lancet*. 20 de abril de 2019;393(10181):1642-56.
21. Chen RY, Dodd LE, Lee M, Paripati P, Hammoud DA, Mountz JM, et al. PET/CT and High Resolution CT as potential imaging biomarkers associated with treatment outcomes in MDR-TB. *Sci Transl Med*. 3 de diciembre de 2014;6(265):265ra166.
22. Bastos HN, Osório NS, Gagneux S, Comas I, Saraiva M. The Troika Host–Pathogen–Extrinsic Factors in Tuberculosis: Modulating Inflammation and Clinical Outcomes. *Front Immunol*. 2018;8.
23. Comas I, Gagneux S. A role for systems epidemiology in tuberculosis research. *Trends Microbiol*. octubre de 2011;19(10):492-500.
24. O’Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:475-527.
25. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis | Pathogens and Disease | Oxford Academic [Internet]. [citado 17 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://academic.oup.com/femspd/article/58/1/3/556623>
26. K. AA, Wolfgang S, S. SL, L. APH. Innate Immune Gene Polymorphisms in Tuberculosis. *Infect Immun*. 1 de octubre de 2012;80(10):3343-59.
27. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- $\gamma$  immunity. *Semin Immunol*. 2014;26(6):454-70.
28. Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA, Casanova JL, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 19 de junio de 2014;369(1645):20130428.

29. Tedla K, Medhin G, Berhe G, Mulugeta A, Berhe N. Delay in treatment initiation and its association with clinical severity and infectiousness among new adult pulmonary tuberculosis patients in Tigray, northern Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):456.
30. Pinto CMA, Carvalho ARM. The HIV/TB coinfection severity in the presence of TB multi-drug resistant strains. *Ecol Complex.* 2017;32:1-20.
31. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol.* 1 de diciembre de 2014;26(6):431-44.
32. Ryndak M, Wang S, Smith I. PhoP, a key player in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Trends Microbiol.* 2008;16(11):528-34.
33. Gehre F, Otu J, DeRiemer K, de Sessions PF, Hibberd ML, Mulders W, et al. Deciphering the growth behaviour of *Mycobacterium africanum*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):e2220.
34. Sarkar R, Lenders L, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Nicol MP. Modern lineages of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit lineage-specific patterns of growth and cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. 2012;
35. Krishnan N, Malaga W, Constant P, Caws M, Thi Hoang Chau T, Salmons J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Lineage Influences Innate Immune Response and Virulence and Is Associated with Distinct Cell Envelope Lipid Profiles. *PLOS ONE.* 8 de septiembre de 2011;6(9):e23870.
36. Rose G, Cortes T, Comas I, Coscolla M, Gagneux S, Young DB. Mapping of genotype–phenotype diversity among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by sequence-based transcriptional profiling. *Genome Biol Evol.* 2013;5(10):1849-62.
37. Khatri B, Fielder M, Jones G, Newell W, Abu-Oun M, Wheeler PR. High throughput phenotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains' metabolism using biologic phenotypic microarrays. *PloS One.* 2013;8(1):e52673.
38. Peters JS, Ismail N, Dippenaar A, Ma S, Sherman DR, Warren RM, et al. Genetic Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates and Resulting Outcomes of Tuberculosis Infection and Disease. <https://doi.org/10.1146/annurev-Genet-022820-085940>. 23 de noviembre de 2020;54:511-37.
39. Portevin D, Sukumar S, Coscolla M, Shui G, Li B, Guan XL, et al. Lipidomics and genomics of *Mycobacterium tuberculosis* reveal lineage-specific trends in mycolic acid biosynthesis. *Microbiologyopen.* 2014;3(6):823-35.
40. Vander Beken S, Al Dulayymi JR, Naessens T, Koza G, Maza-Iglesias M, Rowles R, et al. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *Eur J Immunol.* 2011;41(2):450-60.

41. Yuan Y, Lee RE, Besra GS, Belisle JT, Barry 3rd CE. Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(14):6630-4.
42. Wiseman CA, Gie RP, Starke JR, Schaaf HS, Donald PR, Cotton MF, et al. A Proposed Comprehensive Classification of Tuberculosis Disease Severity in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(4).
43. Karzulovic L, García P, Wozniak A, Villarroel L, Hirsch T, Concha I, et al. Una regla de predicción clínica ¿anticipa el diagnóstico de la faringitis estreptocócica en niños de 2 a 15 años? *Rev Chil Infectol*. 2018;35(5):476-82.
44. Wejse C, Gustafson P, Nielsen J, Gomes VF, Aaby P, Andersen PL, et al. TBscore: Signs and symptoms from tuberculosis patients in a low-resource setting have predictive value and may be used to assess clinical course. *Scand J Infect Dis*. 2008;40(2):111-20.
45. Horita N, Miyazawa N, Yoshiyama T, Sato T, Yamamoto M, Tomaru K, et al. Development and validation of a tuberculosis prognostic score for smear-positive in-patients in Japan. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. enero de 2013;17(1):54-60.
46. Bastos HN, Osório NS, Castro AG, Ramos A, Carvalho T, Meira L, et al. A Prediction Rule to Stratify Mortality Risk of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *PLoS ONE*. 16 de septiembre de 2016;11(9):e0162797.
47. Valade S, Raskine L, Aout M, Malissin I, Brun P, Deye N, et al. Tuberculosis in the intensive care unit: A retrospective descriptive cohort study with determination of a predictive fatality score. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medicale*. 2012;23(4):173-8.
48. Koegelenberg CFN, Balkema CA, Jooste Y, Taljaard JJ, Irusen EM. Validation of a severity-of-illness score in patients with tuberculosis requiring intensive care unit admission. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk*. abril de 2015;105(5):389-92.
49. Hnizdo E, Singh T, Churchyard G. Chronic pulmonary function impairment caused by initial and recurrent pulmonary tuberculosis following treatment. *Thorax*. enero de 2000;55(1):32-8.
50. Plit ML, Anderson R, Van Rensburg CE, Page-Shipp L, Blott JA, Fresen JL, et al. Influence of antimicrobial chemotherapy on spirometric parameters and pro-inflammatory indices in severe pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*. agosto de 1998;12(2):351-6.
51. Ross J, Ehrlich RI, Hnizdo E, White N, Churchyard GJ. Excess lung function decline in gold miners following pulmonary tuberculosis. *Thorax*. noviembre de 2010;65(11):1010-5.
52. Pasipanodya JG, McNabb SJ, Hilsenrath P, Bae S, Lykens K, Vecino E, et al. Pulmonary impairment after tuberculosis and its contribution to TB burden. *BMC Public Health*. mayo de 2010;10:259.

53. Maguire GP, Anstey NM, Ardian M, Waramori G, Tjitra E, Kenangalem E, et al. Pulmonary tuberculosis, impaired lung function, disability and quality of life in a high-burden setting. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. diciembre de 2009;13(12):1500-6.
54. Ralph AP, Kenangalem E, Waramori G, Pontororing GJ, Sandjaja, Tjitra E, et al. High morbidity during treatment and residual pulmonary disability in pulmonary tuberculosis: under-recognised phenomena. *PLoS One*. 2013;8(11):e80302.
55. Schünemann HJ, Dorn J, Grant BJ, Winkelstein WJ, Trevisan M. Pulmonary function is a long-term predictor of mortality in the general population: 29-year follow-up of the Buffalo Health Study. *Chest*. septiembre de 2000;118(3):656-64.
56. Amaral AFS, Coton S, Kato B, Tan WC, Studnicka M, Janson C, et al. Tuberculosis associates with both airflow obstruction and low lung function: BOLD results. *Eur Respir J*. octubre de 2015;46(4):1104-12.
57. Byrne AL, Marais BJ, Mitnick CD, Lecca L, Marks GB. Tuberculosis and chronic respiratory disease: a systematic review. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. marzo de 2015;32:138-46.
58. Rhee CK, Yoo KH, Lee JH, Park MJ, Kim WJ, Park YB, et al. Clinical characteristics of patients with tuberculosis-destroyed lung [Internet]. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2013 [citado 17 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2013/00000017/00000001/art00013>
59. Long R, Maycher B, Dhar A, Manfreda J, Hershfield E, Anthonisen N. Pulmonary tuberculosis treated with directly observed therapy: serial changes in lung structure and function. *Chest*. 1998;113(4):933-43.
60. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de septiembre de 2007;176(6):532-55.
61. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi REA, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005;26(5):948-68.
62. Hunter RL. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis*. 2011;91(6):497-509.
63. Roberts H, Wells A, Milne D, Rubens M, Kolbe J, Cole P, et al. Airflow obstruction in bronchiectasis: correlation between computed tomography features and pulmonary function tests. *Thorax*. 2000;55(3):198-204.
64. Milliron B, Henry TS, Veeraraghavan S, Little BP. Bronchiectasis: mechanisms and imaging clues of associated common and uncommon diseases. *Radiographics*. 2015;35(4):1011-30.

65. Manji M, Shayo G, Mamuya S, Mpembeni R, Jusabani A, Mugusi F. Lung functions among patients with pulmonary tuberculosis in Dar es Salaam—a cross-sectional study. *BMC Pulm Med.* 2016;16(1):1-9.
66. Akkara SA, Shah AD, Adalja M, Akkara AG, Rathi A, Shah DN. Pulmonary tuberculosis: the day after. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17(6):810-3.
67. Seiscento M, Vargas FS, Antonangelo L, Acencio MM, Bombarda S, Capelozzi VL, et al. Transforming growth factor  $\beta$ -1 as a predictor of fibrosis in tuberculous pleurisy. *Respirology.* 2007;12(5):660-3.
68. Martinez V, Castilla-Lievre MA, Guillet-Caruba C, Grenier G, Fior R, Desarnaud S, et al. (18)F-FDG PET/CT in tuberculosis: an early non-invasive marker of therapeutic response. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* septiembre de 2012;16(9):1180-5.
69. Malherbe ST, Shenai S, Ronacher K, Loxton AG, Dolganov G, Kriel M, et al. Persisting PET-CT lesion activity and M. tuberculosis mRNA after pulmonary tuberculosis cure. *Nat Med.* octubre de 2016;22(10):1094-100.
70. Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GAW. Lung Remodeling in Pulmonary Tuberculosis. *J Infect Dis.* 1 de octubre de 2005;192(7):1201-10.
71. Kiran D, Podell BK, Chambers M, Basaraba RJ. Host-directed therapy targeting the Mycobacterium tuberculosis granuloma: a review. *Semin Immunopathol.* 2016;38:167-83.
72. Nagu TJ, Mboka MA, Nkrumbih ZF, Shayo G, Mizinduko MM, Komba E V., et al. Clinical and Imaging Features of Adults with Recurrent Pulmonary Tuberculosis - A Prospective Case-Controlled Study. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 1 de diciembre de 2021;113 Suppl 1:S33-9.
73. Rudolf F, Lemvik G, Abate E, Verkuilen J, Schön T, Gomes VF, et al. TBscore II: refining and validating a simple clinical score for treatment monitoring of patients with pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis.* noviembre de 2013;45(11):825-36.
74. Rudolf F. The Bandim TBscore--reliability, further development, and evaluation of potential uses. *Glob Health Action.* 2014;7:24303.
75. Rudolf F, Joaquim LC, Vieira C, Bjerregaard-Andersen M, Andersen A, Erlandsen M, et al. The Bandim tuberculosis score: Reliability and comparison with the Karnofsky performance score. <http://dx.doi.org/103109/003655482012731077>. abril de 2013;45(4):256-64.
76. McHenry ML, Wampande EM, Joloba ML, Malone LL, Mayanja-Kizza H, Bush WS, et al. Interaction between M. tuberculosis Lineage and Human Genetic Variants Reveals Novel Pathway Associations with Severity of TB. *Pathog Basel Switz.* 1 de noviembre de 2021;10(11).

77. Ministerio de de Salud y Protección Social. Resolución No. 227 de 2020. Lineamientos técnicos y operativos del Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. 2020. p. 175.
78. WHO. Chest Radiography in Tuberculosis. World Health Organ. 2016;1-44.
79. World Health Organization. Tuberculosis prevalence surveys: a handbook [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011 [citado 4 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44481>
80. Bhalla AS, Goyal A, Guleria R, Gupta AK. Chest tuberculosis: Radiological review and imaging recommendations. *Indian J Radiol Imaging*. 2015;25(3):213-25.
81. Martínez Chamorro E, Díez Tascón A, Ibáñez Sanz L, Ossaba Vélez S, Borrueal Nacenta S. Diagnóstico radiológico del paciente con COVID-19. *Radiología*. 2021;63(1):56-73.
82. Rodr P, Servicio I, Cl H, Coru L. Manifestaciones radiológicas de la tuberculosis pulmonar. 2002;39(5):192-206.
83. Yeh JJ, Chen SCC, Teng WB, Chou CH, Hsieh SP, Lee TL, et al. Identifying the most infectious lesions in pulmonary tuberculosis by high-resolution multi-detector computed tomography. *Eur Radiol*. 2010;20(9):2135-45.
84. El-Solh AA, Hsiao CB, Goodnough S, Serghani J, Grant BJ. Predicting active pulmonary tuberculosis using an artificial neural network. *Chest*. octubre de 1999;116(4):968-73.
85. Navarro-ballester A, Marco-domenech SF, Fernandez-garcia P, Moreno-muñoz MR. Predictive clinical-radiological model to diagnose active pulmonary tuberculosis. 2019;25(2):47-59.
86. Ralph AP, Ardian M, Wiguna A, Maguire GP, Becker NG, Drogumuller G, et al. A simple, valid, numerical score for grading chest x-ray severity in adult smear-positive pulmonary tuberculosis. *Thorax*. 1 de octubre de 2010;65(10):863-9.
87. Chakraborty A, Shivananjaiah AJ, Ramaswamy S, Chikkavenkatappa N. Chest X ray score (Timika score): an useful adjunct to predict treatment outcome in tuberculosis. *Adv Respir Med*. 2018;86(5):205-10.
88. Alnour TMS. Smear microscopy as a diagnostic tool of tuberculosis: Review of smear negative cases, frequency, risk factors, and prevention criteria. *Indian J Tuberc*. 1 de julio de 2018;65(3):190-4.
89. Kassa GM, Merid MW, Muluneh AG, Fentie DT. Sputum smear grading and associated factors among bacteriologically confirmed pulmonary drug-resistant tuberculosis patients in Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):238.

90. Tiwari S, Kumar A, Kapoor SK. Relationship between sputum smear grading and smear conversion rate and treatment outcome in the patients of pulmonary tuberculosis undergoing dots--a prospective cohort study. *Indian J Tuberc.* julio de 2012;59(3):135-40.
91. Lohmann EM, Koster BFPJ, Le Cessie S, Kamst-van Agterveld MP, Van Soolingen D, Arend SM. Grading of a positive sputum smear and the risk of *Mycobacterium tuberculosis* transmission. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1 de noviembre de 2012;16(11):1477-84.
92. Zhang L, Pang Y, Yu X, Wang Y, Lu J, Gao M, et al. Risk factors for pulmonary cavitation in tuberculosis patients from China. *Emerg Microbes Infect.* enero de 2016;5(1):1-11.
93. Flynn JL, Chan J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol.* 2005;13(3):98-102.
94. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(1):39-47.
95. Guler R, Ozturk M, Sabeel S, Motaung B, Parihar SP, Thienemann F, et al. Targeting Molecular Inflammatory Pathways in Granuloma as Host-Directed Therapies for Tuberculosis. *Front Immunol [Internet].* 2021 [citado 27 de octubre de 2022];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.733853>
96. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):352-66.
97. Lavalett L, Ortega H, Barrera LF. Human Alveolar and Splenic Macrophage Populations Display a Distinct Transcriptomic Response to Infection With *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol.* 21 de abril de 2020;11:630.
98. Lavalett L, Rodriguez H, Ortega H, Sadee W, Schlesinger LS, Barrera LF. Alveolar macrophages from tuberculosis patients display an altered inflammatory gene expression profile. *Tuberc Edinb Scotl.* 1 de diciembre de 2017;107:156-67.
99. Guirado E, Schlesinger LS. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma—the critical battlefield in host immunity and disease. *Front Immunol.* 2013;4:98.
100. Russell DG, Barry CE, Flynn JL. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science.* 14 de mayo de 2010;328(5980):852-6.
101. Jasenosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Goldfeld AE. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunol Rev.* marzo de 2015;264(1):74-87.
102. Via LE, Lin PL, Ray SM, Carrillo J, Allen SS, Eum SY, et al. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infect Immun.* 2008;76(6):2333-40.
103. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Growth at the Cavity Surface: a Microenvironment with Failed Immunity. *Infect Immun.* 2003;71(12):7099-108.



104. Gideon HP, Hughes TK, Tzouanas CN, Wadsworth MH, Tu AA, Gierahn TM, et al. Multimodal profiling of lung granulomas in macaques reveals cellular correlates of tuberculosis control. *Immunity*. 10 de mayo de 2022;55(5):827-846.e10.
105. Al Shammari B, Shiomi T, Tezera L, Bielecka MK, Workman V, Sathyamoorthy T, et al. The extracellular matrix regulates granuloma necrosis in tuberculosis. *J Infect Dis*. 2015;212(3):463-73.
106. Elkington PT, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax*. 2006;61(3):259-66.
107. Kübler A, Luna B, Larsson C, Ammerman NC, Andrade BB, Orandle M, et al. Mycobacterium tuberculosis dysregulates MMP/TIMP balance to drive rapid cavitation and unrestrained bacterial proliferation. *J Pathol*. 2015;235(3):431-44.
108. Sakamoto K, Kim MJ, Rhoades ER, Allavena RE, Ehrt S, Wainwright HC, et al. Mycobacterial trehalose dimycolate reprograms macrophage global gene expression and activates matrix metalloproteinases. *Infect Immun*. 2013;81(3):764-76.
109. Stek C, Allwood B, Walker NF, Wilkinson RJ, Lynen L, Meintjes G. The Immune Mechanisms of Lung Parenchymal Damage in Tuberculosis and the Role of Host-Directed Therapy. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [citado 21 de agosto de 2022];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02603>
110. Singh S, Maniakis-Grivas G, Singh UK, Asher RM, Mauri F, Elkington PT, et al. Interleukin-17 regulates matrix metalloproteinase activity in human pulmonary tuberculosis. *J Pathol*. 2018;244(3):311-22.
111. Elkington PT, Ugarte-Gil CA, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in tuberculosis. *Eur Respir J*. 2011;38(2):456-64.
112. Fox KA, Kirwan DE, Whittington AM, Krishnan N, Robertson BD, Gilman RH, et al. Platelets regulate pulmonary inflammation and tissue destruction in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(2):245-55.
113. Walker NF, Clark SO, Oni T, Andreu N, Tezera L, Singh S, et al. Doxycycline and HIV infection suppress tuberculosis-induced matrix metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(9):989-97.
114. Ong CW, Elkington PT, Brilha S, Ugarte-Gil C, Tome-Esteban MT, Tezera LB, et al. Neutrophil-derived MMP-8 drives AMPK-dependent matrix destruction in human pulmonary tuberculosis. *PLoS Pathog*. 2015;11(5):e1004917.
115. Hrabec E, Strek M, Zieba M, Kwiatkowska S, Hrabec Z. Circulation level of matrix metalloproteinase-9 is correlated with disease severity in tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6(8):713-9.

116. Seddon J, Kasprowicz V, Walker NF, Yuen HM, Sunpath H, Tezera L, et al. Procollagen III N-terminal propeptide and desmosine are released by matrix destruction in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2013;208(10):1571-9.
117. Singh S, Kubler A, Singh UK, Singh A, Gardiner H, Prasad R, et al. Antimycobacterial drugs modulate immunopathogenic matrix metalloproteinases in a cellular model of pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4657-65.
118. Sathyamoorthy T, Tezera LB, Walker NF, Brilha S, Saraiva L, Mauri FA, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates monocyte migration and collagen destruction in tuberculosis. *J Immunol.* 2015;195(3):882-91.
119. Eum SY, Kong JH, Hong MS, Lee YJ, Kim JH, Hwang SH, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest.* 2010;137(1):122-8.
120. Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 2013;13(2):169-80.
121. Yang CT, Cambier CJ, Davis JM, Hall CJ, Crosier PS, Ramakrishnan L. Neutrophils Exert Protection in the Early Tuberculous Granuloma by Oxidative Killing of Mycobacteria Phagocytosed from Infected Macrophages. *Cell Host Microbe.* 13 de septiembre de 2012;12(3):301-12.
122. Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, O'Garra A, Martineau AR. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol.* 2012;33(1):14-25.
123. de Melo MGM, Mesquita EDD, Oliveira MM, Silva-Monteiro C da, Silveira AK, Malaquias TS, et al. Imbalance of NET and alpha-1-antitrypsin in tuberculosis patients is related with hyper inflammation and severe lung tissue damage. *Front Immunol.* 2019;3147.
124. Lowe DM, Bandara AK, Packe GE, Barker RD, Wilkinson RJ, Griffiths CJ, et al. Neutrophilia independently predicts death in tuberculosis. *Eur Respir J.* 2013;42(6):1752-7.
125. Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. 1984;
126. Dallenga T, Repnik U, Corleis B, Eich J, Reimer R, Griffiths GW, et al. M. tuberculosis-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages. *Cell Host Microbe.* 2017;22(4):519-530. e3.
127. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1017-25.
128. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP. Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. *J Immunol Res.* 2016;2016.

129. Muefong CN, Sutherland JS. Neutrophils in Tuberculosis-Associated Inflammation and Lung Pathology. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [citado 22 de agosto de 2022];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00962>
130. Chen M, Divangahi M, Gan H, Shin DS, Hong S, Lee DM, et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J Exp Med*. 2008;205(12):2791-801.
131. Divangahi M, Behar SM, Remold H. Dying to Live: How the Death Modality of the Infected Macrophage Affects Immunity to Tuberculosis. En: Divangahi M, editor. *The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis* [Internet]. New York, NY: Springer; 2013 [citado 22 de agosto de 2022]. p. 103-20. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_6)
132. Dorhoi A, Kaufmann SHE. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. *Semin Immunol*. 1 de junio de 2014;26(3):203-9.
133. Scott Algood HM, Lin PL, Flynn JL. Tumor Necrosis Factor and Chemokine Interactions in the Formation and Maintenance of Granulomas in Tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 1 de agosto de 2005;41(Supplement\_3):S189-93.
134. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. junio de 1995;2(6):561-72.
135. Takashima T, Ueta C, Tsuyuguchi I, Kishimoto S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. octubre de 1990;58(10):3286-92.
136. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*. octubre de 2001;345(15):1098-104.
137. Condos R, Rom WN, Liu YM, Schluger NW. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. marzo de 1998;157(3 Pt 1):729-35.
138. Hernandez-Pando R, Rook GA. The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology*. agosto de 1994;82(4):591-5.
139. Hernandez-Pando R, Aguilar D, Hernandez MLG, Orozco H, Rook G. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis. *Eur J Immunol*. enero de 2004;34(1):174-83.
140. Mazzarella G, Bianco A, Perna F, D'Auria D, Grella E, Moscariello E, et al. T lymphocyte phenotypic profile in lung segments affected by cavitory and non-cavitory tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. mayo de 2003;132(2):283-8.

141. van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RH, et al. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis.* marzo de 2000;181(3):1194-7.
142. Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Eguale T, Hiwot K, Aderaye G, et al. Circulating TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and IL-10 in Tuberculosis Patients and Healthy Contacts. *Scand J Immunol.* 2001;53(1):85-91.
143. Marshall BG, Wangoo A, Cook HT, Shaw RJ. Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. *Thorax.* 1 de diciembre de 1996;51(12):1253-61.
144. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol.* 1 de enero de 1995;154(1):465-73.
145. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* enero de 1995;146(1):56-66.
146. Ramos C, Montaña M, García-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, et al. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mayo de 2001;24(5):591-8.
147. Torrado E, Cooper AM. Cytokines in the balance of protection and pathology during mycobacterial infections. *New Paradigm Immun Tuberc.* 2013;121-40.
148. Miyake S. Mind over cytokines: Crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2012;3(1):1-15.
149. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci.* 1 de agosto de 2021;8(15):2004433.
150. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:475-527.
151. Bai R, Tao L, Li B, Liu A, Dai X, Ji Z, et al. Using cytometric bead arrays to detect cytokines in the serum of patients with different types of pulmonary tuberculosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2019;33:2058738419845176.
152. Theron G, Peter J, Lenders L, van Zyl-Smit R, Meldau R, Govender U, et al. Correlation of mycobacterium tuberculosis specific and non-specific quantitative Th1 T-cell responses with bacillary load in a high burden setting. *PloS One.* 2012;7(5):e37436.
153. Zhong D, Dong L, Liang Q. Alteration of interferon-gamma and interleukin-12 released by bronchoalveolar lavage cells from pulmonary tuberculosis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi Chin J Tuberc Respir Dis.* 2000;23(9):552-5.

154. Teufel LU, Arts RJW, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. IL-1 family cytokines as drivers and inhibitors of trained immunity. *Cytokine*. 1 de febrero de 2022;150:155773.
155. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. 16 de abril de 2019;50(4):778-95.
156. Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, Chen LS, Grzybek M, Grinenko T, et al. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell*. 11 de enero de 2018;172(1-2):147-161.e12.
157. Moorlag SJCFM, Röring RJ, Joosten LAB, Netea MG. The role of the interleukin-1 family in trained immunity. *Immunol Rev*. 1 de enero de 2018;281(1):28-39.
158. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, Caspar P, et al. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunity*. 23 de diciembre de 2011;35(6):1023.
159. Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, Verbon A, Kolk AH, Speelman P, et al. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 2000;182(3):902-8.
160. Di Paolo NC, Shafiani S, Day T, Papayannopoulou T, Russell DW, Iwakura Y, et al. Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Immunity*. 2015;43(6):1125-36.
161. Bourigault ML, Segueni N, Rose S, Court N, Vacher R, Vasseur V, et al. Relative contribution of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF to the host response to Mycobacterium tuberculosis and attenuated M. bovis BCG. *Immun Inflamm Dis*. 1 de octubre de 2013;1(1):47.
162. Ronacher K, Chegou NN, Kleynhans L, Djoba Siawaya JF, du Plessis N, Loxton AG, et al. Distinct serum biosignatures are associated with different tuberculosis treatment outcomes. *Tuberculosis*. 2019;118:101859.
163. Chowdhury IH, Ahmed AM, Choudhuri S, Sen A, Hazra A, Pal NK, et al. Alteration of serum inflammatory cytokines in active pulmonary tuberculosis following anti-tuberculosis drug therapy. *Mol Immunol*. 1 de noviembre de 2014;62(1):159-68.
164. Shi XY, Yi FS, Qiao X, Pei XB, Dong SF. Diagnostic accuracy of interleukin-33 for tuberculous pleural effusion: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. agosto de 2021;100(31):e26755.
165. Lee KS, Kim HR, Kwak S, Choi KH, Cho JH, Lee YJ, et al. Association between elevated pleural interleukin-33 levels and tuberculous pleurisy. *Ann Lab Med*. 2013;33(1):45.
166. Li D, Shen Y, Fu X, Li M, Wang T, Wen F. Combined detections of interleukin-33 and adenosine deaminase for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):888-93.

167. Coccia EM, Battistini A. Early IFN type I response: Learning from microbial evasion strategies. *Semin Immunol.* 2015;27(2):85-101.
168. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):87-103.
169. Yamada G, Shijubo N, Shigehara K, Okamura H, Kurimoto M, Abe S. Increased levels of circulating interleukin-18 in patients with advanced tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* junio de 2000;161(6):1786-9.
170. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res.* 2012;52(1):89-99.
171. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PloS One.* 2008;3(10):e3331.
172. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med.* 2008;205(2):339-46.
173. Smith DE. IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(2):200-8.
174. Préfontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ, et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol.* 2009;183(8):5094-103.
175. Wieland CW, van der Windt GJW, Florquin S, McKenzie ANJ, van der Poll T. ST2 deficient mice display a normal host defense against pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2009;11(4):524-30.
176. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I inteferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity.* 2006;25(3):349-60.
177. Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol.* mayo de 2011;4(3):252-60.
178. Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, et al. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- $\alpha/\beta$ . *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(10):5752-7.
179. Ordway D, Henao-Tamayo M, Harton M, Palanisamy G, Troudt J, Shanley C, et al. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *J Immunol.* 2007;179(1):522-31.

180. Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*. 19 de agosto de 2010;466(7309):973-7.
181. Desvignes L, Wolf AJ, Ernst JD. Dynamic roles of type I and type II IFNs in early infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2012;188(12):6205-15.
182. Antonelli LR V, Rothfuchs AG, Gonçalves R, Roffê E, Cheever AW, Báfica A, et al. Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1674-82.
183. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-89.
184. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN- $\gamma$  production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*. 2001;22(10):556-60.
185. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(8):569-78.
186. Mogue T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Exp Med*. 2001;193(3):271-80.
187. Keller C, Hoffmann R, Lang R, Brandau S, Hermann C, Ehlers S. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. *Infect Immun*. 2006;74(7):4295-309.
188. Majorov KB, Eruslanov EB, Rubakova EI, Kondratieva TK, Apt AS. Analysis of cellular phenotypes that mediate genetic resistance to tuberculosis using a radiation bone marrow chimera approach. *Infect Immun*. 2005;73(9):6174-8.
189. Ljic Rr. IFN- $\gamma$  Therapy of Tuberculosis and Related Infections. *J Interferon Cytokine Res*. 2007;27(5):353-64.
190. Zhang SY, Boisson-Dupuis S, Chapgier A, Yang K, Bustamante J, Puel A, et al. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunol Rev*. diciembre de 2008;226:29-40.
191. Chegu NN, Heyckendorf J, Walzl G, Lange C, Ruhwald M. Beyond the IFN- $\gamma$  horizon: biomarkers for immunodiagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J*. 2014;43(5):1472-86.
192. Chandrashekara S, Anupama KR, Sambarey A, Chandra N. High IL-6 and low IL-15 levels mark the presence of TB infection: A preliminary study. *Cytokine*. mayo de 2016;81:57-62.

193. Bongiovanni B, Marín-Luevano S, D'Attilio L, Díaz A, Fernández RDV, Santucci N, et al. Evidence that changes in antimicrobial peptides during tuberculosis are related to disease severity, clinical presentation, specific therapy and levels of immune-endocrine mediators. *Cytokine*. febrero de 2020;126:154913.
194. Deveci F, Akbulut HH, Turgut T, Muz MH. Changes in serum cytokine levels in active tuberculosis with treatment. *Mediators Inflamm*. 24 de octubre de 2005;2005(5):256-62.
195. Kumar NP, Moideen K, Banurekha V V, Nair D, Babu S. Plasma Proinflammatory Cytokines Are Markers of Disease Severity and Bacterial Burden in Pulmonary Tuberculosis. *Open Forum Infect Dis*. 1 de julio de 2019;6(7):ofz257.
196. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S ichi, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatol Oxf Engl*. julio de 2010;49(7):1215-28.
197. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:599-623.
198. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:93-129.
199. Elkington PTG, Nuttall RK, Boyle JJ, O'Kane CM, Horncastle DE, Edwards DR, et al. Mycobacterium tuberculosis, but not vaccine BCG, specifically upregulates matrix metalloproteinase-1. *Am J Respir Crit Care Med*. diciembre de 2005;172(12):1596-604.
200. Tram TTB, Nhung HN, Vijay S, Hai HT, Thu DDA, Ha VTN, et al. Virulence of Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates Is Associated With Sputum Pre-treatment Bacterial Load, Lineage, Survival in Macrophages, and Cytokine Response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8.
201. Duque C, Arroyo L, Ortega H, Montúfar F, Ortíz B, Rojas M, et al. Different responses of human mononuclear phagocyte populations to Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*. 1 de marzo de 2014;94(2):111-22.
202. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:393-422.
203. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med*. julio de 1997;186(1):39-45.
204. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. Vol. 2, *Nature reviews. Immunology*. England; 2002. p. 364-71.
205. Soeroto AY, Dahlan Z, Kartasasmita CB, Parwati I. Serum cytokines level can differentiate active pulmonary tuberculosis from latent TB. *Eur Respir J*. 1 de septiembre de 2013;42(Suppl 57):P2842.



206. Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbiol Spectr*. 14 de octubre de 2016;4(5).
207. Nie W, Wang J, Jing W, Shi W, Wang Q, Huang X, et al. Value of serum cytokine biomarkers TNF- $\alpha$ , IL-4, sIL-2R and IFN- $\gamma$  for use in monitoring bacterial load and anti-tuberculosis treatment progress. *Cytokine X*. 1 de junio de 2020;2(2):100028.
208. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol*. 1 de diciembre de 2021;101:107598.
209. Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA. Chemokines Induced by Infection of Mononuclear Phagocytes with Mycobacteria and Present in Lung Alveoli during Active Pulmonary Tuberculosis. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.1932815>. 14 de diciembre de 2012;19(3):513-21.
210. Zhou Y, Zhang F, Shi H, Wu P, Zhou Y. Host Biomarkers Other than Interferon Gamma in QFT-TB Supernatants for Identifying Active Tuberculosis. *SSRN Electron J*. 3 de febrero de 2022;
211. Djoba Siawaya JF, Beyers N, van Helden P, Walzl G. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. abril de 2009;156(1):69-77.
212. Sigal GB, Segal MR, Mathew A, Jarlsberg L, Wang M, Barbero S, et al. Biomarkers of Tuberculosis Severity and Treatment Effect: A Directed Screen of 70 Host Markers in a Randomized Clinical Trial. *EBioMedicine*. 1 de noviembre de 2017;25:112.
213. Kumar NP, Moideen K, Nancy A, Viswanathan V, Thiruvengadam K, Nair D, et al. Plasma Chemokines Are Baseline Predictors of Unfavorable Treatment Outcomes in Pulmonary Tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2 de noviembre de 2021;73(9):e3419-27.
214. Hasan Z, Cliff JM, Dockrell HM, Jamil B, Irfan M, Ashraf M, et al. CCL2 Responses to Mycobacterium tuberculosis Are Associated with Disease Severity in Tuberculosis. *PLOS ONE*. 2009;4(12):e8459.
215. Majumder N, Bhattacharjee S, Bhattacharyya (Majumdar) S, Dey R, Guha P, Pal NK, et al. Restoration of Impaired Free Radical Generation and Proinflammatory Cytokines by MCP-1 in Mycobacterial Pathogenesis. *Scand J Immunol*. 2008;67(4):329-39.
216. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2011;1813(5):878-88.
217. Sodenkamp J, Behrends J, Förster I, Müller W, Ehlers S, Hölscher C. gp130 on macrophages/granulocytes modulates inflammation during experimental tuberculosis. *Eur J Cell Biol*. 2011;90(6-7):505-14.

218. Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun.* 2000;68(6):3322-6.
219. Schmok E, Abad Dar M, Behrends J, Erdmann H, Ruckerl D, Endermann T, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 in macrophages prevents exacerbated interleukin-6-dependent arginase-1 activity and early permissiveness to experimental tuberculosis. *Front Immunol.* 2017;8:1537.
220. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(4):984-1010.
221. Ritter K, Rousseau J, Hölscher C. The Role of gp130 Cytokines in Tuberculosis. *Cells.* 15 de diciembre de 2020;9(12):E2695-E2695.
222. Portevin D, Gagneux S, Comas I, Young D. Human Macrophage Responses to Clinical Isolates from the Mycobacterium tuberculosis Complex Discriminate between Ancient and Modern Lineages. *PLOS Pathog.* 2011;7(3):1-12.
223. Romagnoli A, Petruccioli E, Palucci I, Camassa S, Carata E, Petrone L, et al. Clinical isolates of the modern Mycobacterium tuberculosis lineage 4 evade host defense in human macrophages through eluding IL-1 $\beta$ -induced autophagy. *Cell Death Dis.* 2018;9(6):624.
224. El-Ahmady O, Mansour M, Zoeir H, Mansour O. Elevated Concentrations of Interleukins and Leukotriene in Response to Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Ann Clin Biochem.* 1997;34(2):160-4.
225. Nolan A, Condos R, Huie ML, Dawson R, Dheda K, Bateman E, et al. Elevated IP-10 and IL-6 from bronchoalveolar lavage cells are biomarkers of non-cavitary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* julio de 2013;17(7):922-7.
226. Elkington PT, Friedland JS, O'Kane CM, Boyle JJ, Horncastle DE. Monocyte-Dependent Fibroblast CXCL8. *J Immunol.* 2007;178:3767-76.
227. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu Rev Immunol.* 2007;25(1):787-820.
228. Slight SR, Khader SA. Chemokines shape the immune responses to tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1 de abril de 2013;24(2):105-13.
229. Larsen CG, Thomsen MK, Gesser B, Thomsen PD, Deleuran BW, Nowak J, et al. The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody. *J Immunol.* 1995;155(4):2151-7.
230. Almeida C de S, Abramo C, Alves CC de S, Mazzocchi L, Ferreira AP, Teixeira HC. Anti-mycobacterial treatment reduces high plasma levels of CXC-chemokines detected in active tuberculosis by cytometric bead array. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:1039-41.

231. Bai XJ, Li HM, Yang YR, Zhang JX, Liang Y, Wu XQ. Cytokine and soluble adhesion molecule profiles and biomarkers for treatment monitoring in Re-treated smear-positive patients with pulmonary tuberculosis. *Cytokine*. agosto de 2018;108:9-16.
232. Lui G, Wong CK, Ip M, Chu YJ, Yung IMH, Cheung CSK, et al. HMGB1/RAGE Signaling and Pro-Inflammatory Cytokine Responses in Non-HIV Adults with Active Pulmonary Tuberculosis. *PloS One*. 1 de julio de 2016;11(7).
233. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683.
234. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010 103. 15 de febrero de 2010;10(3):170-81.
235. Kaiser F, Cook D, Papoutsopoulou S, Rajsbaum R, Wu X, Yang HT, et al. TPL-2 negatively regulates interferon- $\beta$  production in macrophages and myeloid dendritic cells. *J Exp Med*. 2009;206(9):1863-71.
236. Shaw TC, Thomas LH, Friedland JS. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytic cells. *Cytokine*. 2000;12(5):483-6.
237. Hickman SP, Chan J, Salgame P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol*. 2002;168(9):4636-42.
238. Bodnar KA, Serbina N V, Flynn JL. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infect Immun*. 2001;69(2):800-9.
239. O'Leary S, O'Sullivan MP, Keane J. IL-10 blocks phagosome maturation in *mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. julio de 2011;45(1):172-80.
240. Shi S, Nathan C, Schnappinger D, Drenkow J, Fuortes M, Block E, et al. MyD88 primes macrophages for full-scale activation by interferon- $\gamma$  yet mediates few responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2003;198(7):987-97.
241. Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NRJ. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol*. 2001;9(2):86-92.
242. Averbakh MM, Ergeshow A. Interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and Human Host: Role of Cytokines in Pathogenesis and Treatment Monitoring. En: *Tuberculosis*. InTech; 2018.
243. Jacobs M, Fick L, Allie N, Brown N, Ryffel B. Enhanced immune response in *Mycobacterium bovis* bacille calmette guerin (BCG)-infected IL-10-deficient mice. 2002;

244. Roque S, Nobrega C, Appelberg R, Correia-Neves M. IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to Mycobacterium avium infection and influences efficacy of antibiotic therapy. *J Immunol.* 2007;178(12):8028-35.
245. Ameglio F, Casarini M, Capoluongo E, Mattia P, Puglisi G, Giosuè S. Post-treatment changes of six cytokines in active pulmonary tuberculosis: differences between patients with stable or increased fibrosis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* enero de 2005;9(1):98-104.
246. Ndishimye P, Seghrouchni F, Domokos B, Soritau O, Sadak A, Homorodean D, et al. Evaluation of interleukin-10 levels in the plasma of patients with various stages of tuberculosis. *Clujul Med 1957.* 2015;88(2):164-7.
247. Moideen K, Kumar NP, Bethunaickan R, Banurekha V V, Nair D, Babu S. Heightened systemic levels of anti-inflammatory cytokines in pulmonary tuberculosis and alterations following anti-tuberculosis treatment. *Cytokine.* marzo de 2020;127:154929.
248. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201(2):233-40.
249. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-9.
250. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1123-32.
251. Lin Y, Ritchie S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity.* 2009;31(5):799-810.
252. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008;28(4):454-67.
253. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24(2):179-89.
254. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007;448(7152):480-3.
255. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Lyakh LA, Batoni G, Esin S, Winkler-Pickett RT, et al. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med.* 2008;205(6):1447-61.

256. Cooper AM, Solache A, Khader SA. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Curr Opin Immunol.* agosto de 2007;19(4):441-7.
257. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, et al. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. *J Immunol.* 15 de abril de 2010;184(8):4414 LP - 4422.
258. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006;7(9):937-45.
259. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* diciembre de 2010;21(6):455-62.
260. Feng CG, Jankovic D, Kullberg M, Cheever A, Scanga CA, Hieny S, et al. Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. *J Immunol Baltim Md 1950.* abril de 2005;174(7):4185-92.
261. Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol.* mayo de 2002;10(5):221-6.
262. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, et al. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med.* julio de 2006;203(7):1805-15.
263. Wozniak TM, Ryan AA, Britton WJ. Interleukin-23 restores immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in IL-12p40-deficient mice and is not required for the development of IL-17-secreting T cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950.* diciembre de 2006;177(12):8684-92.
264. Khader SA, Pearl JE, Sakamoto K, Gilmartin L, Bell GK, Jelley-Gibbs DM, et al. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol Baltim Md 1950.* julio de 2005;175(2):788-95.
265. Zhao Y, Zhang J, Xue B, Zhang F, Xu Q, Ma H, et al. Serum levels of inhibitory costimulatory molecules and correlations with levels of innate immune cytokines in patients with pulmonary tuberculosis. *J Int Med Res.* 2021;49(8).
266. Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan HX, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol.* mayo de 2011;4(3):279.
267. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001;2(7):612-9.

268. Prieto P, Cuenca J, Través PG, Fernández-Velasco M, Martín-Sanz P, Boscá L. Lipoxin A4 impairment of apoptotic signaling in macrophages: implication of the PI3K/Akt and the ERK/Nrf-2 defense pathways. *Cell Death Differ*. 2010;17(7):1179-88.
269. Pavan Kumar N, Moideen K, Nancy A, Viswanathan V, Shruthi BS, Shanmugam S, et al. Plasma Eicosanoid Levels in Tuberculosis and Tuberculosis-Diabetes Co-morbidity Are Associated With Lung Pathology and Bacterial Burden. *Front Cell Infect Microbiol*. 1 de octubre de 2019;9:335.
270. Elmonem MA, Van Den Heuvel LP, Levtchenko EN. Immunomodulatory Effects of Chitotriosidase Enzyme. *Enzyme Res*. 2016;2016.
271. Sutherland TE, Maizels RM, Allen JE. Chitinases and chitinase-like proteins: potential therapeutic targets for the treatment of T-helper type 2 allergies. *Clin Exp Allergy*. 1 de julio de 2009;39(7):943-55.
272. Shemesh E, Deroma L, Bembi B, Deegan P, Hollak C, Weinreb NJ, et al. Enzyme replacement and substrate reduction therapy for Gaucher disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 27 de marzo de 2015;2015(3).
273. Ries M, Schaefer E, Lührs T, Mani L, Kuhn J, Vanier MT, et al. Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann–Pick disease type A/B and C. *J Inherit Metab Dis*. 1 de octubre de 2006;29(5):647-52.
274. Elmonem MA, Makar SH, Van Den Heuvel L, Abdelaziz H, Abdelrahman SM, Bossuyt X, et al. Clinical utility of chitotriosidase enzyme activity in nephropathic cystinosis. *Orphanet J Rare Dis*. 19 de noviembre de 2014;9(1):1-10.
275. Pagliardini V, Pagliardini S, Corrado L, Lucenti A, Panigati L, Bersano E, et al. Chitotriosidase and lysosomal enzymes as potential biomarkers of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: A survey clinic-based study. *J Neurol Sci*. 15 de enero de 2015;348(1-2):245-50.
276. Olsson B, Malmeström C, Basun H, Annas P, Höglund K, Lannfelt L, et al. Extreme Stability of Chitotriosidase in Cerebrospinal Fluid makes it a Suitable Marker for Microglial Activation in Clinical Trials. *J Alzheimers Dis*. 1 de enero de 2012;32(2):273-6.
277. Artieda M, Cenarro A, Gañán A, Jericó I, Gonzalvo C, Casado JM, et al. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(9):1645-52.
278. Bustamante A, Dominguez C, Rodriguez-Sureda V, Vilches A, Penalba A, Giralt D, et al. Prognostic value of plasma chitotriosidase activity in acute stroke patients. *Int J Stroke*. 1 de octubre de 2014;9(7):910-6.

279. Yildiz BS, Barutcuoglu B, Alihanoglu YI, Alkan MB, Bilgin M, Gul I, et al. Serum Chitotriosidase Activity in Acute Coronary Syndrome. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(2):13920.
280. Chang D, Sharma L, Dela Cruz CS. Chitotriosidase: a marker and modulator of lung disease. *Eur Respir Rev.* 30 de junio de 2020;29(156).
281. Vandevenne M, Campisi V, Freichels A, Gillard C, Gaspard G, Frère JM, et al. Comparative functional analysis of the human macrophage chitotriosidase. *Protein Sci.* 1 de agosto de 2011;20(8):1451-63.
282. Barone R, Simporé J, Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase activity in acute Plasmodium falciparum malaria. *Clin Chim Acta.* 1 de mayo de 2003;331(1-2):79-85.
283. Wiesner DL, Specht CA, Lee CK, Smith KD, Mukaremera L, Lee ST, et al. Chitin Recognition via Chitotriosidase Promotes Pathologic Type-2 Helper T Cell Responses to Cryptococcal Infection. *PLOS Pathog.* 1 de marzo de 2015;11(3):e1004701.
284. Choi EH, Zimmerman PA, Foster CB, Zhu S, Kumaraswami V, Nutman TB, et al. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun* 2001 25. 30 de agosto de 2001;2(5):248-53.
285. Tasci C, Tapan S, Ozkaya S, Demirer E, Deniz O, Balkan A, et al. Efficacy of serum chitotriosidase activity in early treatment of patients with active tuberculosis and a negative sputum smear. *Ther Clin Risk Manag.* 2012;8:369.
286. Di Rosa M, Zambito AM, Marsullo AR, Li Volti G, Malaguarnera L. Prolactin induces chitotriosidase expression in human macrophages through PTK, PI3-K, and MAPK pathways. *J Cell Biochem.* 1 de agosto de 2009;107(5):881-9.
287. Correale J, Fiol M. Chitinase effects on immune cell response in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 15 de diciembre de 2011;17(5):521-31.
288. Létuvé S, Kozhich A, Humbles A, Brewah Y, Dombret MC, Grandsaigne M, et al. Lung Chitinolytic Activity and Chitotriosidase Are Elevated in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contribute to Lung Inflammation. *Am J Pathol.* 1 de febrero de 2010;176(2):638-49.
289. Di Rosa M, Malaguarnera G, De Gregorio C, Drago F, Malaguarnera L. Evaluation of CHI3L-1 and CHIT-1 expression in differentiated and polarized macrophages. *Inflammation.* 14 de abril de 2013;36(2):482-92.
290. Di Rosa M, Malaguarnera G, De Gregorio C, D'Amico F, Mazzarino MC, Malaguarnera L. Modulation of Chitotriosidase During Macrophage Differentiation. *Cell Biochem Biophys.* 15 de junio de 2013;66(2):239-47.

291. Cakir G, Gumus S, Ucar E, Kaya H, Tozkoparan E, Akgul EO, et al. Serum chitotriosidase activity in pulmonary tuberculosis: response to treatment and correlations with clinical parameters. *Ann Lab Med.* mayo de 2012;32(3):184-9.
292. Djoba Siawaya JF, Beyers N, van Helden P, Walzl G. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* abril de 2009;156(1):69-77.
293. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol.* 1 de diciembre de 2014;26(6):431-44.
294. Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunol Rev.* 1 de marzo de 2015;264(1):6-24.
295. Coscolla M, Gagneux S, Menardo F, Loiseau C, Ruiz-Rodriguez P, Borrell S, et al. Phylogenomics of *mycobacterium africanum* reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *Microb Genomics.* 8 de febrero de 2021;7(2):1-14.
296. Ngabonziza JCS, Loiseau C, Marceau M, Jouet A, Menardo F, Tzfidia O, et al. A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. *Nat Commun* 2020 111. 9 de junio de 2020;11(1):1-11.
297. Brites D, Loiseau C, Menardo F, Borrell S, Boniotti MB, Warren R, et al. A new phylogenetic framework for the animal-adapted *mycobacterium tuberculosis* complex. *Front Microbiol.* 27 de noviembre de 2018;9(NOV):2820.
298. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 2013 4510. 1 de septiembre de 2013;45(10):1176-82.
299. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wöbeling F, Kubica T, Kremer K, et al. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLOS Pathog.* septiembre de 2008;4(9):e1000160.
300. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, De Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 de febrero de 2006;103(8):2869-73.
301. Gagneux S. Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2012;367(1590):850-9.
302. Eldholm V, Balloux F. Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Odd One Out. *Trends Microbiol.* 1 de agosto de 2016;24(8):637-48.
303. Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, et al. High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. *PLOS Biol.* diciembre de 2008;6(12):e311.



304. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis.* mayo de 2007;7(5):328-37.
305. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol* 2018 164. 19 de febrero de 2018;16(4):202-13.
306. Chiner-Oms Á, López MG, Moreno-Molina M, Furió V, Comas I. Gene evolutionary trajectories in *Mycobacterium tuberculosis* reveal temporal signs of selection. *Proc Natl Acad Sci.* 2022;119(17):e2113600119.
307. Nicol MP, Wilkinson RJ. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 de octubre de 2008;102(10):955-65.
308. López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol.* 24 de junio de 2003;133(1):30-7.
309. Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, et al. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol.* 23 de julio de 2004;137(3):460-8.
310. Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, et al. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis.* 1 de julio de 2005;192(1):98-106.
311. Sampson SL. Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011.
312. Brennan MJ. The Enigmatic PE/PPE Multigene Family of Mycobacteria and Tuberculosis Vaccination. *Infect Immun.* junio de 2017;85(6).
313. McEvoy CRE, Cloete R, Müller B, Schürch AC, van Helden PD, Gagneux S, et al. Comparative Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pe and ppe Genes Reveals High Sequence Variation and an Apparent Absence of Selective Constraints. *PLOS ONE.* 4 de abril de 2012;7(4):e30593.
314. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* diciembre de 1995;33(12):3234-8.
315. Hanekom M, Van Der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CRE, Kidd M, et al. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol.* mayo de 2007;45(5):1483-90.

316. Hu Y, Mathema B, Zhao Q, Zheng X, Li D, Jiang W, et al. Comparison of the socio-demographic and clinical features of pulmonary TB patients infected with sub-lineages within the W-Beijing and non-Beijing *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2016;97:18-25.
317. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, et al. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 de abril de 2004;101(14):4865-70.
318. Rajwani R, Yam WC, Zhang Y, Kang Y, Wong BKC, Leung KSS, et al. Comparative whole-genomic analysis of an ancient L2 lineage *Mycobacterium tuberculosis* reveals a novel phylogenetic clade and common genetic determinants of hypervirulent strains. *Front Cell Infect Microbiol*. 12 de enero de 2018;7(JAN):539.
319. Koster K, Largen A, Foster JT, Drees KP, Qian L, Desmond EP, et al. Whole genome SNP analysis suggests unique virulence factor differences of the Beijing and Manila families of *Mycobacterium tuberculosis* found in Hawaii. *PLOS ONE*. 1 de julio de 2018;13(7):e0201146.
320. Jia X, Yang L, Dong M, Chen S, Lv L, Cao D, et al. The bioinformatics analysis of comparative genomics of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) provides insight into dissimilarities between intraspecific groups differing in host association, virulence, and epitope diversity. *Front Cell Infect Microbiol*. 21 de marzo de 2017;7(MAR):88.
321. Huet G, Constant P, Malaga W, Lanéele MA, Kremer K, van Soolingen D, et al. A lipid profile typifies the Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a mutation responsible for a modification of the structures of phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids. *J Biol Chem*. 2 de octubre de 2009;284(40):27101-13.
322. Gao R, Stock AM. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:133-54.
323. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem*. 2000;69(1):183-215.
324. Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ, Stoker NG. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. marzo de 2003;71(3):1134-40.
325. Isaza JP, Duque C, Gomez V, Robledo J, Barrera LF, Alzate JF. Whole genome shotgun sequencing of one Colombian clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis* reveals DosR regulon gene deletions. *FEMS Microbiol Lett*. mayo de 2012;330(2):113-20.
326. Chiner-Oms Á, Sánchez-Busó L, Corander J, Gagneux S, Harris SR, Young D, et al. Genomic determinants of speciation and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Sci Adv*. 2019;5(6):eaaw3307.

327. Solans L, Aguiló N, Samper S, Pawlik A, Frigui W, Martín C, et al. A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. *Infect Immun*. 2014;82(8):3446-56.
328. Broset E, Martín C, Gonzalo-Asensio J. Evolutionary Landscape of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex from the Viewpoint of PhoPR: Implications for Virulence Regulation and Application to Vaccine Development. *mBio*. 2015;6(5):e01289-15.
329. Brosch R, Gordon S V, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(6):3684-9.
330. Bottai D, Frigui W, Sayes F, Di Luca M, Spadoni D, Pawlik A, et al. TbD1 deletion as a driver of the evolutionary success of modern epidemic *Mycobacterium tuberculosis* lineages. *Nat Commun*. 2020;11(1):684.
331. Lazzarini LCO, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, et al. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage That Is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3891-902.
332. de Almeida IN, Vasconcellos SEG, de Assis Figueredo LJ, Dantas NGT, Augusto CJ, Hadaad JPA, et al. Frequency of the *Mycobacterium tuberculosis* RDRio genotype and its association with multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):556.
333. David S, Duarte EL, Leite CQF, Ribeiro JN, Maio JN, Paixão E, et al. Implication of the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal. *Infect Genet Evol*. 2012;12(7):1362-7.
334. Weisenberg SA, Gibson AL, Huard RC, Kurepina N, Bang H, Lazzarini LCO, et al. Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):664-70.
335. Rindi L, Medici C, Bimbi N, Buzzigoli A, Lari N, Garzelli C. Genomic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Euro-American lineage based on large sequence deletions and 15-locus MIRU-VNTR polymorphism. *PLoS One*. 8 de septiembre de 2014;9(9):e107150-e107150.
336. Mokrousov I, Vyazovaya A, Narvskaya O. *Mycobacterium tuberculosis* Latin American-Mediterranean Family and Its Sublineages in the Light of Robust Evolutionary Markers. *J Bacteriol*. 2014;196(10):1833-41.
337. Vasconcellos SEG, Acosta CC, Gomes LL, Conceição EC, Lima KV, de Araujo MI, et al. Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. *PLOS ONE*. 2014;9(10):1-14.

338. de Jong BC, Hill PC, Aiken A, Awine T, Antonio M, Adetifa IM, et al. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia. *J Infect Dis.* 1 de octubre de 2008;198(7):1037-43.
339. He C, Cheng X, Kaisaier A, Wan J, Luo S, Ren J, et al. Effects of *Mycobacterium tuberculosis* lineages and regions of difference (RD) virulence gene variation on tuberculosis recurrence. *Ann Transl Med.* enero de 2022;10(2):49.
340. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, y García JS, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence.* 2013;4(1):3-66.
341. Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, et al. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2002;45(1):203-17.
342. Goudarzi H, Mirsamadi E, Farnia P, Jahani Sherafat S, Esfahani M, Faramarzi N. Phospholipase C in Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Iran J Microbiol.* diciembre de 2010;2(4):194-7.
343. Vera-Cabrera L, Hernández-Vera MA, Welsh O, Johnson WM, Castro-Garza J. Phospholipase Region of *Mycobacterium tuberculosis* Is a Preferential Locus for IS6110 Transposition. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3499-504.
344. Organization WH. Global tuberculosis report 2012. Geneva PP - Geneva: World Health Organization;
345. Elkington PT, D'Armiento JM, Friedland JS. Tuberculosis immunopathology: the neglected role of extracellular matrix destruction. *Sci Transl Med.* 2011;3(71):71ps6-71ps6.
346. Costa ERD, Lazzarini LCO, Perizzolo PF, Díaz CA, Spies FS, Costa LL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* of the RDRio genotype is the predominant cause of tuberculosis and associated with multidrug resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *J Clin Microbiol.* 16 de abril de 2013;51(4):1071-7.
347. Weisenberg SA, Gibson AL, Huard RC, Kurepina N, Bang H, Lazzarini LCO, et al. Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RD Rio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage. *Infect Genet Evol.* junio de 2012;12(4):664-70.
348. Lazzarini LCO, Spindola SM, Bang H, Gibson AL, Weisenberg S, Carvalho WDS, et al. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitory pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* julio de 2008;46(7):2175-83.
349. Click ES, Moonan PK, Winston CA, Cowan LS, Oeltmann JE. Relationship between *mycobacterium tuberculosis* phylogenetic lineage and clinical site of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 15 de enero de 2012;54(2):211-9.

350. Pareek M, Evans J, Innes J, Smith G, Hingley-Wilson S, Lougheed KE, et al. Ethnicity and mycobacterial lineage as determinants of tuberculosis disease phenotype. *Thorax*. 2013;68(3):221-9.
351. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. Vol. 7, *Lancet Infectious Diseases*. *Lancet Infect Dis*; 2007. p. 328-37.
352. Baena A, Cabarcas F, Alvarez-Eraso KLF, Isaza JP, Alzate JF, Barrera LF. Differential determinants of virulence in two *Mycobacterium tuberculosis* Colombian clinical isolates of the LAM09 family. *Virulence*. 1 de enero de 2019;10(1):695-710.
353. Wallis RS, Wang C, Meyer D, Thomas N. Month 2 culture status and treatment duration as predictors of tuberculosis relapse risk in a meta-regression model. *PloS One*. 2013;8(8):e71116.
354. Wallis RS, Wang C, Doherty TM, Onyebujoh P, Vahedi M, Laang H, et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(2):68-9.
355. Horne DJ, Royce SE, Gooze L, Narita M, Hopewell PC, Nahid P, et al. Sputum monitoring during tuberculosis treatment for predicting outcome: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(6):387-94.
356. Johnson JL, Hadad DJ, Dietze R, Noia Maciel EL, Sewali B, Gitta P, et al. Shortening treatment in adults with noncavitary tuberculosis and 2-month culture conversion. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(6):558-63.
357. Singh P, Rao RN, Reddy JRC, Prasad RBN, Kotturu SK, Ghosh S, et al. PE11, a PE/PPE family protein of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in cell wall remodeling and virulence. *Sci Rep*. 23 de febrero de 2016;6(1):21624.
358. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich A, Korobeynikov A, Lapidus A, et al. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. En: Deng M, Jiang R, Sun F, Zhang X, editores. *Research in Computational Molecular Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013. p. 158-70. (Lecture Notes in Computer Science).
359. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. abril de 2012;9(4):357-9.
360. Sobkowiak B, Glynn JR, Houben RMGJ, Mallard K, Phelan JE, Guerra-Assunção JA, et al. Identifying mixed *Mycobacterium tuberculosis* infections from whole genome sequence data. *BMC Genomics*. 14 de agosto de 2018;19(1):613.
361. Epitools - Home [Internet]. [citado 21 de julio de 2022]. Disponible en: <https://epitools.ausvet.com.au/>
362. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional

- discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 8 de enero de 2019;47(D1):D607-13.
363. Sousa J, Cá B, Maceiras AR, Simões-Costa L, Fonseca KL, Fernandes AI, et al. *Mycobacterium tuberculosis* associated with severe tuberculosis evades cytosolic surveillance systems and modulates IL-1 $\beta$  production. *Nat Commun* 2020 11. 23 de abril de 2020;11(1):1-14.
364. Tuberculosis [Internet]. [citado 2 de diciembre de 2021]. Disponible en: [https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_2)
365. Ravimohan S, Kornfeld H, Weissman D, Bisson GP. Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. *Eur Respir Rev.* 31 de marzo de 2018;27(147):170077.
366. Andreu J, Cáceres J, Pallisa E, Martínez-Rodríguez M. Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis. *Eur J Radiol.* 2004;51(2):139-49.
367. Seedat UF, Seedat F. Post-primary pulmonary TB haemoptysis - When there is more than meets the eye. Vol. 25, *Respiratory medicine case reports.* 2018. p. 96-9.
368. Luies L, du Preez I. The Echo of Pulmonary Tuberculosis: Mechanisms of Clinical Symptoms and Other Disease-Induced Systemic Complications. *Clin Microbiol Rev.* septiembre de 2020;33(4).
369. Chang SW, Pan WS, Lozano Beltran D, Oleyda Baldelomar L, Solano MA, Tuero I, et al. Gut hormones, appetite suppression and cachexia in patients with pulmonary TB. *PloS One.* 2013;8(1):e54564.
370. Morley JE, Thomas DR, Wilson MMG. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr.* abril de 2006;83(4):735-43.
371. Kotler DP. Cachexia. *Ann Intern Med.* octubre de 2000;133(8):622-34.
372. Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med.* diciembre de 1996;335(25):1897-905.
373. Bogomasov K, Braun D, Burbach A, Himmelspach L, Conrad S. Feature and Deep Learning Based Approaches for Automatic Report Generation and Severity Scoring of Lung Tuberculosis from CT Images. 2019.
374. Sathitratanacheewin S, Sunanta P, Pongpirul K. Deep learning for automated classification of tuberculosis-related chest X-Ray: dataset distribution shift limits diagnostic performance generalizability. *Heliyon.* agosto de 2020;6(8):e04614.
375. Skoura E, Zumla A, Bomanji J. Imaging in tuberculosis. *Int J Infect Dis.* 1 de marzo de 2015;32:87-93.

376. Suma LS, Anand HS, Vinod chandra SS. Nature inspired optimization model for classification and severity prediction in COVID-19 clinical dataset. *J Ambient Intell Humaniz Comput.* 2021;
377. Aunsborg JW, Hønge BL, Jespersen S, Rudolf F, Medina C, Correira FG, et al. A clinical score has utility in tuberculosis case-finding among patients with HIV: A feasibility study from Bissau. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* marzo de 2020;92S:S78-84.
378. Rudolf F, Abate E, Moges B, Mendes AM, Mengistu MY, Sifna A, et al. Increasing smear positive tuberculosis detection using a clinical score - A stepped wedge multicenter trial from Africa. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* diciembre de 2021;113 Suppl:S55-62.
379. Jensen SB, Rudolf F, Wejse C. Utility of a clinical scoring system in prioritizing TB investigations - a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* julio de 2019;17(7):475-88.
380. MCV Informe de Calidad de Vida de Medellín, 2021.pdf [Internet]. [citado 4 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.medellincomovamos.org/system/files/2022-07/docprivados/MCV%20Informe%20de%20Calidad%20de%20Vida%20de%20Medelli%CC%81n%2C%202021.pdf>
381. del Corral H, París SC, Marín ND, Marín DM, López L, Henao HM, et al. IFN $\gamma$  Response to Mycobacterium tuberculosis, Risk of Infection and Disease in Household Contacts of Tuberculosis Patients in Colombia. *PLOS ONE.* 14 de diciembre de 2009;4(12):e8257.
382. Jiménez-Corona ME, García-García L, DeRiemer K, Ferreyra-Reyes L, Bobadilla-del-Valle M, Cano-Arellano B, et al. Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax.* abril de 2006;61(4):348-53.
383. Feng JY, Huang SF, Ting WY, Chen YC, Lin YY, Huang RM, et al. Gender differences in treatment outcomes of tuberculosis patients in Taiwan: a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect.* 1 de septiembre de 2012;18(9):E331-7.
384. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(3):679-91.
385. Saunders BM, Cooper AM. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(4):334-41.
386. Zambuzi FA, Cardoso-Silva PM, Espindola MS, Soares LS, Galvão-Lima LJ, Brauer VS, et al. Identification of promising plasma immune biomarkers to differentiate active pulmonary tuberculosis. *Cytokine.* 1 de diciembre de 2016;88:99-107.
387. Phelan JE, O'Sullivan DM, Machado D, Ramos J, Oppong YEA, Campino S, et al. Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs. *Genome Med.* 24 de junio de 2019;11(1):41.

388. Realpe T, Correa N, Rozo JC, Ferro BE, Gomez V, Zapata E, et al. Population structure among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. PLoS ONE. 18 de abril de 2014;9(4).
389. Puerto G, Erazo L, Wintaco M, Castro C, Ribón W, Guerrero MI. *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes Determined by Spoligotyping to Be Circulating in Colombia between 1999 and 2012 and Their Possible Associations with Transmission and Susceptibility to First-Line Drugs. PLOS ONE. 11 de junio de 2015;10(6):e0124308.
390. Guerra J, Mogollón D, González D, Sanchez R, Rueda ZV, Parra-López CA, et al. Active and latent tuberculosis among inmates in La Esperanza prison in Guaduas, Colombia. PLOS ONE. 25 de enero de 2019;14(1):e0209895.
391. Puerto D, Erazo L, Zabaleta A, Murcia MI, Llerena C, Puerto G. Caracterización de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de pueblos indígenas de Colombia. Biomédica. 1 de agosto de 2019;39(Supl. 2 SE-Artículos originales):78-92.
392. Castro C, Ricardo A, Zabaleta A, Llerena C, Puerto G. Caracterización de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de individuos positivos para HIV en Colombia, 2012. Biomédica. 24 de enero de 2017;37(1 SE-Artículos originales):86-95.
393. Beltrán León MY. Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* en aislados clínicos obtenidos de pacientes VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá. En 2016.
394. García DF, Astudillo M. Genotipificación de aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante MIRU-VNTR, Cali, Colombia, 2013-2015. Biomédica. 1 de mayo de 2019;39(0 SE-Artículos originales):71-85.
395. Marín AV, Rastogi N, Couvin D, Mape V, Murcia MI. First approach to the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex in the indigenous population in Puerto Nariño-Amazonas, Colombia. PLOS ONE. 7 de enero de 2021;16(1):e0245084.
396. Rodríguez-Castillo JG, Llerena C, Argoty-Chamorro L, Guerra J, Couvin D, Rastogi N, et al. Population structure of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Colombia. Tuberculosis. 2020;125:102011.
397. Beltrán-León M, Rodríguez-Castillo JG, Zozio T, Rastogi N, I Murcia M. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from HIV-TB patients from two public hospitals at Bogotá, Colombia. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. enero de 2020;77:104059.
398. Sánchez-Corrales L, Tovar-Aguirre OL, Galeano-Vanegas NF, Castaño Jiménez PA, Martínez-Vega RA, Maldonado-Londoño CE, et al. Phylogenomic analysis and *Mycobacterium tuberculosis* antibiotic resistance prediction by whole-genome sequencing from clinical isolates of Caldas, Colombia. PLOS ONE. 7 de octubre de 2021;16(10):e0258402.



399. Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nat Rev Microbiol* 2019 179. 17 de junio de 2019;17(9):533-45.
400. Li X, Lv X, Lin Y, Zhen J, Ruan C, Duan W, et al. Role of two-component regulatory systems in intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Cell Biochem*. 1 de agosto de 2019;120(8):12197-207.
401. Bajaj S, Ng Jun Heng J, Chandy KG, El Sahili A, Lescar J, Chang SC, et al. Biophysical and structural characterization of a putative K<sup>+</sup> channel from *Mycobacterium tuberculosis* - a potential drug target. En: *Asian Biophysics Association Symposium in conjunction with the Australian Society for Biophysics Abstract book*. Australia; 2018. p. 147.
402. Chatrath S, Gupta VK, Dixit A, Garg LC. The Rv1651c-encoded PE-PGRS30 protein expressed in *Mycobacterium smegmatis* exhibits polar localization and modulates its growth profile. *FEMS Microbiol Lett*. 1 de septiembre de 2011;322(2):194-9.
403. Iantomasi R, Sali M, Cascioferro A, Palucci I, Zumbo A, Soldini S, et al. PE\_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol*. 1 de marzo de 2012;14(3):356-67.
404. Farnia P, Farhadi T, Farnia P, Ghanavi J, Velayati A. A review on the C-terminal domain of channel protein with necrosis-inducing toxin as a novel necrotizing toxin of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed Biotechnol Res J BBRJ*. 1 de abril de 2018;2(2):100-5.
405. Ngcobo NS, Chiliza ZE, Chen W, Yu JH, Nelson DR, Tuszynski JA, et al. Comparative Analysis, Structural Insights, and Substrate/Drug Interaction of CYP128A1 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14).
406. Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Specific Interaction between *Mycobacterium tuberculosis* Lipoprotein-derived Peptides and Target Cells Inhibits *Mycobacterial Entry In Vitro*. *Chem Biol Drug Des*. 1 de diciembre de 2014;84(6):626-41.
407. Conserved hypothetical protein [*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv] - Protein - NCBI [Internet]. [citado 12 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CCP45052>
408. Saraav I, Singh S, Pandey K, Vishnoi E, Sharma M, Sharma S. Cell wall-associated *Mycobacterium tuberculosis* rRv3083 protein stimulates macrophages through toll-like receptor-2 (TLR2). *Int J Mycobacteriology*. 2015;4:176.
409. Singh A, Jain S, Gupta S, Das T, Tyagi AK. *mymA* operon of *Mycobacterium tuberculosis*: its regulation and importance in the cell envelope. *FEMS Microbiol Lett*. 1 de octubre de 2003;227(1):53-63.
410. Zhang CX, Luo T, Ma PJ, Wang CH, Suo J, Zhai XQ, et al. [*Mycobacterium Tuberculosis* Rv3084 Encodes Functional Esterase and Suppresses the Pro-inflammatory Cytokines in vivo]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. mayo de 2019;50(3):291-7.

411. Ortiz de Montellano PR. Potential drug targets in the *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 system. *J Inorg Biochem.* 2018;180:235-45.
412. Sutcliffe IC, Harrington DJ. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev.* 1 de noviembre de 2004;28(5):645-59.
413. Salaemae W, Azhar A, Booker GW, Polyak SW. Biotin biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: physiology, biochemistry and molecular intervention. *Protein Cell.* 2011;2(9):691-5.
414. Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.* 1 de febrero de 2010;277(3):605-26.
415. Tao C, Zhao D, Dong H, Shan F, Lian K, Pan Z, et al. [Prokaryotic expression and immunological characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1886c]. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2014;54(3):330-7.
416. Ortega Ugalde S, de Koning CP, Wallraven K, Bruyneel B, Vermeulen NPE, Grossmann TN, et al. Linking cytochrome P450 enzymes from *Mycobacterium tuberculosis* to their cognate ferredoxin partners. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(21):9231-42.
417. Shavkunov AS, Lazarev VN, Chernaurova LN, Kuz'min A V, Govorun VM. [Genetic heterogeneity of cytochrome CYP51 in clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*]. *Vopr Med Khim.* 2002;48(4):361-7.
418. Bragin EY, Shtratnikova VY, Schelkunov MI, Dovbnaya D V, Donova M V. Genome-wide response on phytosterol in 9-hydroxyandrostenedione-producing strain of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D. *BMC Biotechnol.* 2019;19(1):39.
419. Hasan Z, Zaidi I, Jamil B, Khan MA, Kanji A, Hussain R. Elevated ex vivo monocyte chemotactic protein-1 (CCL2) in pulmonary as compared with extra-pulmonary tuberculosis. *BMC Immunol.* 7 de julio de 2005;6(1):14.
420. Adankwah E, Harelimana JDD, Minadzi D, Aniagyei W, Abass MK, Batsa Debrah L, et al. Lower IL-7 Receptor Expression of Monocytes Impairs Antimycobacterial Effector Functions in Patients with Tuberculosis. *J Immunol.* 28 de abril de 2021;ji2001256.
421. Alessandri AL, Souza AL, Oliveira SC, Macedo GC, Teixeira MM, Teixeira AL. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. *Inflamm Res.* 1 de diciembre de 2006;55(12):528-33.
422. Glasser RM, Walker RI, Herion JC. The Significance of Hematologic Abnormalities in Patients With Tuberculosis. *Arch Intern Med.* 1 de abril de 1970;125(4):691-5.
423. Peters W, Scott HM, Chambers HF, Flynn JL, Charo IF, Ernst JD. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 de julio de 2001;98(14):7958-63.

424. Clifton DR, Rydkina E, Huyck H, Pryhuber G, Freeman RS, Silverman DJ, et al. Expression and secretion of chemotactic cytokines IL-8 and MCP-1 by human endothelial cells after *Rickettsia rickettsii* infection: Regulation by nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Int J Med Microbiol.* 2005;4(295):267-78.
425. Su WL, Perng WC, Huang CH, Yang CY, Wu CP, Chen JH. Association of Reduced Tumor Necrosis Factor Alpha, Gamma Interferon, and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) but Increased IL-10 Expression with Improved Chest Radiography in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol CVI.* febrero de 2010;17(2):223-31.
426. Tobin DM, Vary JC, Ray JP, Walsh GS, Dunstan SJ, Bang ND, et al. The *Ita4h* Locus Modulates Susceptibility to Mycobacterial Infection in Zebrafish and Humans. *Cell.* 2010;140(5):717-30.
427. Peresi E, Silva SMUR, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. *J Bras Pneumol Publicacao Of Soc Bras Pneumol E Tisiologia.* noviembre de 2008;34(11):942-9.
428. Karbalaee M, Ghazvini K, Keikha M. IL-33/ST2 Axis as a Well-Known Endogenous Defense Against Tuberculosis. *Rev Clin Med.* 1 de septiembre de 2020;7(3):127-33.
429. Fenhua J, Daohui W, Hui L, Xiaodong X, Wen H. Diagnostic value of combined pleural interleukin-33, adenosine deaminase and peripheral blood tuberculosis T cell spot detection TB for tuberculous pleurisy. *BMC Infect Dis.* 23 de agosto de 2021;21(1):861.
430. van Eijk M, van Roomen CPAA, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaert EFC, et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(11):1505-12.
431. Wang X, Jiang J, Cao Z, Yang B, Zhang J, Cheng X. Diagnostic performance of multiplex cytokine and chemokine assay for tuberculosis. *Tuberculosis.* 1 de noviembre de 2012;92(6):513-20.
432. Choi R, Kim K, Kim MJ, Kim SY, Kwon OJ, Jeon K, et al. Serum inflammatory profiles in pulmonary tuberculosis and their association with treatment response. *J Proteomics.* 21 de octubre de 2016;149:23-30.
433. Luo J, Zhang M, Yan B, Li F, Guan S, Chang K, et al. Diagnostic performance of plasma cytokine biosignature combination and MCP-1 as individual biomarkers for differentiating stages *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect.* abril de 2019;78(4):281-91.
434. Ronacher K, Chegou NN, Kleynhans L, Djoba Siawaya JF, du Plessis N, Loxton AG, et al. Distinct serum biosignatures are associated with different tuberculosis treatment outcomes. *Tuberculosis.* 1 de septiembre de 2019;118:101859.

435. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BRP, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol*. agosto de 2008;20(8):1019-30.
436. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol*. abril de 2009;39(4):1046-55.
437. Blom L, Poulsen LK. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. *J Immunol Baltim Md*. 1 de noviembre de 2012;189(9):4331-7.
438. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, Kanno A, Shimosegawa T. Nuclear expression of interleukin-33 in pancreatic stellate cells. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. octubre de 2010;299(4):G821-32.
439. Wood IS, Wang B, Trayhurn P. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 19 de junio de 2009;384(1):105-9.
440. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, rong, mu, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci*. 5 de agosto de 2008;105(31):10913-8.
441. Wawrocki S, Seweryn M, Kielnierowski G, Rudnicka W, Włodarczyk M, Druszczyńska M. IL-18/IL-37/IP-10 signalling complex as a potential biomarker for discriminating active and latent TB. *PLOS ONE*. 10 de diciembre de 2019;14(12):e0225556.
442. Pokkali S, Das SD. Augmented chemokine levels and chemokine receptor expression on immune cells during pulmonary tuberculosis. *Hum Immunol*. 2009;70(2):110-5.
443. Nakanishi K. Unique Action of Interleukin-18 on T Cells and Other Immune Cells. *Front Immunol*. 2018;9.
444. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol*. febrero de 2000;12(2):151-60.
445. Song CH, Lee JS, Nam HH, Kim JM, Suhr JW, Jung SS, et al. IL-18 Production in Human Pulmonary and Pleural Tuberculosis. *Scand J Immunol*. 1 de diciembre de 2002;56(6):611-8.
446. Beamer GL, Flaherty DK, Assogba BD, Stromberg P, Gonzalez-Juarrero M, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10 promotes Mycobacterium tuberculosis disease progression in CBA/J mice. *J Immunol Baltim Md* 1950. octubre de 2008;181(8):5545-50.
447. Schreiber T, Ehlers S, Heitmann L, Rausch A, Mages J, Murray PJ, et al. Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. *J Immunol*. 2009;183(2):1301-12.

448. Gerosa F, Nisii C, Righetti S, Micciolo R, Marchesini M, Cazzadori A, et al. CD4<sup>+</sup> T cell clones producing both interferon- $\gamma$  and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin Immunol*. 1999;92(3):224-34.
449. Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM, et al. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2002;169(11):6343-51.
450. Redford PS, Boonstra A, Read S, Pitt J, Graham C, Stavropoulos E, et al. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur J Immunol*. 2010;40(8):2200-10.
451. Moreira-Teixeira L, Redford PS, Stavropoulos E, Ghilardi N, Maynard CL, Weaver CT, et al. T Cell-Derived IL-10 Impairs Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de julio de 2017;199(2):613-23.
452. Sotgiu G, Centis R, Migliori GB. Post-tuberculosis sequelae and their socioeconomic consequences: worth investigating. *Lancet Glob Health*. 1 de diciembre de 2021;9(12):e1628-9.
453. Tiberi S, Torrico MM, Rahman A, Krutikov M, Visca D, Silva DR, et al. Managing severe tuberculosis and its sequelae: from intensive care to surgery and rehabilitation. *J Bras Pneumol*. 2019;45(2):e20180324.
454. Bhandari T. Possible new method identified to assess severity of TB infection [Internet]. Washington University School of Medicine in St. Louis. 2022 [citado 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://medicine.wustl.edu/news/possible-new-method-identified-to-assess-severity-of-tb-infection/>
455. Regímenes de tratamiento más cortos para los pacientes con tuberculosis pulmonar | Cochrane [Internet]. [citado 26 de octubre de 2022]. Disponible en: [https://www.cochrane.org/es/CD012918/INFECTN\\_regimenes-de-tratamiento-mas-cortos-para-los-pacientes-con-tuberculosis-pulmonar](https://www.cochrane.org/es/CD012918/INFECTN_regimenes-de-tratamiento-mas-cortos-para-los-pacientes-con-tuberculosis-pulmonar)
456. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Innate Host Responses [Internet]. 9.<sup>a</sup> ed. Vol. 8. Medical Microbiology; 49-63 p. Disponible en: <https://www-clinicalkey-es.aure.unab.edu.co/#!/content/book/3-s2.0-B9780323673228000087>
457. Haberman R, For N CE, Cronstein BN, Saxena A. Reactantes de fase aguda [Internet]. 11.<sup>a</sup> ed. Firestein y Kelley. Tratado de reumatología; [citado 4 de noviembre de 2022]. 907-919 p. Disponible en: <https://www-clinicalkey-es.aure.unab.edu.co/#!/content/book/3-s2.0-B9788413820651000602?scrollTo=%23h10000406>
458. Seyedhosseini FS, Mohammadi S, Ebrahimabad MZ, Khodabakhshi B, Abbasi A, Yazdani Y. Interleukin-6, Interleukin-17 and Transforming Growth Factor-Beta are Overexpressed in Newly Diagnosed Tuberculosis Patients; Potent Biomarkers of *Mycobacterial* Infection. *Arch Clin Infect Dis* [Internet]. 2019 [citado 25 de agosto de 2022];14(4). Disponible en: <https://brieflands.com/articles/archcid-68417.html#abstract>

459. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol.* 2007;8(4):369-77.
460. McKinney JD, Gomez JE. Life on the inside for Mycobacterium tuberculosis. *Nat Med.* 2003;9(11):1356-7.
461. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell.* 2004;119(6):753-66.
462. Kaufmann SHE. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis.* noviembre de 2002;61 Suppl 2:ii54-58.
463. Orme IM, Miller ES, Roberts AD, Furney SK, Griffin JP, Dobos KM, et al. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de enero de 1992;148(1):189-96.
464. Tsao TCY, Huang CC, Chiou WK, Yang PY, Hsieh MJ, Tsao KC. Levels of interferon-gamma and interleukin-2 receptor-alpha for bronchoalveolar lavage fluid and serum were correlated with clinical grade and treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* agosto de 2002;6(8):720-7.
465. Morais da Fonseca D, Lopes Silva C, Oliveira e Paula M, Garcia Soares E, Marchal G, Horn C, et al. Increased levels of interferon- $\gamma$  primed by culture filtrate proteins antigen and CpG-ODN immunization do not confer significant protection against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology.* 2007;121(4):508-17.
466. Bertolini TB, Piñeros AR, Prado RQ, Gembre AF, Ramalho LNZ, Alves-Filho JC, et al. CCR4-dependent reduction in the number and suppressor function of CD4+Foxp3+ cells augments IFN- $\gamma$ -mediated pulmonary inflammation and aggravates tuberculosis pathogenesis. *Cell Death Dis.* 21 de diciembre de 2018;10(1):11.
467. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol.* diciembre de 2014;31:31-7.
468. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:475.
469. Vocca L, Di Sano C, Uasuf CG, Sala A, Riccobono L, Gangemi S, et al. IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology.* agosto de 2015;220(8):954-63.
470. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity.* 1 de noviembre de 2005;23(5):479-90.

471. Chen X, Zhang M, Liao M, Graner MW, Wu C, Yang Q, et al. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T Cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de abril de 2010;181(7):734-42.
472. Joshi L, Ponnana M, Sivangala R, Chelluri LK, Nallari P, Penmetsa S, et al. Evaluation of TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-6 Cytokine Production and Their Correlation with Genotype Variants amongst Tuberculosis Patients and Their Household Contacts. *PLOS ONE.* 11 de septiembre de 2015;10(9):e0137727.
473. Nagabhushanam V, Solache A, Ting LM, Escaron CJ, Zhang JY, Ernst JD. Innate Inhibition of Adaptive Immunity: Mycobacterium tuberculosis-Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN- $\gamma$ . *J Immunol.* 1 de noviembre de 2003;171(9):4750-7.
474. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S ichiro, et al. IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation. *J Immunol.* 15 de septiembre de 2004;173(6):3844-54.
475. Bost P, Giladi A, Liu Y, Bendjelal Y, Xu G, David E, et al. Host-viral infection maps reveal signatures of severe COVID-19 patients. *Cell.* 2020;181(7):1475-88.
476. Obeagu EI, Okoroiwu IL, Nwanjo HU, Nwosu DC. Evaluation of interferon-gamma, interleukin 6 and interleukin 10 in tuberculosis patients in Umuahia. *Ann Clin Lab Res.* 2019;7(2):307.
477. CD4+ T-lymphopenia in HIV negative tuberculous patients at King Khalid University Hospital in Riyadh, Saudi Arabia | SpringerLink [Internet]. [citado 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/2047-783X-16-6-285>
478. Lehrnbecher T, Bernig T, Hanisch M, Koehl U, Behl M, Reinhardt D, et al. Common genetic variants in the interleukin-6 and chitotriosidase genes are associated with the risk for serious infection in children undergoing therapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2005;19(10):1745-50.
479. Boyle JP, Parkhouse R, Monie TP. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol.* 2014;4(12):140178.
480. van Eijk M, Scheij SS, van Roomen CP, Speijer D, Boot RG, Aerts JM. TLR-and NOD2-dependent regulation of human phagocyte-specific chitotriosidase. *FEBS Lett.* 2007;581(28):5389-95.
481. Malaguarnera L, Musumeci M, Di Rosa M, Scuto A, Musumeci S. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal.* 2005;19(3):128-32.
482. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- $\kappa$ B response in macrophages. *BMC Immunol.* 2007;8(1):1-17.

483. Thada S, Horvath GL, Müller MM, Dittrich N, Conrad ML, Sur S, et al. Interaction of TLR4 and TLR8 in the Innate Immune Response against Mycobacterium Tuberculosis. *Int J Mol Sci.* 4 de febrero de 2021;22(4):1560.
484. Lee CG, Herzog EL, Ahangari F, Zhou Y, Gulati M, Lee CM, et al. Chitinase 1 is a biomarker for and therapeutic target in scleroderma-associated interstitial lung disease that augments TGF- $\beta$ 1 signaling. *J Immunol.* 2012;189(5):2635-44.
485. Cakır G, Gumus S, Ucar E, Kaya H, Tozkoparan E, Akgul EO, et al. Serum chitotriosidase activity in pulmonary tuberculosis: response to treatment and correlations with clinical parameters. *Ann Lab Med.* mayo de 2012;32(3):184-9.
486. Van Dyken SJ, Liang HE, Naikawadi RP, Woodruff PG, Wolters PJ, Erle DJ, et al. Spontaneous chitin accumulation in airways and age-related fibrotic lung disease. *Cell.* 2017;169(3):497-509.
487. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science.* 2004;304(5677):1678-82.
488. Friedland JS, Hartley JC, Hartley CG, Shattock RJ, Griffin GE. Cytokine secretion in vivo and ex vivo following chemotherapy of Mycobacterium tuberculosis infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* abril de 1996;90(2):199-203.
489. Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, et al. Contribution of IL-18 to Th1 Response and Host Defense Against Infection by Mycobacterium tuberculosis: A Comparative Study with IL-12p40. *J Immunol.* 1 de julio de 2002;169(1):323-9.
490. Comas I, Moreno-Molina M. Phenogenomics of Mycobacterium abscessus. *Nat Microbiol.* septiembre de 2022;7(9):1325-6.
491. Boeck L, Burbaud S, Skwark M, Pearson WH, Sangen J, Wuest AW, et al. Mycobacterium abscessus pathogenesis identified by phenogenomic analyses. *Nat Microbiol.* septiembre de 2022;7(9):1431-41.
492. Verma S, Bhatt K, Lovey A, Ribeiro-Rodrigues R, Durbin J, Jones-López EC, et al. Transmission phenotype of Mycobacterium tuberculosis strains is mechanistically linked to induction of distinct pulmonary pathology. *PLoS Pathog.* 2019;15(3):e1007613.
493. Lovey A, Verma S, Kaipilyawar V, Ribeiro-Rodrigues R, Husain S, Palaci M, et al. Early alveolar macrophage response and IL-1R-dependent T cell priming determine transmissibility of Mycobacterium tuberculosis strains. *Nat Commun.* 16 de febrero de 2022;13(1):884.
494. Cholo MC, Matjokotja MT, Osman AG, Anderson R. Role of the kdpDE Regulatory Operon of Mycobacterium tuberculosis in Modulating Bacterial Growth in vitro. *Front Genet [Internet].* 2021 [citado 28 de agosto de 2022];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.698875>



495. Singh A, Gupta R, Vishwakarma RA, Narayanan PR, Paramasivan CN, Ramanathan VD, et al. Requirement of the *mymA* Operon for Appropriate Cell Wall Ultrastructure and Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in the Spleens of Guinea Pigs. *J Bacteriol.* junio de 2005;187(12):4173-86.
496. Fisher MA, Plikaytis BB, Shinnick TM. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol.* julio de 2002;184(14):4025-32.
497. Singh A, Jain S, Gupta S, Das T, Tyagi AK. *mymA* operon of *Mycobacterium tuberculosis*: its regulation and importance in the cell envelope. *FEMS Microbiol Lett.* 1 de octubre de 2003;227(1):53-63.
498. Delogu G, Sanguinetti M, Pusceddu C, Bua A, Brennan MJ, Zanetti S, et al. PE\_PGRS proteins are differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* in host tissues. *Microbes Infect.* 2006;8(8):2061-7.
499. Bottai D, Di Luca M, Majlessi L, Frigui W, Simeone R, Sayes F, et al. Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. *Mol Microbiol.* marzo de 2012;83(6):1195-209.
500. Mi Y, Bao L, Gu D, Luo T, Sun C, Yang G. *Mycobacterium tuberculosis* PPE25 and PPE26 proteins expressed in *Mycobacterium smegmatis* modulate cytokine secretion in mouse macrophages and enhance mycobacterial survival. *Res Microbiol.* abril de 2017;168(3):234-43.
501. Mi YJ, Liang LJ, Ci CH, Wang YY. [The Role of PPE25 in Mycobacterial Infections of Polymorphonuclear Neutrophils]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* noviembre de 2018;49(6):871-5.
502. Saini NK, Baena A, Ng TW, Venkataswamy MM, Kennedy SC, Kunnath-Velayudhan S, et al. Suppression of autophagy and antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS47. *Nat Microbiol.* 15 de agosto de 2016;1(9):1-12.
503. HATFULL GF. Molecular Genetics of Mycobacteriophages. *Microbiol Spectr.* 7 de marzo de 2014;2(2):1-36.
504. Warren R, de Kock M, Engelke E, Myburgh R, Gey van Pittius N, Victor T, et al. Safe *Mycobacterium tuberculosis* DNA extraction method that does not compromise integrity. *J Clin Microbiol.* enero de 2006;44(1):254-6.

## 9. Anexos

### 9.1 Anexo 1. Consentimiento informado

**CORRELACION ENTRE CEPAS CIRCULANTES DE *Mycobacterium tuberculosis*  
PORTADORAS DE LA DELECIÓN RD174 Y/O CON DELECIÓN EN EL GEN *kdpD*, CON LA  
SEVERIDAD DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR Y LA RESPUESTA INMUNE AL  
TRATAMIENTO**

**OBTENCION SANGRE VENOSA PERIFERICA PACIENTES CON TUBERCULOSIS  
PULMONAR Y MUESTRA DE ESPUTO**

**INFORMACIÓN Y FORMATO DE CONSENTIMIENTO**

**Investigadores**

Andrés Baena García, Investigador Principal, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Laboratorio 510, Torre 1, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín. Correo electrónico: [luis.barrera@udea.edu.co](mailto:luis.barrera@udea.edu.co). Teléfono: 219-6448.

Luis Fernando Barrera Robledo, Coinvestigador, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Laboratorio 510, Torre 1, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín. Correo electrónico: [andresbaena@hotmail.com](mailto:andresbaena@hotmail.com). Teléfono: 219-6448.

Mauricio Rojas López, Coinvestigador, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Laboratorio 510, Torre 1, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín. Correo electrónico: [mauricio.rojas@udea.edu.co](mailto:mauricio.rojas@udea.edu.co). Teléfono: 219-6692.

Juan Fernando Alzate, Coinvestigador, Centro nacional de secuenciamiento genómico (CNSG), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. [jfernando.alzate@udea.edu.co](mailto:jfernando.alzate@udea.edu.co). Teléfono: 2196665

Héctor Ortega Jaramillo, Coinvestigador, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Correo electrónico: [horteiga@une.net.co](mailto:horteiga@une.net.co) Teléfono: 445-4000 ext. 4336.

Fernando Montes Zuluaga, Coinvestigador, Secretaría de Salud, Edificio Plaza la Libertad, Torre A-Piso 20, Cra 53A #42-161, Teléfono: 385-9614.

**Sitio donde se llevará a cabo el estudio:** Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Universidad de Antioquia, Medellín.

**Entidad que patrocina la investigación:** Programa Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud, Colciencias.

**Información General.**

Investigadores del Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG), de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, y de la Secretaría de Salud Municipal de Medellín, están realizando un estudio para tratar de entender mejor la forma en que se produce la tuberculosis. La tuberculosis pulmonar es causada por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis* y es considerada un problema de gran importancia para la salud pública en Colombia. La enfermedad es completamente curable y el tratamiento es suministrado de forma gratuita por el Ministerio de Protección Social de Colombia para todas las personas enfermas. La enfermedad se transmite solamente a partir de personas enfermas que no están recibiendo el tratamiento indicado. Normalmente, la bacteria se transmite por el aire a partir de la tos de una persona enferma. Las personas cercanas pueden inhalar el aire contaminado, y la bacteria es transportada hasta los pulmones donde el sistema de defensa de la persona infectada puede controlar la infección durante toda su vida, a pesar de que la bacteria todavía permanece en los pulmones. Sin embargo, en algunas personas infectadas, el sistema de defensa es incapaz de contener la infección y se enferma de tuberculosis. Aunque la gravedad de la enfermedad puede depender de la persona, esta gravedad también puede depender de la agresividad de la bacteria. Todas las bacterias que causan la tuberculosis no son iguales. Algunas de ellas causan una enfermedad más grave, mientras otras causan una enfermedad menos grave. Creemos que la respuesta al tratamiento también puede variar con la mayor o menor agresividad de las bacterias. Por ejemplo, la tuberculosis causada por una bacteria más agresiva puede tardar más tiempo en curarse que la enfermedad causada por una menos agresiva. Otra manera de verlo, es que las defensas de las personas infectadas con una bacteria más agresiva son diferentes al de las personas que están enfermas con una bacteria menos agresiva. Por eso, los investigadores quieren conocer si existe una relación

entre la agresividad de las bacterias, con la respuesta al tratamiento y algunas características del sistema de defensa del organismo.

Este estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Este estudio es financiado por el Programa Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud, Colciencias.

#### **Porque lo estamos invitando a participar**

Lo estamos invitando a participar de manera voluntaria en este estudio porque usted es una persona adulta (mayor de 18 años de edad), a la cual se le ha diagnosticado tuberculosis pulmonar recientemente, se le encontraron bacterias en su muestra de esputo, y puede estar iniciando el tratamiento para la enfermedad. En este estudio queremos tener 100 personas de sexo masculino o femenino a las cuales se les haya diagnosticado tuberculosis pulmonar recientemente, y voluntariamente quieran participar en este estudio durante el tiempo de tratamiento (usualmente seis (6) meses).

#### **Propósito**

El propósito de este estudio es el de tratar de determinar si una variedad de la bacteria a la cual le falta una parte de su material genético, retarda o altera la capacidad del tratamiento para curar la enfermedad, en comparación con otras variedades de la bacteria que no han perdido esta parte del material genético.

#### **Participación.**

Usted es libre de participar o no en el estudio. Si usted decide participar, le pediremos hacer lo siguiente:

- Responder algunas preguntas relacionadas con su historia médica, y los síntomas antes de que se le diagnosticara la enfermedad. Las preguntas las hará una Médica profesional contratada por el proyecto con experiencia en tuberculosis, y sus respuestas serán consignadas en un cuestionario. Se le preguntará si Usted ha tenido: tos, sudoración nocturna, sangre en el esputo, dolor en el pecho y dificultad respiratoria.
- Autorizar para que una parte de su muestra de esputo sea utilizada para identificar la variedad de la bacteria que le causó la enfermedad.
- Permitir que le tome una medida de su peso y altura y una medida de la parte media del brazo que Usted utiliza menos. También, que le midan su temperatura corporal, se le haga un examen visual del color de la conjuntiva del ojo, se le examine con el estetoscopio para determinar la frecuencia de latidos de su corazón, y si tiene ruidos pulmonares extraños.
- Autorizar que le tomen una muestra de sangre de 5 mL, menos de una cucharada, al inicio del tratamiento, 2 y 6 meses después del inicio del tratamiento. Con el suero obtenido de su sangre, estudiaremos la presencia y la cantidad de unas sustancias que producen sus células de defensa u otras células, y podrían permitirnos estimar si su enfermedad se está curando.
- Autorizar para que se le tomen radiografías pulmonares al inicio, 2 meses y al final del tratamiento (6 meses). En sus radiografías, un Médico Neumólogo experto determinará qué tan dañado podrían estar sus pulmones como consecuencia de la enfermedad.
- Si la muestra de sangre que Usted nos proporcionará no cumple con los requisitos de cantidad y calidad de nuestro interés, la muestra será descartada y su participación en el estudio se dará por terminada.

#### **Costos.**

No se le cobrará ningún dinero por participar en este estudio. Los costos asociados con la obtención muestras de sangre, el examen médico descrito anteriormente, y las radiografías pulmonares serán cubiertos por el estudio.

#### **Beneficios**

Los resultados de este estudio podrían servir para tratar de mejorar el tratamiento contra la tuberculosis identificando las variedades más agresivas de la bacteria. Adicionalmente, la toma de radiografías pulmonares a los dos (2) y seis (6) meses a partir del inicio del tratamiento, también puede ayudar a determinar si sus pulmones se están recuperando y la enfermedad está desapareciendo con el tratamiento. Esperamos que los estudios de sus defensas también nos permitan suponer que Usted está mejorando, pero no podemos garantizarlo. A largo plazo, los resultados de esta investigación podrían beneficiar a las personas enfermas con tuberculosis si se puede comprobar que la respuesta al tratamiento depende de la agresividad de la bacteria y de mediciones del sistema de defensa. Sin embargo, también existe la posibilidad de que no se encuentre esta relación, y por consiguiente, Usted o la Comunidad no se beneficiarían de los resultados de esta investigación a corto o largo plazo.

**Riesgos.**

La toma de las muestras de sangre puede doler un poco. Puede salirle un morado, sangrar un poquito o, raras veces infectarse en donde se hizo el procedimiento. Limpiaremos la piel donde se colocará la aguja para tomar la sangre y después de sacar la sangre, se colocará una curita, la cual debe retirarse 24 horas después de ponerla. Usted no debe rascarse el área alrededor del sitio de sangrado. Esto disminuye el riesgo de infección. En caso de aceptar participar en el estudio le tomaremos una cantidad total de sangre de 5 mL, menos de 1 cucharadas, al inicio del tratamiento, 2 y 6 meses después de iniciarlo. El riesgo para la salud que conlleva la obtención de esta cantidad de sangre, no es distinto al riesgo de obtener una muestra de sangre para cualquier otro tipo de examen. En caso de presentar alguna reacción adicional a las descritas, como consecuencia del procedimiento de sangrado, Usted debe consultar con las personas listadas en la Sección de Personas a Contactar.

**Alternativas.**

La presencia de tos por más de dos semanas, sudoración nocturna, fiebre, insuficiencia respiratoria y pérdida de peso, es sospechosa de tener tuberculosis, lo cual es confirmado con la identificación de la bacteria en el esputo. Una vez confirmado el diagnóstico, se inicia el tratamiento, el cual usualmente se prolonga por seis (6) meses. Para determinar si una persona se está curando, se examina la cantidad de la bacteria en el esputo, la cual debe ir disminuyendo a medida que avanza el tratamiento, al igual que los síntomas asociados con la enfermedad. Esta actividad es realizada por las autoridades de salud pública. Si Usted decide no entrar en el estudio, no tomaremos ninguna muestra de sangre, radiografía o llenará ningún cuestionario.

**Derechos.**

Usted es libre de rehusar a participar en el estudio ahora o retirarse en una fecha posterior, sin afectar los servicios médicos que están usualmente disponibles para la persona enferma que vive en su casa o para Usted si en un futuro llegara a necesitarlos. En el momento en que Usted lo considere conveniente a partir del inicio de este estudio (año 2020) y hasta su finalización (año 2022), Usted podrá requerir de las personas responsables (personas a contactar), información nueva sobre los resultados de este estudio, si las hubiera.

**Confidencialidad.**

Guardaremos privacidad acerca de los registros que puedan identificarlo a Usted hasta donde nos lo permita la ley. Ni sus registros ni sus muestras serán marcados con su nombre. Solo se utilizará un código del estudio. Los investigadores que participen en este estudio podrán ver ese código pero no su nombre. Su nombre tampoco aparecerá en ningún informe de este estudio. Una copia de la base(s) de datos que contienen la información será mantenida por el Investigador Principal en un disco duro externo, el cual solo podrá ser accedido por el Investigador Principal.

**Compensación.**

Usted no recibirá compensación económica (dinero) por participar en este estudio. Problemas no relacionados con el estudio o debidos al tratamiento de la tuberculosis pulmonar no están cubiertos por el estudio.

**Personas a contactar**

Si tiene preguntas adicionales o alguna queja con respecto al estudio puede hacérselas Al Dr. Andrés Baena García, en el Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Sede de Investigación Universitaria, la Universidad de Antioquia, carrera 53 No 61-30, Laboratorio 510, en Medellín al teléfono 219 6448.

**Aceptación.**

Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas y/o mímicas para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, consciente y libremente.

Por favor, pregunte si tiene cualquier duda acerca del estudio o de este formato. Su firma abajo indica que usted decidió participar en este estudio.

FIRME (O COLOQUE SU HUELLA DIGITAL) SI USTED LIBREMENTE DECIDIÓ HACER PARTE DE ESTE ESTUDIO.

	Nombre (en letra clara)	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Participante			
Médico o su delegado			

**Testigo**

Observe el proceso de consentimiento. El potencial participante, leyó este formato (o le ha sido leído), tuvo oportunidad de hacer preguntas, estuvo conforme con las respuestas y firmó (o colocó su huella digital) para ingresar al estudio.

FIRME (O COLOQUE SU HUELLA DIGITAL) ABAJO

	Nombre (en letra clara)	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Testigo			
Testigo			

**Autorización para guardar muestras**

Una vez procesadas sus muestras de sangre, nos gustaría poderlas guardar en un Banco de sueros y/o de Material Genético, en el laboratorio del Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Estas muestras se podrán utilizar para futuros estudios encaminados a mejorar el conocimiento sobre la tuberculosis. Por favor, háganos las preguntas que tenga acerca de esto. Si firma abajo, significa que está de acuerdo con dejar guardar las muestras después del estudio. Firme (o coloque su huella digital) abajo si usted libremente elige dejar guardar las muestras.

Es posible que algunas de las pruebas de laboratorio que sea necesario realizar con sus muestras no puedan hacerse en las instalaciones de la Universidad de Antioquia, por lo que sea necesario enviarlas a otras instituciones de Colombia o del exterior. En caso de ser necesario hacer esto sus muestras estarán marcadas solo con un código y su nombre o datos personales no aparecerán en ninguna parte.

Si Usted no está de acuerdo con dejar guardar estas muestras después del estudio, no firme abajo. En ese caso, usted todavía podrá participar en el estudio, pero sus muestras serán descartadas después de ser analizadas.

Si nos permite guardar sus muestras, pero decide cambiar de parecer en cualquier momento, contacte al Dr. Andrés Baena García, en el Laboratorio del Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia para retirar y destruir sus muestras.

	Nombre (en letra clara)	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Participante			

FIRME (O COLOQUE SU HUELLA DIGITAL) ABAJO SI USTED LIBREMENTE DECIDIÓ SER PARTE DE ESE ESTUDIO.

**Testigo**

Observe el proceso de consentimiento. El potencial participante leyó este formato (o le ha sido leído), tuvo oportunidad de hacer preguntas, estuvo conforme con las respuestas y firmó (o colocó su huella digital) para autorizar guardar sus muestras.

	Nombre (en letra clara)	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Testigo			

## 9.2 Anexo 2. Formulario



### Formulario

PROYECTO: Correlación entre cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* portadoras de la delección RD174 y/o con delección en el gen *kdpD*, con la severidad de la tuberculosis pulmonar y la respuesta inmune al tratamiento.

#### IDENTIFICACIÓN - CONSECUTIVO

#### TIEMPO

#### NOMBRE DEL PACIENTE

#### Características Sociodemográficas

##### Fecha de encuesta

Día Mes Año

##### Fecha de Nacimiento

Día Mes Año

##### Edad (años cumplidos):

##### Sexo :

**Ocupación****Historia clínica****Anamnesis****Datos del Diagnostico Actual****Tipo de Muestra**

- Esputo  
 Otro

**Paraclínico:**

- Baciloscopia  
 Cultivo  
 Otro

**Fecha Reporte**   

Día Mes Año

**Lugar Reporte**

**Institución entrega Tto**

**Fecha Inicio Tto**

Día Mes Año

**Año diagnóstico**

Ha presentado alguno(s) de los siguientes síntomas:

**Fecha aproximada de iniciación del síntoma:**

Día Mes Año

**Fecha aproximada de iniciación del síntoma:**

Día Mes Año

**Fecha aproximada de iniciación del síntoma:**

Día Mes Año

**Fecha aproximada de iniciación del síntoma:**

Día Mes Año

**Fecha aproximada de iniciación del síntoma:**

Día Mes Año



**Fecha aproximada de iniciación del síntoma:**

Día Mes Año

**Fecha aproximada de iniciación del síntoma:**

Día Mes Año

**Fecha aproximada de iniciación del síntoma:**

Día Mes Año

**En la actualidad qué otras enfermedad(es) tiene diagnosticada(s):**

**Cuanto tiempo**

**Examen Físico**

**Auscultación pulmonar normal**

**Hallazgos:**

- Sonido pulmonar normal
- Respiración bronquial
- Crépitos finos
- Crépitos gruesos

- Roncus
- Sibilantes

**Descripción de localización:****OBSERVACIONES GENERALES**

Enviar

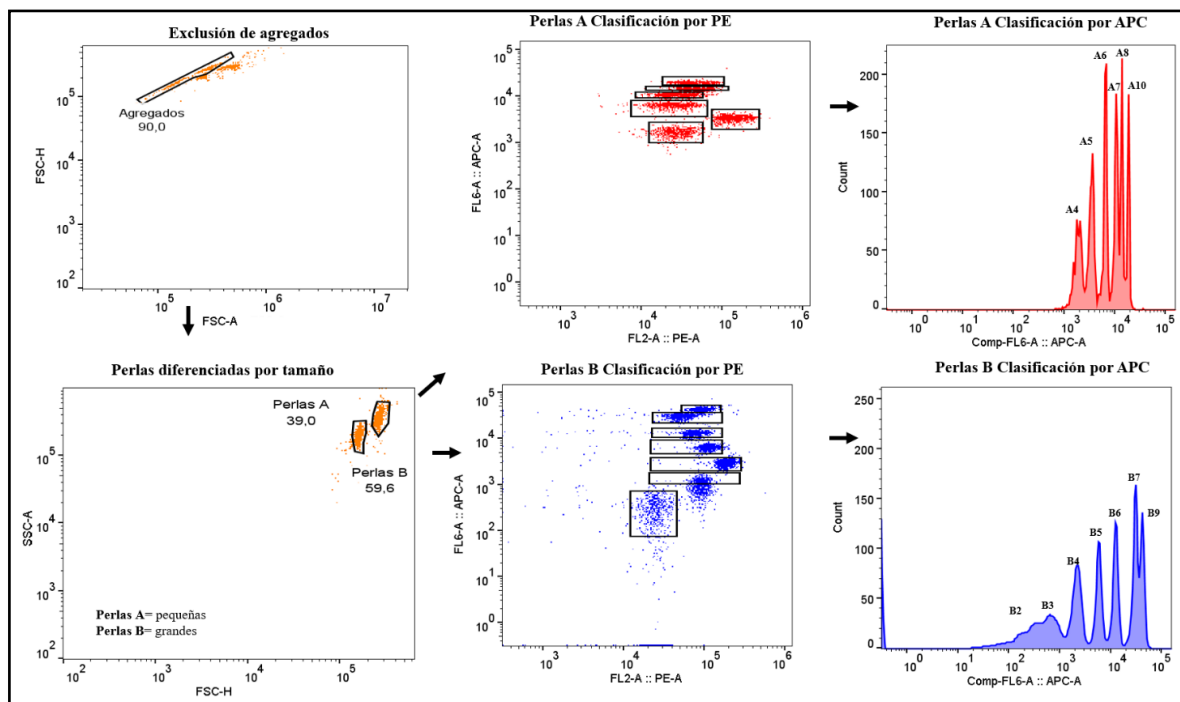
### **9.3 Anexo 3. Análisis de los datos de citometría**

El panel de Inflamación Humana 1 utiliza dos conjuntos de perlas. Para la adquisición de datos utilizamos el Citómetro de flujo CytoFLEX-Beckman y se adquirieron aproximadamente 3000 eventos por analito. El análisis de los datos lo realizamos utilizando FlowJo™ v10 Software (BD, East Rutherford, USA) (Figura 2.), primero realizamos una exclusión de desechos, posteriormente identificamos cada conjunto de perlar en función de sus perfiles de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral. Posteriormente analizamos cada conjunto de perlar en función de su fluorescencia interna utilizando el canal de PE. Las perlas A más pequeñas consisten en 6 poblaciones de perlas y las perlas B más grandes consisten en 7 poblaciones de perlas. Cada analito está asociado con un conjunto de perlas particular como lo indica el manual del proveedor. En el canal de PE realizamos cuadros para agrupar las 13 poblaciones de analitos y cuantificar la mediana de fluorescencia (MFI). Posteriormente realizamos la extracción de las MFI para su análisis en GraphPad Prism 8 (Dotmatics, Bishop's Stortford, Reino Unido), interpolando cada valor a la curva estándar (Anexo 3, Figura 2) obtenida para conocer la concentración de cada analito.

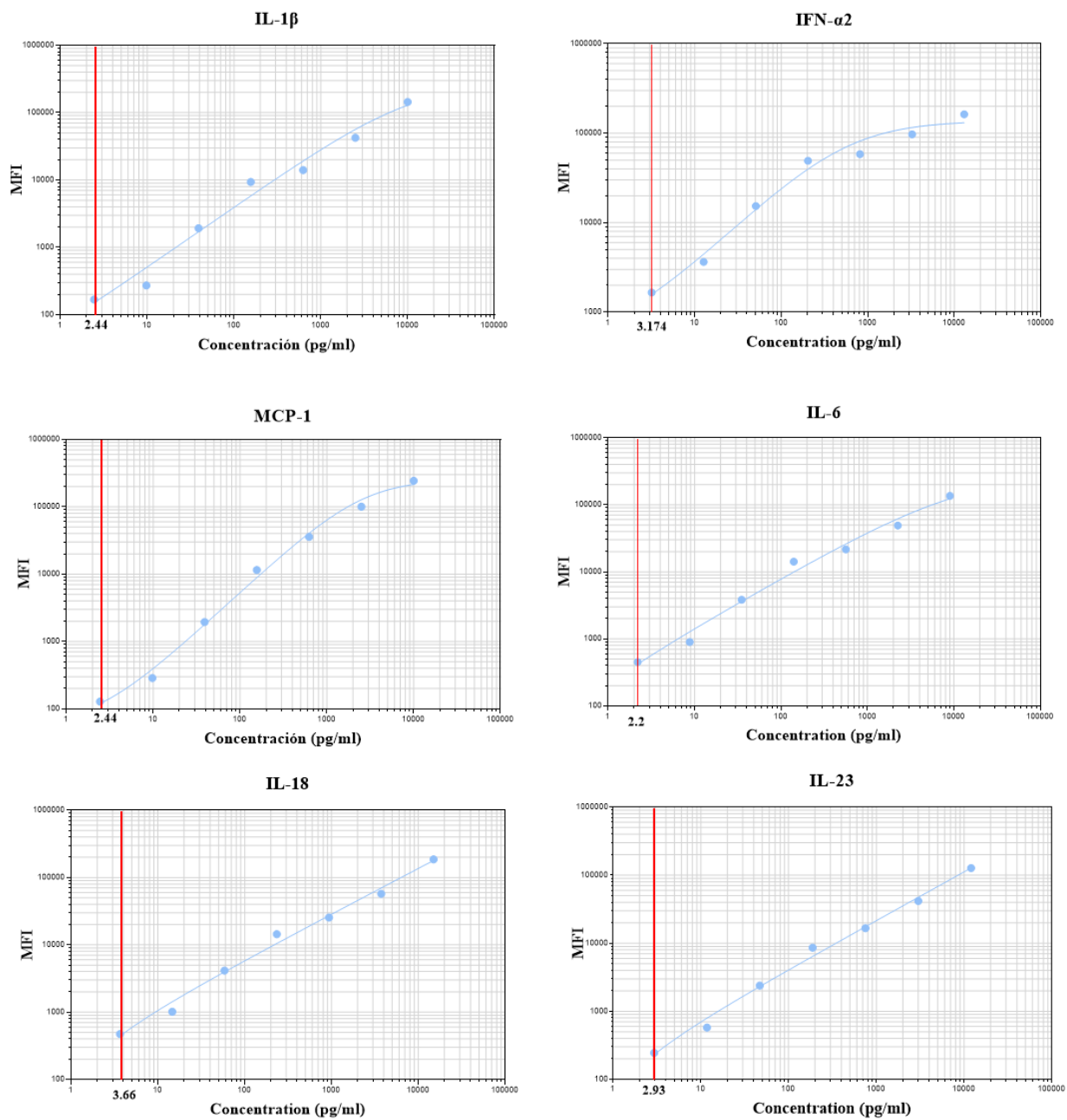
#### **9.3.1. Análisis de los datos de ELISA para cuantificar los niveles séricos de CHIT-1**

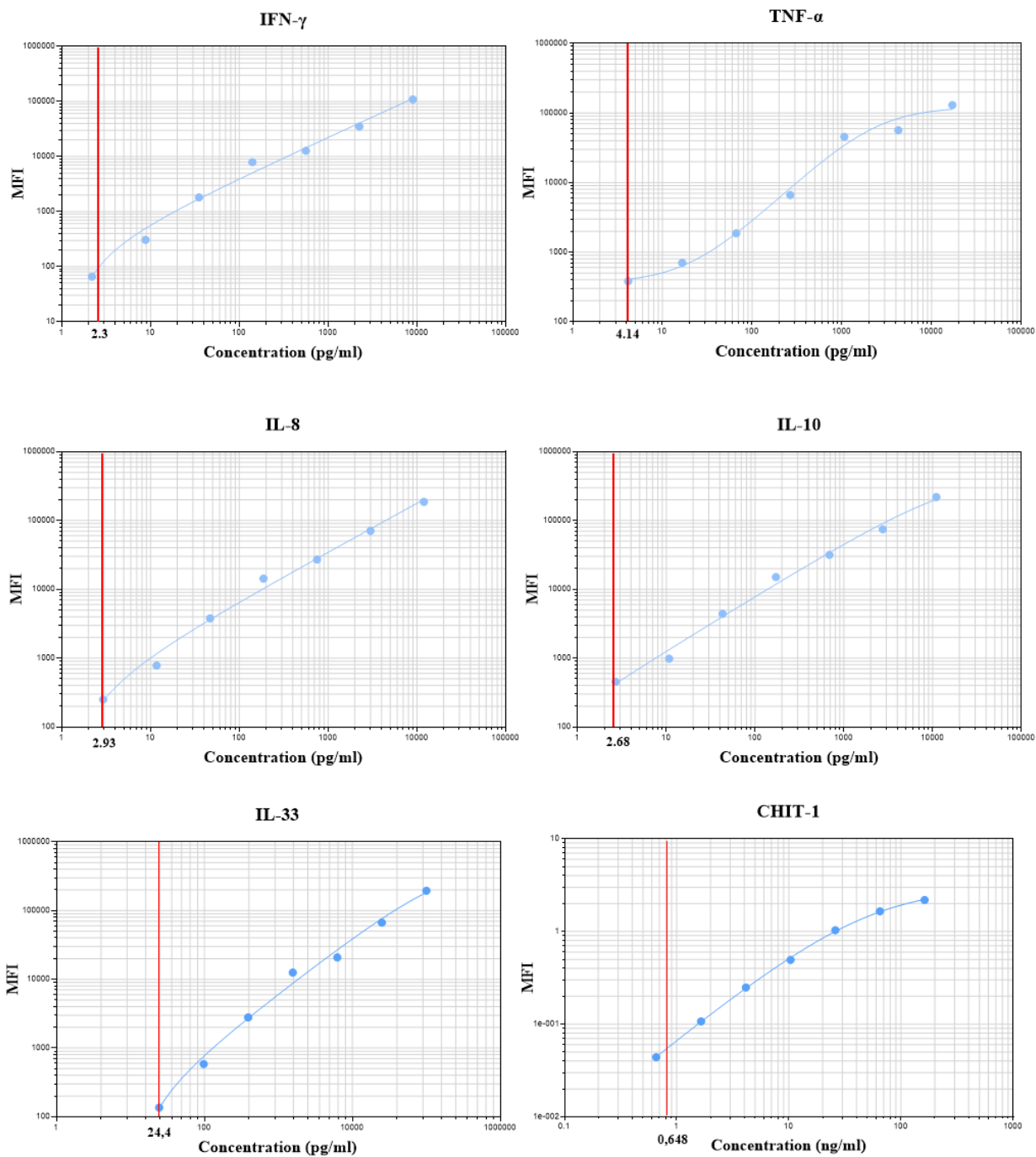
Siguiendo las indicaciones del manual de Human Chitotriosidase (Invitrogen|Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. Número del catálogo:EH105RB), las muestras séricas fueron diluidas 81 veces antes de la mezcla con el anticuerpo de captura, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 450 nm en el Fotómetro de Microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), antes del análisis la absorbancia de fondo se restó de todos los datos, incluidos los estándares y las muestras séricas; posteriormente los valores de absorbancia de las muestras diluidas se multiplicaron por el factor de dilución y finalmente los valores se analizaron en GraphPad Prism 8 (Dotmatics, Bishop's Stortford, Reino Unido), interpolando cada valor a la curva estándar (Anexo 3, Figura 2) obtenida para conocer la concentración de cada muestra.

**Figura 1.** Análisis de datos utilizando FlowJo™ v10 Software



Nota. Las flechas indican la dirección del análisis, FSC, dispersión frontal; SSC, dispersión lateral, PE, ficoeritrina; APC alofocianina.

**Figura 2.** Curvas estándar de los diferentes analitos cuantificado



*Nota.* Las curvas estándar se realizaron con el programa GraphPad Prism 8. MFI, intensidad media de fluorescencia. La línea roja muestra el límite de detección para cada analito.

## 9.4 Anexo 4. Protocolo de extracción de ADN de *Mtb* para genoma total.

El protocolo se basa en 3 artículos: El protocolo se basa en el artículo 1. Isaza JP, Duque C, Gomez V, Robledo J, Barrera LF, Alzate JF. Whole genome shotgun sequencing of one Colombian clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis* reveals DosR regulon gene deletions. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2012 May [cited 2021 Dec 6];330(2):113–20. Available from: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22404577/\(325\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22404577/(325)) 2. Hatfull GF, Jacobs WR. (2014) Molecular genetics of mycobacteria, 2nd Edition. ASM Press.(503) y 3. Warren R, de Kock M, Engelke E, Myburgh R, Gey van Pittius N, Victor T, van Helden P. Safe *Mycobacterium tuberculosis* DNA extraction method that does not compromise integrity. J Clin Microbiol. 2006 Jan;44(1):254-6. doi: 10.1128/JCM.44.1.254-256.2006. PMID: 16390984; PMCID: PMC1351970 (504).

### 1. Obtención de la bacteria

- Se toman 10 mL de un cultivo del aislado clínico de *Mtb* y se centrifugan a 3000rpm a 4°C por 10 min.
- Se remueve todo el sobrenadante
- Se lava el pellet con 10 mL de PBS 1X con 0,05% de Tyloxapol.
- Se centrifugan a 3000 rpm a 4°C por 10 min.
- Se elimina todo el sobrenadante por inversión.
- El pellet se congela a -20°C.

### 2. Extracción del ADN

#### 1er día:

- El pellet se re-suspende en 450uL de buffer TE pH 8.0 (libre de DNAsas).
- Se agregan 50µL de una solución de lisozima a 10 mg/mL.
- Se mezcla bien y se incuba a 37°C toda la noche (en agitación suave).

#### 2º día:

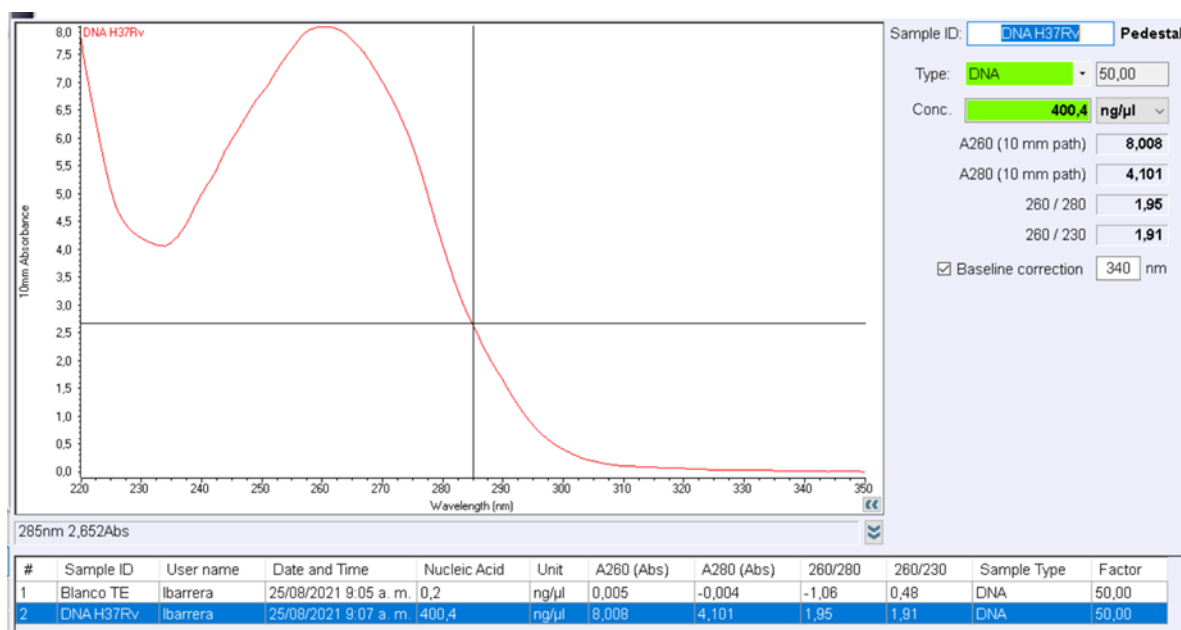
- Se somete a 5 ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido.
- Se adicionan 50 µL de RNasa (10 mg/mL) y mezclar bien.
- Incubar la muestra a 37°C por 30 minutos.
- Se adicionan 100 µL de SDS 10% y se incuba por 1 hr a 60°C.
- Se adiciona un volumen (600 µL) de phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v).

- Se incuba por 2hr a temperatura ambiente en agitación.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente.
- Se recupera la fase acuosa y se pasa a un nuevo tubo.
- Se adiciona un volumen chloroform/isoamyl alcohol (24: 1, v/v).
- Se mezcla bien con un vórtex suave (3 veces de 5 seg) y centrifugar a 14.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente.
- Se recupera la fase acuosa y se pasa a un nuevo tubo.
- Se agrega 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2
- Se agrega isopropanol en un volumen equivalente a 0,7% del volumen de la muestra.
- Mezclar bien y centrifugar a 14.000 rpm por 20 min a 4°C.
- Remover el sobrenadante sin perder o molestar el pellet.
- Se adicionan 500 µL de etanol 70% a 4°C.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 10 min a 4°C.
- Repetir lavado con etanol y centrifugar nuevamente.
- Remover el sobrenadante al máximo sin perder el pellet de ADN.
- Dejar secar el pellet hasta dejar de observar liquido en el tubo.
- Re-suspender la muestra en 50 µL de TE pH 8.0 (libre de DNasas).
- Almacenar la muestra a -20°C.

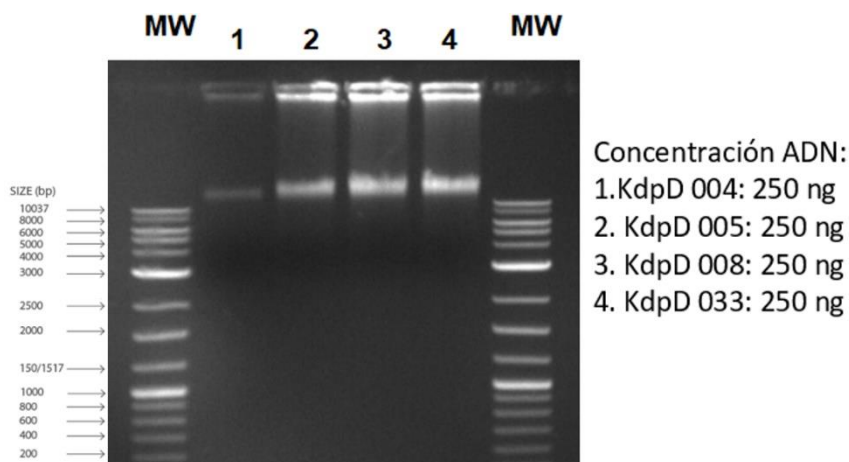
#### Concentración del AND de *Mtb*

- Medición de la concentración del ADN por nanodrop



**Figura 1.** Imagen representativa - Resultados primera extracción de ADN de H37Rv

*Nota.* La relación de absorbancia 260/280 es un indicador de contaminación con proteína: cuando es  $\geq 1,8$  indica pureza de la muestra de ADN. La relación de absorbancia 260/230, cuando es menor que 1,8, indica contaminación con compuestos orgánicos como sales.

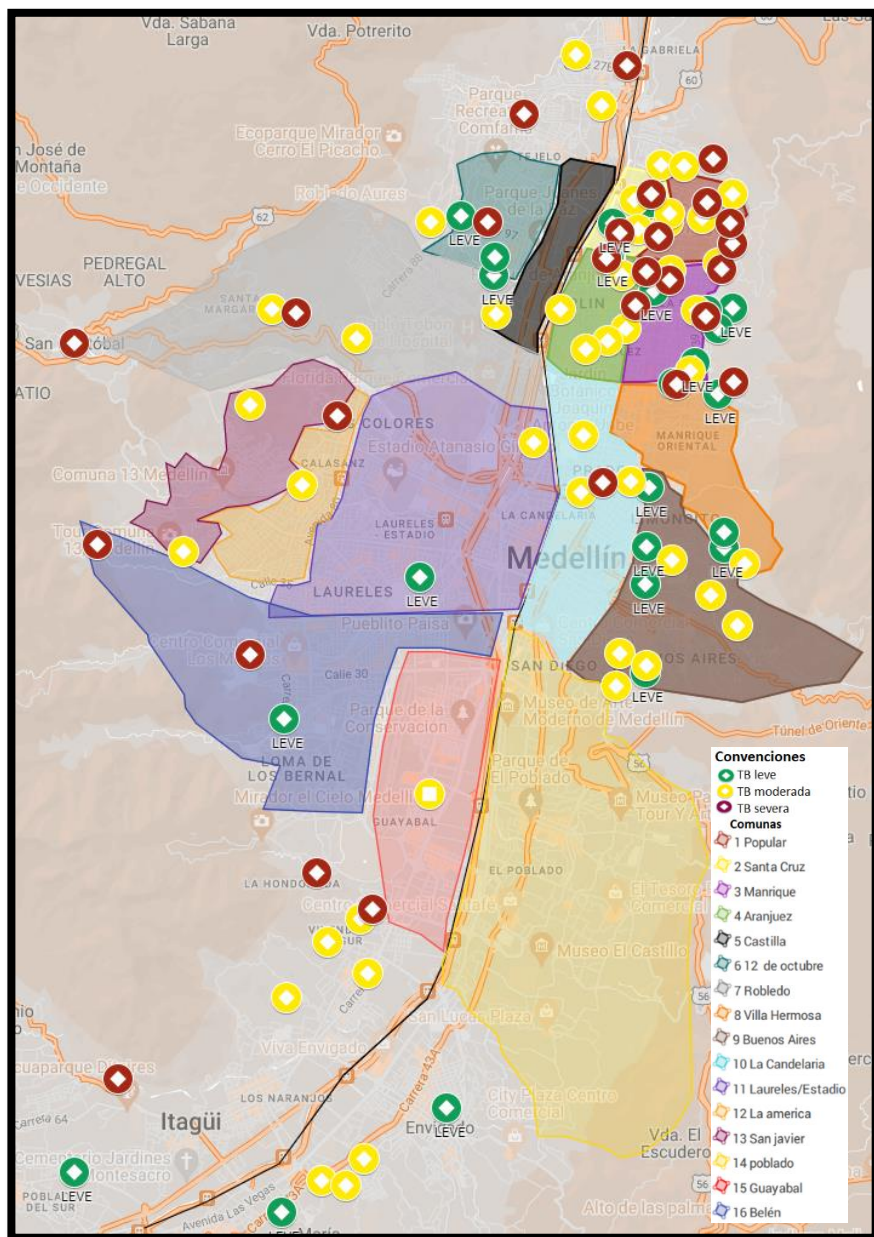
**Figura 2.** Electroforesis de ADN extraído de aislados clínicos de los pacientes de la cohorte con el protocolo descrito

*Nota.* MW, molecular weight/marcador de peso molecular; SIZE, tamaño; bp, base pair/par de bases; ng, nanogramo.

- Preparar un gel de agarosa con bromuro de etidio al 1 % en TBE.
- Correr el

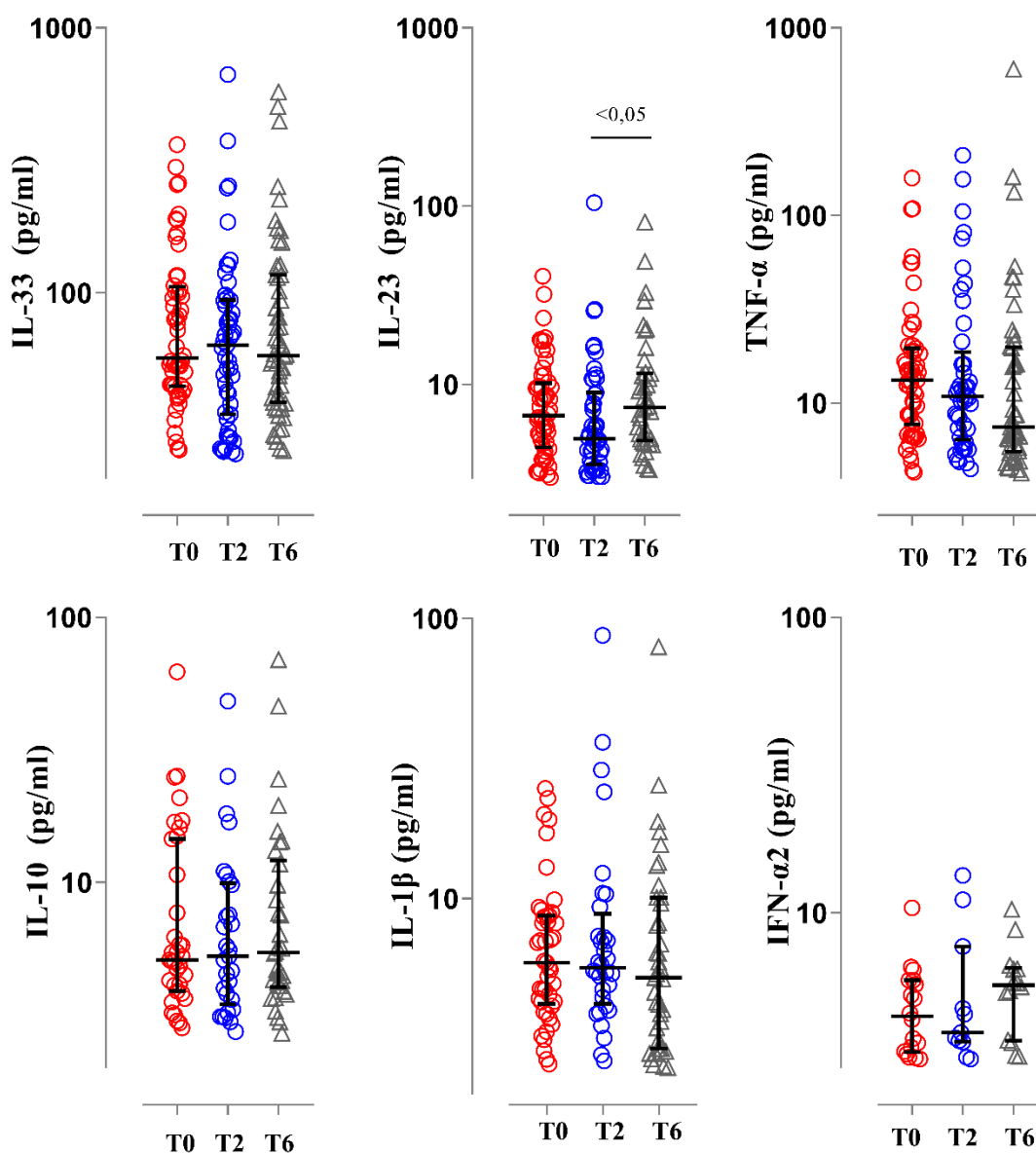
## 9.5 Anexo 5. Figuras suplementarias

**Figura Suplementaria 1.** Georreferenciación de los casos de la cohorte de pacientes con TB pulmonar del Área Metropolitana del Valle de Aburrá de la cohorte KdpDE 2020-2022 clasificados por la severidad de la TB pulmonar



*Nota.* Realizado con Google Maps/Google Earth última modificación: 12 de enero del 2022.

**Figura Suplementaria 2.** Comportamiento de los niveles séricos de citoquinas y moléculas asociadas a inflamación en pacientes con TB pulmonar activa durante el tratamiento

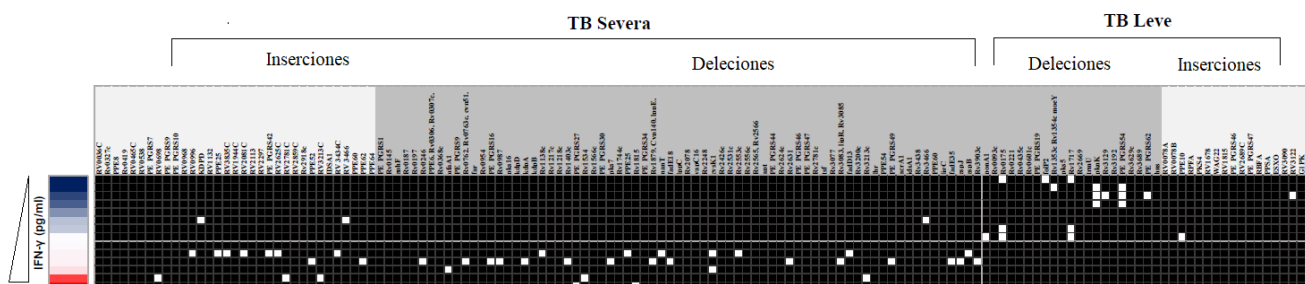


*Nota.* Se evaluaron los niveles séricos de las citoquinas IL-33, IL-23, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$  e IFN- $\alpha$ 2 en muestras de pacientes con TB pulmonar a las (T0, n=92; T2, n=92 y T6, n=73) 0, 8 y 24 semanas desde el inicio de tratamiento, respectivamente. Los datos representan medianas, rangos intercuartílicos, valor máximo y mínimo. Se utilizaron el test de Kruskal-Wallis y la Prueba de comparaciones múltiples de Dunn para comparar las distribuciones de los analitos séricos según el tiempo de tratamiento.

**Tabla suplementaria 1.** Tabla de contingencia sobre patrón de polimorfismos presentes en aislados clínicos de *Mtb* con fenotipo severo y leve

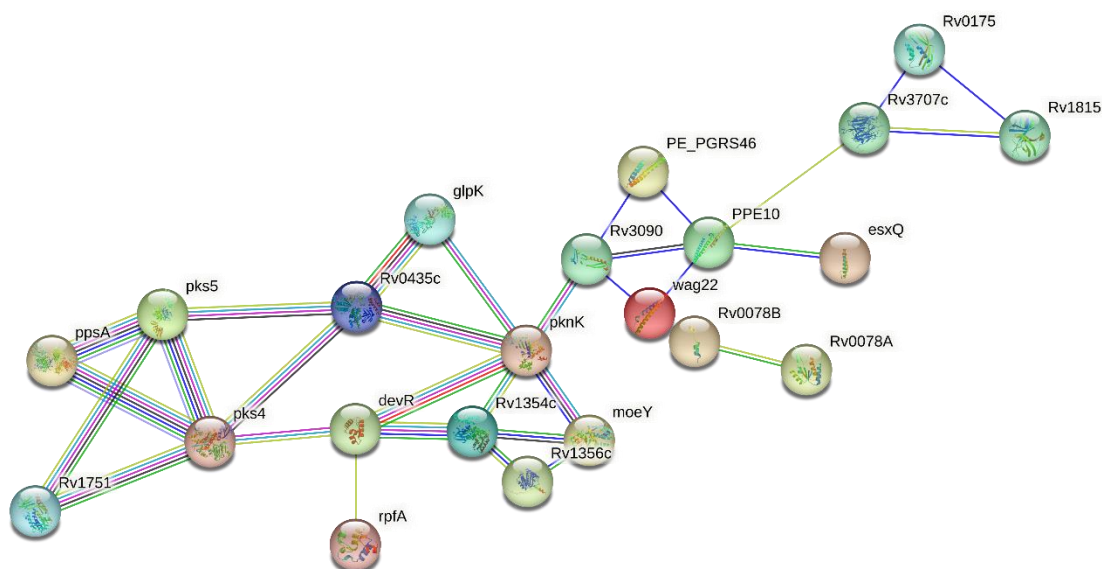
	<b>Polimorfismos de aislados clínicos de <i>Mtb</i> con fenotipo leve</b>	<b>Polimorfismos de aislados clínicos de <i>Mtb</i> con fenotipo severo</b>
<b>Baja concentración de CHIT-1</b>	43	31
<b>Alta concentración de CHIT-1</b>	11	91

**Figura Suplementaria 3.** Deleciones comunes en grupos de aislamientos clínicos de *Mtb* inductores de altos niveles séricos de IFN- $\gamma$  en pacientes con TB pulmonar después de 2 meses de tratamiento



*Nota.* El punto de corte es de 7,36 (pg/mL) y separa los niveles séricos bajos de IFN- $\gamma$  de los altos; fue calculado utilizando el índice de Youden. El color gris claro representa las inserciones unicas por grupo de severidad, el color gris oscuro representa las deleciones unicas por grupo de severidad, la parte izquierda de la figura representa los polimorfismos encontrados en los aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB severa y la parte derecha representa los polimorfismos encontrados en los aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB leve; genes con (cuadrados blancos) o sin polimorfismos (cuadrados negros).

**Figura Suplementaria 4.** Análisis de enriquecimiento funcional de genes asociados a los polimorfismos presentes en aislados clínicos de Mtb, de pacientes con TB leve



*Nota.* Se representan los genes asociados a los polimorfismos presentes en aislados clínicos de Mtb de pacientes con TB severa.

**Tabla suplementaria 2.** Lista detallada de los polimorfismos presentes en los aislados clínicos de *Mtb* de pacientes con TB severa y leve

Nombre del gen	Identificador	ref_inicio	ref_parada	Tamaño	Tipo	fenotipo de TB	Producto proteico
PE_PGRS30	RV1651c	1864097	1864106	9	Delección	Severa	proteína de la familia
PPE25	RV1787	2025847	2025853	6	Delección	Severa	Pertenece a la familia PPE
Rv3083	RV3083	3448507	3451399	2891	Delección	Severa	Probable monooxigenasa
lipR	RV3084	3448507	3451399	2891	Delección	Severa	Probable lipR acetil-hidrolasa/esterasa
Rv3085	RV3085	3448507	3451399	2891	Delección	Severa	Probable deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
fadD13	RV3089	3455966	3455967	1	Delección	Severa	Probable cadena de ácido graso-coa ligasa
PE_PGRS1	RV0109	132097	132311	231	Delección	Severa	Proteína de la familia PE_PGRS1
Rv0145	RV0145	171457	171779	322	Delección	Severa	Posible metiltransferasa
ephF	RV0134	162155	162156	1	Delección	Severa	Epóxido hidatasa
Rv0187	RV0187	219105	219106	1	Delección	Severa	Probable o-metiltransferasa
Rv0197	RV0197	234462	234474	12	Delección	Severa	Posible oxidorreductasa
Rv0246	RV0246	297309	297310	1	Delección	Severa	Probable proteína integral de membrana conservada
fadE6	RV0271c	328056	328120	64	Delección	Severa	acil-CoA deshidrogenasa
Rv0306	RV0306	373462	377838	4376	Delección	Severa	Putativa oxidorreductasa
Rv0307c	RV0307c	373462	377838	4376	Delección	Severa	Proteína desconocida
Rv0308	RV0308	373462	377838	4376	Delección	Severa	Probable proteína integral de membrana conservada
Rv0368c	RV0368c	445587	445588	1	Delección	Severa	Proteína no caracterizada
ufaA1	RV0447c	536029	536030	1	Delección	Severa	Ácido tuberculoso metiltransferasa ufaa
Rv0654	RV0654	751504	751505	1	Delección	Severa	Probable dioxigenasa
PE_PGRS9	RV0746	836360	836361	1	Delección	Severa	proteína de la familia
Rv0762c	RV0762c	856150	861036	4886	Delección	Severa	Proteína no caracterizada
Rv0763c	RV0763c	856150	861036	4886	Delección	Severa	Posible ferredoxina
cyp51	RV0764c	856150	861036	4886	Delección	Severa	Lanosterol 14-alfa desmetilasa
Rv0765c	RV0765c	856150	861036	4886	Delección	Severa	Probable oxidorreductasa
cyp123	RV0766c	856150	861036	4886	Delección	Severa	Citocromo putativo
Rv0767c	RV0767c	856150	861036	4886	Delección	Severa	Regulador transcripcional
aldA	RV0768	856150	861036	4886	Delección	Severa	Probable aldehído deshidrogenasa
far	RV0855	951649	951650	1	Delección	Severa	Probable racemasa de ácidos grasos-coa lejos
Rv0954	RV0954	1065652	1065661	9	Delección	Severa	Proteína antigénica homóloga de 34 kDa
PE_PGRS16	RV0977	1091981	1091982	1	Delección	Severa	proteína de la familia
Rv0987	RV0987	1103412	1103413	1	Delección	Severa	Probable proteína transmembrana de transporte ABC
pkS16	RV1029	1132924	1133057	133	Delección	Severa	Ligasa putativa
kdpD	RV1030	1150324	1150337	13	Delección	Severa	Probable proteína sensorial
kdpA	RV1029	1152659	1152660	1	Delección	Severa	Subunidad de unión a la atpasa transportadora de potasio
kdpB	RV1030	1154471	1154472	1	Delección	Severa	Subunidad de unión a la atpasa transportadora de potasio
Rv1138c	RV1138c	1265683	1265688	5	Delección	Severa	Posible oxidorreductasa
Rv1217c	RV1217c	1361216	1361225	9	Delección	Severa	proteína de membrana integral
Rv1218c	RV1450c	1362414	1362417	3	Delección	Severa	Proteína de unión a ATP
Rv1403c	RV1403c	1580178	1580179	1	Delección	Severa	Metiltransferasa putativa
PE_PGRS27	RV1450c	1631096	1631105	9	Delección	Severa	proteína de la familia
Rv1534	RV1534	1735410	1735460	50	Delección	Severa	Probable regulador transcripcional
Rv1566c	RV1566c	1774056	1774071	15	Delección	Severa	Posible proteína Inv
pkS7	RV1787	1875474	1875475	1	Delección	Severa	sintasa de policétidos
Rv1744c	RV1744c	1971316	1971317	1	Delección	Severa	Probable proteína de membrana
Rv1815	RV1815	2057750	2057751	1	Delección	Severa	Proteína conservada

Nombre del gen	Identificador	ref_inicio	ref_parada	Tamaño	Tipo	fenotipo de TB	Producto proteico
PE_PGRS34	RV1840c	2088489	2088498	9	Delección	Severa	Citocromo putativo
Rv1879	RV1879	2130173	2133710	3535	Delección	Severa	Proteína no caracterizada
cyp140	RV1880c	2130173	2133710	3535	Delección	Severa	Citocromo putativo
lppE	RV1881c	2130173	2133710	3535	Delección	Severa	Posible lipoproteína conservada
Rv1882c	RV1882c	2130173	2133710	3535	Delección	Severa	Probable deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
Rv1883c	RV1883c	2130173	2133710	3535	Delección	Severa	Proteína no caracterizada
nanT	RV1911c	2150069	2150974	905	Delección	Severa	proteína integral de membrana
fadE18	RV1992c	2184718	2184719	1	Delección	Severa	acil-CoA deshidrogenasa
lppC	RV1911c	2157911	2157917	6	Delección	Severa	probable lipoproteína LppC
ctpG	RV2231A	2237058	2240701	3650	Delección	Severa	Probable transportador de cationes metálicos
Rv2078	RV2078	2335323	2335324	1	Delección	Severa	Proteína no caracterizada
vapC16	RV2334	2505811	2505813	2	Delección	Severa	componente tóxico de un sistema de toxina-antitoxina
Rv2248	RV2248	2522487	2522488	1	Delección	Severa	Proteína no caracterizada
cysK1	RV2334	2608799	2608803	4	Delección	Severa	O-acetilserina sulfhidrasa
Rv2426c	RV2426c	2723838	2723841	3	Delección	Severa	Proteína no caracterizada
Rv2531c	RV2531c	2856836	2856837	1	Delección	Severa	Probable aminoácido descarboxilasa
Rv2553c	RV2553c	2873094	2873097	3	Delección	Severa	Probable proteína de membrana conservada
Rv2556c	RV2556c	2876608	2876612	4	Delección	Severa	Proteína hipotética conservada
Rv2565	RV2565	2885737	2886464	727	Delección	Severa	Proteína conservada
Rv2566	RV2566	2885737	2886464	727	Delección	Severa	Proteína larga conservada
apt	RV2584c	2910887	2910888	1	Delección	Severa	Adenina fosforibosiltransferasa
PE_PGRS44	RV2591	2922074	2922103	36	Delección	Severa	proteína de la familia
Rv2624c	RV2624c	2950866	2950867	1	Delección	Severa	familia de las proteínas del estrés
Rv2631	RV2631	2958311	2958314	3	Delección	Severa	Proteína hipotética conservada
PE_PGRS46	RV2634c	2960781	2960782	1	Delección	Severa	proteína de la familia
PE_PGRS47	RV2889c	3054900	3054909	9	Delección	Severa	Contribuye a la evasión de la inmunidad innata y adaptativa.
Rv2781c	RV2781c	3088773	3088774	1	Delección	Severa	oxidorreductasa
tsf	RV2889c	3198825	3198828	3	Delección	Severa	Probable factor de elongación tsf
Rv3077	RV3077	3440478	3440480	2	Delección	Severa	Posible hidrolasa
Rv3200c	RV3200c	3573550	3573551	1	Delección	Severa	Posible transportador transmembrana de cationes
Rv3213c	RV3213c	3590730	3590731	1	Delección	Severa	Posible soj/parA-related protein,
lhr	RV3296	3677656	3677657	1	Delección	Severa	Helicasa dependiente de ATP
PPE54	RV3343c	3730957	3730972	15	Delección	Severa	Proteína de la familia PPE54
PE_PGRS49	RV3344c	3737478	3737514	36	Delección	Severa	proteína de la familia
acrA1	RV3391	3805765	3805766	1	Delección	Severa	multi functional protein with fatty acyl-CoA
IDSA1	RV3398c	3815166	3815167	1	Delección	Severa	farnesil difosfato sintasa
Rv3438	RV3438	3858167	3858176	9	Delección	Severa	Proteína conservada
Rv3466	RV3466	3883816	3883818	2	Delección	Severa	Proteína hipotética conservada
PPE60	RV3478	3895149	3895150	1	Delección	Severa	Pertenece a la familia PPE
ligC	RV3731	4182282	4182283	1	Delección	Severa	Posible ADN ligasa LigC dependiente de ATP
fadE35	RV3797	4251299	4251300	1	Delección	Severa	acil-CoA deshidrogenasa
espJ	RV3878	4357422	4357423	1	Delección	Severa	conservar la proteína rica en alanina
espB	RV3881c	4361798	4361799	1	Delección	Severa	proteína conservada rica en alanina y glicina
Rv3903c	RV3903c	4388381	4388382	1	Delección	Severa	Hipotética proteína rica en alanina y prolina
ponA1	RV0050	55549	55552	3	Delección	Leve	Formación de la pared celular
Rv0093c	RV0093c	103234	103247	13	Delección	Leve	Proteína no caracterizada



Nombre del gen	Identificador	ref_inicio	ref_parada	Tamaño	Tipo	fenotipo de TB	Producto proteico
Rv0175	RV0175	206850	206869	57	Delección	Leve	Probable proteína de membrana conservada asociada a Mce
Rv0221	RV0221	265468	265469	1	Delección	Leve	Posible triacilglicerol sintasa
Rv0435c	RV0435c	522406	522407	1	Delección	Leve	Putativa atpasa conservada
Rv0601c	RV0601c	698606	698641	37	Delección	Leve	Sensor quinasa de dos componentes
PE_PGRS19	RV1067c	1189198	1189201	3	Delección	Leve	proteína de la familia
folP2	RV1207	1351255	1351282	27	Delección	Leve	Dihidropteroato sintasa
Rv1354c	RV1354c	1519822	1524572	4752	Delección	Leve	Proteína no caracterizada
moeY	RV1527c	1519822	1524572	4752	Delección	Leve	Proteína no caracterizada
Rv1356c	RV1356c	1519822	1524572	4752	Delección	Leve	Proteína no caracterizada
pks5	RV1527c	1726074	1726075	1	Delección	Leve	Probable policétido sintasa
Rv1751	RV1751	1980058	1980062	4	Delección	Leve	Probable oxidorreductasa
DosR	RV3024c	2237058	2240701	3650	Delección	Leve	Proteína reguladora transcripcional de dos componentes
Rv2669	RV2670	2985434	2985435	1	Delección	Leve	N-acetiltransferasa relacionada con GCNS
trmU	RV3024c	3383495	3383496	1	Delección	Leve	Probable ARN de transferencia
pknK	RV3080c	3443180	3443181	1	Delección	Leve	Proteína reguladora transcripcional serina/treonina pknk
Rv3129	RV3129	3494824	3494825	1	Delección	Leve	Proteína no caracterizada
Rv3192	RV3192	3559996	3559997	1	Delección	Leve	Proteína hipotética
PE_PGRS54	RV3508	3932918	3932927	9	Delección	Leve	Pertenece a la familia PPE
Rv3629c	RV3629c	4068446	4068447	1	Delección	Leve	Probable proteína integral de membrana conservada
Rv3689	RV3689	4130692	4130710	18	Delección	Leve	Probable proteína transmembrana conservada
PE_PGRS62	RV3812	4277514	4277515	1	Delección	Leve	proteína de la familia
hns	RV3852	4325211	4325212	1	Delección	Leve	proteína similar a la histona
RV0036C	RV0036c	39145	39145	20	Inserción	Severa	Proteína conservada
cyp135A1	RV0327c	393114	393114	1	Inserción	Severa	Citocromo putativo
PPE8	RV0355c	429616	429616	15	Inserción	Severa	Pertenece a la familia PPE
Rv0419	RV0419	506479	506479	1	Inserción	Severa	lipoproteína peptidasa
RV0465C	RV0465c	555449	555449	1	Inserción	Severa	Probable proteína reguladora de la transcripción
RV0538	RV0538	631427	631427	36	Inserción	Severa	Posible proteína de membrana conservada
PE_PGRS7	RV0578c	673142	673142	9	Inserción	Severa	proteína de la familia
RV0698	RV0698	799143	799143	1	Inserción	Severa	Proteína no caracterizada
PE_PGRS9	RV0746	836884	836884	3	Inserción	Severa	proteína de la familia
PE_PGRS10	RV0747	839909	839909	3	Inserción	Severa	Pertenece a la familia PPE
RV0968	RV0968	1078420	1078420	6	Inserción	Severa	Proteína conservada
RV0996	RV0996	1112923	1112923	6	Inserción	Severa	Probable proteína transmembrana conservada
KdpD	RV1028c	1150407	1150407	3	Inserción	Severa	Probable proteína sensorial
RV1132	RV1132	1258959	1258997	39	Inserción	Severa	Proteína de membrana conservada
ppe25	RV1787	2026027	2026027	1	Inserción	Severa	Pertenece a la familia PPE
RV3835C	RV3835c	2081014	2081014	1	Inserción	Severa	Probable proteína de membrana conservada
RV1944C	RV1944c	2195896	2195896	1	Inserción	Severa	Proteína conservada
RV2081C	RV2081c	2338202	2338202	1	Inserción	Severa	Proteína no caracterizada
RV2113	RV2113	2373700	2373700	3	Inserción	Severa	Probable proteína integral de membrana
RV2297	RV2297	2568671	2568671	7	Inserción	Severa	Proteína desconocida
PE_PGRS42	RV2487c	2796138	2796138	1	Inserción	Severa	proteína de la familia
RV2625C	RV2625c	2951328	2951328	1	Inserción	Severa	Metaloproteasa de zinc putativa
RV2781C	RV2781c	3088401	3088401	1	Inserción	Severa	Posible oxidorreductasa

Nombre del gen	Identificador	ref_inicio	ref_parada	Tamaño	Tipo	fenotipo de TB	Producto proteico
<i>RV2859C</i>	RV2859c	3171468	3171516	154	Inserción	Severa	Posible amidotransferasa
<i>Rv2918c</i>	RV2918c	3230408	3230408	7	Inserción	Severa	Probable proteína reguladora de nitrógeno
<i>PPE52</i>	RV3345c	3510729	3510729	24	Inserción	Severa	Pertenece a la familia PPE
<i>RV3213C</i>	RV3213c	3590726	3590726	1	Inserción	Severa	Posible proteína relacionada con soj/parA
<i>IDSA1</i>	RV3398c	3815167	3815167	1	Inserción	Severa	farnesil difosfato sintasa
<i>RV3434C</i>	RV3434c	3853709	3853709	1	Inserción	Severa	Posible proteína transmembrana conservada
<i>RV3466</i>	RV3466	3883813	3883813	2	Inserción	Severa	Proteína hipotética conservada
<i>PPE60</i>	RV3478	3895152	3895152	1	Inserción	Severa	Pertenece a la familia PPE
<i>PPE62</i>	RV3533c	3972133	3972133	1	Inserción	Severa	Pertenece a la familia PPE
<i>PPE64</i>	RV3558	3998807	3998807	15	Inserción	Severa	Pertenece a la familia PPE
<i>RV0078A</i>	RV0078A	87259	87259	1	Inserción	Leve	Proteína no caracterizada
<i>RV0078B</i>	RV0078B	87848	87848	1	Inserción	Leve	Proteína conservada
<i>PPE10</i>	RV0867c	531621	531621	15	Inserción	Leve	Pertenece a la familia PPE
<i>RPFA</i>	RV0867c	964859	964859	6	Inserción	Leve	Posible factor de reanimación
<i>PKS4</i>	RV1181	1316371	1316371	1	Inserción	Leve	Probable policétido beta-cetoacil sintasa
<i>RV1678</i>	RV1678	1903204	1903204	15	Inserción	Leve	Probable proteína integral de membrana
<i>WAG22</i>	RV1759c	1992331	1992331	1	Inserción	Leve	Proteína de la familia Pe-pgrs
<i>RV1815</i>	RV1815	2058048	2058048	1	Inserción	Leve	Proteína conservada
<i>PE_PGRS46</i>	RV2634c	2960951	2960951	1	Inserción	Leve	Pertenece a la familia de las micobacterias PE
<i>RV2689C</i>	RV2689c	3006723	3006723	1	Inserción	Leve	Proteínas ricas en alanina y valina y glicina
<i>PE_PGRS47</i>	RV2741	3055310	3055295	9	Inserción	Leve	Contribuye a la evasión de la inmunidad innata y adaptativa
<i>RBFA</i>	RV2838c	3144646	3144646	2	Inserción	Leve	Probable factor de unión al ribosoma
<i>PPSA</i>	RV2931	3248315	3248315	1	Inserción	Leve	Síntesis de fenolptiocerol tipo i sintasa de policétidos
<i>EsxQ</i>	RV3017c	3376531	3376515	19	Inserción	Leve	Proteína similar a la ESAT-6
<i>RV3090</i>	RV3090	3458953	3458953	6	Inserción	Leve	Proteína desconocida rica en alanina y valina
<i>RV3122</i>	RV3122	3488343	3488343	1	Inserción	Leve	Proteína no caracterizada
<i>GLPK</i>	RV3696c	4139190	4139190	1	Inserción	Leve	Probable glicerol quinasa
<i>RV3707C</i>	RV3707c	4150425	4150425	1	Inserción	Leve	Proteína no caracterizada