



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Impacto del tratamiento para TB pulmonar activa sobre la diversidad de las
células NK circulantes**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Luisa Zuley Barzola Torres

Asesor

Dra. Iskra Tuero Ochoa

Co-Asesor

Dra. Sandra Rosario Delgado Malaga

Lima, Perú

2025

Jurado calificador

Presidente: Dra. Katherine Jessica Torres Fajardo


Vocal: Dra. Nancy Chile Andrade

Secretario: Dra. Sandra Patricia Palma Albornoz

Feedback Studio - Google Chrome
ev.turnitin.com/app/carta/es/?lang=es&o=1&u=1165482885&o=2737011016&ro=103

1 de 1: Uigict FACI FAVEZ
Impacto del tratamiento para TB pulmonar activa sobre la di...

Similitud 16% Marcas de alerta



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Impacto del tratamiento para TB pulmonar activa sobre la diversidad de las células NK circulantes

Trabajo para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Luisa Zuley Barzola Torres

Asesor
Dra. Lirza Torres Ochoa

Co-Asesor
Dra. Sandra Rosario Delgado Málaga

Lima, Perú
2025

Informe estándar
Informe en inglés no disponible [Más información](#)

16% Similitud [Filtros](#)

estándar
20 Exclusiones →

Fuentes
Mostrar las fuentes solapadas

1	Internet	hdl.handle.net	3%
		41 bloques de texto	343 palabras coincidentes
2	Internet	zaguan.unizares	<1%
		11 bloques de texto	86 palabras coincidentes
3	Internet	eprints.ucm.es	<1%
		10 bloques de texto	84 palabras coincidentes

Página 1 de 49 12242 palabras 81%

Tabla de contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Epidemiología y diagnóstico de la tuberculosis.....	3
1.2. Tratamiento de la tuberculosis	4
1.3. Infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.4. Respuesta inmune contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
III JUSTIFICACIÓN.....	16
IV HIPÓTESIS	18
V OBJETIVOS.....	18
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
VI MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
VII RESULTADOS	22
7.1. Estrategia de análisis mediante citometría de flujo:.....	23
7.2. Caracterización fenotípica de células NK – <i>ex vivo</i>	25
7.3. Funcionalidad de células NK – <i>in vitro</i>	26
VIII DISCUSIÓN	32
IX CONCLUSIONES.....	37
X LIMITACIONES.....	37
XI RECOMENDACIONES FUTURAS	37
XII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMEN

Introducción: La tuberculosis, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es una enfermedad altamente contagiosa y una de las principales causas de muerte a nivel mundial. A pesar de tener tratamiento, las herramientas para monitorear el progreso del tratamiento tienen limitaciones debido a la falta de sensibilidad o acceso a la población. *M. tuberculosis* tiene varias estrategias para evadir la respuesta inmune, incluyendo la infección a macrófagos restringiendo al sistema inmune. Las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) son componentes fundamentales del sistema inmune innato, eliminan células infectadas y colaboran con células del sistema inmune adaptativo. El objetivo de esta investigación es estudiar el fenotipo y funcionamiento de las células NK en pacientes que reciben tratamiento antituberculoso. **Métodos:** Se recolectaron 21 muestras de sangre de pacientes tuberculosos antes y después de 6 meses de tratamiento, y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Mediante citometría de flujo, se evaluó las diferentes poblaciones y subpoblaciones de células NK y su habilidad de producir IFN- γ y perforina después de estimularlas vía receptores Fc γ RIII y NKG2C. **Resultados:** Las subpoblaciones de células NK CD56⁺CD16⁺ y CD56⁺CD16⁻ aumenta al finalizar el tratamiento y la subpoblación CD56⁺⁺CD16⁺⁺ disminuye. Además, los niveles de perforina e IFN- γ producidos por las células NK disminuyen en algunas poblaciones de células NK. **Conclusión:** Los fenotipos y funciones de las células NK son diferentes antes y después del tratamiento antituberculoso.

Palabras clave: Tuberculosis, células NK, citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is a highly contagious disease, and one of the main causes of death worldwide. Despite the existence of treatment, tools to monitor treatment progress have limitations due to the lack of sensitivity or access to the population. *M. tuberculosis* has several strategies to evade the immune response, including infection of macrophages by restricting the immune system. Natural Killer (NK) cells are fundamental components of the innate immune system, kill infected cells and collaborate with adaptive immune system cells. Our objective is to study NK cells phenotype and function in patients undergoing antituberculosis treatment.

Methods: 21 blood samples were collected from tuberculosis patients before and after six months of treatment, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated. Using flow cytometry, we evaluated the different populations and subpopulations of NK cells expressing CD56 and CD16, also evaluated their ability to produce IFN- γ and perforin after stimulation via Fc γ RIII and NKG2C receptors. **Results:** CD56⁺CD16⁺ and CD56⁺CD16⁻ NK cell subpopulations increased at the end of treatment and the CD56⁺⁺CD16⁺⁺ subpopulation decreased. In addition, the levels of perforin and IFN- γ produced by NK cells decrease in some NK subsets. **Conclusion:** NK cells' phenotypes and functions are different before and after antituberculosis treatment.

Keywords: Tuberculosis, NK cells, cytokines.

I INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología y diagnóstico de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una de las principales causas de muerte en el mundo transmitida por un único agente infeccioso. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Perú es uno de los 30 países con mayor incidencia de TB resistente a nivel mundial, asimismo, es el primer país con mayor número de casos registrados en las Américas (1).

En el año 2018, la OMS planteó la Estrategia Fin a la tuberculosis, la cual tiene como objetivo reducir mundialmente los casos de TB en un 90% para el año 2030, sin embargo, la alta resistencia de la bacteria al tratamiento, la baja eficacia de las vacunas, las limitaciones en los métodos de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad, así como otros factores sociales, impiden que no se logre un efecto significativo en la lucha contra esta enfermedad (2).

Actualmente, la estrategia más utilizada contra TB es la vacuna en base al bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Esta vacuna contiene una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, una subespecie homóloga a *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*. Esta vacuna se aplica en países en vías de desarrollo (3) y provee una protección limitada en niños de 10 a 15 años, mientras que en adultos y adultos mayores es variable (4). Ante esto, urge la necesidad de mejorar nuestra comprensión acerca de los procesos inmunes involucrados en la protección contra TB para el desarrollo de vacunas racionales.

Para el diagnóstico de los pacientes con TB, se realiza una serie de exámenes como es el examen de esputo o baciloscopia de esputo en frotis que consiste en tomar muestras de la expectoración, esto con la finalidad de poder visualizar bacilos mediante observación al microscopio. El cultivo de esputo es una prueba más sensible que es realizado a personas sospechosas de portar la enfermedad y con resultado negativo a la prueba de baciloscopia de esputo en frotis, sin embargo, esta prueba demora aproximadamente 8 semanas para mostrar resultados y no se encuentra disponible en todos los centros de salud en zonas remotas. Otros test adicionales son el examen de radiografía de tórax, el cual permite ver el alcance, evolución y secuelas de la enfermedad pulmonar y, por último, la prueba cutánea de tuberculina o PPD, que consiste en aplicar tuberculina (derivado proteico purificado del cultivo de *Mtb*) debajo de la piel en el brazo (5).

1.2. Tratamiento de la tuberculosis

Existen diversos esquemas de tratamiento anti-TB y su duración va a depender del tipo de TB y si el paciente fue tratado previamente, pero, el esquema estándar se divide en 2 fases que varían en tiempo, tipo y número de medicamentos. Durante la primera fase se espera que los medicamentos disminuyan considerablemente la carga de bacilos tuberculosos, en esta fase el paciente podría presentar una mejora. En la segunda fase, se espera que los medicamentos eliminen los bacilos restantes hacia la cura estéril y prevención de la recaída (5,6).

Los fármacos usados para tratar esta enfermedad se dividen en 2 grupos: los de primera línea y los de segunda línea. Independientemente de esta clasificación, todos estos fármacos tienen una capacidad bactericida, esterilizante y de prevenir la resistencia, aunque eventualmente pueden ocasionar reacciones adversas. Los fármacos de primera línea se caracterizan por ser los más potentes para la eliminación de *M. tuberculosis*, estos son incluidos en todos los esquemas de tratamiento donde no haya una resistencia por parte del paciente. Dentro de estos medicamentos se incluye la isoniacida (H) y la rifampicina (R) que son bactericidas potentes; la pirazinamida (Z) y la estreptomina (S) que presentan propiedades bactericidas específicas contra cierta población de bacilos y, por último, el etambutol (E) que es un fármaco bacteriostático que evita que los bacilos se vuelvan resistentes. Sin embargo, si el paciente es sospechoso o presenta resistencia, se requiere el uso de los fármacos de segunda línea, los cuales generan más reacciones adversas (5,6).

Para un paciente con TB pulmonar activa y sensible, la duración del tratamiento es de 6 meses. La primera fase dura 2 meses y el tratamiento incluye la rifampicina, isoniacida, pirazinamida y el etambutol. Durante esta fase el paciente debe acercarse diariamente al centro de salud para recibir los medicamentos mencionados y tomarlos en presencia del personal de salud, conocido como tratamiento directamente observado (TOD). Previa evaluación, la segunda fase tiene una duración de 4 meses y hay un cambio en las drogas usadas (la rifampicina e isoniacida): la dosis y frecuencia de su ingesta es interdiario (3 veces por semana) (Tabla 1) (5,6). Para el seguimiento de la respuesta al tratamiento aún se utiliza la prueba de observación de la muestra de esputo en el microscopio, el cual tiene una baja sensibilidad y algunas desventajas, como no poder distinguir entre bacilos vivos y muertos (5,7).

Medicamentos	Primera fase diaria		Segunda fase tres veces por semana	
	Dosis (mg/kg)	Dosis máxima diaria	Dosis (mg/kg)	Dosis máxima por toma
Isoniacida (H)	5 (4-6)	300 mg	10 (8-12)	900 mg
Rifampicina (R)	10 (8-12)	600 mg	10 (8-12)	600 mg
Pirazinamida(Z)	25 (20-30)	2000 mg		
Etambutol (E)	20 (15-25)	1600 mg		

Rango de dosis de medicamentos entre paréntesis.

Tabla 1. Dosis de medicamentos antituberculosos de primera línea. Tabla extraída de Ministerio de Salud *et al* (5)

1.3. Infección por *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es causada por el bacilo *M. tuberculosis* y se transmite por vía aérea a través de pequeñas gotas en aerosol, que son producidas por una persona con TB pulmonar activa y son inhaladas por personas no infectadas. Esta transmisión se puede llevar a cabo durante actividades cotidianas como hablar, reír y, sobre todo, al toser. Los síntomas más comunes que presenta una persona infectada con *Mtb* son: debilidad del cuerpo, dolor torácico, pérdida de peso, fiebre, y la tos, la cual en algunos casos se presenta con sangre en el esputo (8) (Fig. 1).

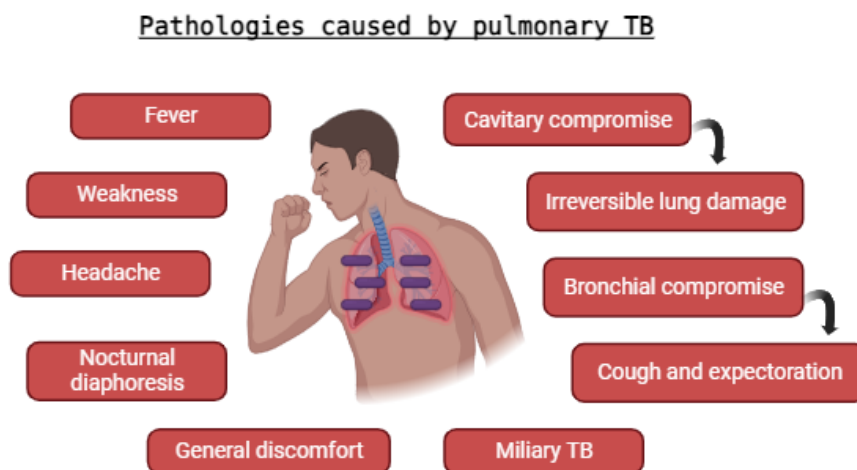


Figura 1. Patologías causadas por TB pulmonar. La tuberculosis pulmonar causa diversos síntomas en las personas que lo padezcan, tales como fiebre, debilidad,

sudores nocturnos, lesiones cavitarias, entre otros. Figura adaptada de Carabalí-Isajar et al. World J Microbiol Biotechnol (8). Creado con BioRender.com

M. tuberculosis es un patógeno intracelular, cuyo único huésped natural conocido es el ser humano. Este microorganismo se caracteriza por ser una bacteria ácido-alcohol resistente, esto debido a que tiene un alto contenido de lípidos en su pared celular que le proporcionan una barrera impermeable muy fuerte frente a compuestos y fármacos nocivos, además, juega un papel fundamental en su patogénesis. La pared celular de *Mtb* tiene componentes como el lipoarabinomano (LAM) que se unen a los receptores de manosa de los macrófagos alveolares y células dendríticas facilitando su ingesta por endocitosis y subsecuente destrucción. También promueve la activación de varios mecanismos antimicrobianos por macrófagos y células dendríticas incluyendo producción de citocinas inflamatorias como TNF- α (9). Sin embargo, *Mtb* ha desarrollado estrategias para poder sobrevivir dentro de las células. Una de ellas es la secreción de proteínas, una de estas es el antígeno 85 (Ag85) que es un complejo proteico que cumple un rol importante en la patogénesis de *Mtb*. Este complejo contiene varias proteínas como: Ag85A (31 kDa), Ag85B (30 kDa) y Ag85C (31.5 kDa)(10). Con respecto a Ag85A, se ha demostrado que induce la respuesta de las células T y genera la producción de interferón- γ (IFN- γ), y se sugiere que dicho antígeno puede ser un componente esencial para la supervivencia del bacilo dentro de los macrófagos (11)(Fig.2).

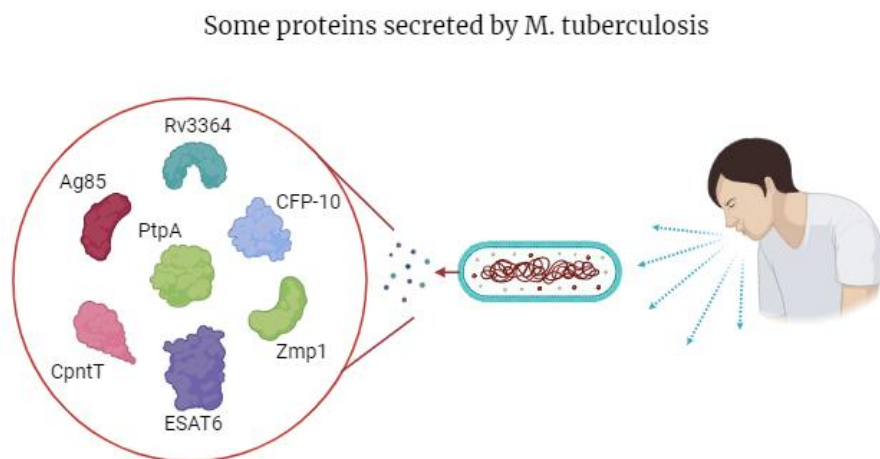


Figura 2. Algunas proteínas secretadas por *M. tuberculosis*. Las proteínas secretadas por *Mtb* modulan la respuesta inmune del hospedero. Figura adaptada de Valdemar et al. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. (12) Creado con BioRender.com

1.4. Respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*

Cuando una persona es infectada con *Mtb*, las bacterias inhaladas ingresan al pulmón y se movilizan hacia los alvéolos, donde tienen un primer contacto con células del sistema inmune innato básicamente macrófagos alveolares residentes y células dendríticas. La interacción entre el sistema inmune innato y *Mtb* es crucial para el éxito de la infección por parte del patógeno. Los macrófagos se activan elaborando una respuesta inflamatoria que se encargaría de contener o eliminar a *Mtb*. Sin embargo, en caso de no ser posible contener la infección, esta progresará acompañada por una replicación de la bacteria, diseminación a tejidos y posterior daño tisular (13).

Las principales células del sistema inmune innato son: los macrófagos alveolares (MA), las células dendríticas (CD), los neutrófilos y las células asesinas naturales o *natural killers* (NK, por sus siglas en inglés). Estas células presentan distintas funciones. Por un lado, los MA fagocitan a las micobacterias y también sirven como un nicho celular principal de estas; las células NK destruyen células infectadas a través mecanismos citotóxicos como la liberación de gránulos citoplasmáticos (conteniendo perforina, granulisina y granzima), asimismo, producen IFN- γ e IL-22, que inhiben el crecimiento intracelular de *Mtb* mejorando la fusión fagolisosomal. Si los bacilos logran sobrevivir a esta primera línea de defensa, se replican dentro de los MA y provocan la destrucción del tejido pulmonar generando inflamación. Esto atrae a monocitos sanguíneos que cumplen la función de células presentadoras de antígenos, mientras que los neutrófilos fagocitan bacterias. Sin embargo, se sabe que *M. tuberculosis* manipula al macrófago y la maduración del fagosoma evitando su formación para prolongar su supervivencia en estas células. Las CD fagocitan bacterias o antígenos y como presentadoras de antígenos viajan a los ganglios linfáticos donde activan linfocitos T y B. Los linfocitos T y B activados y específicos contra *Mtb* migran al sitio de infección donde combaten la infección con el objetivo de que puedan contenerla y formar el granuloma. El granuloma es un agregado de macrófagos infectados junto a otras células inmunes como T, B, NK, monocitos y CD. En esta estructura los bacilos quedan encapsulados en su interior y se contiene su diseminación, pudiendo permanecer por mucho tiempo (TB latente). Sin embargo, la carga bacteriana retenida en el granuloma puede liberarse al romperse la estructura, permitiendo la diseminación de la bacteria, incluso a otros órganos, a través del torrente sanguíneo (TB extrapulmonar) (9,13–15) (Figura 3).

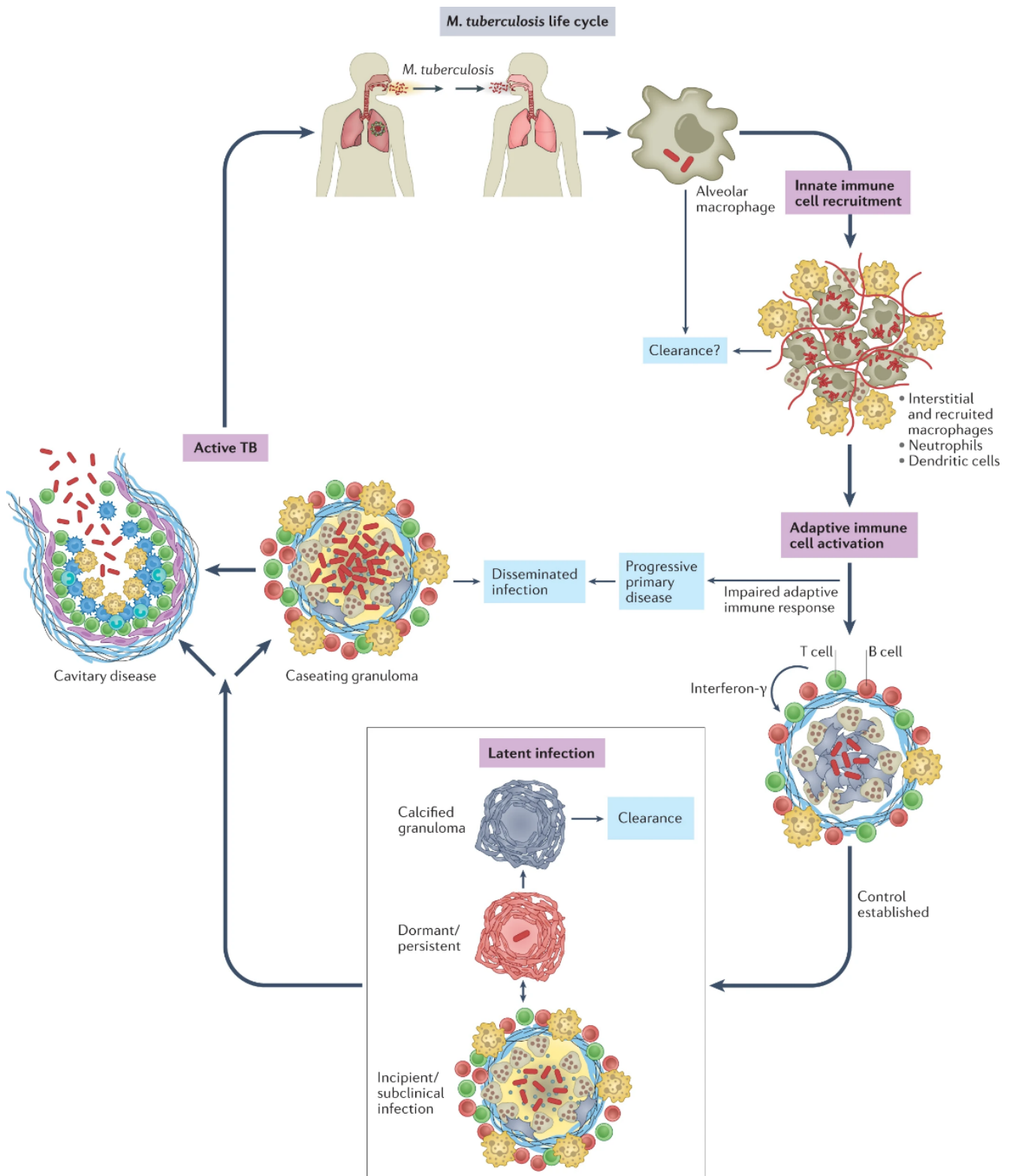


Figura 3. Ciclo de vida de *Mycobacterium tuberculosis*. *Mtb* es transmitido por el aire cuando una persona con TB pulmonar activa tose, estornuda, etc. Como patógeno intracelular, infectada a los macrófagos alveolares los cuales migran hacia el intersticio pulmonar e infectan una variedad de células (macrófagos, células dendríticas, entre otros). Aún no está claro si es que la inmunidad innata logra eliminar la infección en algunos individuos. Las células dendríticas se dirigen hacia el ganglio linfático de drenaje, donde se encuentran las células T que son células

cruciales para controlar y prevenir la diseminación del *Mtb*. Una respuesta inmune adaptativa eficaz puede conducir a que personas infectadas desarrollen una infección latente, sin embargo, por razones aún desconocidas, pueden desarrollar TB pulmonar activa. Figura extraída de Chandra et al. (16).

Como se mencionó anteriormente, las células NK son una de las principales células efectoras en la respuesta inmunitaria innata. Su nombre es atribuido a la capacidad de matar células infectadas sin haber estado previamente expuestas a estas. Asimismo, se ha demostrado que las células NK pueden desarrollar una “memoria inmunológica”, parecida a la del sistema inmune adaptativo y esta característica puede tener implicancia en el esfuerzo de desarrollar vacunas tanto preventivas o terapéuticas (17). Asimismo, las células NK son linfocitos granulares que derivan de células linfoides, y se definen por la ausencia de CD3, expresión de la proteína transmembrana CD56, su receptor CD16 (FcγRIII) es capaz de unir la porción Fc de las inmunoglobulinas (IgG) y activar las células NK para dirigir las hacia la célula diana y provocar una potente actividad citotóxica, desgranulación con la consecuente liberación de perforina y granzima, y secreción de citoquinas como el factor tumoral necrótico (TNFα) e IFN-γ (18,19). En base a la expresión de CD56 y CD16, las células NK se distinguen fenotípicamente por la expresión CD56 (alta: (++) bright en la Fig. 4) o baja (+) dim en la Fig. 4). A lo largo de la maduración, las células CD56⁺⁺ son precursoras de CD56⁺. Así, las células CD56⁺ o CD56⁺CD16⁺ presentan un mayor estado de madurez y una alta actividad citotóxica; mientras que el fenotipo CD56⁺⁺CD16⁻ representan un fenotipo inmaduro con poca capacidad lítica, pero con habilidad de producir citocinas (20–22) (Fig. 4).

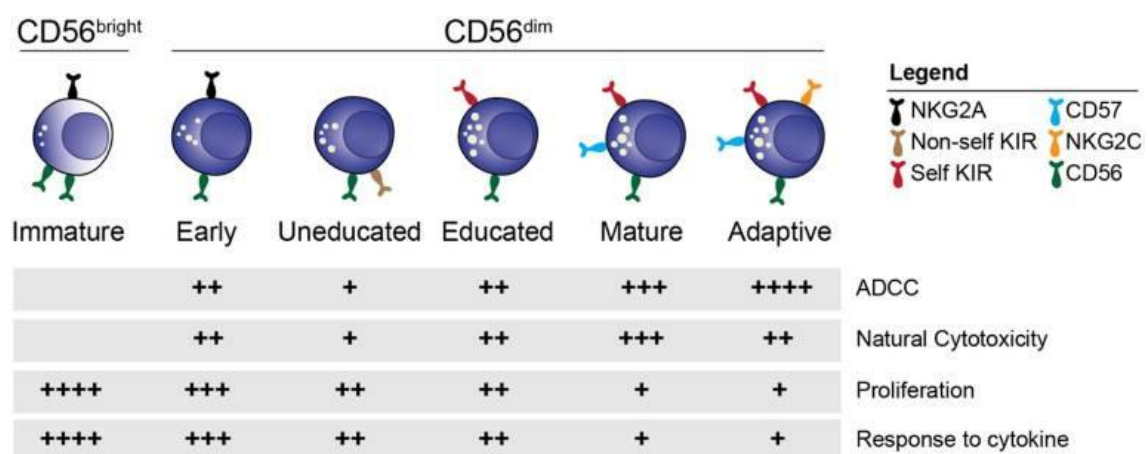


Figura 4. Subpoblaciones de células NK. Las células NK presentan subpoblaciones que se diferencian fenotípicamente por la expresión del receptor CD56 (alta o baja),

lo que le confiere funciones distintas según el nivel de expresión del receptor. Figura extraída de Pfefferle et al. (22).

La función de las células NK está determinada por un balance entre las señales de receptores activadores que tienen motivos de activación del inmunoreceptor basado en tirosina o *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM, por sus siglas en inglés) que permiten la activación de la célula y la ejecución de su efecto citotóxico, así como receptores inhibidores que tienen motivos de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina o *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM, por sus siglas en inglés) que inhiben las señales que conducen a la activación de estas células (Figura 5) (21).

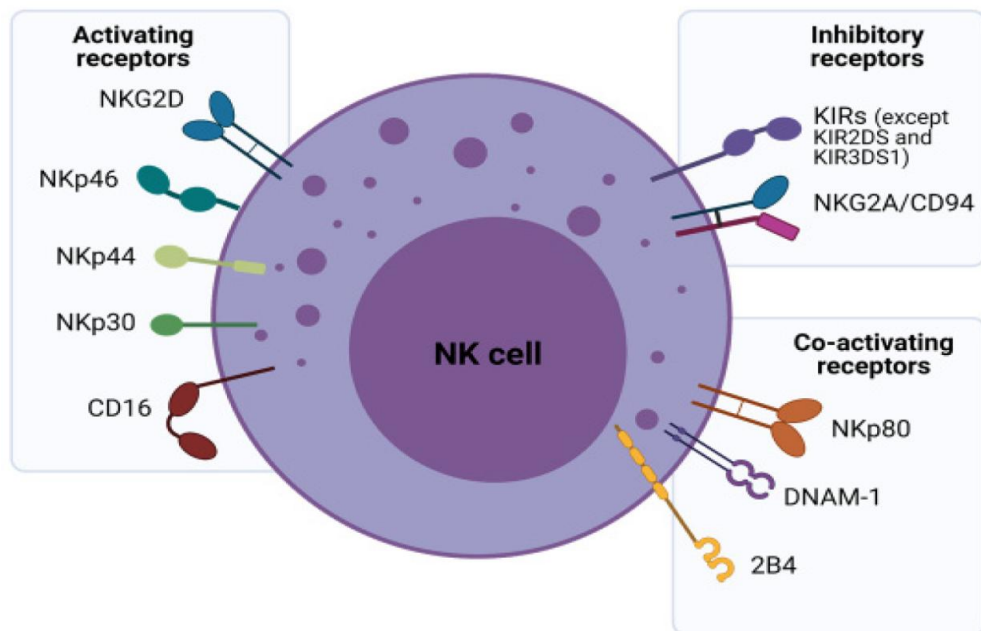


Figura 5. Principales receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NK. Abreviaturas: KIR, receptores de tipo inmunoglobulina de células asesinas; NKG2, conocido como CD159; NKp30, NKp44, NKp46, receptores naturales de citotoxicidad. Figura extraída de Islam et al. Cells (23).

Dentro de los receptores inhibidores se puede diferenciar a la familia de receptores tipo inmunoglobulina de células asesinas o *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR, por sus siglas en inglés) que regulan la función de las células NK. Otra familia, son los receptores de lectinas de tipo C, en la cual se encuentra el receptor NKG2A/CD94. Ambas

familias tienen en común la capacidad de reconocer moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) que conduce a la inhibición de la función citotóxica por células NK (22,24).

Dentro de los receptores activadores se encuentran cinco familias: algunos de los receptores KIR, los receptores de lectinas de tipo C como el receptor NKG2D y NKG2C, los receptores con citotoxicidad natural (NRC) como el NKp44, los DNAM-1 que al interactuar con células tumorales aumenta la habilidad de citotoxicidad y la producción de citoquinas de las células NK; y los TLR (*Toll like receptor*) que le brindan una capacidad de responder a una amplia variedad de patrones de moléculas asociados a patógenos (PAMP). Asimismo, se ha descrito que reconocen antígenos específicos como haptenos de virus y bacterias. Los receptores mejor estudiados son los receptores específicos de la porción Fc o receptores Fc de las inmunoglobulinas IgG (FcγR) e IgA (FcαR) y median actividades de citotoxicidad y de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos. Las células NK también presentan receptores para citocinas como IFN-γ, IL-18, IL-15 las cuales son secretadas por otras células inmunes (24,25) confiriendo una mejor capacidad de respuesta. Tras la activación, las células NK también son capaces de secretar perforina y granzimas. La perforina participa en el proceso de citotoxicidad o citólisis, cumple el rol de generar poros en la membrana celular de las bacterias o células diana permitiendo así la entrada de las granzimas, la cual es una proteasa que destruye estructuras celulares internas. Existen diversos tipos de granzima, sin embargo, los más estudiados son el de tipo A y B. La primera se encarga de inducir apoptosis de las células diana, además, tras la activación de las células NK secretan citocinas que estimulan monocitos para la liberación de citoquinas proinflamatorias. La granzima B induce la activación de RNAsas mediante caspasas para fragmentar el ADN. Durante el proceso de desgranulación tras la activación de receptores activadores e inhibición de receptores inhibidores en simultáneo, provoca que los gránulos migren a la membrana debido a la polarización del aparato de Golgi y la reordenación de los microtúbulos hacia las células diana, con la que después formará una sinapsis inmunológica, lo que permitirá la unión de sus membranas. Tras esto, las células NK liberarán los gránulos al espacio intracelular de la sinapsis inmunológica para que logren polimerizar la membrana de la célula diana (22,24,25).

En resumen, las células NK, tienen dos funciones relevantes en la respuesta inmune innata contra patógenos: la citotoxicidad, mediante la cual reconoce sus células blanco y luego ocurre la lisis de la célula infectada, así como también la secreción de citoquinas, principalmente IFN- γ , para modular la respuesta inmune. Ambas funciones contribuyen a la respuesta del hospedero contra microorganismos. En la Figura 6 se observan las funciones descritas, así como, otras funciones que realizan las células NK.

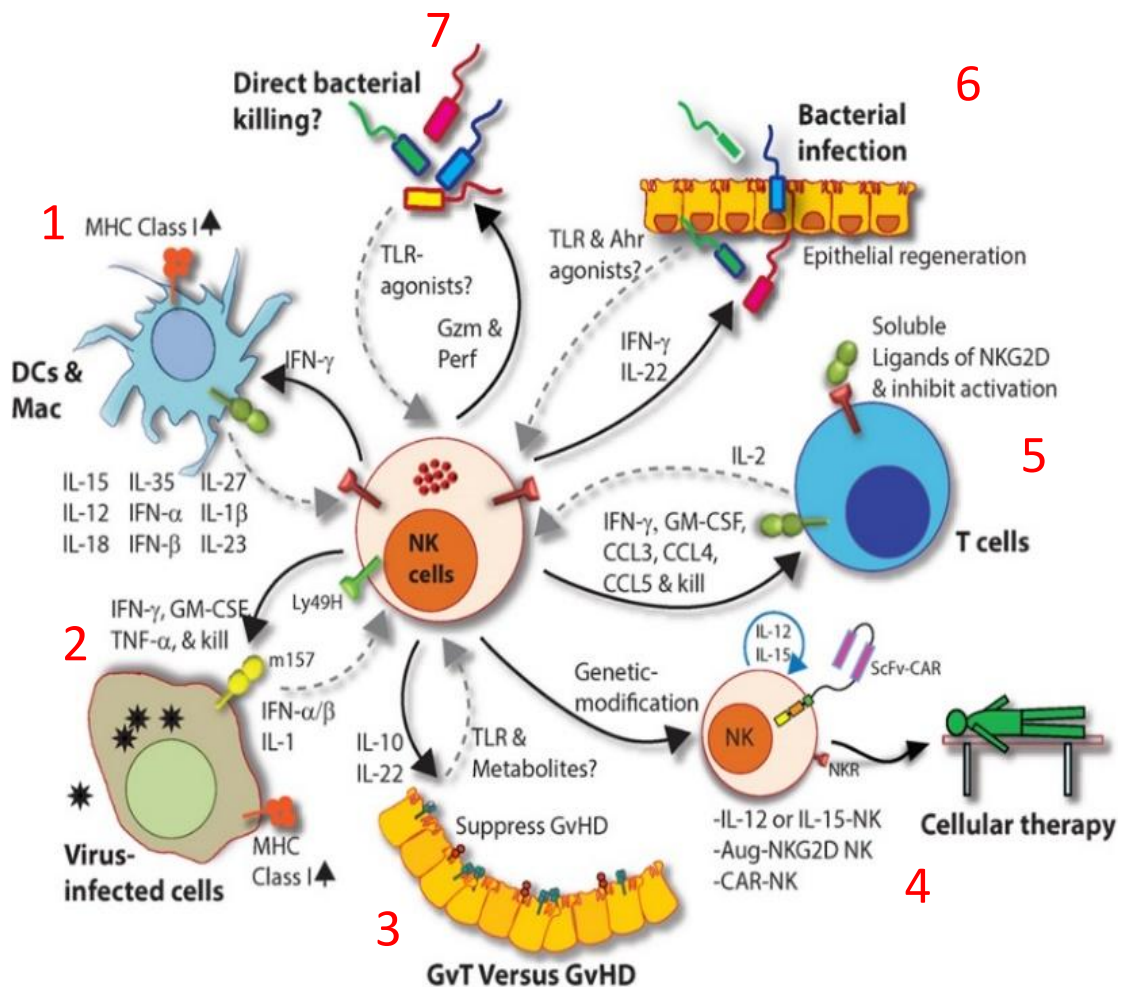


Figura 6. Funciones de las células NK. 1) Las interacciones entre las células NK y las células dendríticas (DCs)/macrófagos (Mac) generan diversas citoquinas activando células NK para que produzcan moléculas inflamatorias como IFN- γ , entre otras. Asimismo, este IFN- γ promueve el incremento de la expresión de MHC de clase I. 2) En células infectadas por virus se producen IFN- γ , IFN- β e IL-1 β y presentan autoligandos o proteínas virales en su superficie que activan a las células NK. 3)

Algunas subpoblaciones de células NK producen IL-22 que pueden ayudar a la regeneración de las células del tejido de la mucosa. 4) Con la manipulación genética de las células NK se puede mejorar su funcionalidad efectora y longevidad; la inserción del gen que codifica IL-12 aumentaría las funciones efectoras de las células NK, como producción de IFN- γ . La expresión de receptores NKG2D y NKp46 aumentarían la citotoxicidad antitumoral. Estas células NK modificadas brindan nuevas oportunidades para el diseño de terapias. 5) La interacción entre las células NK y T regula la inmunidad adaptativa. 6) Las células NK reconocen células infectadas por bacterias, ya sea mediante receptores tipo toll (TLR) o por la activación a través de factores solubles; esto induce secreción de IFN- γ e IL-22 que ayudan a reducir la carga bacteriana y la regeneración de células. 7) Las células NK lisan bacterias y células infectadas tras la liberación de granzimas y perforina. Figura extraída de Abel et al. Front Immunol. (26)

Considerando las características y funciones que presentan las células NK, han sido intensamente estudiadas en distintas infecciones, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), SARS-CoV-2, Hepatitis B, influenza, entre otros. En VIH se ha demostrado que las células NK activadas secretan citocinas y quimiocinas que conducen a una mejora de la actividad antiviral lo que ayudaría a controlar la carga viral (27).

En la infección por SARS-CoV-2, se observó que una elevada activación de células NK mediada por anticuerpos deficientes en galactosa a causa de la enfermedad, estaría asociada con una prognosis negativa de la enfermedad (28). En el contexto de infección por Hepatitis B, Gehring (29) sugiere que las células NK podrían servir como centinelas del mecanismo de acción de fármacos inmunitarios, como IFN tipo 1. Así mismo, la elevada activación de estas células serviría para medir el daño hepático en los pacientes. En el caso de la influenza causado por H1N1, se ha observado que la linfopenia de células NK puede correlacionar con la severidad de la enfermedad.

En el contexto de TB, en el sitio de infección y tras la activación de las células NK, estas son una fuente importante de IFN- γ y promueven la respuesta contra *Mtb* de parte de macrófagos a través de la activación de fagocitosis e incremento del estallido oxidativo o respiratorio (30), que consiste en el aumento de la producción de especies reactivas de

oxígeno (oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo) las cuales son tóxicas para los patógenos y permiten la eliminación de los nichos intracelulares (31,32).

Sobre la funcionalidad de células NK periféricas en TB pulmonar, en un estudio transversal, comparando la inmunología de pacientes con TB activa y latente, se observa que células NK de pacientes con TB latente tenían alta habilidad de mediar citotoxicidad y desgranulación respecto a pacientes con la enfermedad activa. Esto sugiere que existe una función diferencial de las células NK en los diferentes espectros de la enfermedad (33). Respecto a las poblaciones de células NK en circulación, se ha descrito que en TB pulmonar activa el fenotipo $CD56^{bright}CD16^{dim}$ es predominante antes de iniciar el tratamiento comparado a luego de completar el mismo (34). Similarmente, otro estudio ha descrito que las células NK disminuyen su habilidad de producir $IFN-\gamma$ y desgranulación antes del tratamiento (35). Respecto a la producción de perforina y granzima tras estimular células NK, se observó que estas células muestran una habilidad incrementada de liberar estas moléculas, lo que indica que estas moléculas tienen una implicancia en la inmunidad a tuberculosis (36). También se ha reportado cambios en los receptores de células NK en TB activa como el incremento del receptor Tim-3 que se asocia a disfunción celular (37) mientras que el receptor inhibitor KLRG1 es un importante inmunomodulador que mejora la inmunidad anti-TB (34).

En pacientes con TB pulmonar y TB/VIH+ presentaron una mayor frecuencia del fenotipo $CD56^{neg}$ ($CD56^{-}CD16^{+}$) comparado con el grupo control (individuos sanos), además, encontraron que al finalizar el tratamiento hay un incremento de la población células NK totales y una disminución del fenotipo $CD56^{bright}$ ($CD56^{++}CD16^{+/-}$) tanto en pacientes TB/VIH como en pacientes que solo presentaban TB pulmonar (38). Estos resultados sugieren que los niveles de células NK y moléculas que producen podrían ser potenciales biomarcadores de seguimiento/respuesta al tratamiento o prognosis.

En este sentido, las evidencias sobre el rol de las células NK en diferentes enfermedades infecciosas y el creciente interés en el contexto de TB, abren nuevas áreas de investigación para generar conocimiento. Así, este proyecto de investigación planteó entender la funcionalidad de células NK en la evolución de pacientes que se encuentran recibiendo terapia anti-TB. Además, este estudio resalta las características de células NK

en pacientes con TB activa, que a futuro puede tener un impacto importante en el seguimiento al tratamiento, desarrollo de vacunas y terapias contra la TB pulmonar.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas con alta tasa de incidencia y es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Países endémicos, como el Perú, aún permanecen dentro de la lista de los países con mayor ocurrencia de infecciones debido a las formas resistentes de TB (7), como la denominada tuberculosis multirresistente (MDR), llamada así por su alta resistencia a fármacos usados en el tratamiento (2). Si bien TB tiene tratamiento, el seguimiento tiene limitaciones, por ejemplo, las pruebas usadas actualmente son de baja sensibilidad. La prueba de frotis de esputo (no diferencia bacilos vivos de muertos) tiene un rango de sensibilidad que oscila entre 50 – 80% (39) y el cultivo de esputo toma tiempo, aproximadamente 8 semanas para que se formen las colonias de *M. tuberculosis* y de 3 a 6 semanas para poder identificar la especie y finalmente obtener resultados (40). Este tiempo de espera retrasa el manejo clínico del paciente y además que no es accesible en todos los centros de atención primaria. Igualmente, la nueva tecnología llamada GenXpert, la cual es usada para diagnosticar y determinar la sensibilidad de *M. tuberculosis* a la rifampicina (41), no está disponible en lugares lejanos debido a su alto costo, infraestructura requerida y personal especializado (42), además que, no es útil para evaluar el restablecimiento del sistema inmunológico del paciente. La OMS en su estrategia “Fin de tuberculosis” sugiere innovar estrategias de diagnóstico, tratamiento y seguimiento del tratamiento (7). Sin embargo, para la evaluación de nuevas drogas o regímenes de tratamiento en ensayos clínicos, no existen biomarcadores validados que faciliten la evaluación y provean resultados más precisos (4,43).

Durante años se ha resaltado el rol de las células T en la protección contra la tuberculosis, sin embargo, las estrategias de vacunación dirigidas a promover la respuesta de células T no han sido exitosas como es el caso de la vacuna BCG (4) y otras. Por tanto, es importante dirigir la atención hacia otras células inmunes que puedan dar mejor información sobre la respuesta inmune y la protección contra la infección por *Mtb* y que garanticen mejores resultados mediante vacunación, terapia o identificación de biomarcadores inmunes.

Sobre las células NK en TB, se sabe que participan en la respuesta inicial contra la infección por *Mtb*. Asimismo, se ha descrito que las diferentes manifestaciones de la enfermedad de TB está asociado a la diversidad de células NK, así se ha encontrado que el fenotipo CD56⁺⁺CD16⁺ predomina en pacientes con TB pulmonar activa sin tratamiento comparado a TB latente, esto estaría relacionado a la progresión de la enfermedad (34). Sin embargo, la ausencia de estudios longitudinales con pacientes bajo tratamiento no permite conocer la dinámica de estas poblaciones y sus funciones. A la fecha, el seguimiento del tratamiento de TB activa carece de biomarcadores validados en cohortes de pacientes con TB para definir la respuesta a los medicamentos, predecir el éxito del tratamiento (biomarcadores de base) o recaída que puedan guiar a los clínicos (4,43)

En ese sentido, es necesario conocer más sobre la inmunobiología de las células NK en TB pulmonar activa bajo tratamiento para poder desarrollar estrategias innovadoras de tratamiento o marcadores de seguimiento para evaluar la respuesta temprana al tratamiento e incluso poder predecir una potencial recaída de los pacientes.

III JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existe una diversidad de estudios que evidencian el rol de las células NK en infecciones virales tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (27), SARS-CoV-2 (28), el virus de la hepatitis B (29), sin embargo, en infecciones bacterianas los estudios son escasos a pesar que existen evidencias que estas células eliminan patógenos intracelulares, como *Mtb*, mediante la citólisis de la célula que infectan (44). Actualmente, en la infección por VIH ya se está utilizando inmunoterapias en base a células NK para eliminar los reservorios del virus (45) demostrándose así ser una opción prometedora.

El potencial rol de las células NK en la protección contra la infección, incluyendo por *M. tuberculosis*, radica en su habilidad de lisar células infectadas, activación de otras células inmunes como células T, y su habilidad de desarrollar “memoria inmunológica”. Así, en estudios sobre contactos de pacientes con TB activa altamente expuestos, estos permanecieron negativos a la prueba cutánea de tuberculina y los ensayos de medición de la producción de IFN- γ , esto significaría que estas personas no desarrollaron la infección

o la bacteria fue eliminada por el sistema inmune antes ocurrir una infección generalizada. Estos individuos son llamados resistentes, ya que al parecer eliminan a la bacteria antes de que se desarrolle la respuesta inmune adaptativa. Dentro de las bases inmunológicas propuestas para explicar esta eliminación se sugiere que las células NK podrían jugar un rol importante eliminando tempranamente células infectadas mediante citotoxicidad (46). Estas cualidades pueden ser aprovechadas para prevenir la diseminación de la infección mediante el desarrollo de herramientas terapéuticas o preventivas contra TB en base a células NK.

Otra característica que se puede aprovechar del conocimiento sobre la biología de las células NK es su habilidad de desarrollar “memoria inmunológica” (17). Sin embargo, este conocimiento aún falta explorar más en tuberculosis. A la fecha se ha reportado que en individuos con TB activa las células NK pulmonares producen niveles altos de IFN- γ e IL-22/ granzima (CD45RO⁺) en respuesta al estímulo con IL-15 y BCG respectivamente (47). Otros reportes mencionan que la revacunación con BCG induce una respuesta prolongada de las células NK, hasta un año, produciendo citoquinas inflamatorias como IFN- γ . Asimismo, en modelos animales inmunizados con BCG las células NK CD3⁻ CD56⁺CD27⁺ aisladas y co-cultivadas con *M. tuberculosis* fueron capaces de reducir el número de unidades formadoras de colonia (21). Todas estas evidencias resaltan la potencial utilidad de las células NK para mejorar la eficacia de vacunas o terapias contra TB.

Para el desarrollo de terapias en base a células NK contra enfermedades infecciosas, se podría modular la función de las células NK mediante el estímulo con citocinas para promover funciones citotóxicas (matar células infectadas) o producir IL-22, una citoquina involucrada en mantener la integridad del epitelio del pulmón. Esta estrategia sería una buena alternativa para individuos con células T disfuncionales, por ejemplo, pacientes con enfermedades inmunosupresoras como infección con VIH (46).

Finalmente, la identificación de biomarcadores inmunes para seguimiento a enfermedades infecciosas es de interés. Se ha descrito, en la infección por SARS-CoV-2 que una elevada activación de células NK inducida por anticuerpos deficientes en galactosa se asocia con una prognosis negativa de la enfermedad (28). En el contexto de infección por Hepatitis B, se sugiere que las células NK podrían servir para la vigilancia

del mecanismo de acción de fármacos inmunitarios, así como medir el daño hepático en los pacientes (29). Estos y otros estudios argumentan a favor de las células NK y sus funciones como potenciales marcadores de progreso de enfermedad, no solo en enfermedades de origen viral, sino que también podría aplicarse en el contexto de tuberculosis pulmonar.

Estudiar los cambios en el fenotipo o función de células NK a lo largo del tratamiento de TB, permitirá la identificación de parámetros inmunes y que estos pueden ser usados como potenciales marcadores para hacer seguimiento al tratamiento anti-TB y con utilidad para el pronóstico de la enfermedad. Asimismo, este conocimiento puede usarse en el seguimiento de estudios clínicos orientados a la identificación de nuevas drogas o regímenes contra *Mtb* (43). Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que evaluó las características de células NK en un estudio longitudinal en pacientes con TB activa en tratamiento.

IV HIPÓTESIS

A lo largo del tratamiento contra tuberculosis pulmonar activa ocurren cambios en las características fenotípicas y funcionales de las células NK.

V OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las características de las células NK circulantes en pacientes con tuberculosis pulmonar activa sensible que se encuentran bajo el esquema de tratamiento de seis meses.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la cinética de las poblaciones de células NK circulante antes (T0) y después (T6) del tratamiento contra la tuberculosis.
2. Analizar los niveles de expresión de IFN- γ y perforina en las poblaciones de células NK circulantes en los tiempos T0 y T6.
3. Determinar la cinética de las subpoblaciones de células NK circulantes antes (T0) y después (T6) del tratamiento contra la tuberculosis.
4. Evaluar los niveles de expresión de IFN- γ y perforina en las subpoblaciones de células NK circulantes en los tiempos T0 y T6.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Estudio longitudinal y experimental.

Población de estudio

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se obtuvieron de pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de TB pulmonar activa confirmada (microscopía y rayos X) que asisten a los centros de salud. Las muestras fueron tomadas en dos tiempos distintos: antes de iniciar el tratamiento anti-TB y después de 6 meses de tratamiento. Estas muestras provinieron del proyecto con código SIDISI: 210077 (Proyecto base) que tenía aprobación ética y almacenó las CMSP con autorización de los pacientes. Para la realización de esta investigación se solicitaron las muestras al investigador responsable de dicho proyecto. Las muestras tuvieron una codificación numérica conteniendo la abreviación del tiempo de muestreo: T0: tiempo previo al inicio del tratamiento y T6: seis meses posteriores al tratamiento. Los códigos no presentaron información alguna que identifiquen al paciente del cual provenía y de esta forma se garantizó la confidencialidad. Las muestras fueron manejadas con estos códigos en los distintos ensayos.

Tamaño muestral

El tamaño de muestra se calculó usando el software G*Power (Versión 3.9.6.1) y se estimó que para obtener un poder estadístico ($1 - \beta$) del 0.99, con efecto de tamaño igual a 1, un error tipo 1 (α) de 0.05 y se estimó un total de 15 muestras. Sin embargo, asumimos un muestreo por conveniencia y se incluyó un total de 21 ($n = 21$) tanto para el T0 y T6. Los parámetros considerados para el cálculo del tamaño muestral fueron sugeridos por Manterola et al. (48) y Serdar et al. (49).

Fenotipificación de células NK - expresión CD56 y CD16 - *ex vivo*

La identificación de poblaciones y subpoblaciones de células NK expresando CD56 y CD16 en los tiempos T0 y T6 se determinaron mediante citometría de flujo con una adaptación del ensayo realizado por Yamazaki et al. (50). Se realizó la tinción superficial a células inmunes en 200 μ L de sangre total y fueron marcados con 2 μ L de anti-human CD56-PE-Cy7 (Cat:304628, Clona: MEM-188, BioLegend, CA), 2 μ L de anti-human

CD16-PECy5 (Cat: 15-0168-42, Clona: eBioCB16, eBioscience) y 2,5 uL anti-human CD3 PacBlue (Cat: 300417, Clona: UCHT1, BioLegend, CA). La muestra se incubó por 30 min a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Luego, para lisar los eritrocitos, se utilizó buffer de lisis 1X (Biolegend). Posteriormente, se realizaron dos procesos de lavado y se resuspendió en DPBS (Dulbecos buffer fosfato-salino) (Invitrogen, CA)- suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen, CA) al 1%. Finalmente, se adquirió las muestras en un citómetro de flujo FACS CANTO II donde se adquirieron al menos 500000 eventos. Para el análisis, se excluyó a los linfocitos T de la población de células NK con el marcador CD3 seleccionando la población de células CD3 negativas para definir las poblaciones de células NK totales expresando CD56 que expresan (CD16⁺) o no expresan CD16 (CD16⁻) y las subpoblaciones (CD56⁺⁺CD16⁺⁺, CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻, CD56⁺CD16⁺⁺, CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁻). En este análisis se usó el software FlowJo v10.8.

Ensayo de funcionalidad de células NK

Luego de centrifugar y extraer el plasma, el paquete globular se resuspendió en PBS estéril se añadió a un tubo de 15 mL conteniendo Ficoll-Histopaque (Cat: 17144003 – GE Healthcare Bio-Sciences AB) manteniendo la proporción 1:1 (muestra: Ficoll) y teniendo cuidado de no mezclar ambas fases. Luego se realizó una centrifugación a 400 g por 30 minutos. Terminada la centrifugación se removió con mucho cuidado el anillo conteniendo a las CSMP (Fig. 7) y se transfirió a un tubo conteniendo DPBS estéril. Luego se realizaron dos lavados a 1500 rpm por 7 minutos con DPBS estéril, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio R10 (RPMI 1640 (Invitrogen, CA) conteniendo penicilina/estreptomicina (Invitrogen, CA) y SFB (Invitrogen, CA) 10%) y se realizó un recuento celular empleando una cámara de Neubauer (51).

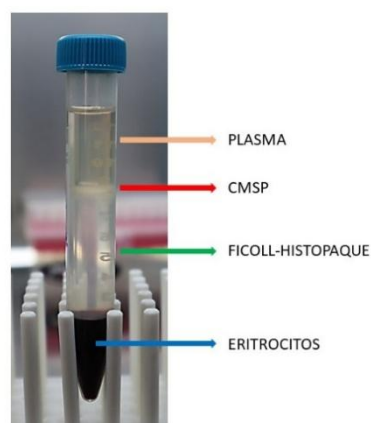


Figura 7. Aislamiento de las CMSP. El proceso de separación de las células mononucleares de sangre periférica se realizó mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad empleando Ficoll-Histopaque.

Para evaluar las funciones de las células NK, se empleó una modificación del ensayo de activación de células NK (51,52). Las células fueron distribuidas en 4 tubos (2×10^6 células/ tubo). Se utilizaron tres estímulos para evaluar su funcionalidad:

Tubo 1: Activación a través de receptores Fc γ RIII (control positivo): se le añadió 3 μ L de anti-CD16-PE-Cy5.

Tubo 2: Activación a través de receptores Fc γ RIII: se añadió pool de plasma conteniendo anticuerpos específicos a *M. tuberculosis* previamente incubado con la proteína recombinante Ag85A (0.4 μ g de Ag85A/mL de R10) (NR-49427-BEI RESOURCES). Esta prueba permitirá evaluar la activación de células NK con anticuerpos específicos a *Mtb* antígenos. El plasma proviene de un paciente con TB activa.

Tubo 3: Activación vía receptores NKG2C: Se realizó un co-cultivo de CMSP con células K562 - no expresan MHC-I - (proporción E: T de 5:1). Las células K562 (Cat # 11699) fueron donadas por NIH AIDS Reagent Program Division of AIDS NIAID, NIH.

Tubo 4: Control negativo: CMSP en medio de cultivo R-10 sin estímulos.

A todos los tubos, se les añadió 1 μ L de cóctel de inhibidores del transporte de proteínas (Golgistop (Cat: 51-2092KZ, BD Bioscience)). Seguidamente se incubaron durante 5 horas a 37 °C y 5% CO₂ para permitir la activación de células NK.

Cumplida las 5 horas de incubación, se centrifugaron los tubos y se lavó las células con 2 mL de PBS-FBS 1% y se centrifugaron a 1500 rpm por 7 minutos. Inmediatamente se descartó el sobrenadante y al pellet de todos los tubos se le añadió 3.5 uL de anti-humano CD56-PE-Cy7 y 3.5ul de anti-humano CD16-PE-Cy5 (Tubo 2, 3 y 4). Al tubo 1 solo se le añadió CD56. Los tubos fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, luego se lavó las células con PBS-FBS 1%.

Para realizar la tinción intracelular, se fijó el pellet agregando 100 uL de *IC Fixation Buffer* (Cat. 00822249 - Invitrogen) a todos los tubos y nuevamente se incubaron por 30 minutos a condiciones estándar. Luego se agregó 2 mL de *Permeabilization buffer* (1X) (Cat. 00833356 – Invitrogen, CA) se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. Después se añadió 3uL de anti-humano perforina-PE, 12 uL de anti-humano IFN γ -FITC y 1,5 uL de anti-humano CD3-Pacific Blue. Los tubos fueron nuevamente incubados por 30 minutos a condiciones estándar, seguidamente, se les agregó 2 mL de *Permeabilization buffer* (1X), se centrifugaron, el pellet fue resuspendido en 500 uL de PBS-FBS 1%. Finalmente, los tubos fueron analizados por citometría de flujo en un equipo FACS CANTO II y se adquirieron 500000 eventos. Para el análisis de los datos se usó el software FlowJo v10.8

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en las pruebas se realizó usando la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas (T0 vs T6) mediante el software *GraphPad PRISM® versión 9.5*. Considerando que las muestras obtenidas son pareadas, en este caso el tiempo antes del inicio del tratamiento (T0) es considerado el nivel basal para ser comparado con el tiempo luego de completar el tratamiento (T6).

VII RESULTADOS

Para el presente estudio, se analizaron muestras de células mononucleares (CMSP) de 21 participantes adultos que fueron reclutados por el proyecto base (SIDISI: 210077). Al momento del enrolamiento, todos los pacientes fueron diagnosticados con tuberculosis (TB) pulmonar activa como se muestra en la Tabla 2.

Prueba frotis de esputo:	Tiempo de tratamiento	
	T0	T6
-	3*	21
+	7	-
++	4	-
+++	7	-

Tabla 2. Diagnóstico de los pacientes antes de (T0) y al finalizar tratamiento (T6). La tabla muestra los resultados de la baciloscopia de esputo en frotis. Se muestra el número de pacientes. Los resultados de la prueba de baciloscopia de esputo en frotis se representan como 1+, 2+, 3+ o -. En consecuencia, "1+" indica la observación de 10 a Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (BAAR) en 100 campos microscópicos vistos; "2+" representa de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos vistos, y "3+" se usa cuando se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos vistos. Si el resultado de la prueba es negativo, se informa con el símbolo "-".

*Con diagnóstico clínico de TB

7.1. Estrategia de análisis mediante citometría de flujo:

Para identificar las diferentes poblaciones y subpoblaciones de células NK se empleó la estrategia de *gating* de la Figura 8.

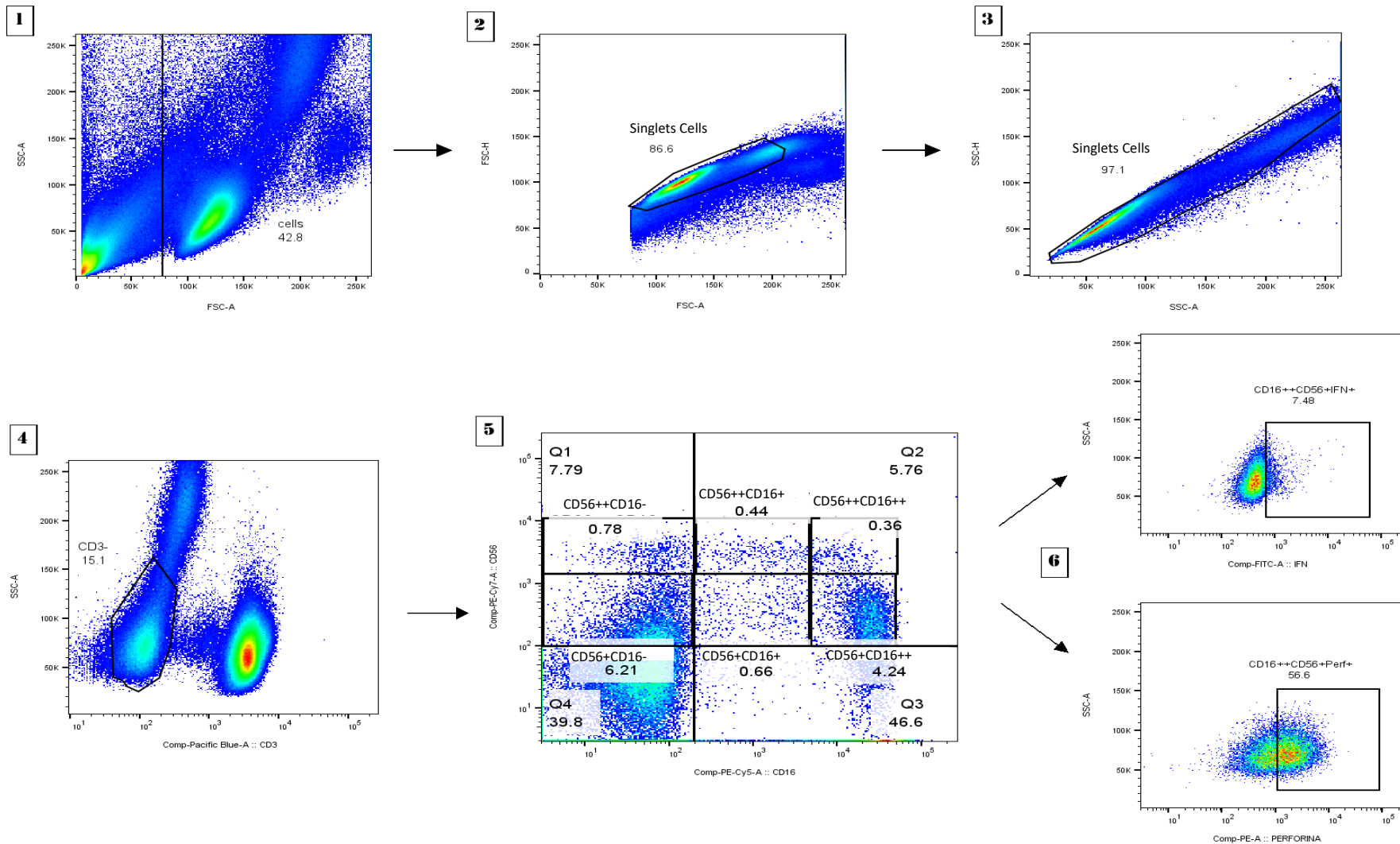


Figura 8. Estrategia de selección de poblaciones y subpoblaciones de células NK. (1) Las células fueron seleccionadas según su tamaño (FSC) y complejidad (SSC), luego se seleccionó células únicas (*singlets*) usando (2 y 3) FSCA/FSCH y SSCA/SSCH. (3) Seguidamente se seleccionaron las células CD3⁻ (que incluye células NK y B). (4) Luego se definió las células NK totales por la expresión de CD56 y CD16 (Q1 y Q2, en el *plot*) y sus subpoblaciones: CD56⁺⁺CD16⁺⁺, CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻, CD56⁺CD16⁺⁺, CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁻. (6) Finalmente, para cada población y subpoblación se determinó la expresión de IFN- γ y perforina. El *plot* es representativo de una muestra. Esta estrategia se utilizó para todas las muestras procesadas tanto *ex vivo* como *in vitro*, según corresponda.

7.2. Caracterización fenotípica de células NK – *ex vivo*

Las células NK se definen por la expresión de la proteína de transmembrana CD56 y el receptor Fcγ CD16. La expresión alta (++) o baja (+) del marcador CD56 y CD16 indican su estado de madurez y habilidad de citotoxicidad, siendo el fenotipo CD56⁺⁺ inmaduro y precursor de CD56⁺ con habilidad de producir citocinas (20–22).

En este estudio, se analizó *ex vivo* la frecuencia de células NK de sangre periférica antes (T0) y después de seis meses de tratamiento (T6) anti-TB.

	<i>Tiempo</i>	
	T0	T6
<i>Población de células NK totales expresando CD56 (%)</i>		
CD16 ⁺	51.03 ± 3.61	46.64 ± 3.17
CD16 ⁻	0.82 ± 0.10*	1.22 ± 0.14*

Tabla 3. Frecuencia de las poblaciones de células NK totales expresando CD56 antes (T0) y después de finalizar el tratamiento (T6). Las células de sangre total se tiñeron en fresco (*ex vivo*) para analizarlas en el citómetro de flujo. Los datos se expresan como media ± SEM, n=21 y fueron analizados usando la prueba de Wilcoxon, con los valores de p<0.05* entre tiempos (T0 vs T6).

Del análisis de células NK totales que expresan CD56 y CD16 (Tabla 3) se observa que no hay diferencia en los niveles de las células NK CD56 que expresan CD16 (CD16⁺) las cuales fueron similares entre T0 y T6, mientras, los niveles de la población que no expresa CD16 (CD16⁻) incrementa al T6 comparado al T0 (p = 0.0025).

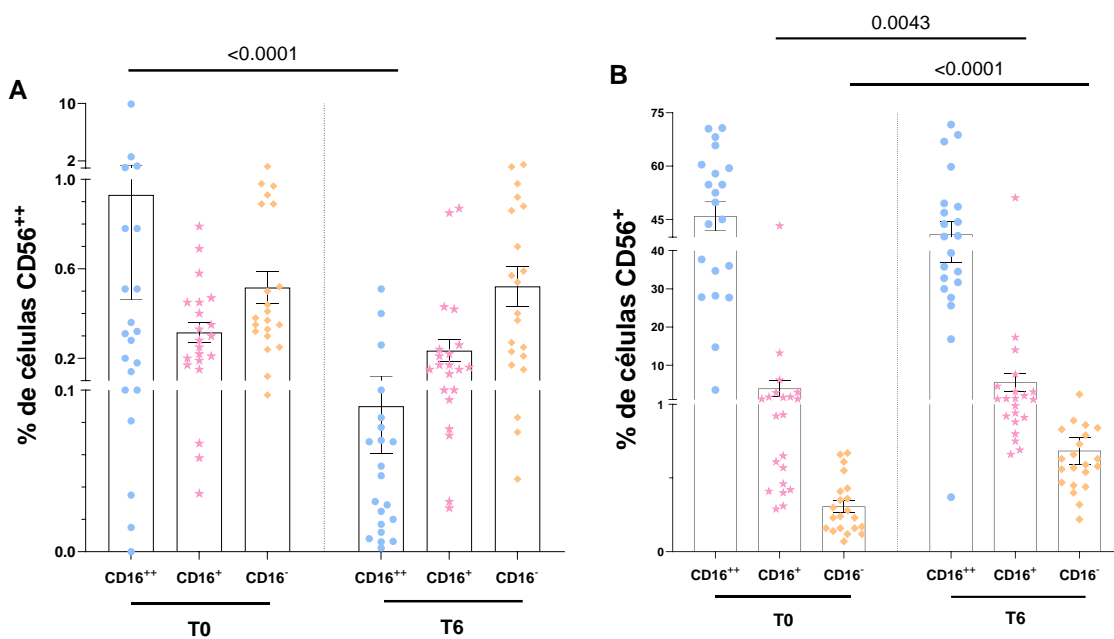


Figura 9. Subpoblaciones de células NK en sangre total antes (T0) y después de finalizar el tratamiento (T6). Las subpoblaciones se definieron en función de los niveles de expresión de CD56 y CD16. A) Porcentaje de células NK CD56⁺⁺CD16⁺⁺, CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻ B) Porcentaje de células NK CD56⁺CD16⁺⁺, CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁻. Las células de sangre total se tiñeron *ex vivo* para ser analizadas en el citómetro de flujo. Los resultados se expresan como media \pm SEM, n=21.

Respecto a las subpoblaciones de células NK *ex vivo*, en la Figura 9A se muestra los resultados de la subpoblación CD56⁺⁺ y se observa que el tratamiento anti-TB tuvo un impacto significativo ($p < 0.0001$) en la reducción de la subpoblación CD56⁺⁺CD16⁺⁺. En la Figura 9B, se muestra los resultados de la subpoblación de CD56⁺ y se puede observar que tanto en la subpoblación CD56⁺CD16⁺ (T0, media: 3.9%, T6, media: 5.5%) y CD56⁺CD16⁻ (T0, media: 0.31%, T6, media: 0.68%) se incrementan después de culminado el tratamiento ($p = 0.0043$ y $p < 0.0001$, respectivamente) comparado a T0 (Fig. 9B). Así mismo, observamos que los niveles de frecuencia de las subpoblaciones CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻, CD56⁺CD16⁺⁺ no cambian a lo largo del tratamiento.

7.3. Funcionalidad de células NK – *in vitro*

Dentro de las funciones de las células NK se describen la habilidad de realizar citotoxicidad contra células infectadas liberando gránulos conteniendo perforina y granzimas, asimismo tras su activación secretan citocinas pro-inflamatorias, principalmente IFN- γ que modula la respuesta inmune (26,27,53).

En esta investigación, se analizó la funcionalidad de las células NK provenientes de pacientes con TB activa en tratamiento antes (T0) y después del tratamiento (T6). Las CMSP, fuente de células NK, fueron cultivadas *in vitro* y estimuladas vía: receptor FcγRIII usando el complejo anticuerpos- proteína Ag85A (AgAb), y vía el receptor NKG2C usando la línea celular K562 las cuales carecen de MHC-I. Al completar las 5h de estímulo se analizó por citometría de flujo la producción de perforina e IFN-γ.

Tiempo	Tratamientos					
	CD16		AgAb		K562	
	T0	T6	T0	T6	T0	T6
<i>Expresión de IFN-γ(%)</i>						
CD16+	5.51 ± 1.61*	1.76 ± 0.52*	0.52 ± 0.12	1.04 ± 0.68	5.56 ± 0.75*	0.67 ± 0.26*
CD16-	0.92 ± 0.19	0.71 ± 0.46	3.14 ± 0.48*	1.07 ± 0.43*	5.50 ± 1.03*	0.36 ± 0.15*
<i>Expresión de Perforina (%)</i>						
CD16+	18.21 ± 4.25*	2.97 ± 1.01*	13.21 ± 3.77*	0.40 ± 0.38*	11.98 ± 3.20*	1.19 ± 0.36*
CD16-	0.13 ± 0.10	0.08 ± 0.05	0.42 ± 0.15	1.42 ± 0.75	1.02 ± 0.40	1.54 ± 0.50

Tabla 4. Niveles de IFN-γ y perforina producidos por las poblaciones de células NK totales expresando CD56 antes (T0) y después (T6) del tratamiento. La tabla muestra los niveles de producción de IFN-γ y perforina en células NK tras la estimulación con 1) anti-human - CD16 (control positivo), 2) el complejo antígeno 85 (Ag85) de *M. tuberculosis* y anticuerpos de un pool de plasma positivo a *Mtb* (TB+) (AgAb) y 3) co-cultivo con la línea celular K562 (K562). Los valores de IFN-γ y perforina producidos por células NK sin estímulo (solo medio) han sido sustraídos de cada tratamiento. Los datos se muestran como la media ± SEM, n = 20 y fueron analizados usando la prueba de Wilcoxon, con los valores de p<0.05* entre tiempos (T0 vs T6).

En la Tabla 4 se muestra la producción de IFN-γ y perforina por la población de células NK totales expresando CD56. Las poblaciones CD16⁺ y CD16⁻ tienen una significativa reducción en la capacidad de producir IFN-γ en respuesta al estímulo vía receptor FcγRIII con el complejo anticuerpos anti *Mtb*- proteína Ag85A (AgAb), así como, vía receptor NKG2C luego de completar el tratamiento anti-TB comparado a T0.

Respecto a la producción de perforina, tras la estimulación (vía FcγRIII y NKG2C), la población CD16⁺ también presentan una habilidad disminuida ($p < 0.05$) de producir perforina al completar el tratamiento anti-TB. Mientras, la población CD16⁻ no muestra diferencias en la respuesta frente a los diferentes estímulos tanto antes (T0) y después de completar el tratamiento (T6).

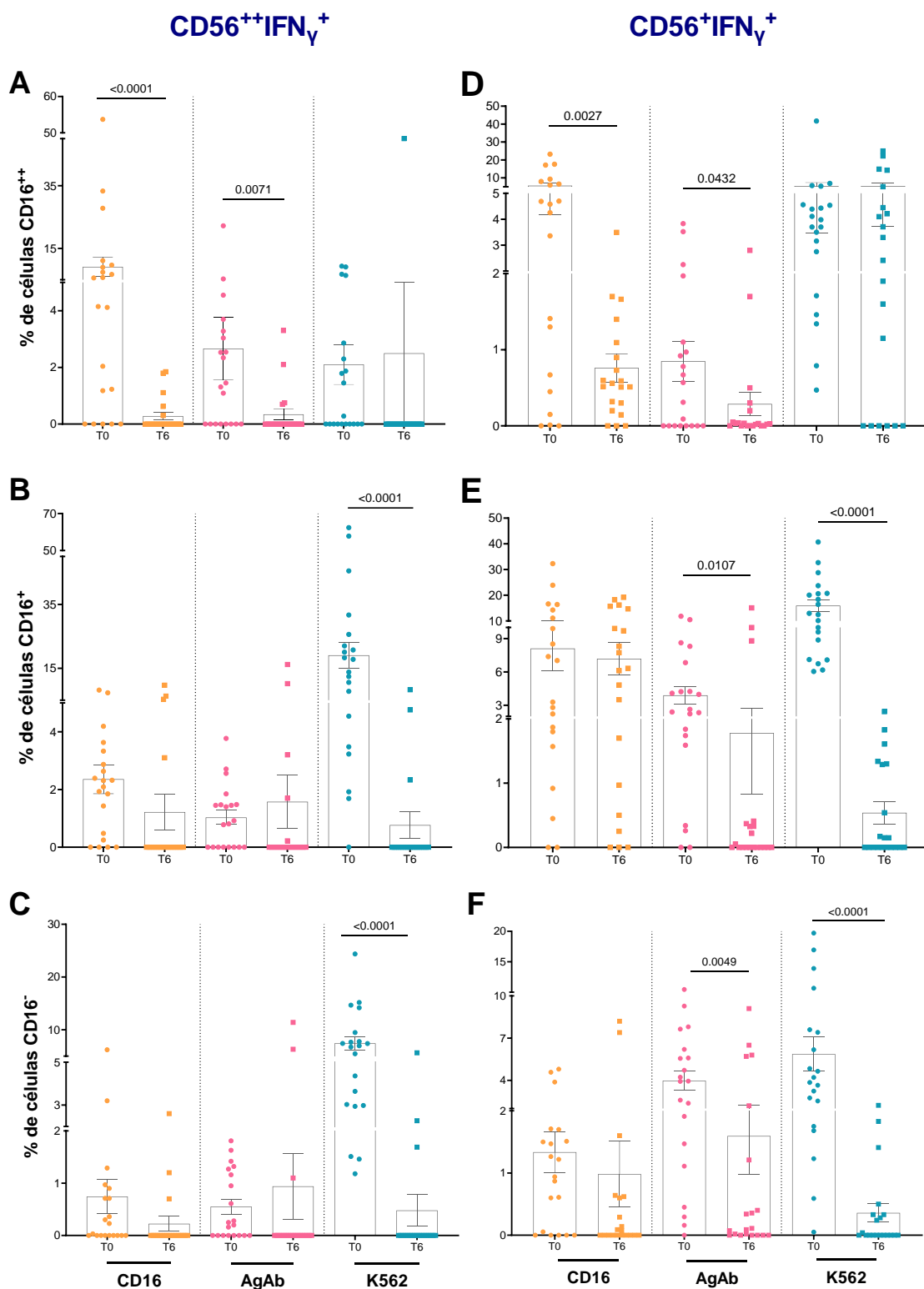


Figura 10. Producción de IFN- γ por las subpoblaciones de células NK antes (T0) y después (T6) del tratamiento. Los gráficos muestran la producción de IFN- γ en las subpoblaciones CD56⁺⁺CD16⁺⁺, CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻ (A, B, C) y CD56⁺CD16⁺⁺, CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁻ (D, E, F) de células NK tras la estimulación con, 1) anti-human - CD16 (control positivo), 2) el complejo antígeno

85 (Ag85) de *M. tuberculosis* con anticuerpos de un pool de plasma de pacientes positivos a *Mtb* (TB+) (AgAb) y 3 co-cultivo con la línea celular K562 (K562). Los resultados se presentan como la media \pm SEM, n=20. Los valores INF- γ producido por células NK sin estímulo (solo medio) han sido sustraídos de cada tratamiento.

En lo que respecta a la funcionalidad de las subpoblaciones de células NK, en la Figura 10, se observa que en las diferentes subpoblaciones: CD56⁺⁺CD16⁺⁺ (Fig. 10A) , CD56⁺CD16⁺⁺ (Fig. 10D), CD56⁺CD16⁺ (Fig. 10E) y CD56⁺CD16⁻ (Fig. 10F) hay una reducida capacidad de producir INF- γ en respuesta al estímulo vía receptor Fc γ RIII con el complejo anticuerpos anti-*Mtb*-Ag85A al finalizar el tratamiento anti-TB comparado a T0. Mientras, las subpoblaciones CD56⁺⁺CD16⁺ (Fig. 10B) , CD56⁺⁺CD16⁻ (Fig. 10C), CD56⁺CD16⁺ (Fig. 10E) y CD56⁺CD16⁻ (Fig. 10F) responden frente al estímulo vía receptor NKG2C y presentan habilidad disminuida de producir INF- γ luego del tratamiento anti-TB.

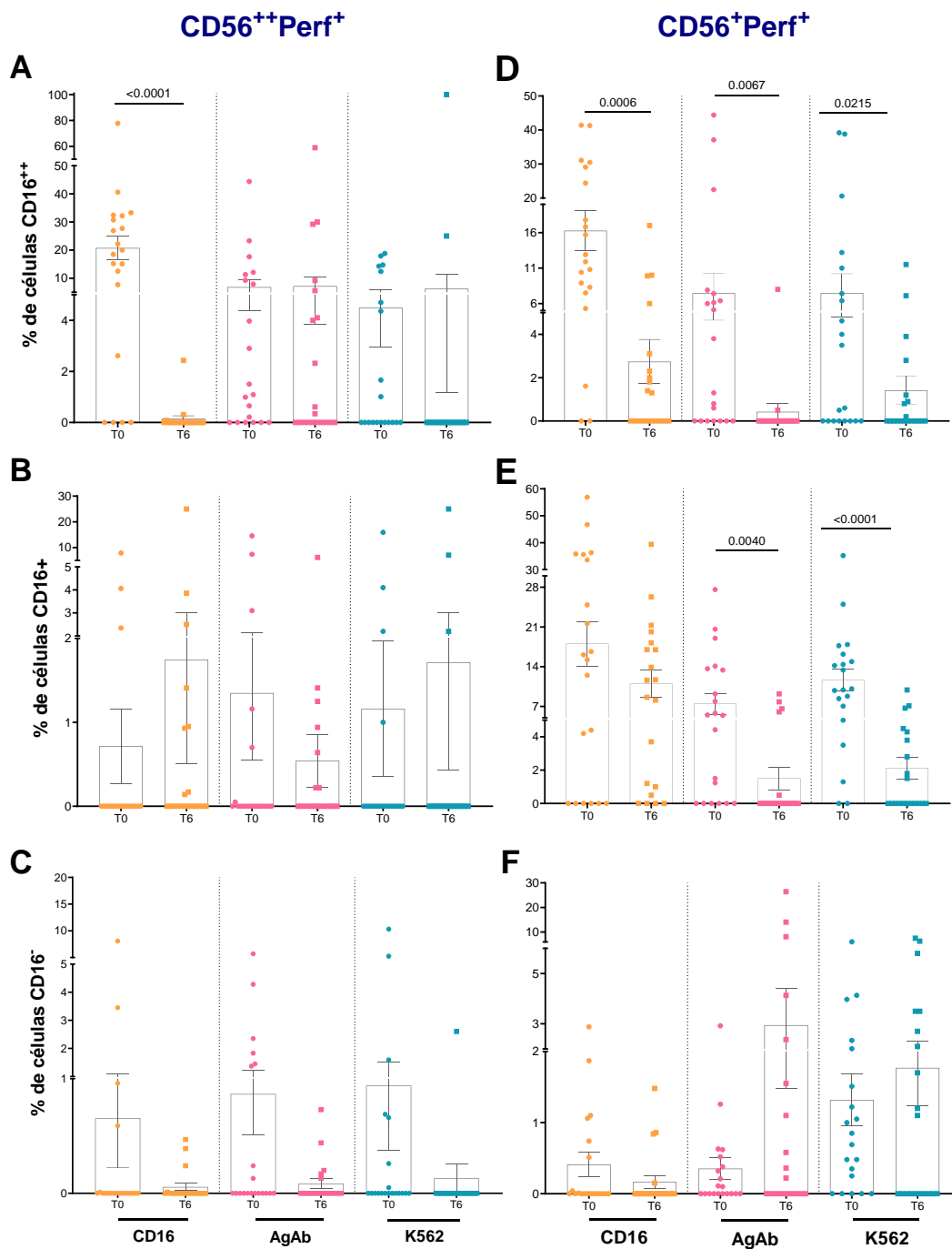


Figura 11. Producción de perforina por las subpoblaciones de células NK antes (T0) y después (T6 = 6 meses) del tratamiento. Los gráficos muestran la producción de perforina en las subpoblaciones CD56⁺⁺CD16⁺⁺, CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻ (A, B, C) y CD56⁺CD16⁺⁺, CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁻ (D, E, F) de células NK tras la estimulación con 1) anti-human - CD16 (CD16), 2) el complejo antígeno 85 (Ag85) de *M. tuberculosis* con anticuerpos de un pool de plasma de pacientes positivos a *Mtb* (TB+) (AgAb) y 3) co-cultivo con la línea celular K562 (K562). Los resultados se presentan como la media \pm SEM, n=20. Los valores de

perforina producidas por células NK sin estímulo (solo medio) han sido sustraídos de cada tratamiento.

Finalmente, en el análisis de las subpoblaciones de células NK: CD56⁺CD16⁺⁺ (Fig. 11D) y CD56⁺CD16⁺ (Fig. 11E) se observa que presentan una disminución en la producción de perforina al finalizar el tratamiento anti-TB tras el estímulo vía receptores FcγRIII con el complejo anticuerpos anti-*Mtb*-Ag85A al finalizar el tratamiento. Mientras, las subpoblaciones CD56⁺CD16⁺⁺ (Fig. 11D) y CD56⁺CD16⁺ (Fig. 11E) estimuladas vía receptor NKG2C también generaron niveles significativamente bajos de perforina luego del tratamiento anti-TB comparado a T0.

No se observó diferencias al comparar antes (T0) y al final del tratamiento (T6) en la respuesta a ninguno de los estímulos en las subpoblaciones CD56⁺⁺CD16⁺⁺, CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻ y CD56⁺CD16⁻ (Fig. 11A, B, C y F, respectivamente) para la producción de perforina.

VIII DISCUSIÓN

Los mecanismos inmunes específicos que controlan la progresión, así como los que contribuyen a la resolución de la tuberculosis no han sido completamente elucidados. En el contexto de TB pulmonar activa, los cambios en las poblaciones y funciones de las células NK permanecen poco explorados. Si bien las células NK son caracterizadas clásicamente por la expresión de CD56 y CD16, existen diferencias funcionales entre sus diversas poblaciones y subpoblaciones.

Diversos estudios en infecciones virales como VIH y ébola, entre otros, resaltan el rol funcional de las células NK y sugieren que podrían ser utilizadas como potenciales biomarcadores y en el desarrollo de terapias y/o vacunas. En este sentido, consideramos que es importante estudiar la inmunobiología de las células NK para el desarrollo de nuevas estrategias para combatir la tuberculosis. Por ejemplo, identificar parámetros inmunes que ayuden a los clínicos en el seguimiento de pacientes en tratamiento contra TB.

En la respuesta inmune en TB, se ha considerado a las células T como las responsables de la protección frente a *M. tuberculosis*, por ser un patógeno intracelular, sin embargo, las vacunas diseñadas para inducir esta respuesta, como la BCG, han demostrado eficacia limitada (4).

Las células NK desempeñarían un papel crucial contra *M. tuberculosis*. Es por ello, que en esta investigación se planteó evaluar el impacto del tratamiento contra TB pulmonar activa sobre la funcionalidad de las células NK. Este efecto podría generar cambios en los diferentes receptores de las células NK; y se conoce que las funciones de estas células dependen de receptores como: los FcγR, los cuales conectan la respuesta inmune innata y adaptativa, receptores de citocinas o receptores que detectan la presencia/ ausencia de MHC-I en las células *targets*, como los receptores NKG2C.

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio longitudinal que describe la dinámica de las células NK circulantes en pacientes con tuberculosis pulmonar activa bajo tratamiento. Este análisis establece una base de conocimiento que podría permitir futuras investigaciones más detalladas sobre la funcionalidad de las células NK en el contexto de TB.

Nuestro análisis *ex vivo* sobre las células NK muestran que hay cambios en algunas de las poblaciones y subpoblaciones. En la población de células NK totales CD56 que no expresan CD16 (Tabla 3), así como en la subpoblación CD56⁺CD16⁻ (Figura 9) se observa un aumento en los niveles al finalizar el tratamiento. Estas poblaciones se caracterizan por producir citoquinas y podrían estar incrementadas debido a una posible inflamación residual. Otra subpoblación que aumenta significativamente al finalizar el tratamiento es CD56⁺CD16⁺, el cual es un fenotipo citotóxico por la expresión de CD16 y que normalmente se encuentra con mayor frecuencia en sangre periférica de personas sanas (54) por lo que el aumento de su frecuencia en sangre sugeriría la recuperación de los pacientes (evidenciado por los resultados de frotis de esputo: negativo en todos los pacientes al final del tratamiento). Los bajos niveles de esta subpoblación durante la infección activa de TB (T0) podría deberse a una posible migración de estas células hacia los principales órganos afectados, sin embargo, una vez contralada la enfermedad (T6) se mantendrían en circulación periférica para cumplir su función de vigilancia inmunológica, así como, la eliminación de posibles células infectadas.

Por otro lado, la disminución de la subpoblación CD56⁺⁺CD16⁺⁺ al finalizar el tratamiento indicaría una reducida actividad citotóxica debido a una reducida carga bacteriana, evidenciado por los resultados de BK en esputo en el cual al completar el tratamiento no hay presencia de bacteria en la muestra analizada. Sin embargo, esta no

sería su principal función ya que este fenotipo también se caracteriza por ser productor de citocinas.

Similar a los resultados hallados en nuestra investigación, se ha reportado que el fenotipo de células NK con alta expresión de CD56 (CD56⁺⁺ en nuestro estudio) también disminuye tras seis meses de tratamiento, lo que podría estar asociado a la movilización de las células NK hacia otros compartimientos tisulares (38). Del mismo modo, en TB pulmonar activa se observó una ligera disminución del porcentaje células CD56⁺CD16^{+/-} y producción de IFN- γ que se mantuvo hasta el cumplimiento del tratamiento (21). Un estudio reportó que el fenotipo CD56⁺CD16⁺ estuvo disminuido en pacientes con TB activa comparado a sujetos sanos, sugiriendo que la infección impacta los niveles de células NK (34). Estos resultados sugieren el rol importante de los diferentes fenotipos de células NK en la interacción con *Mtb*.

En base a nuestros resultados, también observamos que hay poblaciones de células NK que no tienen cambios en sus niveles circulantes como son: CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻, CD56⁺CD16⁺⁺. Estas poblaciones, al parecer, no se ven afectadas por la infección con *Mtb* y podrían tener un rol vigilante (adicional a producir IFN- γ y perforina) a lo largo del tratamiento y en la infección activa.

Para evaluar la funcionalidad de las células NK nos enfocamos particularmente en la respuesta frente a estímulos de los receptores Fc γ RIII (CD16) y NKG2C a lo largo del tratamiento anti-TB. Las células NK pueden ser activadas bajo diferentes vías como receptores Fc γ RIII, NKG2D, NKG2C, Nkp44 (53), entre otros, y como consecuencia de su activación estas células producen citoquinas proinflamatorias como el interferón o liberan gránulos conteniendo perforinas, granzimas o granzulina (26,53).

Con respecto a la producción de IFN- γ nuestros resultados en pacientes con TB pulmonar activa bajo tratamiento, muestran que las poblaciones de células NK totales expresando CD56 que expresan o no CD16 tras ser activadas vía receptores Fc γ RIII y/o NKG2C presentan una disminuida habilidad de producir IFN- γ al completar el tratamiento (T6) probablemente a que una vez resuelta la enfermedad estas células disminuyen sus niveles de activación.

Respecto a las subpoblaciones de células NK, todas responden frente al estímulo vía receptores Fc γ RIII y/o NKG2C a diferentes niveles para cada una. Así CD56⁺⁺CD16⁺⁺,

CD56⁺CD16⁺⁺, CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁻ son activadas vía receptores FcγRIII y las subpoblaciones CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺⁺CD16⁻, CD56⁺CD16⁺ y CD56⁺CD16⁻ son activadas vía receptores NKG2C. Todas estas poblaciones presentaron una alta habilidad de producir IFN-γ al momento de la infección activa (T0), sin embargo, luego del tratamiento disminuyen su habilidad. Esto indicaría que la producción de esta citoquina proinflamatoria por parte de estas poblaciones de células NK ya no sería necesaria para combatir a la micobacteria tras la finalización del tratamiento, ya que la carga bacteriana ya estaría completamente reducida. Estudios previos también han mostrado que en la tuberculosis pulmonar activa hay un mayor porcentaje de células NK productoras de IFN-γ (55,56). Asimismo, Wang (37) reportó que hay una disminución en la producción de IFN-γ después del tratamiento, lo que se asoció con una menor expresión de la vía Tim-3. Sin embargo, en contraste con nuestros hallazgos, también se ha reportado una producción temprana de IFN-γ producido por las células NK del pulmón de ratones infectados previamente con *Mtb*, seguido de un tiempo de inactivación y finalmente un aumento de estas células (57), además, Pitabut (36) y Garand (35) reportaron que las células NK incrementaron su producción de IFN-γ al finalizar el tratamiento. Estos hallazgos sugieren que la producción de esta citoquina se intensifica a medida que la infección progresa.

Asimismo, se observa algunas subpoblaciones de células NK que se mantienen funcionales sin variación en la producción de IFN-γ tanto al momento de la infección activa y al finalizar el tratamiento: CD56⁺⁺CD16^{+/-} tras la activación vía receptores Fcγ, mientras que CD56⁺⁺CD16⁺⁺ y CD56⁺CD16⁺⁺ tras la activación vía receptores NKG2C. Al parecer la infección por *Mtb* no tendría un efecto sobre estas poblaciones y sería importante descifrar su rol en la infección.

En cuanto a la habilidad de las células NK para producir perforinas, una molécula que abre poros en la membrana de los patógenos y células infectadas para posteriormente lizarlas, se encontró que las células NK totales expresando CD56 que expresan CD16 son activadas vía receptores FcγRIII y/o NKG2C, pero muestran una habilidad disminuida de liberar perforina al completar el tratamiento (T6) comparado al T0. Sin embargo, no se observa cambios en la funcionalidad de células NK totales CD56 que no expresan CD16, en las cuales no varía su habilidad de producir perforina al completar el tratamiento (T6) comparado antes del tratamiento (T0).

Sin embargo, las subpoblaciones CD56⁺⁺CD16⁺⁺, CD56⁺CD16⁺⁺, CD56⁺CD16⁺ al ser activadas vía receptores FcγRIII y las subpoblaciones CD56⁺⁺CD16⁺⁺ y CD56⁺CD16⁺ activadas vía receptores NKG2C muestran una disminuida habilidad de producir perforina al completar el tratamiento (T6) comparado al T0. Todas estas poblaciones tienen una alta habilidad de producir perforinas cuando los pacientes presentan la infección y se reduce al completar el tratamiento. Esto nos indica que el nivel de citotoxicidad, o la capacidad de las células NK para destruir células infectadas, podría ser menor debido a la disminución de células infectadas por la micobacteria, como resultado de la reducción de la carga bacteriana. Contrario a nuestros resultados, Kathamuthu, *et al* (58) señala que en el sitio de la infección por *Mtb* hay una menor frecuencia de células NK expresando marcadores citotóxicos en pacientes con linfadenitis tuberculosa antes del tratamiento y esto podría reflejar la falta de protección contra la infección. Así mismo, otro estudio señala un incremento en los niveles de IFN-γ y perforina producidas por células NK (36), así como, del marcador de degranulación CD107 al finalizar el tratamiento antituberculoso (35).

Si bien se han encontrado estudios que soportan nuestros hallazgos, no podemos negar la existencia de investigaciones que reportan hallazgos distintos a los nuestros. Esto podría deberse a los distintos estímulos que se utilizaron para activar a las células, las características de la población estudiada o las distintas estrategias de selección de las poblaciones de las células NK.

Por otra parte, nuestros resultados indicarían que tanto los receptores FcγRIII como NKG2C se encuentran funcionales, ya que se ha observado que tanto al inicio como al final del tratamiento estos responden a los estímulos y logran activar a las distintas poblaciones y subpoblaciones de células NK estudiadas. Este hallazgo sugiere evaluar otras vías de activación de las células NK y en un futuro poder educar esta población para ser usada en tratamientos terapéuticos no solo contra la tuberculosis sino también en otras enfermedades como VIH o cáncer. Por ejemplo, se ha visto que el uso de células NK educadas en terapia contra el cáncer tiene mucho potencial, sin embargo, existen algunas limitaciones que necesitan investigarse (59).

En síntesis, nuestra investigación muestra que las células NK cumplen un papel dinámico en la respuesta contra *Mtb*, ya que a lo largo de la enfermedad cambian su fenotipo y funciones para combatir la infección. Así mismo, sugiere que estas células podrían ser

utilizadas como potenciales biomarcadores de seguimiento al tratamiento del paciente, incluso ser utilizadas en el desarrollo de inmunoterapias y/o vacunas considerando que las células NK presentan capacidad de memoria inmunológica, una característica que se podría explotar no solo contra la tuberculosis sino también contra otras infecciones bacterianas o virales. Aunque se trata de un estudio exploratorio con un tamaño muestral limitado, nuestros resultados establecen una base valiosa para investigaciones futuras más amplias y controladas.

IX CONCLUSIONES

1. A lo largo del tratamiento anti-TB, la frecuencia de las poblaciones de células NK (CD56⁺), con o sin expresión de CD16, presentaron variaciones que reflejan cambios inmunológicos probablemente asociados al control de la infección.
2. Tras el tratamiento exitoso, la frecuencia de las subpoblaciones CD56⁺CD16⁺ y CD56⁺CD16⁻ se incrementó, mientras que la proporción de células CD56⁺⁺CD16⁺⁺ muestra una reducción.
3. A lo largo del tratamiento, las diferentes poblaciones y subpoblaciones de células NK se activan vía receptores FcγRIII y/o NKG2C, pero tienen una producción diferencial de IFN-γ y perforina al completar el tratamiento (T6).

X LIMITACIONES

1. Las muestras de sangre de esta investigación provenían de otro proyecto, por lo que estuvo sujeta a la cantidad de pacientes que dicho proyecto enrolaba.
2. La pérdida de adherencia de los pacientes enrolados fue una limitación importante, ya que de esta manera se perdió pacientes a lo largo del tiempo de estudio.
3. No se evaluó los niveles de INF-γ y perforina *ex vivo* en las diferentes poblaciones y subpoblaciones de células NK.

XI RECOMENDACIONES FUTURAS

1. Esta investigación evaluó el comportamiento de las células NK activadas vía receptores FcγRIII y NKG2C, sin embargo, sería interesante evaluar otras vías de activación por ejemplo la activación vía citoquinas IL-18 o IL-15, entre otras.

2. Evaluar más tiempos a lo largo del tratamiento (2 meses) para poder conocer el estado de las células NK y tiempos luego del tratamiento (1 año o más) para asociarlo a recaídas.
3. Repetir este estudio con una cohorte más amplia de pacientes, que permita evaluar si las células NK podrían ser validadas como biomarcadores inmunológicos de respuesta al tratamiento.
4. Incluir controles sanos para determinar con mayor precisión el grado de alteración y recuperación inmunológica.

XII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Tuberculosis Report 2024. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2024. 1 p.
2. World Health Organization. Tuberculosis [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
3. Fatima S, Kumari A, Das G, Dwivedi VP. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sci.* julio de 2020; 252:117594.
4. Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Prospects in Mycobacterium bovis Bacille Calmette et Guérin (BCG) Vaccine Diversity and Delivery: Why does BCG fail to protect against Tuberculosis? *Vaccine.* 22 de septiembre de 2015;33(39):5035-41.
5. Ministerio de Salud, Dirección General de Intervenciones Estratégicas en Salud Pública, Dirección de Prevención y Control de Tuberculosis (MINSA/DGIESP/DPCTB). Norma técnica de salud para el cuidado integral de la persona afectada por Tuberculosis, familia y comunidad. Perú; 2023. Report No.: 200.
6. Ministerio de Salud. MANEJO DE LA TUBERCULOSIS. CAPACITACIÓN PARA EL PERSONAL DEL ESTABLECIMIENTO DE SALUD. MÓDULO 3: TRATAMIENTO DE PERSONAS CON TUBERCULOSIS [Internet]. Disponible en: <https://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1797.pdf>
7. World Health Organization. Global tuberculosis report 2022 [Internet]. World Health Organization; 2022 [citado 27 de diciembre de 2022]. xiii, 51 p. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/363752>

8. Carabalí-Isajar M, Rodríguez Bejarano O, Amado T, Patarroyo M, Izquierdo M, Peña JR, et al. Clinical manifestations and immune response to tuberculosis. *World J Microbiol Biotechnol*. 24 de mayo de 2023; 39:206.
9. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 16 de noviembre de 2013;5(1):e2013070.
10. Karbalaee Zadeh Babaki M, Soleimanpour S, Rezaee SA. Antigen 85 complex as a powerful Mycobacterium tuberculosis immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. *Microb Pathog*. noviembre de 2017;112:20-9.
11. Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. Disruption of the Genes Encoding Antigen 85A and Antigen 85B of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: Effect on Growth in Culture and in Macrophages. *Infect Immun*. febrero de 2000;68(2):767-78.
12. Valdemar-Aguilar CM, Manisekaran R, Acosta-Torres LS, López-Marín LM. Spotlight on mycobacterial lipid exploitation using nanotechnology for diagnosis, vaccines, and treatments. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 1 de febrero de 2023;48:102653.
13. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol*. diciembre de 2017;14(12):963-75.
14. Sasindran S, Torrelles J. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Front Microbiol* [Internet]. 2011 [citado 3 de enero de 2023];2. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00002>
15. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primer*. 27 de octubre de 2016 ;2(1) :1-23.
16. Chandra P, Grigsby SJ, Philips JA. Immune evasion and provocation by Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol*. diciembre de 2022 ;20(12):750-66.

17. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*. 7 de enero de 2011;331(6013):44-9.
18. Rahman M, Bordoni B. Histology, Natural Killer Cells. En: StatPearls [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK565844/>
19. Picard LK, Claus M, Fasbender F, Watzl C. Human NK cells responses are enhanced by CD56 engagement. *Eur J Immunol*. 2022;52(9):1441-51.
20. Cooper MA, Caligiuri MA. Isolation and Characterization of Human Natural Killer Cell Subsets. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. abril de 2004 [citado 27 de diciembre de 2022];60(1). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im0734s60>
21. Choreño Parra JA, Martínez Zúñiga N, Jiménez Zamudio LA, Jiménez Álvarez LA, Salinas Lara C, Zúñiga J. Memory of Natural Killer Cells: A New Chance against *Mycobacterium tuberculosis*? *Front Immunol*. 14 de agosto de 2017;8:967.
22. Pfefferle A, Jacobs B, Haroun-Izquierdo A, Kveberg L, Sohlberg E, Malmberg KJ. Deciphering Natural Killer Cell Homeostasis. *Front Immunol*. 12 de mayo de 2020;11:812.
23. Islam R, Pupovac A, Evtimov V, Boyd N, Shu R, Boyd R, et al. Enhancing a Natural Killer: Modification of NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Cells*. mayo de 2021;10(5):1058.
24. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:10.1146/annurev-immunol-020711-75005.
25. Marcenaro E, Ferranti B, Falco M, Moretta L, Moretta A. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol*. 1 de septiembre de 2008;20(9):1155-67.
26. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol* [Internet]. 2018

[citado 23 de enero de 2023];9. Disponible en:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01869>

27. Bernard NF, Alsulami K, Pavey E, Dupuy FP. NK Cells in Protection from HIV Infection. *Viruses*. 25 de mayo de 2022;14(6):1143.
28. Vicente MM, Alves I, Gaifem J, Rodrigues CS, Fernandes Â, Dias AM, et al. Altered IgG glycosylation at COVID-19 diagnosis predicts disease severity. *Eur J Immunol*. junio de 2022;52(6):946-57.
29. Gehring AJ, Mendez P, Richter K, Ertl H, Donaldson EF, Mishra P, et al. Immunological biomarker discovery in cure regimens for chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. agosto de 2022;77(2):525-38.
30. Allen M, Bailey C, Cahatol I, Dodge L, Yim J, Kassissa C, et al. Mechanisms of Control of Mycobacterium tuberculosis by NK Cells: Role of Glutathione. *Front Immunol* [Internet]. 5 de octubre de 2015 [citado 27 de octubre de 2022];6. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00508/abstract>
31. Dhiman R, Venkatasubramanian S, Paidipally P, Barnes PF, Tvinnereim A, Vankayalapati R. Interleukin 22 Inhibits Intracellular Growth of Mycobacterium tuberculosis by Enhancing Calgranulin A Expression. *J Infect Dis*. 15 de febrero de 2014;209(4):578-87.
32. Flaherty DK, editor. Chapter 12 - Phagocytosis and Intracellular Killing. En: *Immunology for Pharmacy* [Internet]. Saint Louis: Mosby; 2012 [citado 1 de enero de 2023]. p. 97-101. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323069472100124>
33. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell*. octubre de 2016;167(2):433-443.e14.
34. Zhou Y, Lan H, Shi H, Wu P, Zhou Y. Evaluating the diversity of circulating natural killer cells between active tuberculosis and latent tuberculosis infection. *Tuberculosis*. julio de 2022;135:102221.

35. Garand M, Goodier M, Owolabi O, Donkor S, Kampmann B, Sutherland JS. Functional and Phenotypic Changes of Natural Killer Cells in Whole Blood during Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease. *Front Immunol*. 19 de febrero de 2018;9:257.
36. Pitabut N, Dhepakson P, Sakurada S, Keicho N, Khusmith S. Coordinated In Vitro Release of Granulysin, Perforin and IFN- γ in TB and HIV/TB Co-Infection Associated with Clinical Outcomes before and after Anti-TB Treatment. *Pathogens*. 14 de agosto de 2020;9(8):655.
37. Wang F, Hou H, Wu S, Tang Q, Huang M, Yin B, et al. Tim-3 pathway affects NK cell impairment in patients with active tuberculosis. *Cytokine*. diciembre de 2015;76(2):270-9.
38. Maseko TG, Rambaran S, Ngubane S, Lewis L, Ngcapu S, Hassan-Moosa R, et al. NK cell phenotypic profile during active TB in people living with HIV-evolution during TB treatment and implications for bacterial clearance and disease severity. *Sci Rep*. 20 de julio de 2023;13:11726.
39. Nava Paz O, Hassanhi M, Prieto L. Evaluación de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. *Kasmera*. julio de 2005;33(2):119-31.
40. MINSA. Manuales de Capacitación para el Manejo de la Tuberculosis [Internet]. Vol. 2. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1796.pdf>
41. Peloquin CA, Davies GR. The Treatment of Tuberculosis. *Clin Pharmacol Ther*. diciembre de 2021;110(6):1455-66.
42. Piatek AS, Cleeff MV, Alexander H, Coggin WL, Rehr M, Kampen SV, et al. GeneXpert for TB diagnosis: planned and purposeful implementation. *Glob Health Sci Pract*. 1 de marzo de 2013;1(1):18-23.
43. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. mayo de 2011;11(5):343-54.

44. Schmidt S, Tramsen L, Rais B, Ullrich E, Lehrnbecher T. Natural killer cells as a therapeutic tool for infectious diseases - current status and future perspectives. *Oncotarget*. 17 de abril de 2018;9(29):20891-907.
45. Zenere G, Olwenyi OA, Byrareddy SN, Braun SE. Optimizing intracellular signaling domains for CAR NK cells in HIV immunotherapy: a comprehensive review. *Drug Discov Today*. abril de 2019;24(4):983-91.
46. Abebe F. Immunological basis of early clearance of *Mycobacterium tuberculosis* infection: the role of natural killer cells. *Clin Exp Immunol*. 1 de abril de 2021;204(1):32-40.
47. Fu X, Yu S, Yang B, Lao S, Li B, Wu C. Memory-Like Antigen-Specific Human NK Cells from TB Pleural Fluids Produced IL-22 in Response to IL-15 or *Mycobacterium tuberculosis* Antigens. *PLOS ONE*. 31 de marzo de 2016;11(3):e0151721.
48. Manterola C, Quiroz G, Salazar P, García N. Metodología de los tipos y diseños de estudio más frecuentemente utilizados en investigación clínica. *Rev Médica Clínica Las Condes*. enero de 2019;30(1):36-49.
49. Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. *Biochem Medica*. 15 de febrero de 2021;31(1):010502.
50. Yamazaki T, Hokibara S, Shigemura T, Kobayashi N, Honda K, Umeda Y, et al. Markedly elevated CD64 expressions on neutrophils and monocytes are useful for diagnosis of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome during flares. *Clin Rheumatol*. mayo de 2014;33(5):677-83.
51. Giacoia-Gripp CBW, Cazote A da S, da Silva TP, Sant'Anna FM, Schmaltz CAS, Brum T de S, et al. Changes in the NK Cell Repertoire Related to Initiation of TB Treatment and Onset of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in TB/HIV Co-infected Patients in Rio de Janeiro, Brazil—ANRS 12274. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [citado 27 de diciembre de 2022];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01800>

52. Vargas-Inchaustegui DA, Ying O, Demberg T, Robert-Guroff M. Evaluation of Functional NK Cell Responses in Vaccinated and SIV-Infected Rhesus Macaques. *Front Immunol* [Internet]. 31 de agosto de 2016 [citado 27 de octubre de 2022];7. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00340/abstract>
53. Monserrat Sanz J, García Torrijos C, Díaz Martín D, Prieto Martín A. Linfocitos natural killer. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. marzo de 2013;11(28):1728-36.
54. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*. 15 de mayo de 2001;97(10):3146-51.
55. Niño VE, García LF, Rojas M, Campo V, Ávila G, Klínger JC, et al. Aumento del porcentaje de células CD56 + CD3 + productoras de IFN- γ en pacientes con tuberculosis activa tras la estimulación de células mononucleares periféricas con CFP-10. *Tuberculosis*. 1 de diciembre de 2014;94(6):589-98.
56. Ramana Rao PV, Rajasekaran S, Raja A. Natural Killer Cell–Mediated Cytokine Response Among HIV-Positive South Indians With Pulmonary Tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res*. enero de 2010;30(1):33-42.
57. Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raulet DH, et al. NK Cells Respond to Pulmonary Infection with *Mycobacterium tuberculosis* , but Play a Minimal Role in Protection. *J Immunol*. 1 de diciembre de 2003;171(11):6039-45.
58. Kathamuthu GR, Moideen K, Sridhar R, Baskaran D, Babu S. Diminished Frequencies of Cytotoxic Marker Expressing T- and NK Cells at the Site of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front Immunol* [Internet]. 25 de septiembre de 2020 [citado 14 de enero de 2025];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.585293/full>
59. Niu Z, Wang M, Yan Y, Jin X, Ning L, Xu B, et al. Challenges in the Development of NK-92 Cells as an Effective Universal Off-the-Shelf Cellular Therapeutic. *J Immunol*. 18 de septiembre de 2024;213(9):1318-28.

