

Evaluación de efectores de citotoxicidad (Granzima B y Perforina) en células inmunes
de pacientes con tuberculosis pulmonar activa sensible a tratamiento

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

AUTOR(ES)

ALESSIA LUCILA PIAMONTE FLORES

ASESOR(ES)

ISKRA TUERO OCHOA

CO-ASESOR(ES)

SANDRA PATRICIA PALMA ALBORNOZ

LIMA-PERÚ

2025

Jurado calificador

Presidente: Dra. Katherine Jessica Torres Fajardo

Vocal: Dra. Nancy Chile Andrade

Secretario: Mg. Teresa Victoria Barreto Gaviria

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	PIAMONTE FLORES ALESSIA LUCILA

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **Evaluación de efectores de citotoxicidad (Granzima B y Perforina) en células inmunes de pacientes con tuberculosis pulmonar activa sensible a tratamiento**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	TUERO OCHOA ISKRA	FACI	ASESOR
2.	PALMA ALBORNOZ SANDRA PATRICIA	FACI	COASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **17%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3625711494**; fecha de entrega: **10/08/2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 10 de agosto de 2026**



Iskra Tuero Ochoa

N° DNI: 23932342

ORCID: 0000-0002-5788-1051



Firma del Co-asesor

N° DNI: 10743981

ORCID: 0000-0001-9638-8529

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS	3
1.2. TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE TB EN EL PERÚ	3
1.3. INFECCIÓN POR <i>M. TUBERCULOSIS</i>	4
1.4. CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE A <i>M. TUBERCULOSIS</i>	4
1.4.1 GRANULOCITOS	5
1.4.2 CÉLULAS B	7
1.4.3 CÉLULAS ASESINAS NATURALES O <i>NATURAL KILLER</i> (NK)	8
1.4.4 CÉLULAS T CD8+	10
1.4.5 CÉLULAS T NK (NKT)	10
1.4.6 MOLÉCULAS EFECTORAS DE CITOTOXICIDAD: PERFORINA Y GRANZIMA B	11
1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1.6 JUSTIFICACIÓN	15
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GENERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 TIPO DE ESTUDIO	17
3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	17
3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	17
3.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	17
3.3 TAMAÑO DE MUESTRA	18
3.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN PERFORINA Y GRANZIMA B EN CÉLULAS INMUNES	18
3.5 PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN	19
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
IV. RESULTADOS	21
4.1. COHORTE DE PACIENTES CON TB PULMONAR ACTIVA SENSIBLE	21
4.2. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	22
4.2.1 PARA CÉLULAS B Y GRANULOCITOS	22
4.2.2 PARA CÉLULAS NK Y T CD8+	23
4.2.3 PARA CÉLULAS INKT	24
4.3. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS INMUNES A LO LARGO DEL TRATAMIENTO CONTRA TB.	26
4.4. EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS MEDIADORAS DE CITOTOXICIDAD PRODUCIDAS POR CÉLULAS INMUNES INNATAS.	28
4.5. EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS MEDIADORAS DE CITOTOXICIDAD PRODUCIDAS	

POR CÉLULAS INMUNES ADAPTATIVAS.	30
4.6. EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS INMUNES (FENOTIPO CELULAR) Y TIEMPO DE TRATAMIENTO.	33
4.7. EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS EFECTORAS DE CITOTOXICIDAD (PRF+/GrzB+) Y TIEMPO DE TRATAMIENTO.	34
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	41
VII. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES	42
VII. BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

Anualmente, la tuberculosis (TB) causa millones de muertes a nivel mundial, constituyendo un problema de salud pública de gran magnitud. El control de la epidemia global se ve afectado por varios factores, entre los que se incluyen la ausencia de una vacuna efectiva, la resistencia a antibióticos y la falta de pruebas eficientes de seguimiento al tratamiento.

Luego de la infección, la primera línea de defensa está mediada por células del sistema inmune innato, seguida por activación de la respuesta inmune adaptativa. Si bien se ha descrito que las células T jugarían un rol importante en la protección contra la enfermedad, existen otras células, como las células NK, granulocitos y células B que producen moléculas como perforina y granzima B que contribuyen en la respuesta frente a la infección por *M. tuberculosis*. Aunque, existe un creciente interés en comprender la inmunología de TB, la mayoría de los estudios no se enfocan en cómo evoluciona la respuesta inmune a lo largo del tratamiento. Este conocimiento es esencial para realizar un pronóstico más preciso sobre la evolución del paciente.

En ese sentido, nuestro estudio evaluó los fenotipos y funciones de células T CD8⁺, B, granulocitos, NK y NKT en pacientes antes de iniciar tratamiento y, hasta completar el tratamiento anti-TB. Nuestra hipótesis señala que las células inmunes cambian su habilidad de producir mediadores citotóxicos (perforina, granzima B) tras recibir el tratamiento. Aunque los niveles de neutrófilos y células B no variaron significativamente, se observaron cambios funcionales en su actividad citotóxica. Por otro lado, las células NK, CD8⁺ y NKT mostraron un aumento de su función citotóxica, especialmente en la producción de perforina. Estos resultados nos permitieron identificar mecanismos inmunes que ayuden a establecer herramientas en la clínica para beneficio del paciente. Asimismo, el conocimiento a futuro ayudaría a que se diseñen vacunas más efectivas, implementación de inmunoterapias e identificación de biomarcadores de respuesta al tratamiento.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, Células NK, Células T, Granulocitos, Células B, Inmunobiología.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) causes millions of deaths worldwide annually, constituting a major public health problem. Control of the global epidemic is hampered by several factors, including the lack of an effective vaccine, antibiotic resistance, and a lack of efficient treatment follow-up testing.

After infection, the first line of defense is mediated by cells of the innate immune system, followed by activation of the adaptive immune response. While T cells have been described as playing an important role in protection against the disease, other cells, such as NK cells, granulocytes, and B cells, produce molecules like perforin and granzyme B, which contribute to the response to *M. tuberculosis* infection. Although there is growing interest in understanding the immunology of TB, most studies do not focus on how the immune response evolves throughout treatment. This knowledge is essential for more accurate prognostication of patient outcomes.

In this regard, our study evaluated the phenotypes and functions of CD8⁺ T cells, B cells, granulocytes, NK cells, and NKT cells in patients before starting treatment and until completing anti-TB treatment. Our hypothesis is that immune cells change their ability to produce cytotoxic mediators (perforin, granzyme B) after receiving treatment. Although neutrophil and B cell levels did not vary significantly, functional changes in their cytotoxic activity were observed. Furthermore, NK, CD8⁺, and NKT cells showed an increase in their cytotoxic function, especially in the production of perforin. These results allowed us to identify immune mechanisms that help establish clinical tools for patient benefit. Furthermore, future knowledge would aid in the design of more effective vaccines, the implementation of immunotherapies, and the identification of biomarkers of treatment response.

Keywords: *Mycobacterium Tuberculosis*, NK cells, T cells, Neutrophils, B cells, Immunobiology

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB), enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ha afectado al hombre durante miles de años y lo continúa haciendo, causando muertes en todo el mundo. Según el informe mundial sobre la tuberculosis 2024 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estimó que, en el 2023, un total de 10.8 millones de personas se enfermaron con TB y 1.09 millones de personas fallecieron a causa de la enfermedad ^[1].

En Perú, anualmente se notifican alrededor de 27 mil casos nuevos de tuberculosis activa y 17 mil casos nuevos de tuberculosis pulmonar diagnosticados mediante frotis de esputo positivo. El Perú es uno de los países con mayor cantidad de casos de tuberculosis activa en las Américas ^[2]. Según el boletín informativo 2024 de la sala situacional de TB del Ministerio de Salud (MINSA), se registraron 33 mil casos de morbilidad y 31 mil nuevos casos, incluyendo recaídas. Además, se observa que la tasa de letalidad ha alcanzado su nivel más alto en más de 30 años de seguimiento en nuestro país, y la tasa de pérdida de seguimiento de TB sensible es 7.7 siendo la más alta desde 2018^[3].

1.2. TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE TB EN EL PERÚ

La tuberculosis es una enfermedad tratable y curable. Los medicamentos que se usan con más frecuencia son isoniacida (H), rifampicina (R), etambutol (E) y pirazinamida (Z). En el Perú, el MINSA establece una pauta de 6 meses, donde se incluyen 2 fases: una fase inicial en los 2 primeros meses, durante la que se administra H, R, E, Z diariamente; y una fase de consolidación en los meses restantes, donde se administra R y H tres veces por semana hasta el sexto mes ^[4]. Para el seguimiento del tratamiento contra TB, el MINSA ha establecido que, en cada centro de salud, se realice la prueba de frotis de esputo. Además de ello, se realiza una radiografía de tórax, que permite evaluar la extensión de la enfermedad pulmonar, su evolución y sus secuelas ^[5]. El cultivo de micobacterias en medio sólido o líquido también es recomendado, pero no es

accesible en todos los centros de atención primaria y tiene la limitación de tomar varios días para el crecimiento bacteriano para obtener los resultados, por lo que únicamente se utiliza en casos especiales ^[6].

Considerando las limitaciones en el seguimiento de la tuberculosis, el uso de biomarcadores que permitan predecir el éxito del tratamiento o el pronóstico clínico representan una herramienta de utilidad. Sin embargo, estos biomarcadores aún son temas de estudio y hasta el momento no se cuenta con estándar validado que sea aplicado a nivel población ni transversal entre distintos países ^[7].

1.3. INFECCIÓN POR *M. TUBERCULOSIS*

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mtb*, una bacteria patógena, que ha sobrevivido millones de años evolucionando para lograr evadir las diferentes estrategias del sistema inmune y colonizar principalmente los pulmones, aunque puede infectar otros órganos denominándose tuberculosis extrapulmonar ^[8].

M. tuberculosis se transmite cuando la bacteria se libera al aire a través de la tos, estornudo o habla de una persona con TB pulmonar activa. Las personas cercanas pueden inhalar las partículas e infectarse, ya que ingresan al epitelio de los pulmones y son rápidamente fagocitados por los macrófagos alveolares para evitar la diseminación. La bacteria es un patógeno intracelular que logra sobrevivir dentro del macrófago, rodeado por otras células inmunes formando un granuloma. Esta fase se conoce como tuberculosis latente (LTB), en el cual el sistema inmune contiene la infección por largo tiempo. Se estima que entre el 5% y el 10% de las personas con LTB desarrollan posteriormente tuberculosis activa, y ese riesgo puede aumentar con complicaciones como cáncer, VIH/SIDA, diabetes, insuficiencia renal, co-infecciones virales o desnutrición ^{[9][10]}.

1.4. CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE A *M. TUBERCULOSIS*

La respuesta inmune innata está mediada por granulocitos y células *Natural killer* (NK), mientras que la respuesta específica de defensa, denominada adaptativa, está mediada por células T y células B. Tras la infección, los granulocitos y células NK secretan citocinas

y liberan moléculas citotóxicas como granzima B y perforina importantes para la eliminación del patógeno ^[11] (Fig 1).

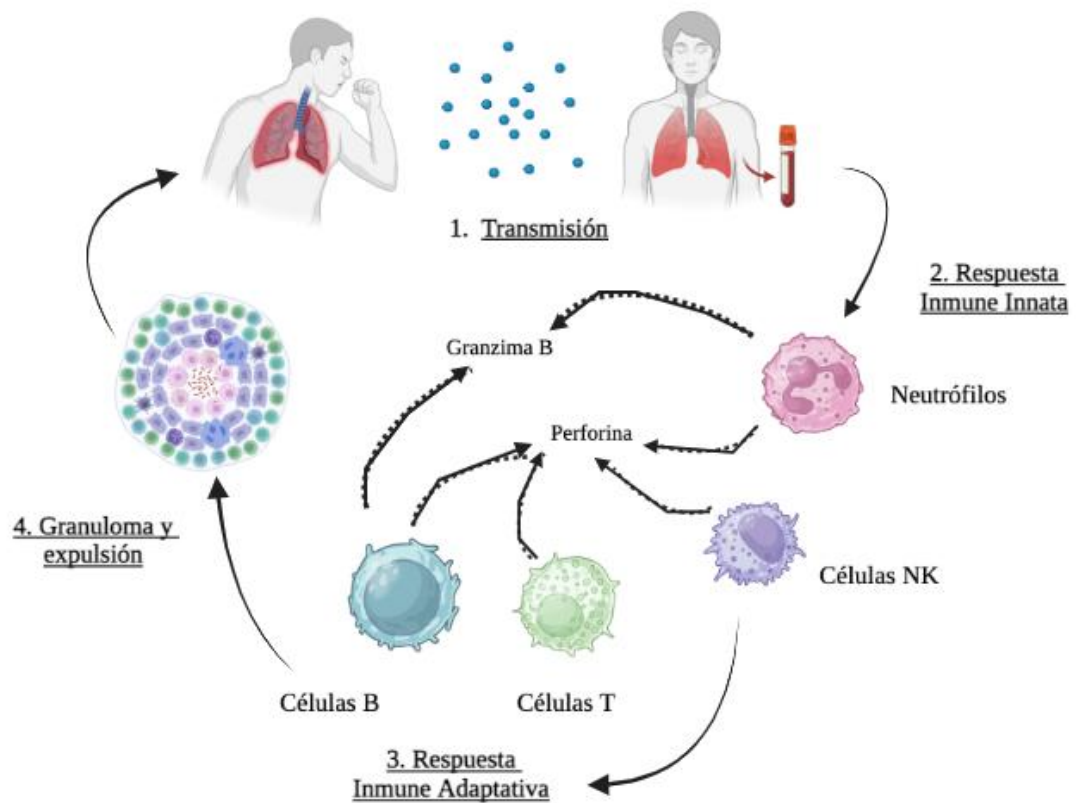


Figura 1. Ciclo patológico de *Mtb*. 1) Transmisión de la tuberculosis iniciada cuando una persona con la enfermedad activa expulsa al toser y/o hablar finas partículas de aerosol que contienen las bacterias, estas son inhaladas por una persona sana e infectan sus pulmones. 2) Respuesta inmune innata: dónde participan activamente los granulocitos y células NK frente a la infección liberando granzimas B y perforinas. 3) Respuesta inmune adaptativa: liderada por células T y B, liberando granzimas B y perforinas. 4) Formación y ruptura del granuloma que contiene la bacteria y linfocitos T, B, neutrófilos y NK. Esta estructura a lo largo del tiempo puede desencapsular y liberar las bacterias de *Mtb* iniciando nuevamente el círculo. (Autoría propia por Alessia Piamonte). Biorender.com

1.4.1 GRANULOCITOS

Los granulocitos son leucocitos con gránulos citoplasmáticos específicos y se dividen en subpoblaciones tales como eosinófilos, basófilos y neutrófilos. Entre ellos, los neutrófilos son los más abundantes, representando entre el 50% y el 70% de todos los leucocitos

circulantes y constituyen la primera línea de defensa en responder frente a una infección [12][11].

Una de las moléculas más utilizadas para identificar los neutrófilos es CD66b también conocido como CEACAM-8 (molécula 8 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario; CD66b⁺). Es una proteína de superficie de 90 kDa perteneciente a la subfamilia CEACAM.7. Los neutrófilos poseen dos mecanismos principales para eliminar patógenos: el primero es la fagocitosis, mediante la cual digieren intracelularmente el patógeno. En este proceso, la enzima NADPH oxidasa genera especies reactivas de oxígeno (ROS) en el fagosoma, también participan péptidos antimicrobianos (AMP) y diferentes enzimas hidrolíticas las cuales se almacenan en los gránulos de los neutrófilos. El segundo mecanismo es la desgranulación con la liberación de gránulos conteniendo perforina y granzimas que destruyen al patógeno [12]. Los neutrófilos son las principales células reclutadas y son movilizadas desde la vasculatura pulmonar hacia el intersticio pulmonar mediante quimiotaxis iniciada por los macrófagos alveolares. También son parte activa en la formación de granulomas, siendo reclutados por macrófagos y permaneciendo en condiciones hipóxicas que prolongan su vida útil [12]. También apoyan la inmunidad adaptativa al activar las células B y T, modulando respuestas inflamatorias (Th1 y Th17). [12]

Estudios experimentales y clínicos de TB pulmonar activa han demostrado que esta enfermedad se acompaña de una afluencia masiva de neutrófilos en los tejidos pulmonares [13][14][15][16]. Pedrosa y col., demostraron que la depleción de los neutrófilos durante la primera semana de la infección por *Mtb* conducía a una mayor proliferación bacteriana en ratones, indicando que los neutrófilos son la primera línea de defensa contra la enfermedad pueden ejercer funciones como fagocitosis [17]. Van de Meer y col., identificaron que los pacientes con tuberculosis activa presentaban niveles plasmáticos elevados de nucleosomas y elastasa, los cuales actúan como biomarcadores de la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), en comparación con los niveles observados en individuos sanos. Esto sugiere que los neutrófilos participan activamente en la respuesta inmune durante la infección activa de tuberculosis [18] (Fig. 2).

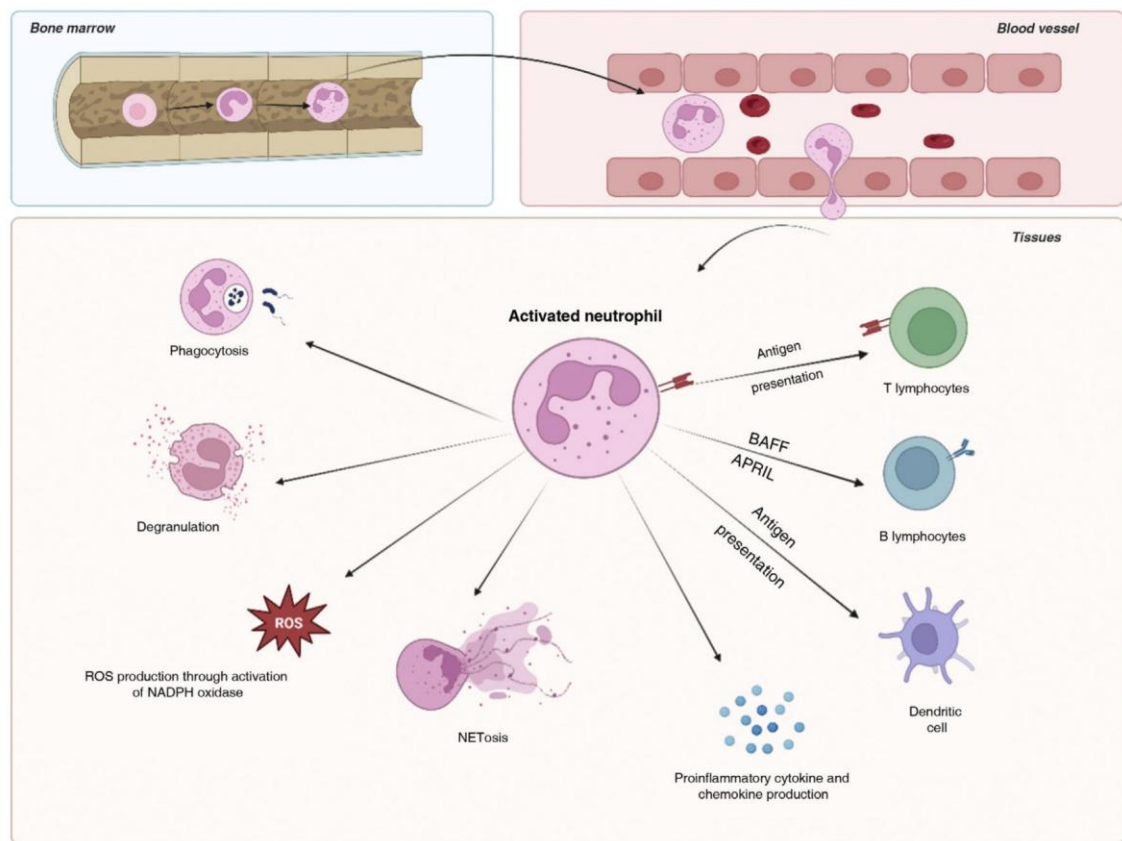


Figura 2. Los neutrófilos y sus funciones inmunes generales (Por Rojas-Valles et al., 2023). Funciones fisiológicas del neutrófilo en la respuesta inmunitaria. APRIL, ligando A inductor de proliferación; BAFF, factor activador de células B; ROS, especies reactivas de oxígeno. Figura creada con Biorender.

1.4.2 CÉLULAS B

Estas células pueden ser identificadas con varios marcadores, entre ellos, se encuentran CD19, un antígeno humano que es una glicoproteína transmembrana de 95 kDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). CD19⁺ desempeña un papel importante en el desarrollo y función de las células B, ya que este funciona como un componente de señalización dentro de un complejo multi-molecular en la superficie de las células B maduras [10].

Las células B tienen una membrana plasmática que contiene partes iguales de glicoesfingolípidos y carbohidratos con un papel importante en la respuesta inmune y en la protección contra cualquier infección [20] y presentan dos características importantes: primero, capacidad de reconocer antígenos extraños; segundo, la habilidad de memoria

inmune con la habilidad de recordar el contacto anterior con antígenos. El rol principal de estas células es producir anticuerpos (IgG, IgA, IgM e IgE) y también citocinas como IFN- γ e IL-10, asimismo son efectoras de citotoxicidad liberando moléculas como perforina y granzima B [21].

En el estudio de Hernandez y col., se observó una reducción significativa en el porcentaje y número total de células B (CD19⁺) en sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar en comparación con donantes sanos. En contraste, no se detectaron diferencias en las células T CD4⁺ y CD8⁺ entre los pacientes y sus controles. Estos resultados sugieren la importancia de las células B en la progresión de la enfermedad [22]. De manera similar, el estudio de Joosten y colaboradores, reporta que los pacientes con TB activa en tratamiento, presentaron niveles bajos de células B que se encontraron disfuncionales pero que luego, se recuperaron y aumentaron [23]. Sin embargo, estos hallazgos se contrastan con los de Wu y colaboradores, que reportaron un aumento del porcentaje de células B en sangre periférica de pacientes con TB pulmonar activa comparado con los controles [24].

1.4.3 CÉLULAS ASESINAS NATURALES O *NATURAL KILLER* (NK)

Las células asesinas naturales (NK) son un componente crucial de la inmunidad innata contra *Mtb*, presentan una rápida expansión y representan entre el 5 y el 20 % de todos los linfocitos circulantes [25].

Cabe destacar que, las células NK pueden diferenciarse en: citotóxicas, reguladoras y tolerantes. Las NK se caracterizan por su activación a través de citocinas, como IL-2, IL-15 e IL-18 que amplifican las respuestas de dichas células. Además, IL-12, IL-18 e IL-21 han demostrado potenciar la citotoxicidad de las células NK humanas produciendo altos niveles de IFN- γ en respuesta. Por otro lado, IL-18 no solo estimula la producción de IFN- γ , sino que también aumenta la expresión de CD25 en las células NK [25]. Las células NK eliminan las células diana que están infectadas o carecen de MHC-I. La destrucción por células NK se puede lograr mediante la activación de receptores como NKG2D y receptores citotóxicos naturales (NCR) NKp30, NKp44 y NKp46 o mediante CD16 (receptor III de Fc γ) que media la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). La

citotoxicidad se origina por el reconocimiento de la porción Fc de los anticuerpos y por la inducción de la apoptosis mediada por receptores de muerte Fas (CD95)^[26].

Se han identificado 2 mecanismos principales mediante los cuales las células NK humanas ejercen su función efectora a través de la liberación de orgánulos relacionados con gránulos líticos como perforina y granzima^{[27][28]}. La perforina forma poros en la membrana de la célula blanco, permite el ingreso de granzima se produce la lisis osmótica y la muerte celular apoptótica^[29].

Por otro lado, la molécula de adhesión de células neurales (NCAM), también conocida como CD56, es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y CD56 suele utilizarse como marcador de células NK. De acuerdo con el marcador CD56, se diferencian dos tipos de células NK: las células NK en la sangre periférica con baja expresión de CD56 (CD56baja) quienes representan una subpoblación madura y con habilidades citotóxicas, mientras que las células NK de alta expresión de CD56 (CD56alta) constituyen la minoría de las células NK de sangre periférica (PB), pero son responsables de la producción de citocinas^[30].

Estudios previos señalan que las células NK de sangre periférica humana pueden reconocer *Mtb* de manera directa por unión a TLR2 y Nkp44^{[31][26][11]}. Las células NK activadas tras el encuentro con *Mtb* producen perforina, granzimas e IFN γ , IL-2 e IL-12 y glutatión^[11]. Además, estas células son capaces de inducir la apoptosis de células infectadas^{[26][11]}. Estas células también eliminan células infectadas mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) a través de la liberación de gránulos conteniendo tanto de perforina y granzima B^[32]. Este proceso de control de la infección ocurre en tres pasos: (1) reconocimiento de las células diana, (2) establecimiento de contacto con las células diana y formación de una sinapsis inmunológica (IS), y finalmente (3) inducción de la muerte de las células diana por las células NK^[26]. Asimismo, Roy y col., indica que la población de células NK disminuye con la enfermedad activa pero que se recupera luego de completarse el tratamiento^[33].

1.4.4 CÉLULAS T CD8⁺

Las células T CD8⁺ pertenecen a una subpoblación que expresa CD8⁺ en su superficie. Estas células, al igual que las células T auxiliares CD4⁺, se generan en el timo y expresan el receptor de células T, solo que este es un co-receptor dimérico, compuesto por una cadena CD8 α y una cadena CD8 β , que permite a las células T CD8⁺ reconocer péptidos presentados por proteínas del MHC de clase I^{[10][34]}.

Las células T CD8⁺ controlan la infección por *Mtb* y coordinan diversas funciones mediante la secreción de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2. Asimismo, secretan moléculas como perforina y granzimas, para la destrucción de células infectadas con *Mtb* y promueven la apoptosis a través de moléculas como Fas o receptores relacionados con la muerte celular inducida por TNF- α ^[32]. Kathamuthu y colaboradores, también hacen mención a marcadores citotóxicos tales como perforina, granzima B y CD107a, que sirve como una medida indirecta para analizar el potencial citotóxico de las células T CD4⁺ y CD8⁺ ^[32]. En TB activa, se ha descrito la disfunción de linfocitos T CD8⁺, así como un cambio en su fenotipo hacia un perfil regulatorio, con la secreción de citocinas como IL-10 y TGF- β ^[32]. Este cambio fenotípico ha sido asociado con un aumento de la carga bacteriana, lo que sugiere un papel diverso de estas células en la respuesta a la infección ^[20]. En el estudio de Jiang y colaboradores, se observa una disminución de perforina en células T CD8⁺ de los pacientes con TB pulmonar activa ^[35]. No obstante, en el estudio de Zahran y col., se reportó que las células T CD8⁺ aumentan en casos recurrentes de TB y este aumento se correlaciona con la gravedad de la enfermedad ^[36].

1.4.5 CÉLULAS T NK (NKT)

Las células T NK (NKT) o células NK invariante (iNKT) se definen por su expresión de marcadores de células NK y un receptor de células T $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$), lo que indica que se combinan las propiedades de ambas células, por el lado de NK en citotoxicidad rápida, pero con las funciones de las células T como reconocimiento específico del antígeno^[37]. Las células NKT, junto con las células NK, se conocen como el puente entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas, por lo que estas tienen la capacidad de

promover o suprimir respuestas inmunes, pero su contexto en la infección de *Mtb* sigue debatiéndose.

De acuerdo con los resultados de Zhou y col., se observó que las células NKT estaban elevadas en pacientes con TB pulmonar activa en comparación con individuos sanos, lo que indica la importancia de la inmunidad innata contra la tuberculosis^[38]. En el estudio de Pandey y col., se analizaron los fenotipos de población de NKT y demostraron una cantidad significativa de estas células en pacientes con TB, indicando que las células NKT se reclutan después de la infección debido a su capacidad para reconocer antígenos glucolípidos, pero luego disminuye después del tratamiento^[39]. Un resultado similar, lo reportaron Zahran y col., quienes observaron un aumento en las células NKT, pero solo en casos de tuberculosis activa^[36]. No obstante, estudios como Lerner, sugieren que la deficiencia de NKT está asociada con un mayor riesgo de desarrollar tuberculosis activa^[40]. Asimismo, en otros estudios también se demuestra la disminución de NKT en TB^{[41][42]}. En el caso de Kee y col., indica niveles bajos y disfuncionalidad de las NKT en TB^[43].

1.4.6 MOLÉCULAS EFECTORAS DE CITOTOXICIDAD: PERFORINA Y GRANZIMA B

PERFORINA Y SUS MECANISMOS

Dentro de la respuesta inmune, existen dos proteínas esenciales para combatir patógenos intracelulares como *Mtb*. Una de ellas es la perforina (PRF), la cual es una glicoproteína de 60-70 kDa aproximadamente con 555 aminoácidos y consta de cuatro dominios, incluidos dos (N-terminal y C-terminal) relacionados con sus funciones biológicas, y los otros dos dominios, que se encuentran en el centro de la molécula que permiten la formación de dos estructuras de láminas y tienen una hélice, volviéndolo un dominio hidrofóbico capaz de incorporarse a la membrana lipídica de la célula diana^[44]. Esta proteína está presente en el interior de los gránulos citoplasmáticos de linfocitos T citotóxicos, células NK, células B y granulocitos como neutrófilos.

La perforina tiene que polimerizarse para formar los poros que perforarán la célula diana, para ello, se requieren iones Ca^{2+} entre otros factores como temperatura, activación de receptores, y la calreticulina, que actúa como proteína chaperona protegiendo la perforina de una sobre activación innecesaria [45]. Además, un pH adecuado, es esencial, ya que un pH bajo puede inhibir la acción de los iones de Ca^{2+} y bloquee los canales transmembrana, dificultando la recuperación del paciente [44]. Entonces, la perforina se une a las células diana a través de fosfolípidos de membrana y la fosfatidilcolina se une a iones Ca^{2+} para aumentar la afinidad [44], siendo este el primer paso para el proceso citotóxico por medio del reconocimiento de las células diana, que puede ser específico mediante receptores de células T (TCR) en células T $\text{CD}8^{+}$ o receptores NKG2, KIR en células NK [44].

El siguiente paso es la formación de sinapsis lítica entre la célula efectora y la célula diana, primero se libera perforina la cual induce y forma un poro (con 5 y 20 nm de diámetro formado por 3-4 moléculas de perforina) con la célula diana (macrófagos infectados), facilitando el transporte de granzima A o B y/o granzulina al citosol, donde inducen la apoptosis [26][44][46]. Los poros formados por la perforina alteran la membrana celular de tal modo que permite dicha entrada y salida de los citotóxicos mencionados que alteran la homeostasis, generando que la célula objetivo entre en un shock tónico.

Del mismo modo, se observa en el estudio de Qin y col., que las células T ($\text{CD}8^{+}$) en comparación con pacientes sanos y TB pulmonar latente, los pacientes con TB pulmonar activa presentaron menos células T $\text{CD}4^{+}$ y $\text{CD}8^{+}$, pero la expresión de granzima A, granzima B y perforina en las células T $\text{CD}8^{+}$ aumentó [47]. Por otro lado, en el estudio de Jiang y col., se reportó la disminución de la expresión de perforina en linfocitos T $\text{CD}8^{+}$ en pacientes con TB pulmonar activa comparado a controles saludables [35].

Autores como Lu y col., indican la importancia y eficacia de las NK en utilizar perforina para eliminar de *Mtb* evaluado en sus estudios en humanos [48]. Cabe destacar que, la deficiencia de perforina *in vivo* provoca una reducida actividad de citotoxicidad hacia células infectadas con *Mtb*, por lo que perforina es una molécula clave en el control de la enfermedad de tuberculosis [49].

Recientemente se ha identificado a las células B productoras de perforina, actúan como un nuevo tipo de posibles células efectoras antitumorales contra enfermedades

autoinmunes. Sin embargo, las funciones y características de las células B productoras siguen sin estar claras ^[50].

GRANZIMA B Y SUS MECANISMOS

La granzima B (GrzB) es una serina proteasa asociada a la defensa citotóxica por linfocitos T y NK contra patógenos intracelulares, y estudios recientes, informaron que es expresado por varios tipos de células adicionales ^{[26][51]}. Esta granzima también se le conoce con el nombre de serina esterasa 1 asociada a linfocitos T citotóxicos o granzima 2, tiene un peso de 32 kDa y una longitud de aproximadamente 3500 pb, contiene cinco exones y cuatro intrones, y se asigna al cromosoma 14 en el genoma humano ^[51].

Su mecanismo de acción consta en la translocación al núcleo para inducir la apoptosis de las células diana a través de la activación directa de las caspasas 3 y 7 o la proteólisis de la proteína agonista de la muerte del dominio que interactúa con BH3 (Bid) ^[26]. Específicamente en TB, se ha observado que, en los granulomas, los neutrófilos son las células más abundantes y contienen gran cantidad de GrzB por célula comparado a células T. Sin embargo, no expresan perforina. La expresión de GrzB en los neutrófilos puede ser inducida por la estimulación con antígenos micobacterianos o presencia de *Mtb*. Además, se observó una correlación entre niveles de GrzB en neutrófilos y carga bacteriana, lo que sugiere que en el granuloma podría estar relacionada con la cantidad de antígeno presente ^[52]. Estos hallazgos resaltan un aspecto previamente no conocido de la biología de los neutrófilos en el contexto de la tuberculosis y sugieren que la GrzB liberada por neutrófilos podría contribuir a la patogénesis en la tuberculosis y potencialmente podría ser usado como biomarcador de seguimiento al tratamiento de tuberculosis ^[52]. Asimismo, en el estudio de Garcia-Laorden y col., en los pacientes con tuberculosis se observó un ligero aumento en la expresión de granzima-B en las células T CD8⁺, mientras que las células NK no mostraron cambios significativos ^[53].

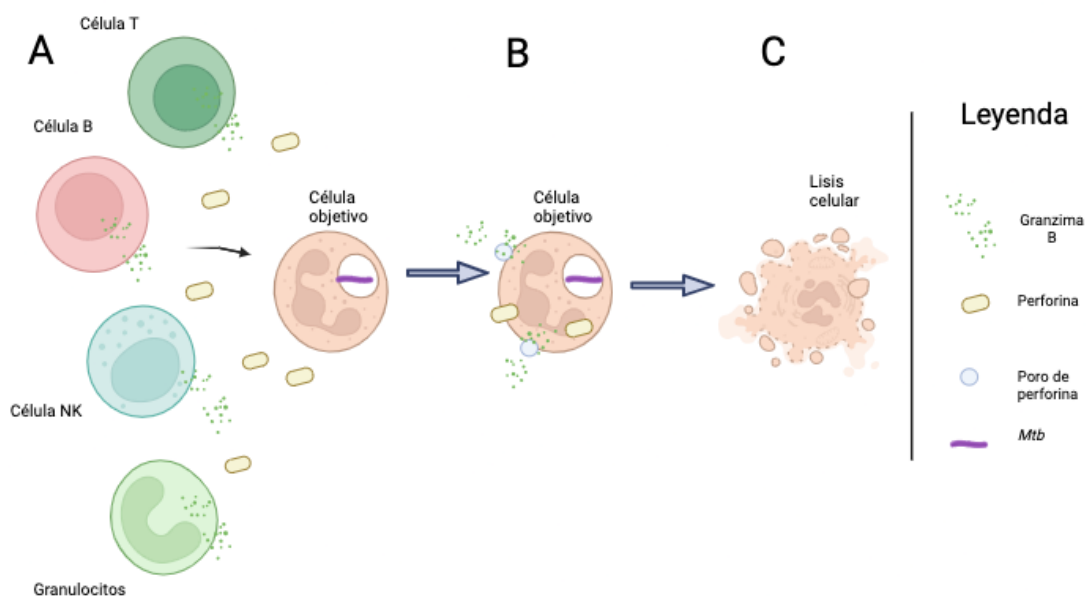


Figura 3. Mecanismo de acción de perforina y granzima B en TB. A. Las células B, T, NK y granulocitos secretan perforina y granzima B en presencia de la célula infectada por *Mtb*. B. Se genera el contacto de estas moléculas con la célula objetivo, la perforina perfora la célula infectada y forma un poro por donde ingresa la granzima B para inducir apoptosis. C. En consecuencia, se genera la lisis celular. (Autoría propia por Alessia Piamonte). Biorender.com

Considerando las moléculas citotóxicas, se ha observado que la co-liberación de perforina permite que la granzima B ingrese a las células diana donde los sustratos para su actividad serina proteasa incluyen caspasa-3 y otras caspasas, por lo que el efecto de la granzima B es producir la muerte apoptótica de las células diana [54].

1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis pulmonar continúa siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial y particularmente en países de alta endemicidad como el Perú^{[1][2]}. La investigación sobre la TB está resurgiendo con un enfoque en la optimización del tratamiento y entendimiento de esta enfermedad, dado que, a pesar de ser una enfermedad curable, todavía figura como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, particularmente en países en desarrollo como el nuestro^[1].

A pesar de la disponibilidad de esquemas de tratamientos eficaces, la progresión clínica de los pacientes depende no solo de la sensibilidad del bacilo a los fármacos, sino también de la respuesta inmune del hospedero^[4]. En ese contexto, las células T CD4⁺ cumplen un papel importante en la protección contra la tuberculosis, sin embargo, otros tipos celulares como las células T citotóxicas, células B y células NK también participan en la coordinación de mecanismos defensivos frente a *Mtb*^[11]. No obstante, la función citotóxica de las células inmunes productoras de perforina y granzima B en pacientes con tuberculosis pulmonar activa bajo tratamiento aún no se encuentra claramente establecida. Existen vacíos de conocimiento sobre cómo la terapia antituberculosa modula la producción de estos efectores, y de qué manera su dinámica se relaciona con la progresión o resolución de la enfermedad.

En este sentido, la caracterización de moléculas citotóxicas como perforina y granzima B en células inmunes de pacientes con TB activa podría aportar información valiosa para entender mejor la fisiopatología de la enfermedad y su potencial utilidad a futuro como biomarcadores inmunológicos de respuesta al tratamiento.

1.6 JUSTIFICACIÓN

Para lograr una cura exitosa en pacientes con tuberculosis pulmonar activa, es fundamental contar con herramientas de seguimiento eficaces; sin embargo, las disponibles actualmente presentan limitaciones. Hasta dónde llega nuestro conocimiento, no existen reportes que evalúen la dinámica de células CD8⁺, NK, neutrófilos y células B circulantes productoras de perforina y granzima B en cohortes de pacientes con TB pulmonar sensible en tratamiento. Profundizar en este aspecto permitirá comprender mejor el papel de estas células inmunes, tanto innatas como adaptativas, que comparten mecanismos citotóxicos en la patología de la enfermedad. Asimismo, este conocimiento contribuirá a la identificación de nuevos biomarcadores que apoyen el diagnóstico y el monitoreo de la respuesta al tratamiento anti-TB, favoreciendo ajustes terapéuticos más precisos y mejorando el seguimiento clínico de los pacientes^[7].

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: En tuberculosis pulmonar activa, el tratamiento con antibióticos reduce la carga bacteriana, generando un cambio en el fenotipo y función de células inmunes T CD8⁺, NK, NKT, granulocitos y células B y en la su producción de granzima B y/o perforina, que consecuentemente impactaría en la cura del paciente.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la producción de moléculas efectoras de citotoxicidad (granzima B y perforina) por células inmunes (NK, NKT, T, B, granulocitos) en pacientes con TB pulmonar activa sensible en tratamiento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Objetivo 1: Analizar las poblaciones de células inmunes NK, NKT, T, granulocitos y células B a lo largo del tratamiento contra TB.
- Objetivo 2: Evaluar las moléculas mediadoras de citotoxicidad (perforina y granzima B) producidas por células inmunes innatas y células inmunes adaptativas
- Objetivo 3: Evaluar la asociación entre parámetros inmunes (fenotipo celular) y tiempo de tratamiento.
- Objetivo 4: Evaluar la asociación entre la producción de moléculas efectoras de citotoxicidad (PRF+/GrzB+) y tiempo de tratamiento.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Este fue un estudio observacional longitudinal.

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las muestras de sangre periférica que se usaron en este estudio fueron proporcionadas por el proyecto con código SIDISI: 211318 (Proyecto base) el cual tenía aprobación ética, para almacenar muestras y su posterior uso en otro proyecto. En ese proyecto se colectó 6 mL de sangre total en el tubo de EDTA-k2. El proyecto base tuvo los siguientes criterios para el enrolamiento de pacientes:

3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Hombres o mujeres adultos cuya edad se estableció entre los 18 a 65 años, y que se les haya diagnosticado de TB pulmonar activa sensible a tratamiento por medio de la confirmación clínica, microscopía, GeneXpert, y pruebas de apoyo como cultivo bacteriológico o radiografía confirmatoria.
- Los seleccionados para el estudio no habían recibido tratamiento anti-TB al momento de la primera recolección de muestra.

3.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Hombres o mujeres adultos enfermos de TB que ya hayan sido tratadas con el tratamiento anti- TB que se menciona a inicios de este estudio.
- Mujeres gestantes o en proceso de gestación, y mujeres con semanas postparto.

- Hombres o mujeres con TB confirmado con otras enfermedades que comprometan su sistema inmune como enfermedades autoinmunes o infecciosas.
- Pacientes de TB sensible que no entiendan la información proporcionada del estudio o decidan no entrar a participar por decisión propia.
- Pacientes con tuberculosis pulmonar latente; tuberculosis extrapulmonar; tuberculosis resistente (MDR y XDR) o pacientes con tuberculosis sensible con diagnóstico de cáncer.

3.3 TAMAÑO DE MUESTRA

Se empleó el muestreo de este estudio longitudinal por conveniencia (n=20). Para realizar el cálculo del tamaño mínimo de muestra se ha utilizado el software G*Power (Versión 3.9.6.1) con una estimado de poder estadístico ($1-\beta$) del 0.99, con efecto de tamaño = 1 y un error tipo 1 (α) = 0.05, quedando que el número de pacientes a enrolar a 15 (n= 15). Para realizar estos cálculos y otras consideraciones dentro de los parámetros de tamaño de muestra fueron sugeridos por los autores Manterola (2019) y Serdar (2021)^{[55][56]}. Las muestras de sangre de los 20 pacientes fueron obtenidas antes de iniciar el tratamiento anti-TB (T0), a los dos meses de iniciar el tratamiento de anti-TB(T2) y al final de este, a los seis meses (T6).

3.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN PERFORINA Y GRANZIMA B EN CÉLULAS INMUNES

La producción de perforina y granzima B se determinó en células T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺), NK (CD3⁻CD56⁺), células B (CD3⁻CD19⁺), granulocitos (CD3⁻CD66b⁺) y subpoblaciones de iNKT (CD3⁺CD8⁺CD56⁺) mediante citometría de flujo.

3.5 PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

A partir de la sangre total colectada en tubos con EDTA, en cabina de bioseguridad biológica (BIOBASE), se alicuotó 200 μ L de muestra a tubos de 5ml, y se adicionaron los anticuerpos según correspondía. Para ello se utilizaron 2 paneles de tinción. Panel 1, granulocitos y células B (se usó un tubo para granzima B y otro para perforina): 1 μ L de *Anti human* CD3 - Pacblue Clona UCHT1, 1.5 μ L *Anti human* CD19 PECy7 Clona HIB19 y 1.5 μ L de *Anti human* CD66b APC Clona G10F5 (Biolegend, CA). Panel 2: células T, NK y iNKT (un solo tubo para perforina): 1 μ L *Anti human* CD3 – Pacblue 1 μ L UCHT1, 1.5 μ L *Anti human* CD56 V500 Clona HCD56, 4 μ L *Anti human* CD8 FITC Clona STK1.

Se adicionaron los anticuerpos para realizar la tinción de superficie de acuerdo con los dos paneles descritos anteriormente. Se incubó por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente, se le añadió 4 mL de un buffer de lisis 1X de glóbulos rojos (BioLegend®, CA) a cada tubo, y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego, se lavó con *PBS* (Invitrogen, CA) 1% suero fetal bovino (Invitrogen, CA) y se centrifugó a 1500 rpm (Centrífuga, Beckman Coulter, USA) por 7 min.

Para la tinción intracelular, se resuspendió el pellet con 50 μ L de *buffer* de *Fix intracellular* (Invitrogen, CA) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Tras la incubación, se adicionó 2 mL de *Buffer Perm intracellular* 1X (Invitrogen, CA). Se centrifugó a 1500 rpm por 7 min. Al *pellet* se adicionó los anticuerpos según corresponda: Panel 1: 1.5 μ L *Anti human* Granzima B – PE Clona R-PE *Conjugate* y 1.5 μ L *Anti human* Perforin - PE Clona dG9; panel 2: 1.5 μ L *Anti human* Perforin - PE Clona dG9 (Biolegend, CA). Se incubó por 30 min y tras la incubación se procedió a lavar con 2ml de *Buffer Perm intracellular* 1X. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 500 μ L de

PBS- 1% suero fetal bovino. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACS CANTO II (*BD Biosciences*) colectando un total de aproximadamente 500000 eventos de la población de células mononucleares (definidas en base al *forward vs side scatter*). El análisis de las poblaciones de células NK, CD8, células B, neutrófilos y iNKT se realizó con el software FlowJo v10.8 (FlowJo LLC, Ashland OR).

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis pareado de las muestras de cada participante en los tres tiempos (T0, T2 y T6) a través de estadísticos no paramétricos de acuerdo con la distribución presentada en los datos: Test de Friedman, para determinar si existe una diferencia significativa entre los tres tiempos, con corrección de Nemenyi como post hoc para comparar los tres tiempos entre sí (T0 vs T2, T2 vs T6 y T0 vs T6) y ajustar las comparaciones múltiples. Asimismo, se usó la correlación de Spearman, dado que la data se le atribuye una distribución no paramétrica, para determinar la relación del fenotipo y función (nivel de perforina y granzima B según corresponda) de las células inmunes estudiadas y los parámetros clínicos del paciente a lo largo del tratamiento. El análisis de los datos se realizó con el software Graph Prism v9 y R Studio.

IV. RESULTADOS

4.1. COHORTE DE PACIENTES CON TB PULMONAR ACTIVA SENSIBLE

En la Tabla 1 se observa la evolución de la carga bacteriana a lo largo del tratamiento y el sexo de los pacientes.

Tabla 1. Seguimiento de cohorte con pacientes de tuberculosis pulmonar activa a lo largo de seis meses de tratamiento.

Baciloscopia (BK)	T0	T2	T6
Negativo	2* (10%)	18 (90%)	20 (100%)
+	12 (60%)	1 (5%)	0 (0%)
++	2 (10%)	1 (5%)	0 (0%)
+++	4 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Sexo			
F	4 (20%)		
M	16 (80%)		

T0: 0 meses de tratamiento anti-TB

T2: 2 meses de tratamiento anti-TB

T6: 6 meses de tratamiento anti-TB

F= Femenino

M= Masculino

*Clínicamente diagnosticado

Para el análisis, se siguieron 20 pacientes a lo largo de 3 tiempos (T0, T2, T6). Con respecto al T0, la mayoría (60%) tiene un BK⁺, seguido de BK⁺⁺ (10%), BK⁻ (10%), y BK⁺⁺⁺ (20%). Mientras que, en el T2, la mayoría de los pacientes presentan una

conversión a BK⁻ (90%), y solo 2 pacientes se mantienen BK^{+ / ++}. Y finalmente al finalizar el tratamiento (T6), se visualiza que todos los pacientes son BK⁻ (100%), indicando la eliminación de *Mtb* a causa del tratamiento, y, por ende, la cura del paciente.

4.2. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Tras la adquisición de las células en el citómetro de flujo, se procedió al análisis de las diferentes poblaciones de células usando estrategias de selección de poblaciones (*gates*) para diferenciar los leucocitos en células B, granulocitos, NK, CD8 e iNKT.

4.2.1 PARA CÉLULAS B Y GRANULOCITOS

Las poblaciones de interés se seleccionaron de acuerdo con el tamaño, *Forward* (FSC, siglas en inglés), y complejidad, *Scatter* (SSC, siglas en inglés). Primero se definieron de la siguiente manera: FSC-área (A)/ FSC- altura (H), seguido de SSC-A/ SSC-H para seleccionar las células únicas (*singlets*). Luego, FSC-H /SSC-A, y a partir de esa población se identificó la población CD3 negativas. A partir de esta población se delimitó la población de granulocitos (CD66b⁺) y células B (CD19⁺). Finalmente, se clasificó los granulocitos y células B para la expresión de granzima (GrzB⁺) y perforina (PRF⁺) (Figura 4).

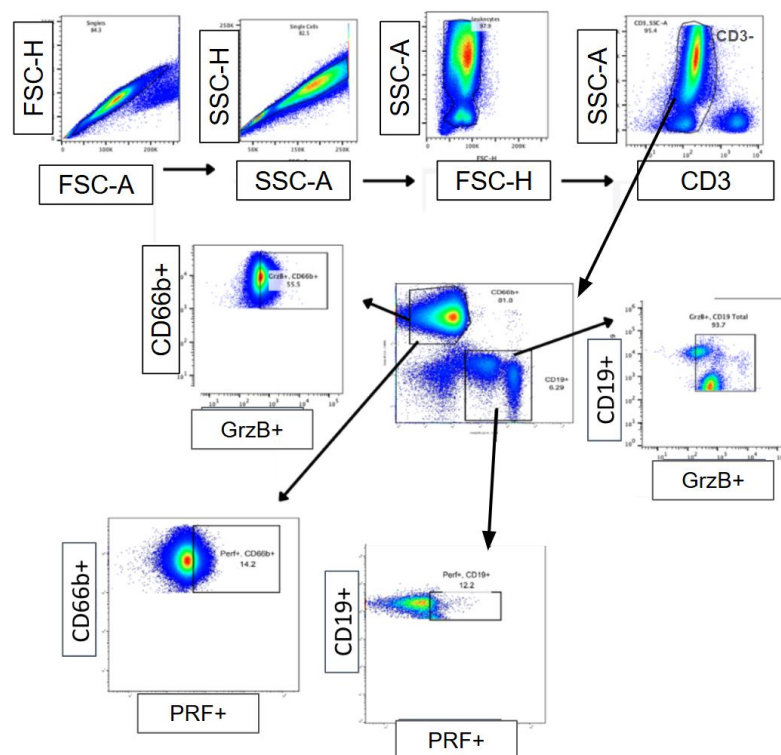


Figura 4. Estrategia de selección de granulocitos y células B. Análisis representativo de la frecuencia de granulocitos CD66b⁺ y células B CD19⁺ productores de granzima B (GrzB⁺) y perforina (PRF⁺).

4.2.2 PARA CÉLULAS NK Y T CD8⁺

Para caracterizar las células NK (CD56⁺) y T CD8⁺, primero se seleccionó las células según FSC-A/FSC-H y SSC-A/SSC-H para determinar la población de células únicas. Luego, a partir de esa población se graficó el plot CD3/SSC-A para identificar la población de células T CD8⁺, excluidas por la expresión de CD56, y NK (CD56⁺) excluidas de la población CD8⁺. Finalmente, se determinó los niveles de expresión de perforina en ambas poblaciones: células NK (CD56⁺/PRF⁺) y células T produciendo perforina (CD8⁺/PRF⁺) (Figura 5).

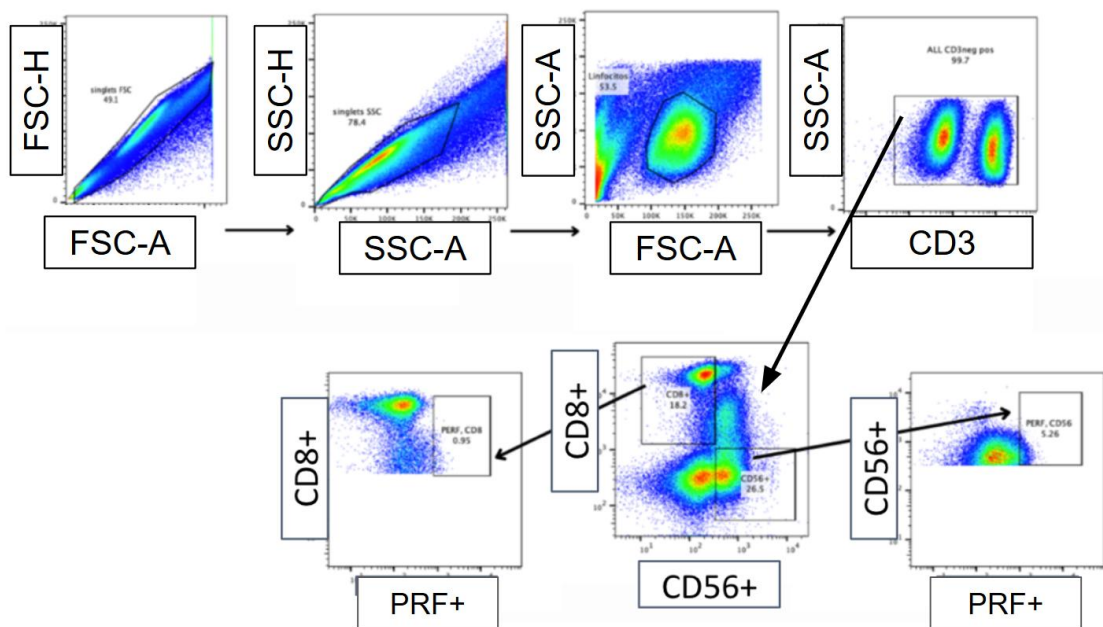


Figura 5. Estrategia de selección de células NK y T CD8⁺. Análisis representativo de la frecuencia de células NK CD56⁺ y células CD8⁺ productores de perforina (PRF⁺).

4.2.3 PARA CÉLULAS iNKT

Para caracterizar las células iNKT (CD8⁺CD56⁺), primero se seleccionó las células según FSC-A/FSC-H y SSC-A/SSC-H para determinar la población de células únicas. A partir de esa población se seleccionó las células mononucleares en base a SSC-A/FSC-A, de esta población se graficó CD3/SSC-A y de esta población se diferencia las células co-expresando CD8 y CD56 (iNKT). A partir de allí, se determinó 2 poblaciones de iNKT en base a los niveles de expresión de CD8⁺ en dos *subsets*: CD8⁺/CD56⁺/PRF⁺ y CD8⁺⁺/CD56⁺/PRF⁺ (Figura 6).

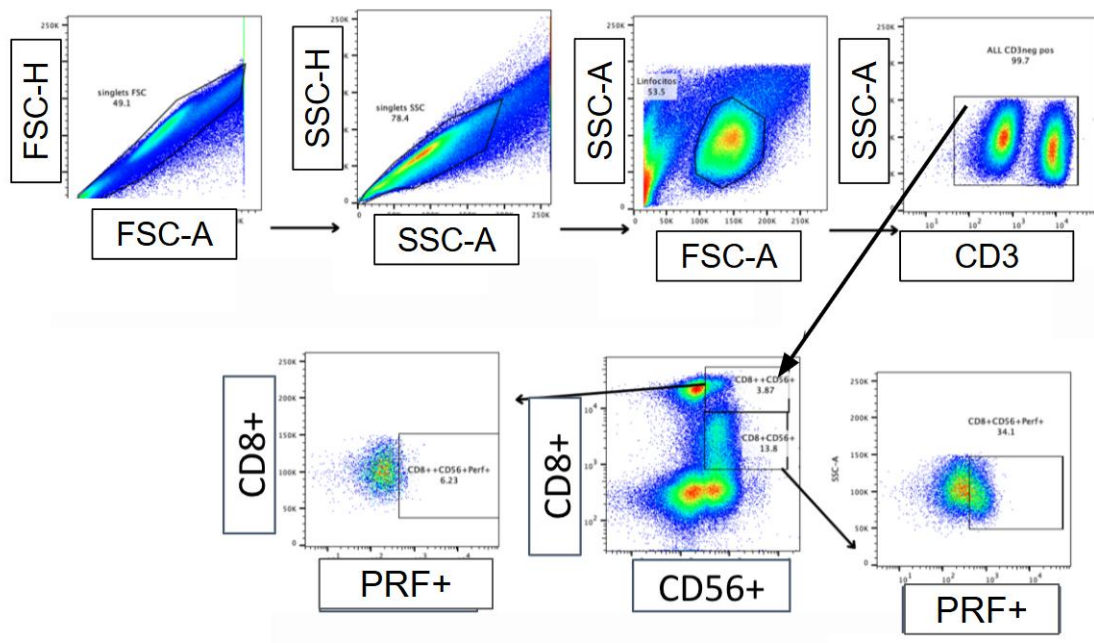


Figura 6. Estrategia de selección de poblaciones y clasificación de células iNKT. Análisis representativo de la frecuencia de células iNKT: iNKT⁺ (CD8⁺CD56⁺) y iNKT⁺⁺ (CD8⁺⁺CD56⁺) productores de perforina (PRF⁺).

4.3. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS INMUNES A LO LARGO DEL TRATAMIENTO CONTRA TB.

Para conocer el fenotipo de células inmunes en los 20 pacientes con TB pulmonar activa a lo largo del tratamiento, se analizó la población de células inmunes innatas: granulocitos ($CD66b^+$), NK ($CD56^+$), $iNKT^+$ ($CD8^+CD56^+$), $iNKT^{++}$ ($CD8^{++}CD56^+$) (Figura 7) y la población de células inmunes adaptativas: células B ($CD19^+$) y células T ($CD8^+$) (Figura 8).

En la figura 7 se observa que no hay cambios en la población de granulocitos a lo largo del tratamiento. Mientras que la población de células NK circulantes disminuye significativamente a los dos meses de tratamiento (T2), pero luego de completar el tratamiento (T6) se incrementan los niveles. Respecto a la población de $iNKT^+$ y $iNKT^{++}$ se observa que la frecuencia de ambas poblaciones disminuye significativamente al T2 comparadas al inicio del tratamiento (T0).

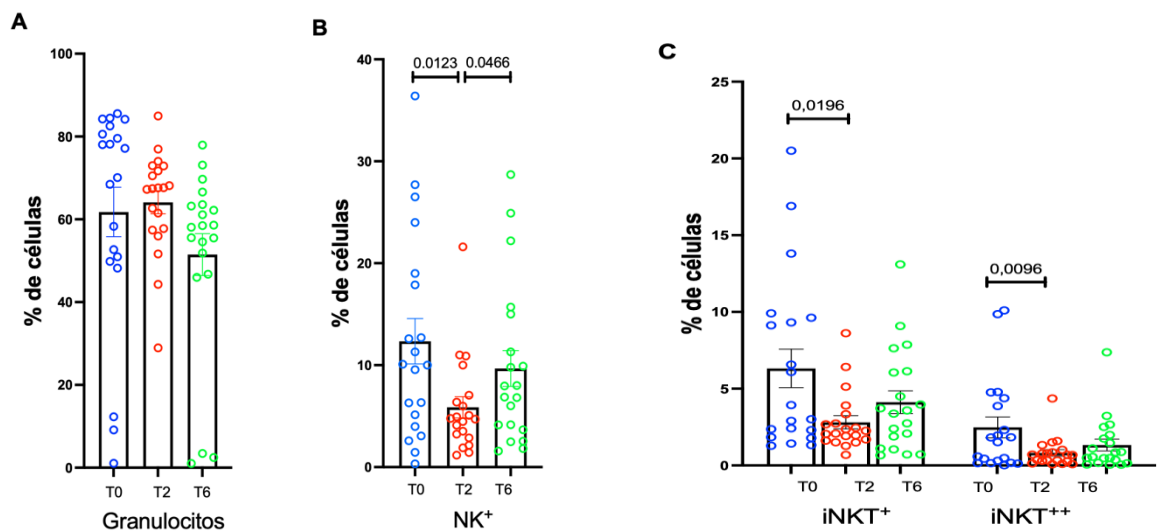


Figura 7. Fenotipo de células de respuesta inmune innata en pacientes con TB pulmonar activa sensible a lo largo de 6 meses de tratamiento. Células inmunes innatas a lo largo del tratamiento, granulocitos ($CD66b^+$), NK ($CD56^+$), $iNKT^+$ ($CD8^+CD56^+$), $iNKT^{++}$ ($CD8^{++}CD56^+$). La fenotipificación se realizó mediante citometría de flujo usando sangre total. Los resultados se expresan en media $\pm$ SEM, n=20. T0: inicio del tratamiento, T2: a los dos meses de tratamiento, T6: finalización del tratamiento.

Con respecto a la frecuencia de células inmunes adaptativas (Figura 8), se observa que no hubo cambios significativos en la población de células B totales ($CD19^+$) durante los seis meses de tratamiento (T6). Sin embargo, se observa una tendencia en la disminución de células B al T6. Por otro lado, las células T $CD8^+$, aumentaron significativamente en el T6 comparadas al T0.

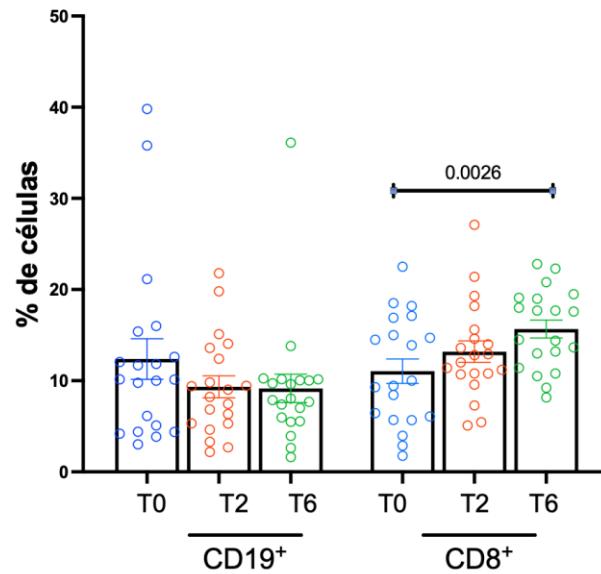


Figura 8. Fenotipo de células de respuesta inmune adaptativas en pacientes con TB pulmonar activa sensible a lo largo de 6 meses de tratamiento. Células inmunes adaptativas a lo largo del tratamiento células B ($CD19^+$) y T $CD8^+$. La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo usando sangre total. Los resultados se expresan en media $\pm$ SEM, $n=20$. T0: inicio del tratamiento, T2: a los dos meses de tratamiento, T6: finalización del tratamiento.

4.4. EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS MEDIADORAS DE CITOTOXICIDAD PRODUCIDAS POR CÉLULAS INMUNES INNATAS.

Se evaluó la producción de las moléculas mediadoras de citotoxicidad, perforinas y granzima B en los granulocitos (Figura 9) niveles de perforinas en las células NK (Figura 10) y iNKT (iNKT⁺ e iNKT⁺⁺) (Figura 11).

En la figura 9 se observa que no hay diferencias significativas en los niveles de granzima B secretado por granulocitos durante los 6 meses de tratamiento (T6). Sin embargo, se observa una disminución significativa en los niveles de perforina en T2 y T6 comparado al T0.

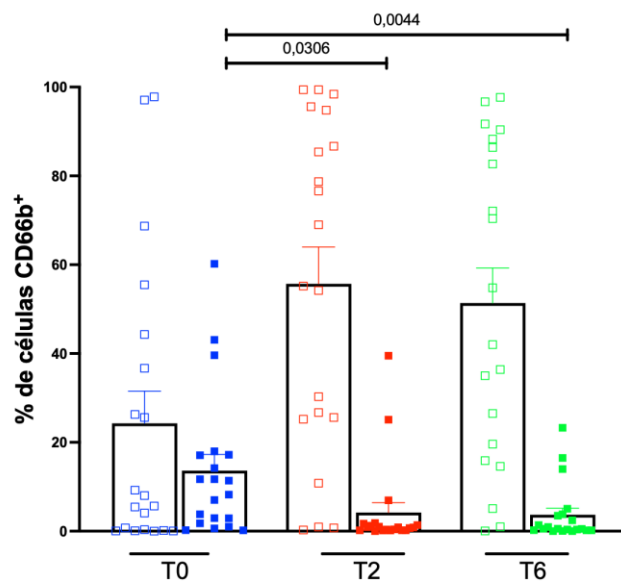


Figura 9. Producción de granzima B y perforina por granulocitos (CD66b⁺) a lo largo de 6 meses de tratamiento. Frecuencia de granulocitos productores de granzima B (GrzB⁺) y perforina (PRF⁺). La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo usando sangre total. Los resultados se expresan en media $\pm$ SEM, n=20. T0: inicio del tratamiento, T2: a los dos meses de tratamiento, T6: finalización del tratamiento. Símbolos: cuadrados abiertos: Granzima B; cuadrados cerrados: Perforina.

Entretanto, se observa que las células NK productoras de perforina tuvieron un aumento significativo en sus niveles a lo largo del tratamiento tanto al T2 y T6 comparados al T0 (Figura 10). Mientras, en la población de células iNKT, se observa que las ambas subpoblaciones iNKT⁺ e iNKT⁺⁺ aumentaron sus niveles de perforina a partir del T2 comparado al T0 (Figura 11A y B). No obstante, se observó una disminución de los niveles de perforina de manera significativa para la población iNKT⁺⁺ en el T6 comparado al T2 (Figura 11B).

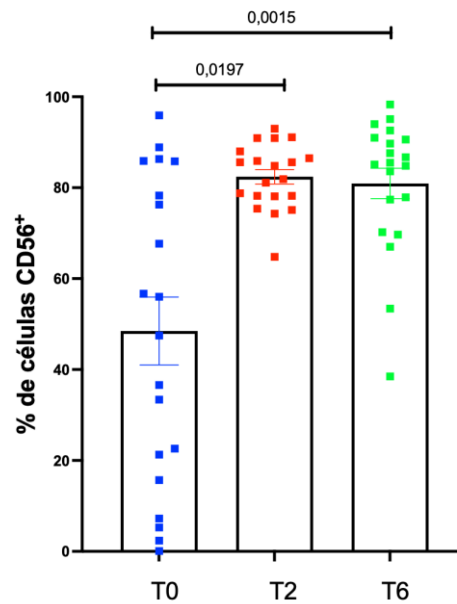


Figura 10. Producción de perforina por células NK (CD56⁺) a lo largo de 6 meses de tratamiento. Frecuencia de NK (productores de perforina (PRF⁺)). La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo usando sangre total. Los resultados se expresan en media +/- SEM, n=20. T0: inicio del tratamiento, T2: a los dos meses de tratamiento, T6: finalización del tratamiento.

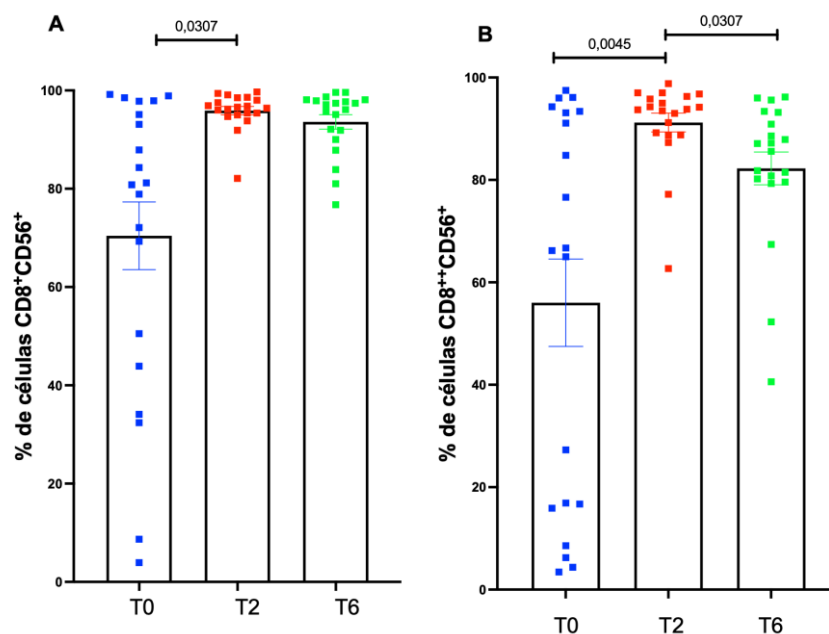


Figura 11. Producción de perforina por las subpoblaciones de iNKT a lo largo de 6 meses de tratamiento. Frecuencia de células $iNKT^+$ ($CD8^+CD56^+$) (A) e $iNKT^{++}$ ($CD8^{++}CD56^+$) (B) productoras de perforina (PRF^+). La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo usando sangre total. Los resultados se expresan en media $\pm$ SEM, $n=20$. T0: inicio del tratamiento, T2: a los dos meses de tratamiento, T6: finalización del tratamiento.

4.5. EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS MEDIADORAS DE CITOTOXICIDAD PRODUCIDAS POR CÉLULAS INMUNES ADAPTATIVAS.

Para conocer el perfil de moléculas citotóxicas en dos de las principales células de la respuesta inmune adaptativa, se analizó los niveles de perforina y granzima en células B ($CD19^+$) (Figura 12) y de perforina en células $TCD8^+$ (Figura 13).

En la Figura 12 se observa un aumento significativo de células B productoras de granzima B en el T2 comparado al T0 y una tendencia de disminución en el T6. Por otro lado, se observa una disminución significativa de los niveles de perforina en el T6 comparado al T0 y T2.

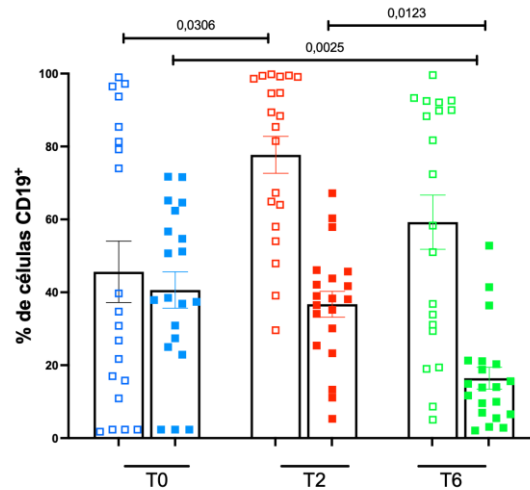


Figura 12. Producción de granzima B y perforina en células B (CD19⁺) a lo largo de 6 meses de tratamiento. Frecuencia de células CD19⁺ productores de granzima (GrzB⁺) y perforina (PRF⁺). La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo usando sangre total. Los resultados se expresan en media +/- SEM, n=20. T0: inicio del tratamiento, T2: a los dos meses de tratamiento, T6: finalización del tratamiento. Símbolos: cuadrados abiertos : Granzima B; cuadrados cerrados: Perforina.

Para el caso de células T CD8⁺ se observa un aumento de los niveles de perforina en el T2 comparados al T0 y se mantiene en nivel comparable al T6 (Figura 13)

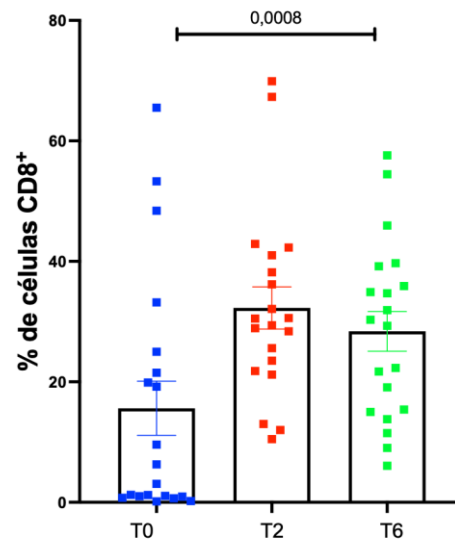
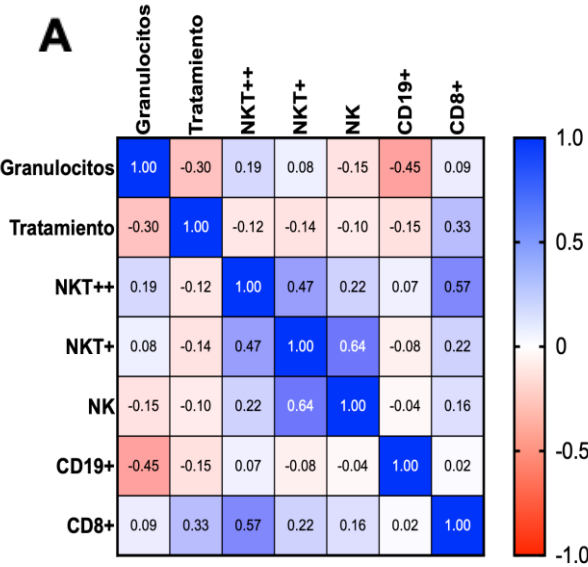


Figura 13. Producción de perforina en células T CD8⁺ a lo largo de 6 meses de tratamiento. Frecuencia de células CD8⁺ productores de perforina (PRF⁺). La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo usando sangre total. Los resultados se expresan en media $\pm$ SEM, n=20. T0: inicio del tratamiento, T2: a los dos meses de tratamiento, T6: finalización del tratamiento.

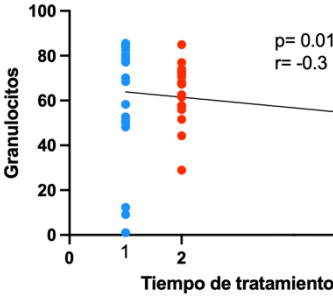
4.6. EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS INMUNES (FENOTIPO CELULAR) Y TIEMPO DE TRATAMIENTO.



B

<i>P value</i>	Granulocitos	Tratamiento	NKT++	NKT+	NK	CD19+	CD8+
Granulocitos		0,019	0,137	0,546	0,260	0,0003	0,481
Tratamiento	0,019		0,365	0,273	0,449	0,254	0,011
NKT++	0,137	0,365		1,559E-04	0,091	0,590	2,459E-06
NKT+	0,564	0,273	1,559E-04		3,760E-08	0,560	0,086
NK	0,260	0,449	0,091	3,760E-08		0,774	0,228
CD19+	3,464E-04	0,254	0,590	0,560	0,774		0,874
CD8+	0,481	0,011	2,459E-06	0,086	0,228	0,874	

C



D

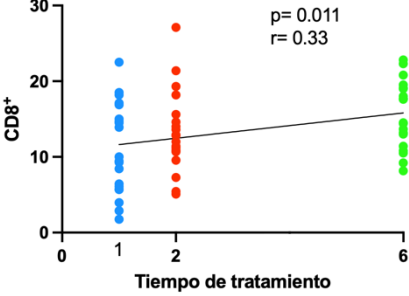
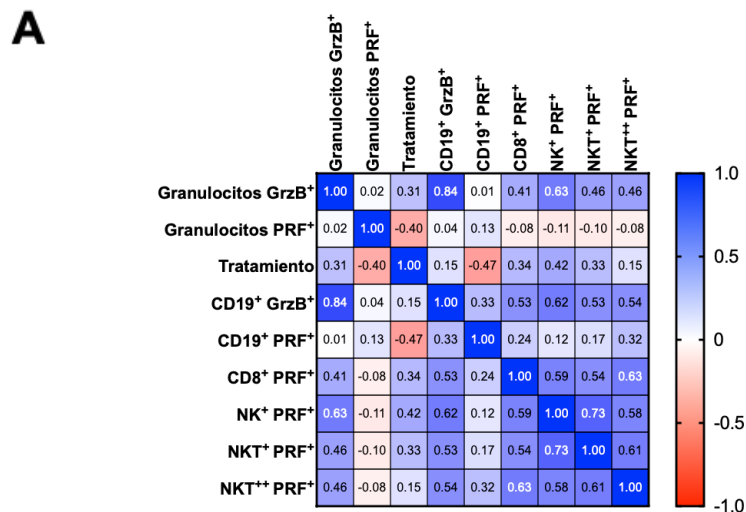


Figura 14. Correlato inmunológico de la respuesta de células inmunes al tratamiento en pacientes con TB. La ilustración del mapa de calor muestra la correlación (valores de r) entre tiempo de tratamiento y variables inmunológicas como niveles de granulocitos, células iNKT⁺⁺, iNKT⁺, NK, B y T CD8. En la leyenda del mapa de calor, los grados de alta correlación se indican en azul y rojo intenso (A). Valores de p de la correlación mostrados en la figura A (B). Correlación de niveles de granulocitos (C) y células T CD8⁺ (D) con el tiempo de tratamiento.

En este correlato inmunológico de los diversos fenotipos celulares (Figura 14), se observa; por un lado, que los granulocitos frente al tratamiento tienen una correlación negativa ($r=-0.3$), es decir, conforme aumenta los meses de tratamiento, disminuye la cantidad de granulocitos. Por otro lado, con respecto a las células CD8⁺, estas tienen una correlación positiva débil ($r=0.33$), indicando que conforme aumentan los meses de tratamiento, aumentan los niveles de CD8⁺.

4.7. EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS EFECTORAS DE CITOTOXICIDAD (PRF⁺/GRZB⁺) Y TIEMPO DE TRATAMIENTO.



B

<i>P value</i>	Granulocitos	Tratamiento	NKT++	NKT+	NK	CD19+	CD8+
Granulocitos		0,019	0,137	0,546	0,260	0,0003	0,481
Tratamiento	0,019		0,365	0,273	0,449	0,254	0,011
NKT++	0,137	0,365		1,559E-04	0,091	0,590	2,459E-06
NKT+	0,564	0,273	1,559E-04		3,760E-08	0,560	0,086
NK	0,260	0,449	0,091	3,760E-08		0,774	0,228
CD19+	3,464E-04	0,254	0,590	0,560	0,774		0,874
CD8+	0,481	0,011	2,459E-06	0,086	0,228	0,874	

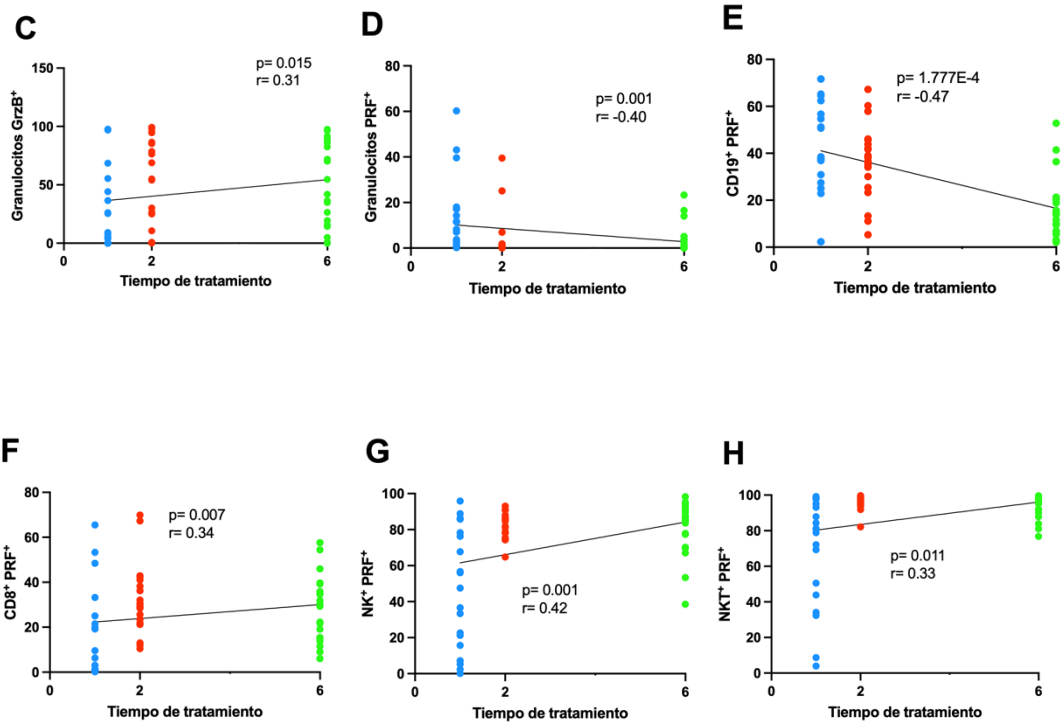


Figura 15. Correlato inmunológico de la respuesta de moléculas mediadoras de citotoxicidad al tratamiento en pacientes con TB. La ilustración del mapa de calor muestra la correlación (valores de r) entre tiempo de tratamiento y variables inmunológicas como niveles de perforina y granzima B en granulocitos, células iNKT⁺⁺, iNKT⁺, NK, B y T CD8. En la leyenda del mapa de calor, los grados de alta correlación se indican en azul y rojo intenso (A). Valores de p de la correlación mostrados en la figura B. Correlación de niveles de granulocitos GrzB⁺(C), granulocitos PRF⁺(D),

células B PRF⁺(E), células T CD8⁺ PRF⁺(F), células NK PRF⁺(G), y iNKT⁺ PRF⁺(H) con el tiempo de tratamiento.

En este correlato inmunológico sobre células efectoras de citotoxicidad produciendo PRF⁺/GrzB⁺ (Figura 15), se observa que, al completar el tratamiento, la producción de GrzB⁺ por granulocitos (Figura 15 C) y la producción de PRF⁺ por CD8⁺ (Figura 15 F), NK (Figura 15 G) y iNKT⁺ (Figura 15 H), tienen una correlación positiva, indicando que conforme aumenta los meses de tratamiento, la producción de estas moléculas también. No obstante, la producción de perforina correspondiente de granulocitos (Figura 15 D) y células B (Figura 15 E) muestran una correlación negativa moderada, indicando que conforme aumentan los meses de tratamiento, la producción de estas moléculas disminuye.

V. DISCUSIÓN

En este estudio se buscó comprender la dinámica de las diversas poblaciones de células inmunes citotóxicas circulantes (granulocitos, células B, células T, células NK, células iNKT) y la producción de moléculas citotóxicas (perforina y granzima B) a lo largo del tratamiento de 6 meses para tuberculosis pulmonar activa sensible. Asimismo, se analizó la asociación entre parámetros inmunes y la progresión clínica del paciente.

En cuanto a la progresión clínica a lo largo del tratamiento, los 20 pacientes con BK positivo o con diagnóstico clínico antes del inicio del tratamiento, evolucionaron favorablemente, logrando una conversión negativa del BK con el transcurso de los meses y al completar el tratamiento, indicando su cura exitosa.

Dentro de la población de granulocitos, se evaluó el comportamiento de los neutrófilos CD66⁺ sin observarse cambios significativos a lo largo del tratamiento. Otras investigaciones, resaltan su rol protector en TB y han demostrado que la ausencia de neutrófilos exacerba la infección por *Mtb*^[17], y que existe una expansión de esta población en las lesiones tuberculosas ^[57]. No obstante, en nuestra cohorte de pacientes se observa que en los neutrófilos hay disminución de la producción de perforina a los dos meses de tratamiento hasta que se completó el tratamiento, mientras que los niveles de granzima se mantuvieron constantes. Estos resultados sugieren que ya no era necesaria la producción de perforina debido a que a los 2 meses de tratamiento la mayoría de los pacientes presentaban un resultado de BK negativo lo que significa el control de la carga bacteriana. Respecto a la ausencia de cambios en los niveles de granzima, esto podría ser debido a que la granzima también cumple otros roles como inducir apoptosis de células infectadas ^[58].

Otra población estudiada fueron las células NK, las cuales se activan mediante receptores como el CD16 secretando citocinas para atraer más células al sitio de la infección y pueden liberar gránulos citotóxicos conteniendo perforina y granzima B que fueron

evaluadas mediante el marcador CD56^[26]. Nuestros resultados muestran una disminución de los niveles de células NK a los 2 meses de tratamiento, pero desde los dos meses (T2) hasta el final del tratamiento (T6) se observa un incremento en la población de células NK productoras de perforina. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Roy y col., del 2018, quienes indicaron que esta se incrementa tras la finalización del tratamiento. Por otro lado, Lu y col., demostraron que las células NK pueden destruir *Mtb* a través de mecanismos citotóxicos mediados por perforina, lo que refuerza el papel de estas células en el control de la infección^[48]. En casos de coinfección TB-HIV, también se ha reportado una restauración de la población de células NK tras el tratamiento anti-TB. Asimismo, se ha reportado que elevados niveles de células NK expresan bajos niveles de CD56 y están asociados a la reducida presencia de cavidades en el pulmón de los pacientes. Esto resalta el rol en la patogénesis de la enfermedad y control de la carga bacteriana^[59]. En nuestro estudio, la baja producción de perforina observada antes del inicio del tratamiento podría deberse a un estado de disfunción o inhibición de las células NK inducido por la alta carga bacteriana o por el entorno inflamatorio de la infección activa. En este sentido, el incremento de la función citotóxica de las células NK al final del tratamiento refleja la reactivación del sistema inmunológico una vez controlada la infección, permitiendo a las células NK retomar su capacidad de eliminar células infectadas.

Al igual que las células NK, las células T CD8⁺ desempeñan un papel clave en la respuesta citotóxica, mediante la eliminación de células infectadas por *Mtb*. En nuestro estudio, se observó un aumento en la población de células CD8⁺ al finalizar el tratamiento (T6), lo cual concuerda con lo reportado por Florez-Gonzalez y col., en el 2024, quienes observaron que, en pacientes con tuberculosis activa antes del tratamiento, estas células presentaban un estado de agotamiento inmunológico, caracterizado por la expresión de marcadores como PD-1 y TIM-3, pero su frecuencia aumentaba una vez completada la terapia^[60]. Asimismo, nuestros resultados coinciden con los hallazgos de Rajeswari y col., del 2005, quienes observaron un incremento en el porcentaje de células CD8⁺ productoras de perforina en pacientes tratados^[61]. Este incremento de los niveles de CD8⁺ secretando perforina cuando el paciente presenta cura, sugeriría que la carga bacteriana y

la inflamación crónica afectan esta población de células que pueden verse funcionalmente comprometidas por la exposición prolongada a antígenos y, a un microambiente inmunosupresor; sin embargo, al disminuir dichos estímulos tras el tratamiento, se recuperaría su funcionalidad.

En TB, un aspecto poco explorado es la capacidad citotóxica de las células B. Tradicionalmente reconocidas por su rol en la producción de anticuerpos, sin embargo, las células B pueden producir citocinas inflamatorias^[62] y granzima B^[63]. En este estudio, nos enfocamos en una función poco explorada, y observamos que, al igual que en los granulocitos, los niveles totales de células B no cambiaron a lo largo del tratamiento. Sin embargo, su perfil funcional mostró un patrón dicotómico: la expresión de granzima B aumentó al finalizar el tratamiento (T6), mientras que la de perforina disminuyó (Fig. 12). Este comportamiento sugiere que, una vez reducida la carga bacteriana, ya no sería necesaria una actividad citotóxica dependiente de perforina, que implica la lisis de células infectadas. En contraste, la granzima B puede tener funciones adicionales, incluyendo la modulación de respuestas inflamatorias o la inducción de apoptosis de forma más controlada^{[26][63]}. En base a nuestros resultados hipotetizamos que luego de terminado su papel citotóxico de las células B (inducido por la inflamación y quizá algunos antígenos) y haber resuelto la infección ocurriría un cambio funcional y en esta etapa podrían dedicar sus actividades a producir anticuerpos^[64]. Poco se conoce sobre la producción de perforina por células B en humanos, sin embargo, se ha descrito su rol inmunológico en lupus eritematoso: la producción de perforina que se potenciaban aún más tras la estimulación con anti-BCR e IL-21^[50]. El rol citotóxico de células B debe ser explorado más profundamente y entender su participación en la respuesta inmune a *Mtb*.

Otra población poco estudiada, pero con un papel relevante en el control de la infección por *Mtb* son las células NKT. Esta población es un tipo de célula T que presentan ciertas características de los linfocitos citotóxicos naturales (como las células NK). Son capaces de destruir patógenos como bacterias y virus y también liberan citocinas^[65]. En nuestro estudio, se observó un aumento en la producción de perforina por parte de esta población

a partir de los dos meses de tratamiento (T2), seguido de una leve disminución al finalizar (T6), particularmente en la subpoblación NKT⁺⁺. Este patrón sugiere que las células NKT podrían haber contribuido a la eliminación de células infectadas en una fase inicial del tratamiento, cuando la carga bacteriana aún es evidente. La posterior reducción en la producción de perforina podría reflejar una menor necesidad de actividad citotóxica una vez que la infección ha sido controlada. Las células NKT se caracterizan por responder rápidamente a la infección mediante la producción de citocinas y moléculas citotóxicas, por lo que su activación temprana puede ser clave para limitar la diseminación de *Mtb*. Este comportamiento dinámico sugiere que su actividad está finamente regulada en función del estado de la infección y del microambiente inmunológico.

En este estudio se evaluó la función citotóxica de diferentes poblaciones inmunes durante el tratamiento de la tuberculosis pulmonar activa. Aunque los niveles de neutrófilos y células B no variaron significativamente, se observaron cambios funcionales en su actividad citotóxica. Por otro lado, las células NK, CD8⁺ y NKT mostraron un aumento de su función citotóxica, especialmente en la producción de perforina. Estos resultados fueron respaldados por los análisis de correlación, los cuales indican, que, en la cura del paciente, los efectores de citotoxicidad desempeñan funciones diferentes en respuesta a la carga bacteriana. El escenario observado en este estudio sugiere que tanto neutrófilos y células B estarían participando activamente en la fase activa de la infección, mientras que las células NK, CD8⁺ y NKT jugarían un rol más vigilante ya en la ausencia de carga bacteriana cuando la enfermedad ya se resolvió y el paciente presenta cura.

Nuestros resultados resaltan el valor de los parámetros inmunológicos funcionales en el entendimiento de la inmunobiología de la tuberculosis y este conocimiento puede representar posibles biomarcadores para monitorear la respuesta al tratamiento, complementando métodos actuales como la baciloscopia, cuya sensibilidad es limitada [66].

VI. CONCLUSIONES

1. Al finalizar el tratamiento de TB activa, se observó que los granulocitos y células B no tuvieron cambios significativos en su frecuencia, mientras que las poblaciones celulares NK, NKT y T CD8⁺ aumentaron significativamente.
2. Luego de 6 meses de tratamiento anti TB, se observó una asociación entre la disminución de la frecuencia de granulocitos y un aumento de la frecuencia de células T CD8⁺ con el tratamiento exitoso (paciente curado).
3. Al finalizar el tratamiento se observa una disminución de producción de perforina en granulocitos y células B, mientras que en las células NK, NKT y T CD8⁺ aumentaron su habilidad de producir perforina. Con respecto a la producción de granzima B, aumentó en granulocitos y células B.
4. El tratamiento exitoso de 6 meses se asoció al aumento de la producción de GrzB por granulocitos y perforina por células T CD8⁺, NK y NKT. Se asoció a la disminución de la producción de perforina en granulocitos y células B.

VII. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES

Limitaciones:

1. Tamaño muestral (20 pacientes), de lo cual se podría considerar un estudio más grande para evaluar si hay algún cambio significativo entre los hallazgos de los fenotipos y funciones de las células inmunes de interés.
2. Asimismo, por una limitación en los fondos del estudio no fue posible adquirir la cantidad suficiente de anticuerpos para la tinción de todas las células inmunes evaluadas.

Recomendaciones:

- Se sugiere evaluar perforina y granzima B a todas las células inmunes.
- Incrementar el tamaño muestral para corroborar los resultados.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **World Health Organization.** TB disease burden: 2.1 TB incidence [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2022 [citado 25 oct 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-disease-burden/2-1-tb-incidence>
2. **Dirección General de Epidemiología, Ministerio de Salud (Perú).** Vigilancia de tuberculosis [Internet]. Lima: Ministerio de Salud; s.f. [citado 25 oct 2023] Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/vigilancia-epidemiologica/vigilancia-de-tuberculosis/>
3. **Ministerio de Salud (Perú).** Sala situacional de Tuberculosis 2024 [Internet]. Lima: Ministerio de Salud; 2 jul 2025 [citado 5 mar 2025]. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20250702082837.pdf>
4. **Ministerio de Salud (Perú).** Resolución ministerial 752-2018 [Internet]. Lima: Ministerio de Salud; 4 abr 2019 [citado 25 oct 2023]. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20190404114640.pdf>
5. **Ministerio de Salud (Perú).** Portal DPC TB [Internet]. Lima: Ministerio de Salud; s.f. [citado 25 oct 2023]. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/Contenido.aspx?op=>
6. **Lyon SM, Rossman MD.** Pulmonary tuberculosis [Internet]. *Microbiology Spectrum*. 2017 Jan;5(1):[citado 25 oct 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016>
7. **Pai M, Behr M, Dowdy D, et al.** Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges [Internet]. *Lancet Infect Dis*. 2016 Jan;16(1):e34–e46. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70034-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70034-3)

8. **Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L.** Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis* [Internet]. *Cell*. 2014 Dec 18;159(7):1497–1509. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024>
9. Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection [Internet]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):e2013070. Disponible en: <https://doi.org/10.4084/mjhid.2013.070>
10. Janeway S (2017). Immunobiology 9th edition. Garland Science. https://immunologos.wordpress.com/wp-content/uploads/2020/08/janeways-immunobiology-9th-ed_booksmedicos.org_.pdf
11. Sankar P, Mishra BB. Early innate cell interactions with *Mycobacterium tuberculosis* in protection and pathology of tuberculosis. *Front Immunol*. 2023;14:1260859. doi:10.3389/fimmu.2023.1260859
12. **Alcantara CA, Glassman I, Nguyen KH, Parthasarathy A, Venketaraman V.** Neutrophils in *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccines (Basel)*. 2023 Mar 12;11(3):631. doi:10.3390/vaccines11030631
13. **Muefong CN, Sutherland JS.** Neutrophils in Tuberculosis-Associated Inflammation and Lung Pathology. *Front Immunol*. 2020 May 27;11:962. doi:10.3389/fimmu.2020.00962
14. **Gideon HP, Phuah J, Junecko BA, Mattila JT.** Neutrophils express pro- and anti-inflammatory cytokines in granulomas from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cynomolgus macaques. *Mucosal Immunol*. 2019 Aug;12(6):1370–81. doi:10.1038/s41385-019-0195-8
15. **Ordway D, Palanisamy G, Henao-Tamayo M, Smith EE, Shanley C, Orme IM, Basaraba RJ.** The cellular immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in the guinea pig. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2532–41. doi:10.4049/jimmunol.179.4.2532

16. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, Orlova MO, Apt AS 2005. Neutrophil Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice. *Infect Immun* 73: <https://doi.org/10.1128/iai.73.3.1744-1753.2005>
17. **Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, Cooper AM.** Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun*. 2000 Feb;68(2):577–83. doi:10.1128/IAI.68.2.577-583.200
18. **van der Meer AJ, Zeerleder S, et al., .** Neutrophil extracellular traps in patients with pulmonary tuberculosis. *Respir Res*. 2017 Oct 30;18(1):181. doi:10.1186/s12931-017-0663-1
19. Rojas-Valles et al., 2023. ¿Los neutrófilos como células de defensa? *Inmunobiología y fisiopatología en las enfermedades infecciosas respiratorias humanas*. <https://www.revistanct.org.mx/resumen.php?idArt=116815&id2=>
20. Stewart, P., Patel, S., Comer, A., Muneer, S., Nawaz, U., Quann, V., ... & Venketaraman, V. (2023). Role of B cells in Mycobacterium tuberculosis infection. *Vaccines*, 11(5), 955.
21. **Althwaiqeb SA, Fakoya AO, Bordoni B.** Histology, B-cell lymphocyte. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan [citado el 24 de marzo de 2025]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32809740/>
22. Hernandez J, Velazquez C, Valenzuela O, Robles-Zepeda R, Ruiz-Bustos E, Navarro M, et al. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunol Invest* 2010;39(3):197–205. 10.3109/08820130903586346.
23. Joosten SA, van Meijgaarden KE, del Nonno F, Baiocchi A, Petrone L, Vanini V, et al. Patients with tuberculosis have a dysfunctional circulating B-cell

compartment, which normalizes following successful treatment. PLoS Pathog 2016;12(6). 10.1371/journal.ppat.1005687

24. **Wu YE, Zhang SW, Peng WG, Li KS, Li K, Jiang JK, et al.** Changes in lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. *J Int Med Res.* 2009;37(6):1742–9. doi:10.1177/147323000903700610.
25. Perera Molligoda Arachchige A. S. (2021). Human NK cells: From development to effector functions. *Innate immunity*, 27(3), 212–229. <https://doi.org/10.1177/175342592110015>
26. **Abebe F.** Immunological basis of early clearance of *Mycobacterium tuberculosis* infection: the role of natural killer cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2021;204(1):32–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/cei.13565>
27. Gwalani LA, Orange JS. Single degranulations in natural killer cells can mediate target cell killing. *J Immunol* 2018; 200: 3231–3243.
28. Netter P, Anft M, Watzl C et al. Termination of the activating NK cell immunological synapse is an active and regulated process. *J Immunol* 2017; 199: 2528–2535
29. Hsu HT, Mace EM, Carisey AF et al. NK cells converge lytic granules to promote cytotoxicity and prevent bystander killing. *J Cell Biol* 2016; 215: 875–889.
30. Van Acker, H. H., Capsomidis, A., Smits, E. L., & Van Tendeloo, V. F. (2017). CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity?. *Frontiers in immunology*, 8, 892. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00892>
31. Esin S, Batoni G, Counoupas C, Stringaro A, Brancatisano FL, Colone M, et al. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* [Internet]. 2008;76(4):1719–27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00870-07>

32. Kathamuthu, G. R., Moideen, K., Sridhar, R., Baskaran, D., & Babu, S. (2020). Diminished Frequencies of Cytotoxic Marker Expressing T- and NK Cells at the Site of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Frontiers in immunology*, 11, 585293. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585293>
33. Roy Chowdhury R, Vallania F, Yang Q, Lopez Angel CJ, Darboe F, Penn-Nicholson A, et al. A multi-cohort study of the immune factors associated with m. tuberculosis infection outcomes. *Nature* (2018) 560(7720):644–8. doi: 10.1038/s41586-018-0439-x
34. Dornell. CD8+ T cells: Foot soldiers of the immune system. *Technology Networks* [Internet]. c. 2021 [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/cd8-t-cells-348043>
35. Jiang H, Gong H, Zhang Q, Gu J, Liang L, Zhang J. Decreased expression of perforin in CD8+ T lymphocytes in patients with Mycobacterium tuberculosis infection and its potential value as a marker for efficacy of treatment. *J Thorac Dis* [Internet]. 2017;9(5):1353–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21037/jtd.2017.05.74>
36. Zahran, W. A., Ghonaim, M. M., Koura, B. A., El-Banna, H., Ali, S. M., & El-Sheikh, N. (2006). Human natural killer T cells (NKT), NK and T cells in pulmonary tuberculosis: potential indicators for disease activity and prognosis. *The Egyptian journal of immunology*, 13(1), 67–78.
37. Balato, A., Unutmaz, D., & Gaspari, A. A. (2009). Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(7), 1628-1642. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X1534389X>
38. Zhou, Y., Lan, H., Shi, H., Wu, P., & Zhou, Y. (2022). Evaluating the diversity of circulating natural killer cells between active tuberculosis and latent

- tuberculosis infection. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland), 135, 102221. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2022.102221>
39. Pandey, P., Bhatnagar, A. K., Mohan, A., Sachdeva, K. S., Vajpayee, M., Das, B. K., Samantaray, J. C., Guleria, R., & Singh, U. B. (2019). Insights in tuberculosis immunology: Role of NKT and T regulatory cells. *International journal of mycobacteriology*, 8(4), 333–340. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_141_19
 40. Lerner, T. R., Borel, S., & Gutierrez, M. G. (2015). The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular microbiology*, 17(9), 1277–1285. <https://doi.org/10.1111/cmi.12480>
 41. Snyder-Cappione JE, et al. 2007. Individuals with pulmonary tuberculosis have lower levels of circulating CD1d-restricted NKT cells. *J. Infect. Dis.* 195:1361–1364
 42. Sutherland JS, et al. 2009. High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting. *Tuberculosis* (Edinb.) 89:398–404
 43. Kee, S. J., Kwon, Y. S., Park, Y. W., Cho, Y. N., Lee, S. J., Kim, T. J., Lee, S. S., Jang, H. C., Shin, M. G., Shin, J. H., Suh, S. P., & Ryang, D. W. (2012). Dysfunction of natural killer T cells in patients with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and immunity*, 80(6), 2100–2108. <https://doi.org/10.1128/IAI.06018-11>
 44. Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Cent Eur J Immunol* [Internet]. 2014;1:109–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5114/ceji.2014.42135>
 45. Young, J. D., Liu, C. C., & Persechini, P. M. (1988). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated killing. *Brazilian journal of medical and biological research* = *Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 21(6), 1145–1153.

46. Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, et al. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* [Internet]. 2005;23(3):249–62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.001>
47. Qin, S., Chen, R., Jiang, Y., Zhu, H., Chen, L., Chen, Y., Shen, M., & Lin, X. (2021). Multifunctional T cell response in active pulmonary tuberculosis patients. *International immunopharmacology*, 99, 107898. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107898>
48. Lu, C.-C., Wu, T.-S., Hsu, Y.-J., Chang, C.-J., Lin, C.-S., Chia, J.-H., ... Lai, H.-C. (2014). NK cells kill mycobacteria directly by releasing perforin and granulysin. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(6), 1119–1129. doi:10.1189/jlb.4a0713-363rr
49. Woodworth, J. S., Wu, Y., & Behar, S. M. (2008). Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells require perforin to kill target cells and provide protection in vivo. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 181(12), 8595–8603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8595>
50. Bai, M., Xu, L., Zhao, Z., Xue, J., Zhong, H., Liu, T., Sun, F., Yao, H., Hu, F., & Su, Y. (2023). Decreased perforin-producing B cells correlate with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental rheumatology*, 41(3), 634–641. <https://doi.org/10.55563/clinexprheumatol/s16m7j>
51. Boivin, W. A., Cooper, D. M., Hiebert, P. R., & Granville, D. J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 89(11), 1195–1220. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.91>
52. Mattila JT, Maiello P, Sun T, Via LE, Flynn JL. Granzyme B -expressing neutrophils correlate with bacterial load in granulomas from Mycobacterium

- tuberculosis -infected cynomolgus macaques. *Cell Microbiol* [Internet]. 2015;17(8):1085–97. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12428>
53. Garcia-Laorden, M. I., Blok, D. C., Kager, L. M., Hoogendijk, A. J., Van Mierlo, G. J., Lede, I. O., ... & Van Der Poll, T. (2015). Increased intra-and extracellular granzyme expression in patients with tuberculosis. *Tuberculosis*, 95(5), 575-580. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472979215207676>
 54. Lee, J., Hartman, M., & Kornfeld, H. (2009). Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei medical journal*, 50(1), 1–11. <https://doi.org/10.3349/ymj.2009.50.1>.
 55. 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* [Internet]. 2019;30(1):36–49. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmcl.2018.11.005>
 56. 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 Med (Zagreb)* [Internet]. 2021;31(1):27–53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.11613/bm.2021.010502>
 57. Chinta K.C., Rahman M.A., Saini V., Glasgow J.N., Reddy V.P., Lever J.M., Nhamoyebonde S., Leslie A., Wells R.M., Traylor A., et al. (2018). Microanatomic Distribution of Myeloid Heme Oxygenase-1 Protects against Free Radical-Mediated Immunopathology in Human Tuberculosis. *Cell Rep.*;25:1938–1952. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.073
 58. Hagn, M., & Jahrsdörfer, B. (2012). Why do human B cells secrete granzyme B? Insights into a novel B-cell differentiation pathway. *Oncoimmunology*, 1(8), 1368–1375. <https://doi.org/10.4161/onci.22354>
 59. Maseko, T.G., Rambaran, S., Ngubane, S. 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* 13, 11726 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38766-7>
60. Flores-Gonzalez, J., Ramón-Luing, L. A., Falfán-Valencia, R., Batista, C. V. F., Soto-Alvarez, S., Huerta-Núñez, L., & Chávez-Galán, L. (2024). The presence of cytotoxic CD4 and exhausted-like CD8⁺ T-cells is a signature of active tuberculosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1870(6), 167219. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167219>
 61. Rajeswari, D. N., Selvaraj, P., Jawahar, M. S., Adhilakshmi, A. R., Vidyarani, M., & Narayanan, P. R. (2006). Elevated percentage of perforin positive cells in active pulmonary tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*, 123(5), 687.
 62. Carpenter, S. M., & Lu, L. L. (2022). Leveraging Antibody, B Cell and Fc Receptor Interactions to Understand Heterogeneous Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in immunology*, 13, 830482. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.830482>
 63. Xu W, Narayanan P, Kang N, Clayton S, Ohne Y, Shi P, et al. Human plasma cells express granzyme B. *Eur J Immunol*. 2014;44(1):275–84. doi:10.1002/eji.201343711
 64. **Hagn M, Jahrsdörfer B.** Why do human B cells secrete granzyme B? Insights into a novel B-cell differentiation pathway. *OncoImmunology*. 2012;1(8):1368–75. doi:10.4161/onci.22354
 65. **Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA.** Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol*. 2009 Jul;129(7):1628–42. doi:10.1038/jid.2009.30
 66. **Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A.** Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2011 May;11(5):343–54. doi:10.1038/nri2960.