



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
SECRETARIA DE SALUD

**“EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN  
LA PATOGÉNESIS DE LA REMODELACIÓN PULMONAR EN  
TUBERCULOSIS**

**T É S I S D E P O S G R A D O**

PARA OBTENER EL TÍTULO EN LA SUBESPECIALIDAD DE

**NEUMOLOGÍA**

P R E S E N T A:

**DRA. VERÓNICA GONZÁLEZ LÓPEZ**

TUTORA:

**DRA. ALEJANDRA RENATA BÁEZ SALDAÑA**



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## FIRMAS DE ACEPTACIÓN

---

Dr. Jorge Salas Hernández  
Director de Enseñanza  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"

---

Dr. Juan Carlos Vázquez García  
Subdirector de Enseñanza  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"

---

Dra. Margarita Fernández Vega  
Jefe del Departamento de Formación de Posgrado  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"

---

Dra. Alejandra Renata Báez Saldaña  
Medico adscrito al servicio de Neumología Clínica  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"

## AGRADECIMIENTOS:

A Dios por permitirme completar esta hermosa etapa de mi vida .

A mis padres por su apoyo incondicional, por ser siempre mi inspiración y mi guía.

A mis hermanos por acompañarme siempre a lo largo de este camino, por que sin ellos la vida no sería igual.

A Edwin y Kaleb por ser una gran alegría en mi vida.

A mis compañeros de residencia en especial a Nachelly y Maria Elena por hacer la estancia en el INER toda una aventura y permitir que aprendiera de todos ellos.

A mis verdaderos amigos de la especialidad por ayudarme a crecer como médico y persona.

A mis maestros por su enseñanza, dedicación, en especial a la Dra. Renata Báez por su paciencia, tenacidad para la elaboración de esta tesis.

# **INDICE**

<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Introducción</b>	<b>6</b>
<b>Justificación</b>	<b>11</b>
<b>Objetivo</b>	<b>12</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>12</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>13</b>
<b>Análisis Estadístico</b>	<b>18</b>
<b>Consideraciones Éticas</b>	<b>19</b>
<b>Resultados</b>	<b>20</b>
<b>Discusión</b>	<b>24</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>28</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>29</b>
<b>Anexos</b>	<b>31</b>

## RESUMEN

**Introducción:** La tuberculosis es una enfermedad curable, no obstante, la curación generalmente se asocia a diversos grados de fibrosis, bronquiectasias de tracción y broncostenosis, lo que ocasiona pérdida de volumen y alteración de la función pulmonar con el consiguiente incremento de la morbilidad. La inmonopatogénesis de la remodelación pulmonar que se asocia a tuberculosis (cavitación y fibrosis) y distorsión de la arquitectura pulmonar, hasta el momento no ha sido explicada satisfactoriamente. Estudios previos han demostrado que prácticamente todos los pacientes con tuberculosis pulmonar curada, quedan con diversos grados de remodelación pulmonar lo que ocasiona morbilidad significativa. La remodelación pulmonar forma parte de la respuesta inmune al hospedero por la presencia de la micobacteria en el parénquima pulmonar, sin embargo, la participación exacta de los componentes individuales de la misma hasta ahora es desconocida, y aunque la respuesta es protectora, también produce daño.

**Objetivo:** Evaluar la relación entre los niveles de expresión de biomarcadores inmunológicos y el grado de remodelación pulmonar en pacientes con tuberculosis pulmonar comprobada bacteriológicamente al momento de su diagnóstico.

**Material y Métodos:** Se estudiaron 62 pacientes con tuberculosis pulmonar activa recién diagnóstica y comprobada bacteriológicamente mediante baciloscopia y/o cultivo positivo a los cuales se les realizó la medición de biomarcadores inmunológicos, expresión de IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 en células de sangre periférica así como biomarcadores de inflamación como PCR, VSG, DHL, albúmina y se correlacionó con el grado de remodelación pulmonar evaluado por radiografía de tórax.

**Resultados:** Se demostró una buena correlación entre los niveles de PCR con el grado de remodelación pulmonar y una correlación moderada pero significativa en cuanto a albúmina, leucocitos, neutrófilos y linfocitos. En cuanto a las citocinas no se presentó en ningún caso correlación significativa, pero si se observó una tendencia a la elevación en el porcentaje de expresión para IL-10 mientras más daño pulmonar se cuantificó, lo contrario sucedió con el IFN- $\gamma$  cuya expresión se encontraba disminuida en aquellos paciente con un alto grado de remodelación pulmonar.

**Conclusiones:** De los biomarcadores estudiados la proteína C reactiva, albúmina, cambios en la biometría hemática (leucocitos, neutrófilos, linfocitos) se asociaron significativamente a la remodelación pulmonar. De las citocinas estudiadas en ninguna se demostró correlación significativa, no obstante la IL10 e IFN- $\gamma$  mostraron una tendencia con la remodelación pulmonar. Dichos biomarcadores pueden ser útiles para identificar a los pacientes con mayor grado de remodelación pulmonar y que serán candidatos para seguimiento por la posibilidad de presentar morbilidades secundarias.

**Palabras clave:** tuberculosis pulmonar, remodelación, citocinas, reactantes de fase aguda.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que afecta a todo el mundo, por lo que constituye un serio problema de salud pública, ya que es la segunda causa mundial de mortalidad, después del SIDA, causada por un agente infeccioso.

Según el reporte de la Organización Mundial de la Salud para el 2010, 8.8 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.4 millones murieron por esta causa. Más del 95% de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos.<sup>1</sup>

En México se reportaron 18,848 casos nuevos de TB en todas sus formas, de las cuales el 81.6% correspondió a la forma pulmonar, 1.6% meníngea, 5.7% ganglionar y 11.1% a otras formas. De los 15,384 casos nuevos de tuberculosis pulmonar 20% se asoció a Diabetes Mellitus. Se presentó curación en el 82.3% de la población afectada.<sup>2</sup>

La tuberculosis es una enfermedad curable, no obstante, la curación generalmente se asocia a diversos grados de fibrosis, bronquiectasias de tracción y broncostenosis, lo que ocasiona pérdida de volumen y alteración de la función pulmonar con el consiguiente incremento de la morbilidad.<sup>3</sup>

Estudios previos han demostrado que la mayoría de los pacientes con tuberculosis pulmonar curada quedan con diversos grados de remodelación pulmonar evaluada mediante la radiografía de tórax, de éstos el 47% presenta grados de remodelación de moderada a grave, así mismo, el 40% presentan alteraciones en la función respiratoria y el 58% algún grado de disnea.<sup>4,5</sup>

En este estudio remodelación pulmonar en tuberculosis se refiere a los cambios estructurales y anatómicos que no son fácilmente reversibles debido al depósito de matriz extracelular y contrasta con los cambios por edema e infiltración celular<sup>6</sup> y que incluye cavitación residual, cicatriz o fibrosis pulmonar, distorsión de la arquitectura pulmonar que conduce a la pérdida de volumen y bronquiectasias, todos los cuales representa una respuesta inapropiada que culmina en el daño de la arquitectura pulmonar<sup>3</sup>

El granuloma es la lesión histopatológica característica en la tuberculosis pulmonar y aunque muchos trabajos se han enfocado hacia los mecanismos de su formación y persistencia, poco se conoce en relación a su resolución. Esto es especialmente

relevante en tuberculosis en donde el granuloma se puede aclarar completamente con la consiguiente reparación de la arquitectura pulmonar, o progresar a producir un tejido aberrante, remodelado con la obliteración permanente de la arquitectura pulmonar por fibrosis.<sup>7</sup> Se especula que el aclaramiento está regulado por un balance entre la expresión de citocinas Th1/Th2.

El control de la infección requiere una respuesta inmune protectora, este tipo de respuesta inmunológica incluye la participación de macrófagos alveolares, linfocitos T (CD4, CD8 y natural killer) con la producción de citocinas como interleucina 12 (IL-12), Interferón-gamma (por su siglas en ingles IFN- $\gamma$ ), interleucina 18 (IL-18) y factor de necrosis tumoral-alfa (FNT-  $\alpha$ ) que tiene un papel muy importante en la migración de las diferentes subpoblaciones celulares al sitio de infección para la formación del granuloma.<sup>8</sup>

La primera línea de defensa posterior a la inhalación de la micobacterias son los macrófagos alveolares (MA) y este primer contacto es crucial ya que va a definir el control de la infección o el desarrollo de la enfermedad. Diversos componentes de la micobacteria como lipoarabinomano (LAM), la lipoproteína de 19kDa y glicoproteínas, al unirse a los receptores tipo Toll2 (TLR2) induce la producción de moléculas como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (FNT-  $\alpha$ ) y óxido nítrico (ON) que activan señales intracelulares que tienen en común el factor nuclear  $\kappa\beta$  (FN  $\kappa\beta$ ), induciendo la expresión de citocinas y moléculas involucradas en la respuesta inmune.

La *M. tuberculosis* utiliza diferentes vías de entrada a los macrófagos alveolares, ya que promueve su propia fagocitosis a través de diferentes receptores presentes en la superficie de estos.

Posterior a la fagocitosis, *M. tuberculosis* es incluida en un fagosoma para formar el fagolisosoma, donde, es destruida por los mecanismos bactericidas y proteolíticos de los macrófagos con la consecuente generación de péptidos y otros antígenos.

Por lo que los MA además de ser células efectoras funcionan como células presentadores de antígeno y pueden definir el curso de la respuesta de inmunidad adaptativa (Th1 o Th2). Ya que si los MA no son capaces de controlar la infección se favorecerá una respuesta inmunitaria humoral (Th2), que no es protectora en tuberculosis pulmonar y que se caracteriza por producción de citocinas como interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), IL10, interleucina 13 (IL-13) y factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en ingles TGF- $\beta$ ) los



cuales antagonizan la respuesta inmune celular tipo Th1, caracterizada por la producción de citocinas como IFN-  $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18 y FNT-  $\alpha$ .

Los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas de complejo de histocompatibilidad tipo I y presentados a los linfocitos T CD8+, o bien, acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo II y presentados a los linfocitos T CD4+, mientras que los antígenos de naturaleza glicolipídica son acoplados con moléculas CD1 y presentados a los linfocitos CD8+. El proceso de presentación de antígenos constituye un paso importante en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa que se basa en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares que se activan y producen los factores y las citocinas que se mencionaron previamente.

Las citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y FNT- $\alpha$  se producen en las etapas iniciales de la infección; atraen a los neutrófilos, linfocitos y macrófagos para que fagociten bacilos extracelulares, y generan, además un foco inflamatorio. Posteriormente los linfocitos T CD4 específicos se transforman en linfocitos Th1, bajo la influencia de IL-12 secretada por los macrófagos. Estos linfocitos, tras su activación secretan otras citocinas, principalmente IFN- $\gamma$  el cual activará a los macrófagos infectados, inducirá la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno y favorecerá la eliminación de la bacteria.

Se ha atribuido un papel importante en la resolución de la infección a las citocinas Th1, mientras que las de células T cooperadoras tipo 2 (Th2) como la IL-4 e IL-10 no se han asociado con la resolución de la infección, pero si en el control del proceso inflamatorio que podría afectar al hospedero e incluso causar la muerte. La orientación a una respuesta inmune tipo Th1 o Th2 parecer estar relacionada con la naturaleza del ligando bacteriano o por la vía de receptor de entrada a la célula fagocítica.

Al parecer, los cambios en el proceso inflamatorio de agudo a crónico, el equilibrio entre el balance de las citocinas proinflamatorias, Th1 y Th2, y la activación de los macrófagos infectados, son eventos necesarios para que el sistema inmune controle la infección.<sup>9</sup>

La enfermedad tuberculosa crónica es controlada por la formación de granulomas tuberculosos, estructuras protectoras que impiden a la micobacteria extenderse, localizan la inflamación y disminuyen el daño tisular. Su formación se inicia con la infección de los macrófagos alveolares que constituyen el componente mayoritario de esta estructura. Los otros componentes son células gigantes multinucleadas, células

dendríticas, células T (CD4+, CD8+, células T  $\gamma\delta$ , células B y fibroblastos). El granuloma posee un área central necrótica donde están presentes micobacterias extracelulares rodeadas de macrófagos y linfocitos. Alrededor de esta área se localizan unas estructuras parecidas a folículos linfoides que son ricas en células B, T y macrófagos. La producción del FNT- $\alpha$  es muy importante, ya que se trata de la citocina clave en la formación y el mantenimiento del granuloma.<sup>10</sup>

El TGF- $\beta$  es otra citocina también está presente en los granulomas, sin embargo, ésta inhibe la expresión de IL-12 e IFN- $\gamma$ . La falta de TGF- $\beta$  genera una respuesta inflamatoria intensa en ratones knockout. TGF- $\beta$  también es una citocina con potente actividad fibrogénica, por lo tanto podría expresarse en un delicado balance con otros mediadores inflamatorios. En el granuloma, linfocitos T y macrófagos producen FNT- $\alpha$  y linfotóxina alfa<sup>3</sup>. FNT- $\alpha$  es crucial para la defensa del hospedero y junto con TGF- $\beta$  también facilita la integridad estructural del granuloma mediante la formación de la pared fibrosa.<sup>11</sup>

Por lo tanto ¿qué determina que el granuloma se aclare o se resuelva completamente sin cicatriz, o que termine en necrosis licuificada y formación de cicatriz? Y ¿Por qué ocurre la necrosis caseosa y licuificación y porque la fibrosis se presenta en una enfermedad que se caracteriza por una potente respuesta o producción de IFN- $\gamma$  cuando esta citocina generalmente se opone a la fibrosis?

Algunas de estas citocinas, principalmente la IL-6 y el FNT- $\alpha$  son inductores de la respuesta de fase aguda (RFA) la cual resulta en un aumento en la síntesis hepática y los niveles séricos de proteínas de fase aguda, las cuales pueden ser cuantificadas en serie, siendo útiles en el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes.<sup>12</sup> Sin embargo inhiben la producción de albumina sérica causando una dramática caída en la concentración plasmática de esta.<sup>13</sup>

La proteína C reactiva (PCR), es considerada uno de los marcadores de la respuesta de fase aguda más sensible y específico, ya que su concentración plasmática refleja directamente la intensidad del proceso patológico.<sup>14</sup> Por otra parte, la velocidad de sedimentación globular (VSG), un marcador no específico que cambia durante un proceso infeccioso, lo que indica la intensidad de la inflamación, por lo que es útil para monitorear el progreso de las enfermedades inflamatorias tales como la tuberculosis.<sup>15</sup>

Otro marcador que nos pueden ser de utilidad, orientando hacia la presencia de una inflamación crónica y que pueden correlacionar con la gravedad son los cambios en la biometría hemática. Se han reportado leucocitosis, neutrofilia y trombocitosis así como

monocitosis, considerada como característica de la enfermedad, es un hallazgo inconstante cuya ocurrencia varía de 5 a 28% de los casos, su normalización también puede representar un indicador del control de la enfermedad.<sup>16</sup>

Existen varios estudios en donde ya han tratado de identificar el patrón de los biomarcadores inmunológicos principalmente citocinas, así como reactantes de fase aguda en la tuberculosis activa.

Eliana Peresi y cols en Brasil estudiaron el comportamiento de las citocinas (IL-10, IFN- $\gamma$ , FNT- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, velocidad de sedimentación eritrocitaria y alfa-1-acido glicoproteína), en suero y su regresión durante el tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar, concluyendo que para individuos con baciloscopia de esputo negativo los reactantes de fase aguda son potenciales marcadores en tuberculosis pulmonar y de la necesidad de tratamiento, que la proteína C reactiva puede también ser un marcador de respuesta al tratamiento. En cuanto a las citocinas estas se encontraban elevadas al momento del diagnóstico y persistieron elevadas durante el tratamiento, solo el IFN- $\gamma$  se normalizó al término del tratamiento.<sup>12</sup>

Figen Deveci y cols en Turquía también estudiaron el comportamiento en suero de los niveles de citocinas (IL-12, IL-4, IL-10, FNT- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ ) en tuberculosis activa e inactiva (posterior al tratamiento) comparado con controles de pacientes sanos, ellos observaron reducción estadísticamente significativa en la IL-10 y FNT- $\alpha$  4 meses posterior a la terapia, así como IFN- $\gamma$  al término del tratamiento, pero sin cambios en IL-12, IL-4 y TGF- $\beta$ , y en comparación con los pacientes sanos solo la IL-10 presentaba una diferencia estadísticamente significativa. Concluyendo que solo mediciones de IL-10 en el suero es útil para evaluar la actividad de la tuberculosis y en el monitoreo clínico del efecto del tratamiento.<sup>17</sup>

Diversos estudios han evaluado los niveles de citocinas en relación con la tuberculosis activa y su comportamiento durante el tratamiento pero no existen aquellos que relacionen el nivel de citocinas y reactantes de fase aguda con el grado de remodelación pulmonar.

## **JUSTIFICACION**

La inmunopatogénesis de la remodelación pulmonar que se asocia a tuberculosis (cavitación y fibrosis) y distorsión de la arquitectura pulmonar, hasta el momento no ha sido explicada satisfactoriamente. Esto es importante ya que la cavitación y la necrosis caseosa lícificada, constituyen los principales mecanismos de transmisión de la enfermedad y adicionalmente la morbilidad asociada a la remodelación pulmonar. Toda investigación que proporcione los conocimientos sobre los mecanismos y vías inmunológicas sobre el desarrollo de la necrosis tisular, puede ofrecer estrategias para interrumpir la transmisión de la enfermedad e incorporar estrategias de inmunoterapia. Estudios previos han demostrado que prácticamente todos los pacientes con tuberculosis pulmonar curada, quedan con diversos grados de remodelación pulmonar lo que ocasiona morbilidad significativa. Se sabe que la remodelación pulmonar forma parte de la respuesta inmune del hospedero por la presencia de la micobacteria en el parénquima pulmonar, sin embargo, la participación exacta de los componentes individuales de la misma hasta ahora es desconocida, y aunque la respuesta es protectora, también produce daño.

Con este trabajo se contribuirá a un mejor entendimiento de la fisiopatogenia de la tuberculosis y la remodelación pulmonar, determinando el papel que juegan los diferentes biomarcadores en la remodelación pulmonar de pacientes con tuberculosis pulmonar al momento de su diagnóstico.

## **OBJETIVO**

Evaluar la relación entre los niveles de expresión de biomarcadores inmunológicos y el grado de remodelación pulmonar en pacientes con tuberculosis pulmonar comprobada bacteriológicamente al momento de su diagnóstico

## **HIPÓTESIS**

De acuerdo al biomarcador, nosotros esperamos identificar una asociación entre los niveles de expresión de los biomarcadores inmunológicos y el grado de remodelación pulmonar que afecta a pacientes con tuberculosis pulmonar comprobada bacteriológicamente al momento de su diagnóstico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El universo de estudio fueron pacientes con tuberculosis pulmonar activa recién diagnosticada los cuales cuentan con baciloscopia y cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

Los casos se seleccionaron de la clínica de tuberculosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias ( INER), pacientes captados en la consulta externa, así como hospitalizados. El muestreo fue no probabilístico, por conveniencia, los pacientes ingresarán al estudio en forma consecutiva.

Se seleccionaron a los pacientes que vivían en la Ciudad de México y el Estado de México. Se les invitó a participar en el protocolo de estudio, informando detalladamente el objetivo del estudio, las características del mismo y en que consistía su participación. Al entrevistarlos se les dió a conocer el consentimiento informado, para la participación en el estudio.

### **CRITERIOS DE INCLUSION:**

- Pacientes con tuberculosis pulmonar comprobada bacteriológicamente mediante baciloscopia y/o cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis*.
- De reciente diagnóstico (no más de una semana de haber iniciado el tratamiento)
- Que acepten participar y firmen la hoja de consentimiento informado
- 18 años de edad en adelante.

### **CRITERIOS DE EXCLUSION:**

- Pacientes con antecedentes de tabaquismo mayor o igual a 10 paquetes/año
- Cualquier comorbilidad asociada que ocasiona daño estructural pulmonar previo o limitación funcional como: neumopatía intersticial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma.
- Tuberculosis por *Mycobacterias* no tuberculosas
- Cualquier tipo de tuberculosis extrapulmonar
- Coinfección con VIH.

## VARIABLES DE ESTUDIO:

- ❖ **Variables sociodemográficas**
- ❖ **Comorbilidad asociada**
- ❖ **Tiempo de evolución del padecimiento**
- ❖ **Sintomas respiratorios**
- ❖ **Biomarcadores inmunológicos:**
  - Llamamos biomarcadores a citocinas e índices de inflamación medidos por el laboratorio, para el primer caso se midieron la expresión de IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 en células de sangre periférica mediante el siguiente procedimiento.
  - **Obtención de células mononucleadas.** A partir de 20 ml de sangre venosa, las células mononucleadas fueron separadas mediante una centrifugación a 1,700 rpm en un gradiente de Ficoll-hypaque (1.077 de densidad) durante 30 minutos a 8°C. Posteriormente se colectaron las células de la interface, se lavaron en solución amortiguadora salino fosfato (PBS), se centrifugaron a 1,100 rpm durante 10 minutos, se decantó sobrenadante, se realizó un segundo lavado en las mismas condiciones. Finalmente las células mononucleadas se cuantificaron en un hemocitómetro y la viabilidad celular fué valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripano.
  - **Moléculas intracelulares.** Para la determinación de citocinas intracelulares en linfocitos T CD4+, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD3 para demostrar que la población es linfocitos T CD4+ además de los anticuerpos para citocinas intracelulares anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF-  $\alpha$ , anti-IL10 y anti-IL12 así como sus respectivos controles de isotipo. Una vez aisladas las células mononucleadas se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino donde se realizó la determinación de citocinas intracelulares, cabe mencionar que se realizaron determinaciones

basales (sin estímulo) y otras con estímulo de acetato miristato de forbol mas ionomicina (PMA-IO) en presencia de brefeldin-A durante 4 horas a 37 °C en un ambiente de CO<sub>2</sub>. Una vez que se obtuvieron las células (con o sin estímulo) se fijaron en *p*-formaldehído al 4%, posteriormente se permeabilizaron con una solución de saponina (0.1% saponina, 0.01% IgG de cerdo, 10 mM HEPES, 10% BSA en PBS) dejándose en agitación continua durante 10 min. Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpos monoclonales contra las moléculas previamente mencionadas. Después de la incubación, las células se lavaron con saponina al 0.1% en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo.

- **Antígeno de la micobacteria.** El antígeno que se usó en este proyecto fue obtenido del sobrenadante de 28 días de cultivo de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Se cuantifico el contenido proteico y se hizo un análisis electroforético en geles de poliacrilamida siguiendo el método de Laemmli.
- **Citometría de flujo.** Se hizo un lavado inicial con PBA, posteriormente las células se resuspendieron en la solución salina para el citómetro (FACS). Las células se analizaron en un citómetro Becton & Dickinson con software Cell Quest. Luego de obtener 10,000 células se diseño una gráfica de tamaño contra granularidad, en la cual se limitó la región de linfocitos. Se realizó una triple inmunofluorescencia; de las células positivas a CD4 y CD3 se hizo una segunda región para determinar en esa región el porcentaje de células positivas a la citocina intracelular.

La expresión de cada una de las citocinas previamente descritas se midio en porcentaje de expresión. En el segundo grupo de biomarcadores se midieron índices de inflamación como proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular, deshidrogenasa láctica y albúmina. Las mediciones de estos biomarcadores se realizaron al momento del ingreso del paciente al estudio. Estas se midieron como variables continuas.

Las mediciones de estos biomarcadores se realizaron al momento del ingreso del paciente al estudio.

#### ❖ Evaluación de la Remodelación Pulmonar



- **La remodelación pulmonar** se evaluó mediante la descripción de las lesiones y grado de daño pulmonar parenquimatoso mediante la radiografía frontal de tórax que se realizó al momento del ingreso al estudio.

Para el caso de la radiografía frontal de tórax se realizó tanto la descripción del tipo de alteración radiológica y el grado de daño de lesión pulmonar de la siguiente manera:

A).- Descripción del tipo de alteración radiológica:

Se describió en cada estudio radiológico la presencia o ausencia del tipo de lesiones que se enlista a continuación.

Vidrio deslustrado, opacidades nodulares, opacidades alveolares, líneas septales, opacidades reticulares, cavitaciones y la presencia de alteraciones hiliares, mediastinales y pleurales.

Definiciones:

Vidrio deslustrado: Opacidades con aumento de la atenuación sin la opacificación de los vasos.

Consolidación: opacidades parenquimatosas homogéneas con opacificación de los vasos correspondientes a la zona afectada, y presencia de broncograma aéreo, con bordes irregulares y que tiende a respetar las cisuras.

Opacidades nodulares: Opacidades redondas focales, menores de 3 cm.

Opacidades reticulares: Opacidades lineales tipo red.

Tipo de distribución

La distribución de las lesiones se caracterizará como focal, multifocal o difusa.

Focal: Cuando se trata de un foco único de anormalidad.

Multifocal unilateral: Más de un foco afectado en un pulmón.

Multifocal bilateral: Más de un foco afectado en ambos pulmones.

Periférico

Central

Basal

Mixto

Zona de pulmón afectada:

Zona definida como una tercera parte de la extensión cráneo-caudal del pulmón.

B).- Calificación del daño anatómico pulmonar en una escala de daño cuantitativa en base a la radiografía frontal de tórax.

Un radiólogo y un neumólogo calificaron el grado de lesión pulmonar mediante la evaluación de la radiografía frontal de tórax de la siguiente manera:

A nivel del hilio pulmonar se trazó una línea horizontal que dividió cada pulmón en dos mitades quedando cuatro cuadrantes. A cada cuadrante y de acuerdo al daño del parénquima pulmonar, se le asignó una calificación del 0 al 5 de acuerdo a la intensidad de la alteración mencionada, en donde el 0 corresponde a ninguna lesión y el 5 corresponde al daño de todo el cuadrante y cada punto corresponde aproximadamente al 20% del daño pulmonar parenquimatoso. La calificación final se asignó sumando el puntaje de los cuatro cuadrantes de acuerdo a la intensidad que califique el investigador. La máxima calificación en una radiografía fue de 20 puntos, 10 puntos para cada hemitórax.

Un neumólogo y un radiólogo cegados a los resultados de los biomarcadores y a los datos clínicos de los pacientes, graduaron el daño estructural del parénquima pulmonar en la radiografía de tórax en dos ocasiones distintas con un intervalo entre cada una de dos semanas a un mes. Se midió la concordancia intraobservador e interobservador de las mediciones. Esta escala ya ha sido validada previamente y utilizada en otros estudios, con una concordancia intraobservador de 0.81 ( $p = 0.001$ ), medida mediante el coeficiente de correlación intraclass. <sup>4,5.</sup>

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis se utilizó el paquete estadístico STATA versión 10. Los valores se expresaron como mediana ( intervalo intercuartil) para variables continuas, y como frecuencias y porcentajes para variables categóricas.

La asociación entre los niveles de expresión de los biomarcadores y el grado de remodelación pulmonar, se realizó mediante análisis de correlación de Spearman.

Se estableció la significancia estadística con un valor  $p < 0.05$  con intervalo de confianza al 95%.

Se formaron dos grupos de acuerdo al grado de remodelación pulmonar, tomando como punto de corte la puntuación mínima hasta un valor de 7 para el grupo con moderada remodelación pulmonar y un segundo grupo con alto grado de remodelación pulmonar en los pacientes con una puntuación mayor de 7. Se hicieron comparaciones entre ambos grupos para cada uno de los biomarcadores estudiados. Estas comparaciones se evaluaron mediante estadística no paramétrica con la prueba de U de Mann-Whitney.

## **ASPECTOS ÉTICOS Y CONFIDENCIALIDAD**

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado que contiene la información precisa explicando los objetivos del estudio, beneficios al paciente, y sus derechos, todo de acuerdo a la ley General de Salud en materia de investigación.

Este estudio fue aprobado por la Comisión de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con el folio B-29. Todos los resultados fueron manejados para garantizar la protección de los derechos individuales y mantener la confidencialidad siendo utilizados solos por los investigadores de este estudio. Los registros y cuestionarios se colocaron en un lugar seguro, siendo accesibles solo al personal seleccionado. Los archivos computarizados tienen únicamente códigos de identificación, las claves solo son accesibles para los investigadores. Todos los reportes y publicaciones hacen referencia únicamente a datos agrupados.

## **RESULTADOS**

Se estudiaron un total de 62 pacientes sin embargo no fué posible realizar la determinación de biomarcadores en la totalidad de ellos por falta de reactivos.

De los 62 pacientes estudiados la mediana de edad fue de 47 años con un intervalo intercuartil (IIC) de 30 a 58 años, con leve predominio del sexo femenino que correspondió al 52% (32), y 48%(30) al sexo masculino, 28 (45%) de ellos era mayor de 50 años.

En cuanto a la ocupación 23 (37.10%) pacientes eran prestadores de servicios, 17 (27.42%) eran ama de casa, 5 (8.06%) se encontraban desempleados, 4 (6.45%) eran campesinos, 4 (6.45%) estudiantes, 4(6.45%) comerciantes, 3(4.84%) profesionistas y 2 (3.23%) jubilados. (Cuadro 1)

La historia de tabaquismo activo solo se presentó en 5 (8.06%) pacientes y 17 (28.33%) tenían historia de tabaquismo inactivo, sin embargo el índice tabáquico era menor de 10 paquetes año, con una mediana (IIC) de 1.55 (0.75–4.05) de acuerdo a los criterios de inclusión. 13 (20.97%) pacientes tenían el antecedente de historia de ingesta de alcohol y solo 4(6.45%) uso de drogas ilegales.

Respecto a las comorbilidades 34 (55.84%) pacientes presentaba al menos una comorbilidad, siendo portadores de diabetes 29 (46.77%), con un tiempo promedio de evolución de 9 años, 6 (9.68%) tenían hipertensión arterial sistémica, con un tiempo promedio de evolución de 8.5 años.

En relación a su estado nutricional y de acuerdo al índice de masa corporal 15 (25.86%) pacientes presentaron desnutrición, 12 (20.69%) sobrepeso, 2(3.45%) obesidad, a los cuales se les pudo evaluar correctamente su peso y talla al ingreso al estudio. (cuadro 2)

La mediana(IIC) del tiempo de evolución en días desde inicio de la enfermedad hasta que el paciente solicitó valoración médica fué de 150 (90-300) días.

Las manifestaciones clínicas que reportaron los pacientes fueron tos en 59 (95.16%), la cual se presentó con expectoración en 55 (88.71%), hemoptisis 15(24.19%) y hemoptoicos en 21(33.87%). Otra manifestación cardinal fue la fiebre en el 47(75.81%), pérdida de peso en 49(79.03%), disnea 45 (72.58%), calosfríos 29

(46.77%), ataque al estado general 29(46.77%) y dolor torácico en 21(33.87%). (Cuadro 3)

A la exploración física durante la valoración a su ingreso al estudio la mediana (IIC) de frecuencia cardíaca reportada fue de 86 (80-96) latidos por minuto (lpm), presentando taquicardia mayor de 90 lpm 22 (35.48%) pacientes, y mayor de 110 lpm en 5(8.06%). En cuanto a la taquipnea ( $\geq 20$  rpm) fue reportada en 33(53.23%) pacientes, desaturación por debajo de 90% en 9(14.52%). (Cuadro 4)

Los resultados de la puntuación de remodelación pulmonar en la valoración radiográfica demostraron los siguiente: la mediana (IIC) fue de 9 (6.5 –11.5) puntos.

La mediana (IIC) de leucocitos totales al momento del diagnóstico fue de 8300 (6,400 a 12,400) leucocitos, presentándose leucocitosis mayor de 12,000 en 17(27.42%), leucopenia en 1(1.61%), neutrofilia en 23(37.10%), linfopenia en 11(17.74%) y anemia en 16(25.81%).

La baciloscopia en expectoración fue positiva en 60 pacientes, en los 2 pacientes restantes, se corroboró la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* mediante cultivo positivo de biopsia transbronquial y lavado bronquial por fibrobroncoscopia respectivamente. Presentaron en la baciloscopia una cruz 10(16.13%), dos cruces 15(24.19%), tres cruces 18(29.03%) cuatro cruces 17(27.42%).

En cuanto a los resultados de laboratorio se determinó el nivel de albúmina en 60 pacientes, con una mediana (IIC) del nivel de albúmina de 3.24 (2.68-3.89) mg/dl, con hipoalbuminemia en 34(56.67%) de ellos.

En relación a los biomarcadores iniciando por los reactantes de fase aguda la velocidad de sedimentación globular se determinó en 52 pacientes, con una mediana (IIC) de 26 (18-33), encontrándose elevada ( $>20$ mm) en (34)65.38%, la proteína C reactiva se midió en 54 pacientes con una mediana (IIC) de 5.70 (2.44-12.8) presentándose elevada ( $>0.8$ ) en 54(87.10%) , la DHL se midió en 60 pacientes con una mediana (IIC) de 168 (149-252.5) UI/l y DHL elevada ( $>192$ UI/l) en 21(35%). (Cuadro 5)

La medición de interleucinas se realizó en 20 pacientes. En el cuadro 6 se muestran los valores individuales de la expresión de citocinas en porcentaje para cada uno de los pacientes así como su calificación radiográfica.

El estudio de la relación entre la remodelación pulmonar medido por radiografía de tórax y los diferentes biomarcadores de inflamación e inmunológicos demostró lo siguiente:

Para la proteína C reactiva se documentó un coeficiente de correlación de 0.614, valor de  $p=0.0000$  (Figura 1); velocidad de sedimentación globular coeficiente -0.1368, valor de  $p=0.3384$  (Figura 2); albúmina coeficiente -0.5480, valor de  $p=0.0000$  (Figura 3); deshidrogenasa láctica coeficiente 0.1386, valor de  $p=0.2993$ ; leucocitos totales coeficiente 0.3005, valor de  $p=0.0231$  (Figura 4), neutrófilos totales coeficiente 0.3770, valor de  $p=0.0030$  (Figura 5); neutrófilos en porcentaje 0.4858, valor de  $p=0.0001$  (Figura 6); linfocitos totales coeficiente -0.1088, valor de  $p=0.4081$ , linfocitos en porcentaje -0.4436, valor de  $p=0.0004$  (Figura 7); monocitos totales coeficiente 0.1685, valor de  $p=0.1982$ ; monocitos en porcentaje coeficiente -0.2036, valor de  $p=0.1187$ , baciloscopia número de cruces coeficiente 0.3237, valor de  $p=0.0109$  (Figura 8). Se determinó la correlación entre el daño radiográfico y la diferentes citocinas sin embargo no se presentó en ningún caso correlación significativa, no obstante en el cuadro 7 se muestran los resultados individuales para cada caso.

Se formaron dos grupos de acuerdo al grado de remodelación pulmonar, tomando como punto de corte la puntuación mínima hasta un valor de 7 para el grupo con moderada remodelación pulmonar y un segundo grupo con alto grado de remodelación pulmonar en los pacientes con una puntuación mayor de 7. En cuanto a la proteína C reactiva presentaron aquellos con moderada puntuación en remodelación una mediana (IIC) de 2.56 (1-4.46) y comparado con el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 9.1 (4.23-14.8), valor de  $p=0.0001$ ; para velocidad de sedimentación globular presentaron aquellos con moderada puntuación una mediana (IIC) de 24 (16-32), y en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 26 (20-34) valor de  $p=0.3610$ ; para albúmina en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 3.76 (2.26-4.04), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 2.86 (2.52-3.53) valor de  $p=0.0004$ ; para deshidrogenasa láctica en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 163 (142-291), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 177 (155-248) valor de  $p=0.3737$ ; para leucocitos totales en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 7500, en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 9400 (7000-12700) valor de  $p=0.0095$ ; para neutrófilos totales en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 5250 (3450-5900), en el grupo de alta

puntuación una mediana (IIC) de 7050 (4600-10400) valor de  $p=0.0050$ ; para linfocitos totales en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 1650 (1250-1850), en el grupo de alta puntuación una mediana ( IIC) de 1450 (1000-2200) valor de  $p=0.6747$ , en el porcentaje de linfocitos en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 20.3 (18.1-25.3), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 16.05 (11.2-20.6), valor de  $p=0.0036$ ; para monocitos totales en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 700 (500-900), para el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 700(500-900) valor de  $p=0.0318$ ; para el número de cruces de baciloscopia, en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 2(1-3), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 3(2-4) valor de  $p=0.0124$ ; para CD69/CD3 en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 2.35(0.63-31.9), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 5.5 (0.79-36.3) valor de  $p=0.8494$ ; para CD25/CD3 en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 0.4 (0.22-4.09), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 1.28(0.18-2.19) valor de  $p=0.9394$ ; para IL-10/CD3 en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 3.10 (0.74-20.18), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 6.99 (2.18-16.30) valor de  $p=0.7903$ ; para IL-12/CD3 en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 3.14(0.61-9.57), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 2.86 (2.08-6.36) valor de  $p=0.9697$ ; para TNF/CD3 en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 3.13 (0.62-13.86), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 3.08 (0.26-4.48) valor de  $p=0.5688$ ; para IFN/CD3 en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 4.7 (2.21-13.15), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 4.66 (1.09-16.45) valor de  $p=0.7903$ ; para IL-12/CD8 en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 5.71 (2.32-11) en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 4.98 (2.43-7.06) valor de  $p=0.7108$ ; para IFN/CD8 en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 8.39 (3.01-16.6), en el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 6.97 (3.55-12.9) valor de  $p=0.7897$ , para el tiempo de enfermedad en días en el grupo de moderada puntuación una mediana (IIC) de 120(60-240), para el grupo de alta puntuación una mediana (IIC) de 150 (90-365) valor de  $p=0.2327$ . (cuadro 8)



## DISCUSIÓN

El propósito de nuestro trabajo fué estudiar el comportamiento de los biomarcadores inmunológicos (tanto citocinas como reactantes de fase aguda) y su relacion con el grado de remodelación medida por radiografía de tórax. De acuerdo a nuestra hipótesis, nosotros identificamos diversos grados de asociación en pacientes con tuberculosis pulmonar comprobada bacteriológicamente al momento de su diagnóstico.

En cuanto a la correlación de la proteína C reactiva (PCR) con el grado de remodelación nosotros encontramos una buena correlacion positiva de 0.614 con una ( $p=0.000$ ) significativa, lo que nos indica que a mayor nivel de proteína C reactiva existe mayor grado de remodelación pulmonar. Esta proteína ha sido estudiada previamente en pacientes con tuberculosis pulmonar encontrando que puede ser útil en diferenciar enfermedad tuberculosa de la no tuberculosa <sup>18</sup>, tambien se ha evaluado su correlacion con la carga bacilar para ser utilizado como marcador de extension o severidad de la enfermedad <sup>19</sup>, sin embargo algunos estudios limitan su uso. <sup>20,21</sup> En todos los estudios sus niveles sericos se reportan por arriba del limite considerado como normal <sup>12,17,22</sup> al momento del diagnóstico lo que concuerda con nuestro estudio en donde se demostro elevación en el 87% de los casos.

La velocidad de sedimentación globular (VSG) presentó una correlación negativa de 0.1368 no significativa ( $p=0.3384$ ), concluyendo que no existe nunguna correlación entre el nivel de este biomarcador y la remodelación pulmonar medida por radiografía, no siendo un parametro que nos ayude a identificar el daño que presenta nuestro paciente, sin embargo se encontró elevada en el 65% de los casos.

La correlacion de estos reactantes de fase aguda ( PCR y VSG) de acuerdo al grado de remodelación no han sido evaluados en estudios previos, los datos encontrados confirman que la proteína C reactiva podría ser un marcador útil para identificar a paciente con tuberculosis y en especial a aquellos pacientes con mayor grado de remodelación.

La DHL sérica es un marcador de daño celular, relacionado con la inflamación y fibrosis, los cuales juegan un papel muy importante dentro de la fisiopatología de pacientes con tuberculosis, esperando por lo tanto que la DHL se encuentre elevada en estos pacientes y que exista una relación con el daño pulmonar (grado de

remodelación), sin embargo no hay estudios previos que hayan tratado de correlacionar el nivel de DHL con el grado de remodelación en tuberculosis, en este estudio la correlación de DHL y el grado de remodelación fue positiva de 0.1386 pero sin significancia estadística ( $p=0.2993$ ), por lo que la DHL tampoco es un marcador que nos oriente hacia el grado de remodelación pulmonar que presente el paciente, incluso solo se encontró elevada en 21/60 (35%), tal vez es necesario extender su determinación en muestras de lavado bronquioloalveolar así como de su isoenzima LDH3 la cual se ha encontrado que refleja el daño pulmonar agudo causado por el daño y muerte celular.<sup>23</sup>

Otro biomarcador relacionado con la actividad de ciertas citocinas y la inducción de proteínas de fase aguda, es la albúmina cuyos niveles se han reportado que disminuyen en pacientes con tuberculosis, como lo reportado por Kuppumuthu Ramakrishnan y cols en la India (2008) donde compararon el nivel de albúmina y zinc en pacientes con tuberculosis portadores de VIH, no VIH y controles sanos, observando una correlación positiva entre el IMC y el nivel de albúmina y zinc, y encontrando los niveles más bajos en pacientes con tuberculosis pulmonar con coinfección con VIH y sin esta, concluyendo como posibles causas de su disminución factores nutricionales, enteropatía y por la síntesis hepática de proteínas de fase aguda como IL-6 y FNT- $\alpha$ , los cuales inhiben la producción de albúmina sérica a nivel hepático causando disminución de su concentración en plasma.<sup>13</sup> En nuestro estudio encontramos hipoalbuminemia en 34/60(56.67%), con una mediana (IIC) de albúmina de 3.24(2.68-3.89), solo 13/60(21.66%) presentaba desnutrición (IMC) e hipoalbuminemia, por lo que consideramos que la disminución en el nivel de albúmina igual que en el estudio mencionado es secundario a la producción de reactantes de fase aguda por el hígado.

La albúmina presentó una correlación negativa de -0.5480 con una ( $p=0.0000$ ) significativa, lo que significa que a menor nivel de albúmina se observó un mayor grado de remodelación explicado posiblemente por una mayor expresión de citocinas y producción de reactantes de fase aguda.

Se reportaron también los cambios en la Biometría hemática que se relacionan con la presencia de inflamación, la leucocitosis solo se presentó en 17(27.42%) de los casos, al realizar la correlación de leucocitos totales con el grado de remodelación se encontró una correlación positiva de 0.3005 con una ( $p=0.0231$ ) significativa, lo que

nos indica que el nivel de leucocitos se relaciona con el grado de remodelación pulmonar, encontrándose elevados en aquellos pacientes con mayor grado de remodelación, los neutrófilos totales presentan un nivel de correlación similar, con una correlación positiva de 0.3770 aunque modesta pero ( $p=0.0030$ ) significativa. A diferencia del porcentaje de linfocitos que presenta una correlación negativa -0.4436 con una ( $p=0.0004$ ) significativa, todos estos resultados desde el punto de vista de plausibilidad biológica son muy congruentes con el grado de remodelación pulmonar que está ocurriendo dada la presencia de la infección activa, pues esto indica la actividad de estas células ante esta situación. Se ha descrito previamente que los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son fundamentales en los mecanismos de defensa de primera línea en contra de bacterias y hongos patógenos. En el caso de tuberculosis, el influjo de PMN hacia el pulmón es uno de los eventos en la patogénesis de la enfermedad. Los productos bacterianos generan la expresión de moléculas de adhesión y liberación de citocinas proinflamatorias, contribuyendo con ello al reclutamiento de leucocitos en el sitio de la infección ampliando la respuesta inmune.<sup>24</sup>

El tiempo entre el inicio de los síntomas y el momento del diagnóstico es otra variable que se estudio para evaluar su posible participación en la remodelación pulmonar y observamos que los pacientes que tienen mayor puntuación de remodelación pulmonar presentaron a su vez un mayor tiempo de evolución comparado con los que se clasificaron como remodelación pulmonar moderada (150 días vs 120 días) respectivamente, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Se determinaron las citocinas en 20 pacientes, así como la cuantificación del daño radiológico, en ninguno de los casos se encontró una correlación significativa, sin embargo el porcentaje de expresión de IL10 tiende a elevarse en relación a mayor grado de daño radiológico, recordemos que es una potente citocina inmunomoduladora que ha mostrado afectar múltiples tipos celulares incluyendo macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T CD4, CD8. Su función principal es desactivar a los macrófagos, resultando en disminución de la producción de citocinas Th1, de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno y presentación antigénica limitada la cual tiene consecuencia tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. En pacientes con TB activa puede ser un importante bio marcador de progresión de la enfermedad y presencia de daño a nivel pulmonar.<sup>25</sup>

Se sabe que el IFN- $\gamma$  juega un papel en la inmunomodulación durante la inflamación crónica. Aunque inicialmente su actividad es pro-inflamatoria, también actúa inhibiendo la inflamación. Además el papel de IFN- $\gamma$  en la activación de la actividad antibacteriana de los macrófagos, también tiene una función esencial para la limitación de la inflamación pulmonar independiente de su actividad antibacteriana. Un estudio en ratones demostró que en ausencia de la vía de señalización de IFN- $\gamma$  se acumulan más neutrófilos en los pulmonares de ratones infectados por MTB y por el contrario, la señalización de IFN- $\gamma$  directamente inhibe la acumulación de neutrófilos en los pulmones.<sup>26</sup> Estos resultados en estudios en animales son congruentes con nuestros resultados, debido a que demostramos que tanto el número total de neutrófilos circulantes como el porcentaje de ellos con respecto a los leucocitos totales, están significativamente elevados en el grupo de pacientes con alto grado de remodelación pulmonar. Así mismo, los niveles de interferón-gamma estuvieron disminuidos en el grupo de alto grado de remodelación pulmonar, aunque las diferencias no fueron significativas, esto muy probablemente debido al limitado tamaño de muestra en el que se realizaron las mediciones para las citocinas. (Cuadro 8.) Es posible que si la inmunidad celular falla por cualquier razón, o la respuesta del IFN- $\gamma$  es reducida, se incrementa el reclutamiento de neutrófilos en los pulmones y produce la inmunopatología, caracterizada por la pérdida del control bacteriano y un mal desenlace de la infección.

Por otra parte se planteó la posibilidad de que la carga de la población bacilar en cada paciente medida mediante el número de cruces de la baciloscopia, pudiera estar asociada con el grado de remodelación, y efectivamente así fue, se demostró una correlación modesta pero estadísticamente significativa entre el número de cruces de la baciloscopia en expectoración y el grado de remodelación pulmonar ( $r=0.3237$   $p=0.0109$ ). (Figura 8)

Dentro de las limitaciones de este estudio se encuentran el poco número de sujetos a los cuales se les midió la expresión de citocinas, sin embargo se tiene que seguir investigando para poder entender completamente los mecanismos que llevan a un mayor daño pulmonar en los pacientes con tuberculosis y por que algunos llegan a presentar remodelación y fibrosis con el consiguiente aumento en la morbilidad y otros no.

## **CONCLUSIONES**

De los biomarcadores estudiados la proteína C reactiva, albúmina, cambios en la biometría hemática (leucocitos, neutrófilos, linfocitos) se asociaron significativamente a la remodelación pulmonar. De las citocinas estudiadas en ninguna se demostró correlación significativa, no obstante la IL10 e IFN- $\gamma$  mostraron una tendencia con la remodelación pulmonar. Dichos biomarcadores pueden ser útiles para identificar a los pacientes con mayor grado de remodelación pulmonar y que serán candidatos para seguimiento por la posibilidad de presentar morbilidades secundarias.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. [www.who.int/tb/publications/global\\_report/es/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/index.html)
2. Plataforma Única de Información/SUIVE./Secretaría de Salud.
3. Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GA. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2005; 192:1201-9.
4. Yesenia del Carmen López Arteaga. . Tesis de Subespecialidad en Neumología: "Relación entre la función pulmonar, grado de disnea y de alteración radiológica, en pacientes con tuberculosis pulmonar curada". Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Noviembre de 2008.
5. Alma Rosa Bizarrón Muro. . Tesis de Subespecialidad en Neumología: "Evaluación de la función respiratoria en pacientes con tuberculosis pulmonar curada". Noviembre 2006.
6. Caughey GH. Chairman's summary: mechanisms of airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164:S26-7.
7. Pérez RL, Rivera-Marrero CA, Roman J. Pulmonary granulomatous inflammation: From sarcoidosis to tuberculosis. *Semin Respir Infect*. 2003; 18:23-32.
8. Rivas-Santiago Bruno; Vieyra-Reyes, Patricia; Araujo, Zaida. Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar: Revisión. *Invest. clín*, Maracaibo, v. 46, n. 4, dic. 2005 .
9. Herrera Barrios-Maria Teresa. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex Vol* 18, n.4, oct-dic 2005;327-336.
10. Timo Ulrichs and Stefan HE Kaufmann. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 2006; 208: 261-269.
11. Mohan VP, Scanga CA, Yu K. et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun*. 2001; 69: 1847-55.
12. Peresi Eliana. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2008;34(11):942-949.
13. Kuppmuthu Ramakrishnan. Serum Zinc and Albumin levels in Pulmonary Tuberculosis in patients with y without HIV. *Jpn. J. Infect. Dis* 2008;61, 202-204

14. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003;111(12):1805-12.
15. Santos VM, Cunha SF, Cunha DF. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Rev Assoc Med Brasil.* 2000;46(3):232-6.
16. Hurtado Torres G, Zarazúa Juárez M. Hallazgos en la biometría hemática de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar activa. *Med Int Mex* 2009;25(2): 101-4.
17. Fingen Deveci, H. Handan Akbulut. Changes in serum cytokine levels in active tuberculosis with treatment. *Mediators of inflammation.* 2005;5 ;256-262.
18. Choi CM, Kang CI, Jeung WK, et al. Role of C-reactive protein for the diagnosis of tuberculosis among military personnel in South Korea. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11(2):233-236.
19. Sukhesh Rao, MC and Vidya Bernhardt. Serum C-reactive protein in pulmonary tuberculosis. *Infect Dis Clin Pract* 2009;17:314-316.
20. Kuniyiko Ito, Takashi Y, Masako W. C-reactive protein in patients with bacteriological positive lung tuberculosis. *Kekkaku.*2004;79(4):309-311.
21. Kannapiran M, Immanuel C, Krishnamoorthy PV, et al. C-reactive protein levels in patients with pulmonary tuberculosis, *Lung India.* 1989;7(1)34-36.
22. Lawn S.D, Obeng J, Acheampong J.W.Griffin G.E. Resolution of the acute-phase response in West African patients receiving treatment for pulmonary tuberculosis *Int J Tuberc Lung Dis.*2000 4(4):340-344.
23. Drent M., Cobben N.A.M, Herderson R.F, Wouters E.F.M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes indicators of lung damage or inflammation, *Eur Respir J,* 1996(9):1736-1742.
24. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 2003;5:1317-1327.
25. Redford PS, Murray PJ and O'Garra . The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal Immunology,* 2011;4 (3):261-270.
26. Nandi B, Behar S. Regulation of neutrophils by interferon-g limits lung inflammation during tuberculosis infection. *JEM* 2011;208:2251-2262.

## ANEXOS

**Cuadro 1. Características generales de los pacientes.**

Variable	N= 62
<b>Edad<sup>a</sup></b>	47 (30-58)
<b>Hombre</b>	30 (48)
<b>Mujer</b>	32 (52%)
<b>Mayor de 50 años</b>	28 (45%)
<b>Lugar de residencia</b>	
<b>D.F.</b>	26 (42%)
<b>Estado de México</b>	26 (42%)
<b>Otros</b>	10 (16%)
<b>Ocupación</b>	
<b>Campesino</b>	4(6.45%)
<b>Desempleado</b>	5(8.06%)
<b>Comerciante</b>	4(6.45%)
<b>Hogar</b>	17 (27.42%)
<b>Prestador de servicio</b>	23 (37.10%)
<b>Estudiante</b>	4(6.45%)
<b>Profesionista</b>	3 (4.84%)
<b>Jubilados</b>	2 (3.23%)

<sup>a</sup> Mediana (intervalo intercuartil 25-75)

**Cuadro 2. Antecedentes de exposición y comorbilidades.**

Variable	N= 62
<b>Tabaquismo</b>	
<b>Activo</b>	5 (8.06%)
<b>Inactivo</b>	17 (28.33%)
<b>Índice tabáquico<sup>a</sup></b>	1.55 (0.75 – 4.05)
<b>Alcoholismo</b>	13 (20.97%)
<b>Exposición humo leña</b>	22 (35.48%)
<b>Índice de exposición<sup>a</sup></b>	54 (26 – 200)
<b>Uso de drogas ilegales</b>	4 (6.45%)
<b>Comorbilidad</b>	34 (55.84%)
<b>Diabetes</b>	29 (46.77%)
<b>Tiempo de la diabetes (años)</b>	9 (5 – 17)
<b>Hipertensión arterial sistémica</b>	6 (9.68%)
<b>Tiempo en años<sup>a</sup></b>	8.5 (3 – 12)
<b>Desnutrición</b>	15/58 (25.86%)
<b>Sobrepeso</b>	12/58 (20.69%)
<b>Obesidad</b>	2/58 (3.45%)

<sup>a</sup> Mediana (intervalo intercuartil 25-75)



**Cuadro 3. Características de las manifestaciones clínicas**

<b>Variable</b>	<b>N=62</b>
<b>Tiempo del padecimiento (días)<sup>a</sup></b>	150 (90-300)
<b>Fiebre</b>	47 (75.81%)
<b>Calosfríos</b>	29(46.77%)
<b>Tos</b>	59 (95.16%)
<b>Expectoración</b>	55 (88.71%)
<b>Disnea</b>	45 (72.58%)
<b>Dolor torácico</b>	21 (33.87%)
<b>Hemoptisis</b>	15 (24.19%)
<b>Hemoptoicos</b>	21 (33.87%)
<b>Hemoptisis o hemoptoicos</b>	36 (58.06%)
<b>Pérdida de peso</b>	49 (79.03%)
<b>Ataque al estado general</b>	29 (46.77%)

<sup>a</sup> Mediana (intervalo intercuartil 25-75)

**Cuadro 4. Características de la exploración física.**

<b>Variable</b>	<b>N=62</b>
<b>Frecuencia cardiaca<sup>a</sup></b>	86 (80-96)
<b>Frecuencia respiratoria<sup>a</sup></b>	21 (20-24)
<b>Taquicardia (&gt; 90 lpm)</b>	22 (35.48%)
<b>Taquicardia (<math>\geq</math> 110 lpm)</b>	5 (8.06%)
<b>Taquipnea (<math>\geq</math> 20 rpm)</b>	33 (53.23%)
<b>Desaturación de oxígeno</b>	9 (14.52%)
<b>Puntuación de la remodelación pulmonar<sup>a</sup></b>	9 (6.5 -11.5)

<sup>a</sup> Mediana (intervalo intercuartil 25-75)

**Cuadro 5. Características de laboratorio, baciloscopia y biomarcadores de inflamación e inmunológicos.**

Variable	N=62
<b>Leucocitos totales<sup>a</sup></b>	8300 (6400-12400)
<b>Leucocitosis (Mayor de 12,000)</b>	17 (27.42%)
<b>Leucopenia</b>	1 (1.61%)
<b>Neutrofilia</b>	23 (37.10%)
<b>Linfopenia</b>	11 (17.74%)
<b>Anemia</b>	16 (25.81%)
<b>Número de cruces de baciloscopia</b>	
	<b>0</b> 2 (3.23%)
	<b>1</b> 10 (16.13%)
	<b>2</b> 15 (24.19%)
	<b>3</b> 18 (29.03%)
	<b>4</b> 17 (27.42%)
<b>Albúmina<sup>a</sup></b>	3.24 (2.68 -3.89)
<b>Hipoalbuminemia</b>	34/60 (56.67%)
<b>VSG<sup>a</sup> (n= 52)</b>	26 (18 - 33)
<b>VSG elevada (&gt; 20 mm ) n (%)</b>	34/52 (65.38%)
<b>Proteína C Reactiva<sup>a</sup></b>	5.70 (2.44-12.8)
<b>Proteína C Reactiva elevada (&gt;0.8) n (%)</b>	54 (87.10%)
<b>DHL<sup>a</sup> (n= 60)</b>	168 (149-252.5)
<b>DHL elevada</b>	21/60 (35%)

<sup>a</sup> Mediana (intervalo intercuartil 25-75)

**Cuadro 6. Relacion de la expresion de la citocinas (%) en pacientes con tuberculosis pulmonar activa y el daño pulmonar evaluado por radiografía.**

PACIENTE	CD69/ CD3	CD25/ CD3	IL10/ CD3	IL12/ CD3	TNF- $\alpha$ / CD3	INF- $\gamma$ / CD3	IL12/ CD8	INF- $\gamma$ / CD8	DAÑO RX
1	2.35	0.16	3.095	6.23	4.425	12.795	11	16.6	6
2	3.83	1.28	16.3	2.6	4.44	1.085	7.06	2.61	13
3	44.7	2.19	2.175	6.36	2.255	19.22	7.24	12.9	9
4	0.2	0.1	8.42	2.855	2.68	4.145	1.86	1.98	12
5	38.5	19.9	20.18	9.565	24.137	50.65	5.71	8.93	7
6	37.1	0.23	0.35	0.043	0.043	0.21	-	-	9
7	31.9	4.09	3.995	0.885	3.13	4.635	2.32	4.32	6
8	0.29	0.4	0.72	3.14	0.62	2.21	-	-	5.5
9	5.5	0	0.052	17.595	0.0245	0.5075	-	3.55	8
10	36.3	3.31	6.195	31.25	4.475	31.7	5.11	13.8	8
11	1.4	1.06	0.335	0.1385	0.1385	0.08	2.62	1.12	7
12	17.8	8.08	6.985	2.075	0.255	11.295	1.86	6.15	8
13	4.44	1.57	20.1	3.69	9.835	10.005	4.98	4.3	12.5
14	51.2	0	1.245	0.405	0.604	4.7	-	16.6	6
15	9.53	0.72	18.895	5.215	6.815	16.45	17.5	32.2	10
16	0.37	0.18	5.37	2.395	3.075	4.66	4.5	10.8	12
17	0.79	1.38	7.795	0.695	4.295	1.845	2.43	7.78	11
18	24.5	17.6	22.6	21.35	13.855	13.2	14.1	27.6	6
19	0.21	0.31	0.735	0.61	0.675	1.18	1.24	1.7	2
20	0.63	0.22	28.3	45.75	51.2	13.15	8.37	7.84	7

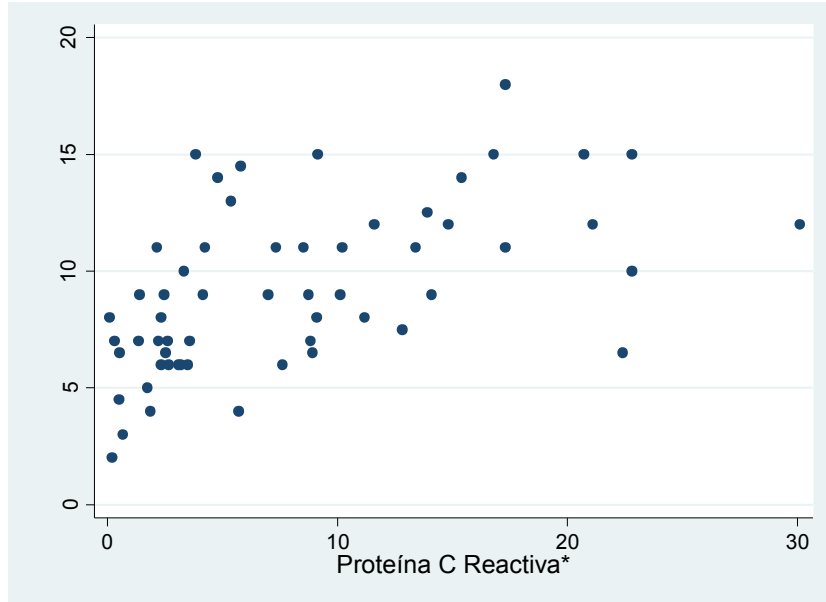
**Cuadro 7. Correlación entre el grado de remodelación medido por la radiografía de tórax y los diferentes biomarcadores de inflamación**

<b>Biomarcador</b>	<b>Correlación (Spearman's rho)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Proteína C Reactiva</b>	0.6147	0.0000
<b>Velocidad de sedimentación globular</b>	- 0.1368	0.3384
<b>Albúmina</b>	- 0.5480	0.0000
<b>Deshidrogenasa láctica</b>	0.1386	0.2993
<b>Leucocitos totales</b>	0.3005	0.0231
<b>Neutrófilos totales</b>	0.3770	0.0030
<b>Neutrófilos (%)</b>	0.4858	0.0001
<b>Linfocitos totales</b>	- 0.1088	0.4081
<b>Linfocitos (%)</b>	- 0.4436	0.0004
<b>Monocitos totales</b>	0.1685	0.1982
<b>Monocitos (%)</b>	- 0.2036	0.1187
<b>Número de cruces de baciloscopia</b>	0.3237	0.0109

**Cuadro 8. Niveles de los diferentes biomarcadores con respecto al grado de remodelación pulmonar (moderado vs alto).**

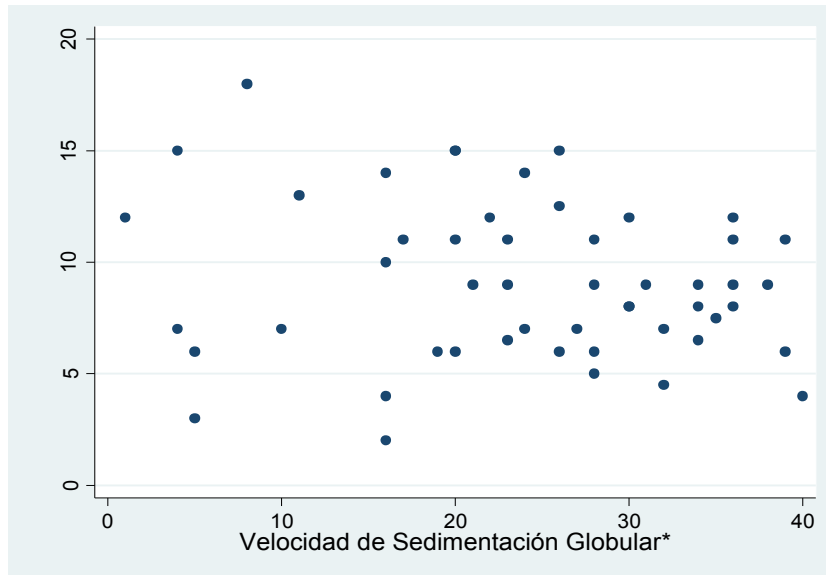
<b>Biomarcador inmunológico</b>	<b>Moderada puntuación de remodelación pulmonar (<math>\leq 7</math> puntos) n = 24 (39%)</b>	<b>Alta puntuación de remodelación pulmonar (<math>&gt;7</math> puntos) n = 38 (61%)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Proteína C Reactiva</b>	2.56 (1.00 – 4.46)	9.1 (4.23 – 14.8)	0.0001
<b>Velocidad de sedimentación globular</b>	24 (16-32)	26 (20-34)	0.3610
<b>Albúmina</b>	3.76(2.26 -4.04)	2.86(2.52 -3.53)	0.0004
<b>Deshidrogenasa láctica</b>	163 (142-291)	177 (155-248)	0.3737
<b>Leucocitos totales</b>	7500 (5000-8400)	9400 (7000-12700)	0.0095
<b>Neutrófilos totales</b>	5250 (3450-5900)	7050 (4600-10400)	0.0050
<b>Neutrófilos (%)</b>	69.1 (60.6-73.85)	76.35 (69.4-79.2)	0.0052
<b>Linfocitos totales</b>	1650 (1250-1850)	1450 (1000-2200)	0.6747
<b>Linfocitos (%)</b>	20.3 (18.1-25.3)	16.05 (11.2-20.6)	0.0036
<b>Monocitos totales</b>	550 (400-700)	700 (500-900)	0.0318
<b>Monocitos (%)</b>	7.25 (6.3-8.55)	7.05 (5.5-8.8)	0.7725
<b>Número de cruces de baciloscopia</b>	2 (1-3)	3 (2-4)	0.0124
<b>CD 69/CD3</b>	2.35 (0.63-31.9)	5.5 (0.79-36.3)	0.8494
<b>CD25/CD3</b>	0.4 (0.22-4.09)	1.28 (0.18-2.19)	0.9394
<b>IL10/CD3</b>	3.10 (0.74-20.18)	6.99 (2.18-16.30)	0.7903
<b>IL12/CD3</b>	3.14 (0.61-9.57)	2.86 (2.08-6.36)	0.9697
<b>TNF-<math>\alpha</math>/CD3</b>	3.13 (0.62-13.86)	3.08 (0.26-4.48)	0.5688
<b>IFN-<math>\gamma</math>/CD3</b>	4.7 (2.21-13.15)	4.66 (1.09-16.45)	0.7903
<b>IL12/CD8</b>	5.71 (2.32-11)	4.98 (2.43-7.06)	0.7108
<b>IFN-<math>\gamma</math>/CD8</b>	8.39 (3.01-16.6)	6.97 (3.55-12.9)	0.7897
<b>Tiempo enfermedad en en días</b>	120 (60-240)	150 (90-365)	0.2327

\*Estas mediciones solo se realizaron en 20 sujetos



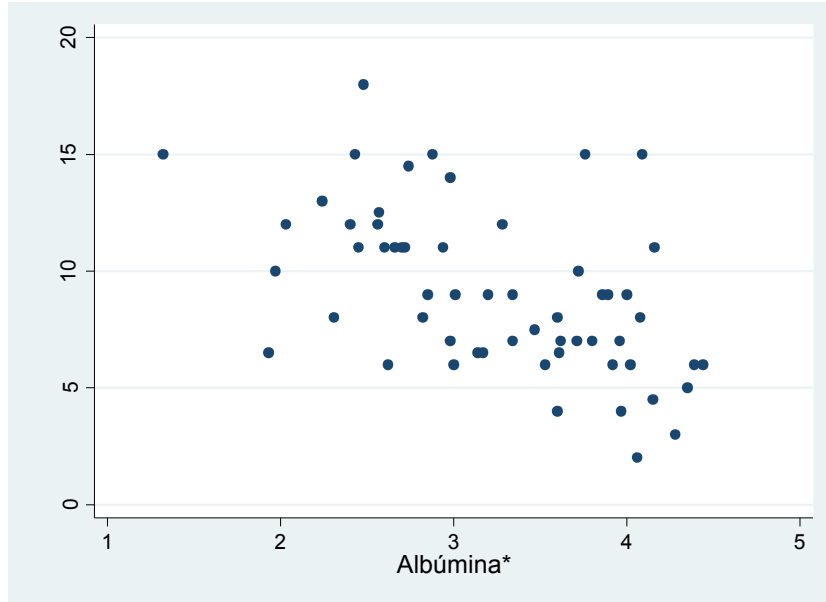
Spearman's rho = 0.6147 p= 0.000

**Figura 1. Correlación entre la puntuación de remodelación pulmonar y niveles de Proteína C Reactiva**



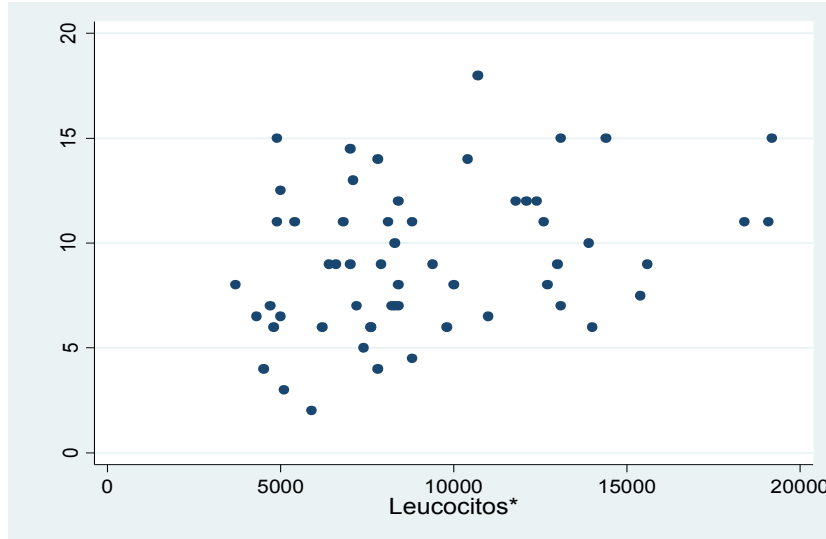
Spearman's rho = -0.1368 p= 0.3384

**Figura 2. Correlación entre la puntuación de remodelación pulmonar y niveles de Velocidad de sedimentación globular.**



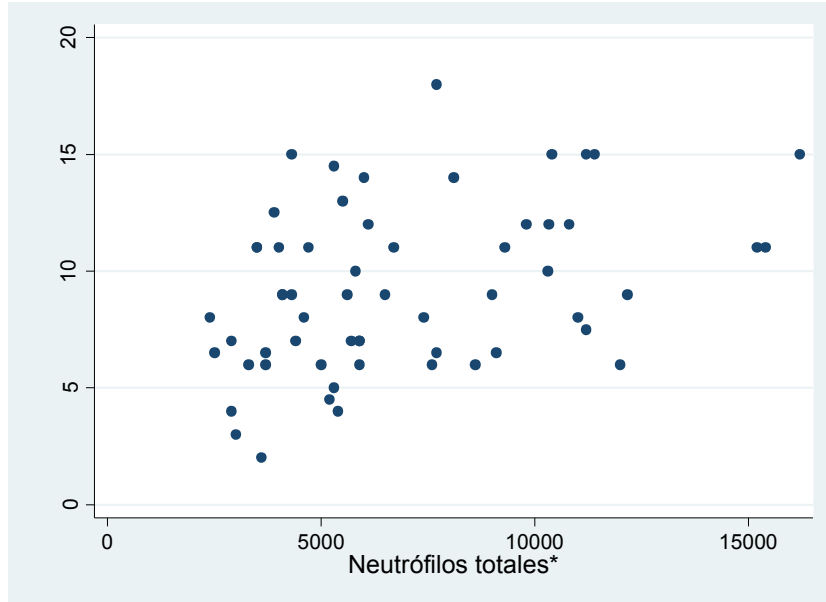
Spearman's rho = -0.5480 p=0.000

**Figura 3. Correlación entre la puntuación de remodelación pulmonar y niveles de Albúmina sérica.**



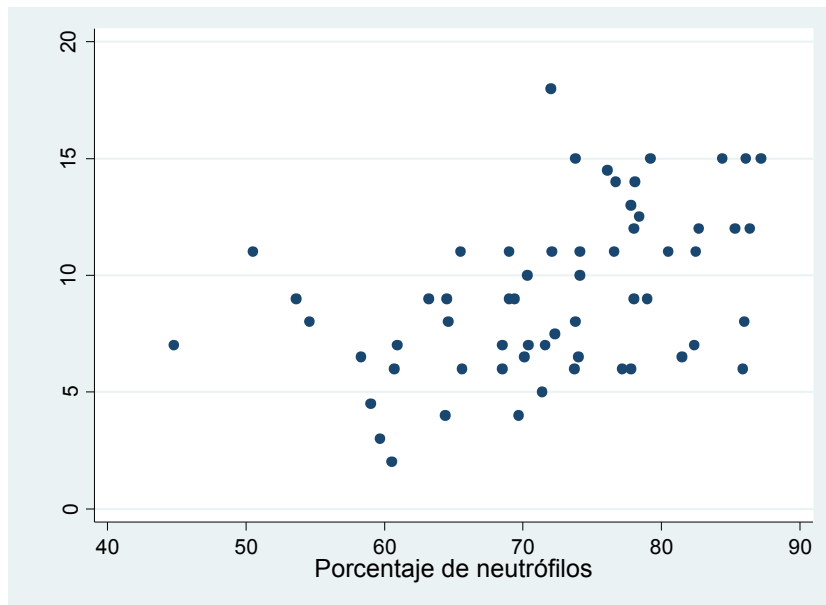
Spearman's rho = 0.3005 p= 0.0231

**Figura 4. Correlación entre la puntuación de remodelación pulmonar y niveles de Leucocitos totales.**



Spearman's rho = 0.3770 p= 0.0030

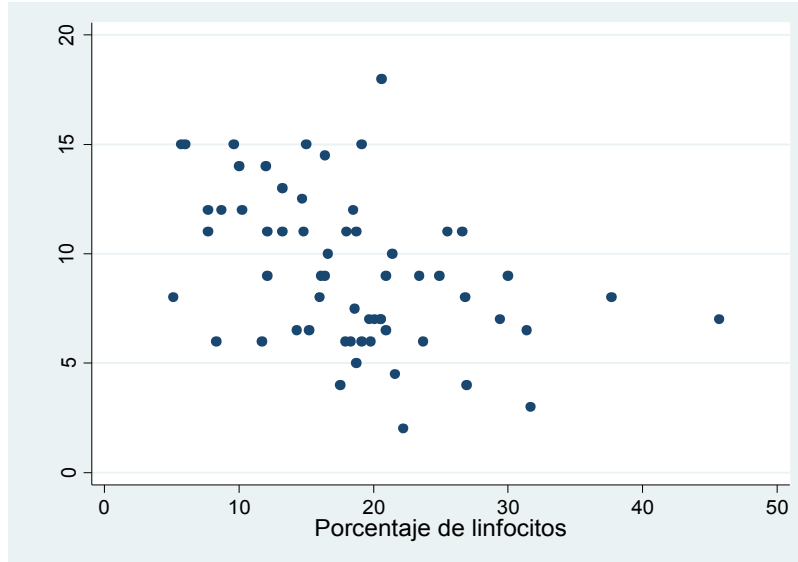
**Figura 5. Correlación entre la puntuación de remodelación pulmonar y niveles de Neutrófilos totales.**



Spearman's rho = 0.4858 p= 0.0001

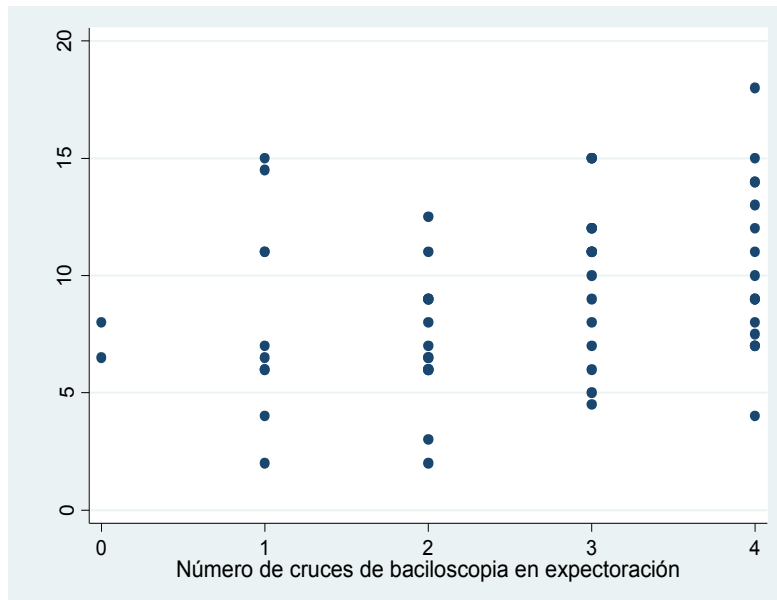
**Figura 6. Correlación entre la puntuación de remodelación pulmonar y niveles de Porcentaje de neutrófilos.**





Spearman's rho = -0.4436 p= 0.0004

**Figura 7. Correlación entre la puntuación de remodelación pulmonar y niveles de Porcentaje de linfocitos.**



Spearman's rho = 0.3237 p= 0.0109

**Figura 8. Correlación entre la puntuación de remodelación pulmonar y numero de cruces en la baciloscopia.**