



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Investigación aplicada a las Ciencias Sanitarias

**TESIS DOCTORAL**

Caracterización de parámetros inmunológicos  
en sangre de diabéticos infectada *in vitro* con  
*Mycobacterium tuberculosis*

Sara Raposo García

León, 2018





# UNIVERSIDAD DE LEÓN

Investigación aplicada a las Ciencias Sanitarias

Caracterización de parámetros inmunológicos  
en sangre de diabéticos infectada *in vitro* con  
*Mycobacterium tuberculosis*

Sara Raposo García

León, Abril de 2018



**D. Octavio Miguel Rivero Lezcano**, Doctor en Veterinaria. Investigador en la Unidad de Investigación del Complejo Asistencial Universitario de León.

**D. José Manuel Guerra Laso**, Doctor por la Universidad de León. Médico Adjunto del Servicio de Medicina Interna del Complejo Asistencial Universitario de León.

**Dña. Claudia Pérez Martínez**, Doctora en Veterinaria. Profesora titular del área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León.

**CERTIFICAN:** Que la memoria titulada “**Caracterización de parámetros inmunológicos en sangre de diabéticos infectada *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis***” ha sido realizada, bajo su dirección, en la Unidad de Investigación del Complejo Asistencial Universitario de León por **Dña. Sara Raposo García**, Licenciada en Medicina por la Universidad de Valladolid.

Consideran que dicha memoria está terminada y reúne todos los requisitos necesarios para que la interesada la pueda presentar y defender como TESIS DOCTORAL y optar al título de Doctor por la Universidad de León.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en León a 23 de Abril de 2018.

Fdo: Octavio Miguel Rivero Lezcano

Fdo: José Manuel Guerra Laso

Fdo: Claudia Pérez Martínez



Las investigaciones realizadas en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido financiadas por la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León 2013 [GRS721/A/13], por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (31/2012) y por la Sociedad Castellano-Leonesa y Cántabra de Patología Respiratoria (SOCALPAR).



**A mis padres**



*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:*

A los directores de esta Tesis Doctoral, los Doctores Octavio Miguel Rivero Lezcano, José Manuel Guerra Laso y Claudia Pérez Martínez, por su excelente dirección, por el seguimiento y la supervisión continuas. Gracias por lo que me habéis enseñado, por tener siempre una respuesta a mis múltiples preguntas y por el esfuerzo y tiempo que me habéis dedicado en estos años.

A Edu y Carol, los Técnicos de laboratorio, por tantas horas de trabajo empleadas en esta Tesis. Gracias por la motivación y el apoyo.

A todas las personas que han colaborado en la extracción y transporte de las muestras (personal de enfermería, auxiliares, celadores, conductores del Monte San Isidro...). Gracias por vuestra ayuda desinteresada. También a los pacientes diabéticos de la provincia de León y a las personas que empleamos como controles, muchos de ellos compañeros de trabajo. Gracias por permitirnos daros un pequeño pinchazo.

A mis amigos, por su interés y preocupación. Gracias por vuestro ánimo.

Y, sin duda alguna, si hay alguien a los que estoy y estaré eternamente agradecida, porque sin ellos este trabajo nunca se hubiera realizado, es a mi familia. Gracias especialmente a mi madre, a mi padre, a mi hermano, a Marta y como no, a ti, Abel. Porque siempre estáis ahí cuando os necesito. Gracias por vuestro apoyo, cariño, comprensión y dedicación. Gracias por los consejos, por el optimismo que me habéis transmitido continuamente y por la ayuda técnica prestada. Gracias por recordarme cada día que soy capaz y que lo que me proponga sólo depende de mí. Porque este trabajo es también vuestro, un millón de gracias.

Y a mis pequeños, Jimena y Gabriel. Lo primero, pediros perdón por todas las horas que me he quedado encerrada en casa sin acompañaros. Y... qué decir de vosotros. Gracias porque siempre me sacáis una sonrisa y conseguís que desconecte en los momentos más estresantes. Gracias por esos “abrazos de oso” y esos besos interminables que nos damos diariamente. Sin duda, habéis conseguido que vea este duro trabajo con otros ojos. Aunque sois pequeñitos, esta Tesis tiene una parte muy grande de cada uno de vosotros. Por todo esto y por mucho más, gracias enanos.

**MUCHAS GRACIAS**



# Índice



0 Índice .....	1
I Introducción .....	7
1 TUBERCULOSIS .....	9
1.1 Historia .....	9
1.2 Epidemiología .....	10
1.3 Microbiología .....	12
1.4 Patogénesis y clínica .....	13
1.5 Tratamiento .....	16
1.6 Factores de riesgo .....	18
Factores dependientes del huésped .....	18
Factores sociales y ambientales .....	19
Factores dependientes de la micobacteria .....	19
2 MECANISMOS INMUNOLÓGICOS FRENTE A <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	20
2.1 Respuesta inmune frente a la tuberculosis .....	20
Inmunidad innata .....	20
<i>Monocitos y macrófagos alveolares</i> .....	20
<i>Neutrófilos</i> .....	23
<i>Células epiteliales, NK y dendríticas</i> .....	25
Inmunidad adaptativa .....	26
<i>Desarrollo del granuloma tuberculoso</i> .....	28
2.2 Mecanismos antimicrobianos .....	29
2.3 Citocinas en tuberculosis .....	32
IFN $\gamma$ .....	32
TNF $\alpha$ .....	33
GM-CSF .....	34
Interleucina-15 .....	35

<b>3 DIABETES MELLITUS .....</b>	<b>36</b>
3.1 Historia .....	36
3.2 Definición y clasificación .....	37
3.3 Epidemiología .....	38
3.4 Complicaciones .....	39
3.5 Tratamiento .....	40
3.6 Comorbilidades .....	40
<b>4 BINOMIO TUBERCULOSIS Y DIABETES ....</b>	<b>41</b>
4.1 Epidemiología y clínica de la asociación .....	41
Epidemiología entre TB y DM .....	41
Efectos de la DM en la TB .....	43
<i>Efectos en las características clínicas de la TB ...</i>	<i>43</i>
<i>Efectos en la respuesta al tratamiento tubercu-</i>	
<i>lostático .....</i>	<i>44</i>
Efectos de la TB en la DM .....	45
4.2 <i>Screening</i> de tuberculosis y diabetes .....	47
<i>Screening</i> de TB en pacientes diabéticos .....	47
<i>Screening</i> de DM en pacientes con TB .....	47
4.3 Profilaxis de TB en pacientes diabéticos .....	48
4.4 Respuesta inmune frente a <i>M. tuberculosis</i> en	
diabéticos .....	49
Inmunidad innata frente a <i>M. tuberculosis</i> en dia-	
béticos .....	50
Inmunidad adaptativa frente a <i>M. tuberculosis</i> en	
diabéticos .....	52
Contribución de los modelos de ratón con DM tipo	
2 a la comprensión de la inmunidad de la TB en	
pacientes diabéticos .....	54

<b>II Planteamiento y objetivos .....</b>	<b>57</b>
1 HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	60
2 OBJETIVOS .....	60
2.1 Objetivo principal .....	60
2.2 Objetivos secundarios .....	61
<b>III Material y métodos .....</b>	<b>63</b>
1 Cepas bacterianas .....	65
2 Individualización de las micobacterias .....	65
3 Población de estudio .....	67
4 Purificación de monocitos .....	70
5 Citometría de flujo .....	71
Recuento celular .....	72
Actividad fagocítica de monocitos y neutrófilos .....	73
Producción de ROS .....	74
6 Cuantificación de citocinas mediante ensayo por in- munoabsorción ligado a enzimas (en inglés, ELISA) ..	76
7 Actividad antimicobacteriana .....	78
Actividad antimicobacteriana de sangre completa ..	78
Actividad antimicobacteriana de monocitos .....	79
8 Análisis estadístico y programas informáticos .....	80
<b>IV Resultados .....</b>	<b>83</b>
1 DIABÉTICOS TIPO 2 .....	85
1.1 Características de la población de estudio .....	85
1.2 Concentración de monocitos y neutrófilos .....	86
1.3 Fagocitosis .....	88
1.4 Viabilidad de los leucocitos en sangre .....	90

1.5 Citocinas .....	92
1.6 Producción de ROS .....	94
1.7 Actividad antimicobacteriana .....	97
Modelo de sangre completa. Comparación de dos grupos .....	97
Modelo de macrófagos derivados de monocitos. Comparación de dos grupos .....	99
Modelo de sangre completa. Diseño factorial .....	101
2 DIABÉTICOS TIPO 1 .....	104
<b>V Discusión .....</b>	<b>115</b>
<b>VI Conclusiones .....</b>	<b>129</b>
<b>VII Resumen/Summary .....</b>	<b>133</b>
<b>VIII Abreviaciones .....</b>	<b>139</b>
<b>IX Índice de tablas .....</b>	<b>143</b>
<b>X Índice de figuras .....</b>	<b>147</b>
<b>XI Bibliografía .....</b>	<b>151</b>
<b>XII Publicaciones .....</b>	<b>183</b>

# Introducción



# 1 TUBERCULOSIS

## 1.1 Historia

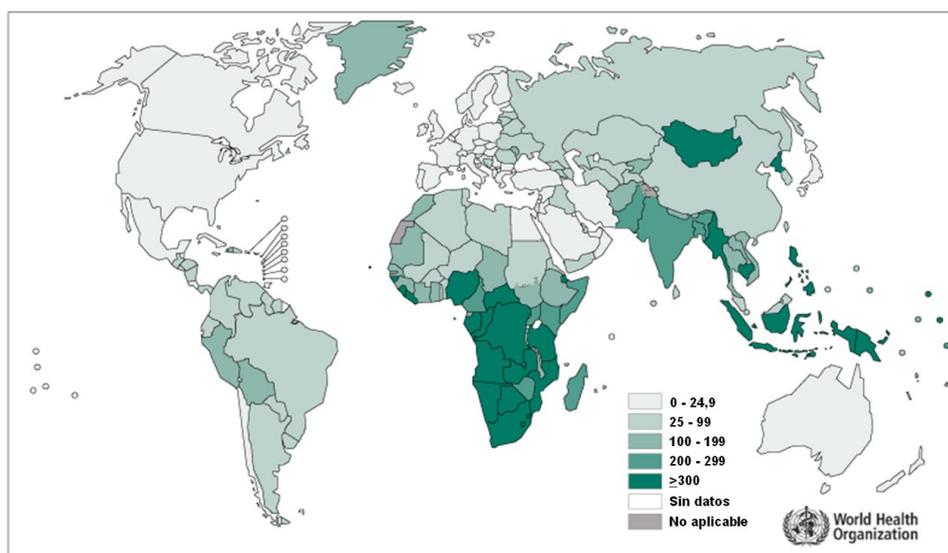
La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas con mayor morbilidad en el mundo<sup>1</sup> y la patología de origen bacteriano con mayor mortalidad global, según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016<sup>2</sup>, agravado, entre otras causas, por el incremento del número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) resistentes a fármacos<sup>3</sup>.

En la literatura hay evidencias de seres humanos afectados desde el año 2400 a.C. En los siglos XVII y XVIII, una cuarta parte de las muertes de adultos en Europa fueron causadas por la TB, debido a la pobreza, al hacinamiento y a las deficientes condiciones de ventilación y humedad de las viviendas, muy propicias para la propagación de estos microorganismos<sup>4</sup>. El agente causante de la TB fue descubierto en 1882 por Robert Koch. Posteriormente, la mejora de las condiciones de vida hizo que el número de casos comenzara a disminuir, incluso antes de que apareciesen los primeros antibióticos.

El primer antibiótico eficaz para tratar la TB fue la estreptomina. En 1952 se desarrolló un nuevo fármaco, la isoniazida, convirtiéndose desde entonces en una enfermedad curable<sup>5</sup>. La rifampicina logró que los regímenes terapéuticos se acortaran de forma significativa desde

los años sesenta. De esta manera, se consiguió un descenso progresivo de los casos hasta mediados de los años ochenta, en los que la aparición del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), la inmigración desde países con alta prevalencia de la enfermedad y la escasez de recursos sanitarios, propiciaron que la TB se convirtiera en un problema relevante, con la adquisición y propagación de nuevos casos<sup>6</sup>. Años después, la situación se agravó con la aparición de cepas multirresistentes de *M. tuberculosis* por el cumplimiento inadecuado de los tratamientos<sup>7</sup>.

## 1.2 Epidemiología



**Figura 1.** Mapa de la incidencia de tuberculosis por países en 2015. La graduación de colores corresponde a los casos nuevos estimados de TB por cada 100.000 habitantes y año. El 60% de los casos se notificaron, por orden de frecuencia, en India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica. WHO. Global Tuberculosis Report. 2016. Switzerland.

Según la OMS, a nivel mundial la cifra estimada de nuevos casos de TB en 2015 fue de 10,4 millones (Fig. 1), siendo portadores de VIH el 11% de ellos (1,2 millones)<sup>2</sup>.

En España, se calculó en 2015 una tasa de incidencia de 12 casos por cada 100.000 habitantes, con un total de 4.191 diagnósticos de TB notificados, lo cual supone un notable descenso respecto al año previo, en el cual se documentaron 5.018 casos<sup>2,8</sup>. Los datos provisionales del año 2016 muestran que, en España, el número ha disminuido ligeramente respecto al 2015<sup>9</sup>.

En Castilla y León, en el año 2015 se comunicaron 246 casos, lo que supone una tasa anual de 9,93 casos de TB por 100.000 habitantes. Como en años anteriores, las provincias que han registrado el mayor número de eventos han sido León (67) y Valladolid (39). La tasa global ha descendido un 13,6% respecto a 2014<sup>10</sup>.

En 2015, el número estimado de muertes por TB en todo el mundo fue de 1,4 millones, al que se deben sumar 0,4 millones de muertes adicionales en personas con VIH. A pesar de la reducción del 22% en los fallecimientos por TB entre 2000 y 2015, esta enfermedad continuó siendo una de las diez principales causas de muerte en 2015<sup>2</sup>.

### 1.3 Microbiología

Se han descrito más de 170 especies de micobacterias, entre las cuales se encuentran varias patógenas obligadas. En la práctica clínica, las micobacterias se clasifican en tres grupos principales: el complejo *M. tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* y micobacterias no tuberculosas<sup>11</sup>, que incluyen a las micobacterias distintas de las anteriores.

*M. tuberculosis* es el principal agente causante de la TB pulmonar en humanos. Su tamaño oscila entre 1-10  $\mu\text{m}$  de longitud X 0,2-0,6  $\mu\text{m}$  de ancho, presenta extremos redondeados y es aerobio, parásito estricto, inmóvil, de crecimiento lento y de multiplicación y virulencia variables. Se trata de un bacilo Gram positivo y ácido-alcohol resistente, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Se puede observar al microscopio óptico mediante las tinciones de Ziehl-Neelsen o auramina-rodamina<sup>12,13</sup>.

El complejo *M. tuberculosis* comprende, además, otras bacterias patógenas que comparten genéticamente más del 99% de la secuencia nucleotídica total, siendo idéntica la del ARN ribosómico 16S<sup>14,15</sup>. Las especies de micobacterias se diferencian en el rango de huéspedes que infectan, la epidemiología y la presentación clínica en humanos.

Dicho complejo está compuesto por varias especies diferentes de micobacterias. Epidemiológicamente, las más relevantes son: *M. tuberculosis*; *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), causante de la TB

bovina; *Mycobacterium africanum*, que se subdivide en dos tipos (I y II), de los cuales, el tipo I se considera epidémico del Este de África<sup>16</sup>; y *Mycobacterium caprae*, que es responsable de enfermedades en el ganado y, ocasionalmente, de patología en humanos<sup>17</sup>.

Las micobacterias carecen de factores de virulencia clásicos, como las toxinas. Sus determinantes de virulencia se pueden clasificar en nueve grupos en base a su función, características moleculares y localización celular: 1) lípidos y metabolismo de ácido grasos; 2) proteínas de la envoltura celular; 3) proteínas que inhiben los efectos antimicrobianos del macrófago; 4) proteínas quinasas; 5) proteasas; 6) proteínas transportadoras de metales (divididas en importadoras y exportadoras); 7) proteínas reguladoras de la expresión génica; 8) proteínas de función desconocida y 9) otras proteínas de virulencia<sup>18</sup>.

## 1.4 Patogénesis y clínica

La TB pulmonar, forma más común de presentación de la enfermedad, se adquiere por vía aérea. El microorganismo penetra en el tracto respiratorio a través de pequeñas gotas de 1-5  $\mu\text{m}$  de diámetro medio, procedentes de pacientes con TB pulmonar bacilífera que contienen bacterias (gotículas de Wells). Una vez en los alvéolos, los macrófagos alveolares fagocitan al *M. tuberculosis*. En este punto, es importante diferenciar entre infección y enfermedad

tuberculosa, condicionado por la virulencia de la micobacteria, la dosis infectiva y la capacidad antimicrobiana del hospedador<sup>19,20</sup>.

Un individuo que ha estado expuesto al *M. tuberculosis* y no enferma, se convierte en portador y presenta bacilos en su organismo, que permanecen en estado latente o quiescente<sup>21</sup>. Se estima que aproximadamente la cuarta parte de la población mundial (más de 2.000 millones de personas) está infectada por *M. tuberculosis*<sup>2,22</sup>. En el momento de la infección la bacteria comienza a multiplicarse dentro de los macrófagos. Posteriormente se liberan nuevos bacilos, que son fagocitados, a su vez, por otros macrófagos alveolares. Neutrófilos, monocitos y otras células del sistema inmune son atraídos hasta el foco de la infección. Tras la detección del agente causal de la enfermedad por las células presentadoras de antígenos, se desarrolla la inmunidad mediada por linfocitos T y se produce la liberación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Esta citocina es la responsable de activar al macrófago para eliminar las bacterias<sup>23</sup>. En este momento, la bacteria puede continuar replicándose (generando síntomas y enfermedad activa) o dejar de multiplicarse de forma exponencial, entrando en estado de latencia y permaneciendo quiescente durante largos periodos de tiempo, para desarrollar la enfermedad con posterioridad, existiendo también la posibilidad de que no se desarrolle en ningún momento<sup>19,23</sup>. Se denomina enfermedad tuberculosa a la situación clínica que cursa con signos o síntomas de

enfermedad activa (siendo los más frecuentes: tos crónica, febrícula o fiebre, sudoración, síndrome constitucional o hemoptisis), demostrándose además la presencia del microorganismo en alguna muestra orgánica. Si esto último no fuese posible, se deberían excluir otros posibles diagnósticos alternativos y conseguir una respuesta completa al tratamiento<sup>21</sup>.

La literatura divide los episodios de enfermedad tuberculosa en dos tipos, según la cronología de su aparición: TB primaria y TB post-primaria, también denominada secundaria o de reactivación<sup>21</sup>. Se denomina TB primaria a la forma activa de enfermedad que se desarrolla inmediatamente tras la infección, y se observa con más frecuencia en niños y adultos jóvenes que no han estado expuestos a este patógeno con anterioridad<sup>21</sup>. La TB post-primaria o secundaria se debe a la reactivación endógena meses o años después de una infección tuberculosa latente, generalmente motivado por una alteración del sistema inmune que facilita la multiplicación de las bacterias. Esto ocurre en, aproximadamente, el 5-10% de las personas infectadas por *M. tuberculosis*<sup>24</sup>. Tanto en la TB primaria como en la secundaria, si no se consigue controlar el crecimiento bacteriano, la micobacteria se puede extender a otras áreas del pulmón, formándose nuevos granulomas y fibrosis, o bien producir una diseminación bacilar vía hematológica o linfática al resto del organismo. Como resultado, se pueden originar lesiones tuberculosas en diferentes

órganos. Las localizaciones anatómicas más frecuentemente afectadas, por orden, son: ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos y articulaciones, meninges, peritoneo y pericardio, aunque prácticamente todos los órganos y aparatos pueden resultar afectados<sup>21,25</sup>.

## 1.5 Tratamiento

El tratamiento estándar es una combinación de cuatro fármacos, considerados de primera línea (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol), durante dos meses, seguidos de isoniazida y rifampicina cuatro meses más hasta completar la pauta habitual de 6 meses. En situaciones especiales, como en pacientes con hepatopatía crónica, formas meníngeas, inmunodeprimidos o portadores de patología fibrosante pulmonar (silicosis), se modifica la duración del mismo, precisando una prolongación hasta un mínimo de 9 o 12 meses. Los fármacos de segunda línea (kanamicina, amikacina, ácido paraaminosalicílico, cicloserina, etionamida y capreomicina) se emplean en caso de existir efectos secundarios con los fármacos de primera línea o bien resistencias a los mismos<sup>21</sup>.

Con las pautas habituales de tratamiento, la curación de la enfermedad se logra en un alto porcentaje de los casos. Sin embargo, la falta de adherencia al tratamiento y el mal uso de los fármacos

han contribuido a la aparición de cepas resistentes. Actualmente la OMS clasifica las resistencias en varios grupos, en función del número y tipo de antibiótico afectado, entre los cuales se encuentran la TB multirresistente (en inglés, TB-MDR), referida a las cepas resistentes al menos a isoniazida y rifampicina, y la TB extremadamente resistente (en inglés, TB-XDR), que hace referencia a los casos en los que, además de cumplir las características de TB-MDR, presentan resistencia a alguna fluoroquinolona y a uno o más de los fármacos de segunda línea inyectables (amikacina, capreomicina o kanamicina)<sup>26</sup>.

En los últimos años, el incremento del número de pacientes diagnosticados de TB-MDR es preocupante, estimándose en 480.000 enfermos a nivel mundial durante el año 2015. En ese mismo año, en España, el 2% de los casos notificados se clasificaron como TB-MDR, siendo el 5,7% de ellos TB-XDR<sup>2</sup>.

## 1.6 Factores de riesgo

Los factores de riesgo para el desarrollo de TB se pueden dividir en tres grupos:

- Dependientes del huésped.
- Sociales y ambientales.
- Dependientes de la propia micobacteria<sup>27</sup>.

### Factores dependientes del huésped

Son aquellos que ocasionan una alteración del sistema inmune del individuo. Entre ellos destacan el abuso de sustancias (como drogas por vía parenteral, el tabaco o el alcohol), la malnutrición o los niveles bajos de vitamina D. Igualmente, pacientes con infección por VIH, trasplante de órganos sólidos, tratamiento crónico con glucocorticoides o el uso de inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (en inglés, TNF $\alpha$ ) muestran una mayor predisposición al desarrollo de la enfermedad, al igual que individuos que padecen enfermedades sistémicas, entre las que destacan la silicosis, las neoplasias (en particular hematológicas y de la región de cabeza y cuello), la insuficiencia renal, el bypass gástrico, la enfermedad celíaca y la diabetes mellitus (DM), especialmente si existe un mal control glucémico<sup>27,28</sup>.

## **Factores sociales y ambientales**

Dentro de este grupo se incluyen todos aquellos que implican una mayor exposición a personas contagiosas. Son múltiples, como el contacto íntimo con una persona tuberculosa contagiosa, conversores recientes de la prueba de la tuberculina<sup>1</sup>, residentes y empleados de instituciones que hospedan a pacientes infectados (como son hospitales, centros penitenciarios, hogares de ancianos o albergues para indigentes), inmigrantes recientes de países con altas tasas de TB y un nivel socioeconómico bajo, el cual se relaciona con mayor riesgo de hacinamiento, mala alimentación, desempleo y bajo nivel educativo<sup>27</sup>.

## **Factores dependientes de la micobacteria**

El genotipo bacteriano influye en el fenotipo de la enfermedad, con una relevancia clínica directa. El genotipado permite identificar las cepas con mayor probabilidad de peor respuesta al tratamiento, en las que un tratamiento más agresivo podría resultar beneficioso. La virulencia de las diferentes especies es variable, existiendo una cepa (Beijing) con mayor patogenicidad<sup>29</sup>.

## 2 MECANISMOS INMUNOLÓGICOS FRENTE A *M. TUBERCULOSIS*

### 2.1 Respuesta inmune frente a la tuberculosis

La capacidad de la respuesta inmunitaria frente a la infección por *M. tuberculosis* es diferente en cada persona. De hecho, se ha documentado la existencia de individuos resistentes a la infección<sup>30</sup>. Esto refleja la importancia del balance que se establece entre el huésped y el patógeno tras la infección y que determinará el curso de la enfermedad<sup>31</sup>. En caso de que la inmunidad innata no pueda impedir la multiplicación del patógeno, se desarrollará la inmunidad adaptativa.

#### **Inmunidad innata**

La respuesta innata del organismo frente a agentes externos se compone de diferentes células: monocitos/macrófagos, neutrófilos, células “natural killers” (NK) y células dendríticas.

#### ***Monocitos y macrófagos alveolares***

Las células más estudiadas en la respuesta inmune frente a la TB son los macrófagos. Estas células realizan un doble papel en la respuesta inmune del hospedador. En primer lugar, son las primeras células en

fagocitar agentes extraños, que intentarán destruir mediante el empleo de distintas actividades biológicas, como la producción de especies reactivas del oxígeno (en inglés, ROS)<sup>32,33</sup>, la liberación de enzimas lisosomales en los fagosomas, la limitación de la disponibilidad de hierro para la micobacteria, la apoptosis<sup>34</sup> o la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos con adquisición de sus gránulos, que ayudarán a estas células a eliminar la bacteria (eferocitosis)<sup>35</sup>. También producen citocinas y quimiocinas<sup>32,33</sup>. Tras la fusión del fagosoma con los lisosomas se constituye el fagolisosoma, cuyo funcionamiento bloquea *M. tuberculosis*, impidiendo su maduración y evadiendo los mecanismos defensivos oxidativos<sup>36</sup>. En segundo lugar, actúan como células accesorias importantes en la respuesta inmune adaptativa mediante la presentación de antígenos<sup>37,38</sup>.

Los resultados obtenidos *in vitro* sobre la actividad antimicobacteriana de los monocitos/macrófagos son muy debatidos. La razón de esta controversia puede atribuirse a la variedad de cepas empleadas, así como a la diferencia en los modelos de cultivo e infección<sup>39-41</sup>. Se ha documentado la obtención de actividad bactericida y bacteriostática de los macrófagos frente a *M. tuberculosis* y otras especies de micobacterias mediante su activación con citocinas, como el TNF $\alpha$  y/o el IFN $\gamma$ <sup>42-44</sup>. También se han investigado vitaminas<sup>45,46</sup>, lípidos<sup>47</sup>, nucleótidos<sup>48</sup> y otras moléculas. Sin embargo, las actividades bactericidas no han sido fácilmente reproducidas por otros autores,

quienes observaron que los macrófagos humanos no prevenían la multiplicación de *M. tuberculosis*, aunque fueran activados con IFN $\gamma$ <sup>46,49</sup>. Experimentos realizados con la cepa BCG (Bacilo Calmette-Guérin) de *M. bovis* mostraron que no era posible inducir actividad antimicrobiana en macrófagos humanos frente a esta micobacteria, a pesar de emplear diversas citocinas [desde la interleucina-1 hasta la interleucina-15 (IL-15)], con la excepción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (en inglés, GM-CSF) e interleucina-3<sup>50</sup>. Incluso estudios realizados con micobacterias no patógenas como *Mycobacterium phlei*, muestran ausencia de esta actividad<sup>51</sup>.

Otro factor que es indudablemente importante en la modulación de la actividad antimicrobiana de los macrófagos, es la interacción entre diferentes citocinas. Es habitual estudiar distintas citocinas simultáneamente, especialmente IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  y son varios los grupos que ya lo han analizado, con diferentes resultados<sup>39,52,53</sup>. Vogt y Nathan probaron un gran número de ellas, y observaron que los macrófagos fueron capaces de eliminar a *M. bovis* y limitar en gran medida la replicación de *M. tuberculosis* durante varias semanas si se diferenciaban en plasma humano en presencia de GM-CSF y/o TNF $\alpha$  junto con IFN $\gamma$ <sup>52</sup>.

## ***Neutrófilos***

Estas células son los leucocitos más abundantes de la sangre y son fundamentales como primera línea de defensa<sup>54,55</sup>. No obstante, su papel en la respuesta frente a la TB es controvertido<sup>56</sup>. Exhiben receptores que les permiten reconocer a las bacterias para fagocitarlas y englobarlas en una vacuola denominada fagosoma. La mayoría de las bacterias son eliminadas por las moléculas antimicrobianas contenidas en los lisosomas, que se vierten al fagosoma<sup>57,58</sup>. Sin embargo, se ha descrito que las micobacterias inhiben la fusión de los gránulos azurófilos con el fagosoma<sup>59</sup>.

Los resultados de estudios *in vivo* sobre la capacidad de los neutrófilos para eliminar a *M. tuberculosis* son contradictorios. Se ha descrito la replicación de la bacteria en los neutrófilos encontrados en el esputo y en el lavado broncoalveolar de los pacientes con TB pulmonar activa, lo cual se consideró una incapacidad de estas células de defensa para controlar la enfermedad<sup>60</sup>. Por otro lado, los neutrófilos se han relacionado con cierta protección frente a la TB. Particularmente, en contactos de pacientes bacilíferos, el recuento de neutrófilos en sangre periférica se ha correlacionado inversamente con el riesgo de desarrollo de TB<sup>61</sup>. En el modelo humano, se ha observado que los neutrófilos activados mediante citocinas u otras moléculas (como el forbol-12-miristato-13-acetato, calcio, defensinas o

leucotrienos), son capaces de eliminar varias especies de micobacterias<sup>62-64</sup>. Sin embargo, otros autores no han podido confirmar dichos resultados<sup>39,65,66</sup>.

Los estudios *in vitro* relacionados con la actividad antimicobacteriana directa o indirecta de los neutrófilos, también presentan resultados controvertidos y variables. Varios estudios revelaron una pobre actividad antimicobacteriana de los neutrófilos, incluso después de estimular a las células con IFN $\gamma$ <sup>65,66</sup>. Kisich *et al.* observaron que la capacidad micobactericida dependía de la estimulación de los neutrófilos con TNF $\alpha$ , sugiriendo que la escasa actividad bactericida encontrada en otros trabajos, podría atribuirse a una estimulación celular inapropiada<sup>62</sup>. Sin embargo, otros autores no apreciaron este efecto<sup>39,67</sup>. También se ha descrito que los neutrófilos y sus moléculas bactericidas eliminan a *M. tuberculosis in vitro*<sup>62-64</sup>. No obstante, se ha documentado que neutrófilos infectados *in vitro* liberan elastasa neutrofílica o histonas, sin destruir las micobacterias<sup>68</sup>. Estas sustancias liberadas pueden incluso favorecer el crecimiento extracelular de *M. tuberculosis* contribuyendo a la progresión de las lesiones pulmonares<sup>69,70</sup>.

## ***Células epiteliales, NK y dendríticas***

Varios autores han estudiado la capacidad que tienen las micobacterias para unirse e invadir las células epiteliales<sup>71</sup>. Bermúdez *et al.* demostraron que *Mycobacterium avium* y *M. tuberculosis* invaden las células epiteliales alveolares A549 (neumocitos tipo II) y se replican dentro del citoplasma<sup>72</sup> desencadenando una serie de eventos, como son la producción de citocinas, quimiocinas o péptidos antimicrobianos, que favorecen el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y monocitos para la eliminación del agente patógeno<sup>73</sup>.

Las células NK representan aproximadamente el 10% de los linfocitos de la sangre periférica. *In vitro*, se ha observado que estas células pueden contribuir a la resistencia frente a las micobacterias mediante la inducción de apoptosis en monocitos infectados<sup>74</sup>. Además, la interleucina-12 (IL-12) secretada por los macrófagos, activa a las células NK para producir IFN $\gamma$  e impulsar la respuesta mediada por linfocitos “T helper”<sup>75</sup>.

Las células dendríticas constituyen otro tipo celular que forma parte de la inmunidad innata. Pueden fagocitar patógenos, como las micobacterias<sup>76</sup>. No obstante, su principal función es la de presentar antígenos, actuando como vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Una vez localizado un antígeno determinado, maduran y

migran hacia órganos linfoides secundarios, donde se lo presentan a los linfocitos T<sup>77,78</sup>.

## **Inmunidad adaptativa**

La respuesta inmunológica adaptativa es específica y su desarrollo depende, en gran medida, de la eficiencia de la inmunidad innata. Las principales células implicadas en este tipo de respuesta inmune frente a la TB son los linfocitos T, los cuales reconocen a las células presentadoras de antígenos (fundamentalmente macrófagos y células dendríticas). Se diferencian en células T de tipo CD4<sup>+</sup> o “T helper” y CD8<sup>+</sup> o “T citotóxico”. La importancia de la respuesta de las células CD4<sup>+</sup> queda muy bien reflejada en pacientes infectados por el VIH, los cuales son muy susceptibles a la reactivación de la TB debido a la disminución del número de células CD4<sup>+</sup><sup>79</sup>. Los macrófagos que albergan a la micobacteria presentan los antígenos a las células T CD4<sup>+</sup>, las cuales pueden expresar dos fenotipos principales (Th1 ó Th2) en función de las citocinas que produzcan<sup>32</sup>.

Las células Th1 producen citocinas como TNF $\alpha$  (que activa el endotelio para inducir la unión de los macrófagos y su salida de los vasos sanguíneos al foco de la infección), IFN $\gamma$  (activadora de los macrófagos) e IL-12 (que induce la proliferación de las células T, induce la producción de IFN y aumenta el número de células

efectoras). Esta respuesta favorece una progresión lenta de la enfermedad.

Por otro lado, las células Th2, activadas por la interleucina-4, producen grandes cantidades de esa misma citocina, así como de interleucina-5 e interleucina-10<sup>32,79</sup>, generando una respuesta humoral en el individuo infectado y favoreciendo el desarrollo de la TB<sup>80</sup>. Por lo tanto, que la respuesta sea de tipo Th1 o Th2 determina un tipo de respuesta, u otro, frente a la infección. En poblaciones de niños se ha observado una relación entre una producción defectuosa de IL-12 o de IFN $\gamma$  y una elevada susceptibilidad a la TB<sup>81</sup>.

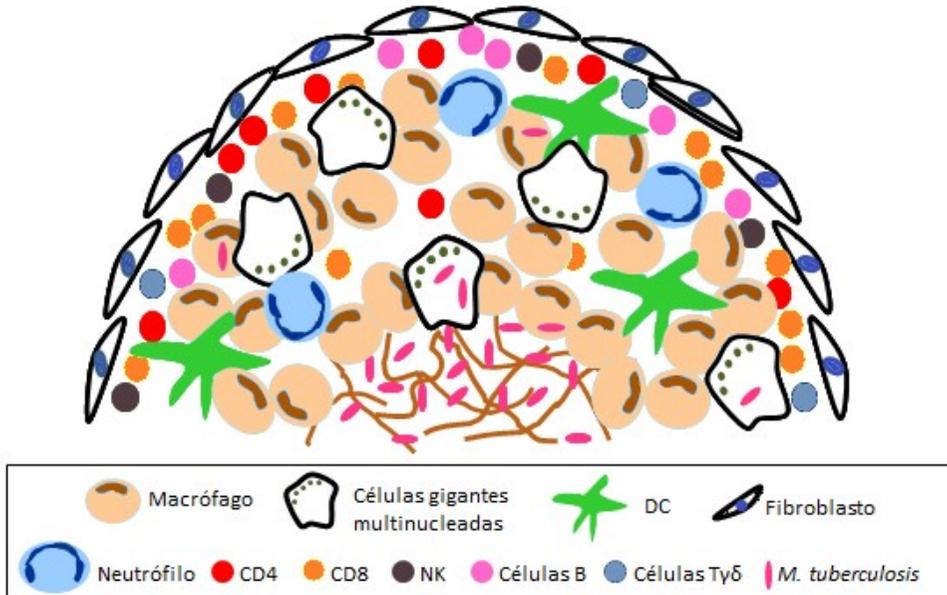
Las células CD8<sup>+</sup>, aunque consideradas de menor relevancia en el control de la TB, participan en la actividad antimicobacteriana mediante la producción de granulicina, péptido antibacteriano eficaz frente a las micobacterias tanto intra como extracelulares y mediante la génesis de determinadas citocinas (interleucina-4 e IFN $\gamma$ )<sup>32,79,82</sup>.

La respuesta inmune humoral llega con dificultad a los microorganismos intracelulares<sup>32</sup>. Por ello, históricamente se ha tendido a minusvalorar la participación de la misma en la fisiopatología de la enfermedad. No obstante, la presencia de linfocitos B en el granuloma tuberculoso y su demostrada influencia en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células T, ha hecho que se reconsidere la importancia de la respuesta humoral en

esta patología<sup>83,84</sup>. Además, las células B activadas pueden generar una amplia gama de citocinas asociadas tanto a la respuesta Th1 como a la Th2<sup>85</sup>.

### ***Desarrollo del granuloma tuberculoso***

La enfermedad tuberculosa crónica se caracteriza por la formación de granulomas tuberculosos, estructuras protectoras que localizan la inflamación, disminuyen el daño tisular e impiden la extensión de la micobacteria. Su formación se inicia con la infección de los macrófagos alveolares. Tanto los macrófagos infectados como los que no lo están, constituyen el componente mayoritario de esta estructura. Los otros componentes son células T, células B, células gigantes multinucleadas, células dendríticas y fibroblastos<sup>86,87</sup> (Fig. 2). En los humanos, el granuloma posee un área central necrótica donde aparecen micobacterias extracelulares rodeadas de linfocitos y macrófagos. Alrededor de este área se localizan unas estructuras, parecidas a los folículos linfoides, que contienen gran cantidad de macrófagos y linfocitos B y T<sup>88</sup>. El granuloma presenta una constante actividad celular. Los antígenos presentados a las células T activan la producción de citocinas y quimiocinas. Entre ellas, la síntesis de TNF $\alpha$  es de gran relevancia, al tratarse de una citocina clave en la formación y mantenimiento del granuloma<sup>89</sup>.



**Figura 2.** Granuloma tuberculoso. Definición de abreviaciones: Células Tγδ: Células T gamma/delta; CD4: Linfocito T CD4<sup>+</sup>; CD8: Linfocito T CD8<sup>+</sup>; DC: Célula dendrítica; *M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*; NK: Célula “natural killer”.

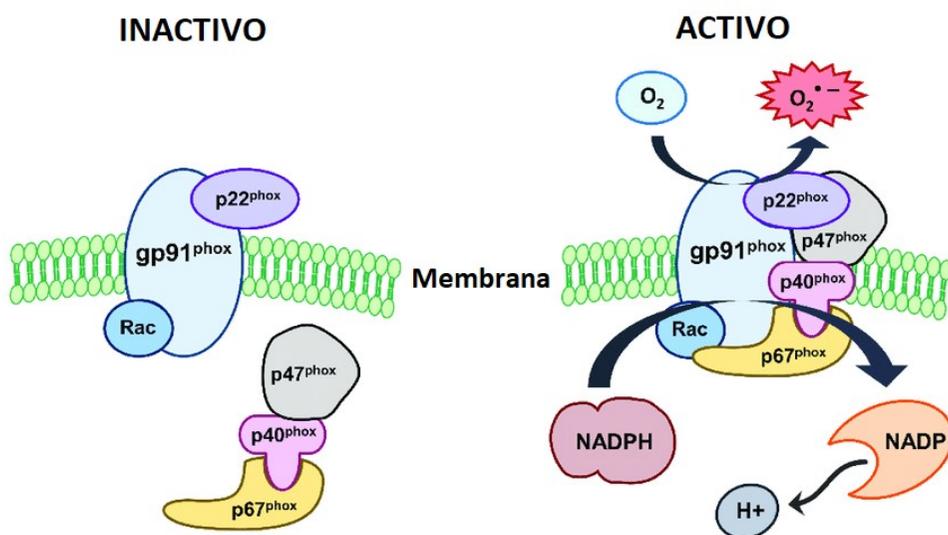
## 2.2 Mecanismos antimicrobianos

Las células poseen diversos mecanismos con los que enfrentarse a los agentes externos. Entre ellos están la producción de ROS, radicales intermediarios de nitrógeno (en inglés, RNI) y péptidos antimicrobianos (defensinas, catelicidina LL-37, granulinas y protegrinas)<sup>90</sup>, así como la actividad de enzimas (lactoferrina, catepsina G o lisozima), la restricción de acceso al hierro, imprescindible para el crecimiento de la micobacteria,<sup>91</sup> y la producción de algunas citocinas y quimiocinas importantes en la regulación de la respuesta inmune<sup>92</sup>.

La enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, presente en los fagocitos, juega un papel decisivo en la defensa del organismo mediante la producción de ROS. Se trata de un complejo enzimático constituido por varias proteínas que se encuentran distribuidas entre el citoplasma (p40phox, p47phox, p67phox y dos proteínas G, Rac1 y Rac2) y la membrana plasmática del fagocito y de los gránulos específicos (gp91phox y p22phox) cuando la célula está en reposo. Las proteínas p22phox y gp91phox componen un heterodímero denominado flavocitocromo b558. La separación de los componentes de membrana y citosólicos, asegura que esta enzima se encuentra inactiva<sup>93</sup>. Cuando la célula fagocita bacterias, la proteína p47phox es fosforilada e interacciona con p67phox. Posteriormente, el complejo es translocado a la membrana, estableciéndose interacción entre p47phox y p22phox. Como consecuencia, la enzima cataliza la producción del anión superóxido, el cual se convierte en ácido hipoclorhídrico, peróxido de hidrógeno y otros productos microbicidas<sup>94,95</sup> (Fig. 3).

La producción de ROS en fagocitos infectados por *M. tuberculosis*, se ha relacionado con la respuesta inmune a la TB. Durante mucho tiempo se ha asumido que la explosión oxidativa de los fagocitos está relacionada directamente con su capacidad antimicrobiana, pero no parece existir una relación causa-efecto, ya que la mayoría de las evidencias indican que la explosión oxidativa de los neutrófilos no

elimina a *M. tuberculosis*<sup>96</sup>. Así por ejemplo, en un trabajo realizado por González-Cortés *et al.* no se observó relación entre la producción de ROS por los neutrófilos y la capacidad antimicrobiana, debido a que *M. tuberculosis* activa la producción pero aun así se multiplica intracelularmente<sup>97</sup>. Otros autores también mostraron que *M. tuberculosis* no se elimina tras la producción de ROS por parte de los neutrófilos<sup>67</sup>. Sin embargo, la explosión oxidativa parece desempeñar un papel indirecto en la defensa contra la micobacteria, posiblemente a través de mecanismos como la apoptosis, la autofagia de fagolisosomas, la producción de citocinas o la formación de granulomas<sup>96</sup>.



**Figura 3.** Activación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa.

## 2.3 Citocinas en tuberculosis

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular. Poseen una vida media muy corta, afectan al comportamiento de otras células y actúan a bajas concentraciones mediante la unión a receptores de alta afinidad. Su expresión está estrictamente controlada, evitando así daño en el organismo por su producción prolongada o excesiva<sup>92</sup>.

### IFN $\gamma$

Es una citocina producida fundamentalmente por los linfocitos T y por las células NK<sup>79</sup>, aunque también se ha descrito la capacidad de monocitos/macrófagos activados con IL-12, interleucina-18 y/o factor estimulante de colonias de macrófagos de producirla<sup>98</sup>. Esta citocina potencia en los fagocitos la producción de ROS, aumenta la generación de óxido nítrico, regula la expresión del receptor de Fc<sup>99</sup>, del complejo de histocompatibilidad clase I y la expresión de las quimiocinas inducibles por el IFN $\gamma$ , incrementando el reclutamiento de leucocitos al foco de infección. Junto con la IL-12, el IFN $\gamma$  coordina la respuesta inmune adaptativa amplificando la respuesta Th1<sup>100</sup>.

A pesar de su importancia, el papel del IFN $\gamma$  en la lucha frente a la TB no ha sido bien aclarado. Los monocitos/macrófagos humanos activados *in vitro* con esta molécula son incapaces de eliminar a las

micobacterias. No obstante, su importancia es indiscutible, habiéndose comprobado que mutaciones deletéreas en el receptor del IFN $\gamma$  aumentan la susceptibilidad a la micobacteriosis, incluyendo aquellas causadas por especies consideradas no patógenas<sup>81,81,101</sup>. De este modo, aunque el IFN $\gamma$  es necesario en la respuesta inmune frente a la TB, no parece suficiente para terminar con la infección como se demuestra en numerosos estudios y ensayos clínicos<sup>102-104</sup>. En el modelo de ratón se ha observado la misma actividad que en humanos<sup>105</sup>. Así, ratones *knock-out* para el IFN $\gamma$ , desarrollan una mayor susceptibilidad a *M. tuberculosis*. La diferencia radica en que, en el ratón, el IFN $\gamma$  se comporta como el mayor activador de los macrófagos y, solo o en sinergia con GM-CSF, es capaz de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis in vitro*<sup>106</sup>, mientras que en los macrófagos humanos esta activación no ha sido claramente observada<sup>107</sup>.

## **TNF $\alpha$**

El TNF $\alpha$  es una de las citocinas proinflamatorias más importantes identificadas en la respuesta inmune frente a la TB, y está producida por linfocitos B y T, fibroblastos, células dendríticas, monocitos/macrófagos y células NK. Induce la producción de óxido nítrico y activa el endotelio microvascular, entre otras acciones biológicas. Favorece la fagocitosis, la necrosis tisular, la muerte

intracelular y la activación de células T<sup>108,109</sup>. Aunque no es mediador directo de la migración de leucocitos, posee un papel muy importante en la formación del granuloma tuberculoso mediante la regulación de la expresión de moléculas que contribuyen a la extravasación y al reclutamiento de neutrófilos, monocitos y linfocitos al foco de la infección<sup>92</sup>.

En estudios con ratones deficientes en TNF $\alpha$  o en su receptor, se ha comprobado un aumento importante del crecimiento bacteriano al compararlos con ratones control, lo que demuestra que la infección por *M. tuberculosis* conlleva una muerte rápida<sup>108,110</sup>. La importancia del TNF $\alpha$  en la TB se ha observado en pacientes tratados con terapias biológicas anti-TNF $\alpha$ , en los que se produce una reactivación y diseminación fatal de la enfermedad<sup>111-113</sup>.

## **GM-CSF**

El GM-CSF es producido por linfocitos Th1, Th2 y T citotóxicos. Aumenta la producción de granulocitos, macrófagos y células dendríticas. GM-CSF e interleucina-3 estimulan la producción de nuevos macrófagos cuando actúan sobre las células hematopoyéticas primarias de la médula ósea. GM-CSF tiene un papel fundamental en la defensa del huésped, concretamente en la inmunidad innata contra el bacilo de la TB. Ello es debido a que ayuda a preservar la

integridad de las células epiteliales alveolares y a regular los macrófagos y las células dendríticas, lo que facilita la contención de las micobacterias en los granulomas pulmonares. Una desregulación prolongada de la expresión de GM-CSF, favorece el desarrollo de TB pulmonar en individuos inmunocompetentes<sup>114</sup>. El deterioro de la señalización de GM-CSF determina una inmunidad innata defectuosa en los macrófagos alveolares, permitiendo una alta susceptibilidad a infecciones pulmonares<sup>115</sup>. GM-CSF tiene, a su vez, una función relevante en la inmunidad de células T contra *M. tuberculosis*<sup>116</sup>.

## **Interleucina-15**

Esta citocina tiene un amplio espectro de actividades biológicas. Es fundamental para el desarrollo, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de múltiples células, actuando tanto en el sistema inmune adaptativo como en el innato<sup>117</sup>.

La IL-15 administrada a ratones infectados con *M. tuberculosis* a las tres semanas de la infección, promueve su supervivencia, no observándose este efecto cuando se aplicaba en el momento de la inoculación<sup>118</sup>. En otro estudio experimental similar de TB en ratones con déficit de IL-15, no se observó ninguna alteración en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pero sí resultaban afectadas la producción de IFN $\gamma$  y la citotoxicidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Ello conducía a un aumento

en la mortalidad de los ratones durante la fase crónica de la infección, lo que implica que la IL-15 es necesaria para inducir mecanismos efectores en los linfocitos T CD8<sup>+119</sup>.

## 3 DIABETES MELLITUS

### 3.1 Historia

La diabetes es una enfermedad conocida desde el siglo XV a.C. En el siglo II de la era cristiana, Areteo de Capadocia le dio a esta afección el nombre de diabetes (que en griego significa *sifón*), debido a que la eliminación exagerada de agua por el riñón constituía el signo más llamativo. Tomas Willis, en 1679, refiriéndose al sabor dulce de la orina, le dio el nombre de DM. En la segunda mitad del siglo XIX, el clínico francés Bouchardat señaló la importancia de la obesidad y de la vida sedentaria en el origen de la diabetes. En 1869 se inició la búsqueda por parte de Langerhans de la presunta hormona producida por las células del páncreas. En 1921, los jóvenes canadienses Banting y Best consiguieron aislar la insulina y demostrar su efecto hipoglucemiante. Este hallazgo transformó el porvenir y la vida de los diabéticos, y abrió amplios horizontes en el campo experimental y biológico para el estudio de la diabetes y del metabolismo de los glúcidos<sup>120</sup>.

## 3.2 Definición y clasificación

La DM es un conjunto de trastornos metabólicos que comparten la característica común de presentar concentraciones elevadas de glucosa en sangre, de manera persistente o crónica, como consecuencia de un defecto en la secreción de insulina, una alteración de la respuesta a la misma a nivel periférico o ambos<sup>121</sup>.

La Sociedad Americana de Diabetes clasifica la DM en cuatro tipos:

- 1) DM tipo 1 (DM-1), en la que existe una destrucción autoinmune de las células beta del páncreas con déficit absoluto de insulina.
- 2) DM tipo 2 (DM-2), debida a un déficit progresivo de secreción de insulina sobre la base de una insulinoresistencia.
- 3) Diabetes gestacional, que es la que se diagnostica durante el embarazo y que, generalmente, desaparece al término del mismo.
- 4) Otros tipos de diabetes, debidos a diferentes causas, como defectos genéticos en la función de las células beta o en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino o inducidas por fármacos y/o productos químicos<sup>122</sup>.

Los criterios diagnósticos de la DM en la actualidad son: 1) glucemia basal en ayunas  $\geq 126$  mg/dl en dos determinaciones separadas en el tiempo, 2) hemoglobina glicosilada (HbA1c)  $\geq 6,5\%$ , 3) glucemia  $\geq 200$  mg/dl medida a las dos horas tras la ingesta en la prueba de

sobrecarga oral con glucosa (realizada con 75 gr de glucosa disuelta en agua), o 4) glucemia al azar  $\geq 200$  mg/dl en presencia de síntomas clásicos de hiperglucemia (polidipsia, poliuria, polifagia y/o pérdida de peso). En el caso de DM-1, también se puede emplear para el diagnóstico el nivel de insulina o la determinación de anticuerpos en sangre y la detección de glucosa o cuerpos cetónicos en un análisis de orina<sup>122</sup>.

### **3.3 Epidemiología**

Según los últimos datos disponibles, 422 millones de adultos padecen DM en todo el mundo, cifra que se ha cuadruplicado durante las últimas décadas. Es una de las diez enfermedades más letales a nivel mundial, con 1,6 millones de defunciones (cifra que ha aumentado respecto a los años previos)<sup>123</sup>.

En España, la prevalencia de la DM es del 10,6% en varones frente al 8,2% en mujeres. En el año 2016, la mortalidad varió en función de la edad: entre los 30 y los 69 años fue superior en los varones, invirtiéndose dicha relación en mayores de 70 años<sup>123</sup>.

Según proyecciones de la OMS, el número total de diabéticos en todo el mundo está previsto que aumente a 439 millones en 2030<sup>124</sup>, y en ese año se prevé que la DM sea la séptima causa de muerte<sup>125</sup>.

### 3.4 Complicaciones

El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM, provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en diversos sistemas orgánicos. Las complicaciones agudas (hipoglucemia, cetoacidosis, coma hiperosmolar) son consecuencia de un control inadecuado de la enfermedad. Las complicaciones crónicas pueden dividirse en vasculares y no vasculares. A su vez, las vasculares se subdividen en micro y macroangiopatía. Las complicaciones no vasculares comprenden problemas como gastroparesia, disfunción sexual y afecciones de la piel<sup>126</sup>. Además, en los pacientes diabéticos las infecciones son más frecuentes y más graves, consecuencia de las alteraciones en la vascularización y en la respuesta inmune. La hiperglucemia se relaciona con la colonización de organismos comunes, apareciendo también, en estos enfermos, infecciones provocadas por microorganismos muy poco frecuentes en otras circunstancias: mucormicosis rinocerebral, colecistitis enfisematosa y otitis externa maligna, frecuentemente provocada por *Pseudomonas aeruginosa*. El mal control glucémico es el denominador común de los sujetos con estas infecciones<sup>126</sup>. El riesgo de complicaciones crónicas está en relación con la duración de la hiperglucemia, las concentraciones plasmáticas de glucosa en ayunas y postprandiales y con el nivel de HbA1c<sup>122</sup>.

### **3.5 Tratamiento**

Actualmente, las guías internacionales recomiendan un tratamiento individualizado basado en la utilización de antidiabéticos orales, terapia insulínica o combinación de ambos, además de educación diabetológica, terapia nutricional, ejercicio físico y vigilancia del grado de control glucémico, todo ello con el fin de alcanzar los siguientes objetivos: eliminar los síntomas relacionados con la hiperglucemia, reducir o eliminar las complicaciones de la micro o macroangiopatía a largo plazo y permitir al paciente un modo de vida tan normal como sea posible<sup>122,127</sup>.

### **3.6 Comorbilidades**

El tabaquismo, la hipertensión, la dislipemia y el déficit de vitamina D, actúan sinérgicamente con la hiperglucemia para promover las complicaciones vasculares y renales de los diabéticos. El tabaquismo y el déficit de vitamina D están relacionados con la susceptibilidad a la TB en humanos<sup>128,129</sup>.

La DM-2 se asocia con niveles elevados de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) (en inglés, LDLc), descenso del colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) (en inglés, HDLc) e hipertrigliceridemia. La hiperlipemia no ha sido objeto de estudios clínicos en relación con la TB, quizá porque estas condiciones eran excepcio-

nales hasta hace poco en los países con alta carga de TB<sup>130</sup>. En modelos animales se ha demostrado una relación entre hiperlipemia y respuesta inflamatoria neutrofílica<sup>131,132</sup>. Por ello, la dislipemia podría crear una sinergia con la DM, para agravar aún más la patología tuberculosa en humanos; dicho mecanismo, que podría explicar las diferencias en la susceptibilidad a la TB entre pacientes con DM-2 y DM-1, aún no ha sido muy investigado<sup>130</sup>.

## **4 BINOMIO TUBERCULOSIS Y DM**

### **4.1 Epidemiología y clínica de la asociación**

#### **Epidemiología entre TB y DM**

Se ha observado que la DM es un factor de riesgo importante para la TB activa<sup>27,133,134</sup>. La alteración de la respuesta inmune en pacientes diabéticos, podría facilitar tanto la infección primaria por *M. tuberculosis* como la reactivación de TB latente<sup>135</sup>. Los pacientes diabéticos tienen un riesgo de desarrollar TB tres veces superior a los individuos sin DM, especialmente si presentan mal control glucémico<sup>136,137</sup>. La DM-2 comprende el 90% de los casos a nivel mundial, por lo que hay una mayor proporción de diabéticos tipo 2 con TB<sup>138</sup>. Sin embargo, la DM-1 también se asocia con un mayor riesgo de enfermedad tuberculosa<sup>139</sup>. Además, la presencia de DM en pacientes

con TB supone un incremento de 1,89 veces del riesgo de mortalidad<sup>27,140</sup>.

Tanto la TB como la DM se sitúan entre las 10 principales causas de mortalidad a nivel mundial. La incidencia de TB ha disminuido por término medio un 1,5% anual desde el año 2000 y la mortalidad por esta causa también ha descendido en las últimas décadas<sup>2</sup>. Sin embargo, el envejecimiento, los cambios en el estilo de vida, los factores socioeconómicos y el crecimiento de la población, han conducido a un aumento de la prevalencia de la DM, especialmente el tipo 2<sup>141</sup>.

El primer informe de la asociación entre ambas enfermedades lo documentó Avicena (980-1027 a.C.), hace más de mil años<sup>141</sup>. Antes de 1950 era frecuente que los diabéticos murieran por coma diabético o por TB. Esta relación desapareció de la literatura con la llegada de la insulina (para el tratamiento de la DM) y de los antibióticos (para el tratamiento de la TB)<sup>142</sup>. En décadas recientes, con el aumento de la prevalencia de TB-MDR y el mayor número de casos de diabéticos en el mundo, la asociación de estas dos enfermedades ha reaparecido como un problema de salud pública<sup>141</sup>. Por eso, la OMS ha identificado recientemente a los diabéticos como una población de riesgo emergente para el desarrollo de TB<sup>143,144</sup>.

## Efectos de la DM en la TB

### *Efectos en las características clínicas de la TB*

Las principales características clínicas de los pacientes con TB no difieren entre individuos con y sin DM. No obstante, se ha observado que las personas diabéticas con TB tienen más fiebre, mayor recuento leucocitario y mayor cifra de reactantes de fase aguda<sup>124,145-147</sup>, de lo que se deduce que la DM puede afectar a la presentación o al curso clínico de la enfermedad tuberculosa. En este sentido, la DM incrementa el riesgo de desarrollar TB activa y enfermedad tuberculosa grave<sup>130</sup>. Los pacientes diabéticos son más propensos a desarrollar TB pulmonar frente a extrapulmonar<sup>124</sup> y a presentar cavitaciones<sup>148</sup>, por lo que son más bacilíferos<sup>149</sup>.

Aunque el mecanismo fisiopatológico del efecto de la DM como factor de riesgo predisponente a la TB es desconocido, se sugieren algunas hipótesis: depresión de la inmunidad celular, disfunción de macrófagos alveolares, bajos niveles de producción de IFN $\gamma$ , microangiopatía pulmonar y déficit de micronutrientes<sup>150</sup>. Los pacientes con VIH presentan un 50% de riesgo adicional para el desarrollo de la TB, comparado con aquellos inmunocompetentes. La contribución relativa de la DM frente a otro tipo de factores de riesgo puede variar entre las comunidades, lo cual se debe considerar para el control de la TB<sup>142</sup>.

En relación a la distribución de la afectación pulmonar observada en pruebas de imagen como la radiografía o la tomografía axial computarizada, se ha demostrado una mayor afectación del lóbulo inferior entre los diabéticos tuberculosos<sup>151-153</sup>, aunque no todos los autores lo describen<sup>154,155</sup>. En determinados estudios se ha encontrado que las lesiones cavitadas son más comunes entre diabéticos<sup>147,156</sup>, especialmente las nodulares<sup>147</sup>. Esta diferencia parece más evidente entre casos de DM mal controlada<sup>157</sup>, o en diabéticos dependientes de insulina<sup>158</sup>. No se han encontrado diferencias en la frecuencia de derrames pleurales o TB pleural aislada entre pacientes con y sin DM<sup>147,155</sup>.

### *Efectos en la respuesta al tratamiento tuberculostático*

Aunque con resultados variables, se ha demostrado que la DM tiene un impacto negativo en los resultados del tratamiento tuberculostático, con un mayor índice de fracaso<sup>159,160</sup>, mayor tasa de todas las causas de mortalidad y mortalidad específicamente relacionada con la TB<sup>161</sup>.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar los peores resultados del tratamiento tuberculostático en diabéticos, incluyendo un mayor índice de resistencia a los fármacos (al encontrarse un aumento de

TB-MDR entre los diabéticos)<sup>159,162</sup>, una alteración de la inmunidad celular o un retraso en la conversión del esputo por una menor concentración de los fármacos tuberculostáticos en sangre como efecto de la hiperglucemia<sup>124,158</sup>. Por otro lado, se ha documentado una alcalinización del contenido gástrico<sup>163</sup> y una alteración en la absorción de los fármacos, incluso en ausencia de gastroparesia<sup>164</sup>.

En cuanto a la recaída de TB en pacientes con DM también hay discrepancias. Unos autores afirman que existe mayor incidencia de recaídas en diabéticos<sup>165</sup> y otros defienden lo contrario<sup>146,162</sup>.

En resumen, no hay suficiente evidencia para recomendar un régimen tuberculostático alternativo en este grupo de pacientes<sup>166</sup>.

## **Efectos de la TB en la DM**

La intolerancia a la glucosa oscila entre el 16,5% al 49% de los pacientes con TB activa. Singh *et al.* encontraron que el 56,6% de los casos con intolerancia a la glucosa en el momento del diagnóstico de TB, mostraban niveles de glucemia normales tras completar el tratamiento tuberculostático, un fenómeno denominado “hiperglucemia transitoria”<sup>167</sup>. Además, se ha observado que el control de la glucemia es más difícil durante la fase activa de la TB y muchos pacientes requieren insulina para el control de la misma<sup>168,169</sup>. La TB a menudo conduce a la hiporexia, con disminución de la masa

corporal y de la actividad física, pudiendo alterarse la homeostasis de la glucosa.

Aunque no se ha identificado una causa definida de hiperglucemia asociada con TB, se han sugerido algunos posibles mecanismos<sup>170</sup>. La inflamación causada por citocinas, tales como la interleucina-6 o el IFN $\gamma$  en respuesta a la infección tuberculosa, puede producir un aumento en la resistencia a la insulina o disminuir la producción de insulina, dando lugar a la hiperglucemia<sup>171</sup>. La rifampicina y la isoniazida tienen efectos hiperglucemiantes. La pirazinamida también puede dificultar el control de la DM<sup>168,170</sup>. Así, por ejemplo, la rifampicina altera el metabolismo hepático y hace descender los niveles en sangre de sulfonilureas, originando un aumento de los niveles de glucosa<sup>124</sup>. El efecto máximo de esta alteración se aprecia una semana después de comenzar el tratamiento y desaparece dos semanas tras la retirada de la rifampicina<sup>172</sup>. Éste fármaco, sin embargo, no parece afectar al metabolismo de la metformina ni al de la insulina<sup>124</sup>.

## **4.2 *Screening* de tuberculosis y diabetes**

### ***Screening* de TB en pacientes diabéticos**

Al igual que en otras poblaciones susceptibles a la TB (como en pacientes inmunodeprimidos por VIH o silicóticos), el *screening* para TB activa en diabéticos podría mejorar la detección de nuevos casos y conducir a un tratamiento temprano, con la consecuente prevención de la transmisión de la enfermedad<sup>143</sup>. Se pueden utilizar técnicas de imagen (como la radiografía de tórax) pero, debido a su baja especificidad, ocasionaría un “sobrediagnóstico”<sup>143,173</sup>. En la actualidad aún no hay evidencias suficientes para promover cribados activos<sup>139,150,166</sup>.

### ***Screening* de DM en pacientes con TB**

La prevalencia de DM en las poblaciones con TB presenta una amplia variabilidad, dependiendo de la serie analizada, con un rango que oscila entre el 1,9% y el 35% de la población. Muchos de los pacientes fueron diagnosticados al recibir tratamiento médico para la TB (diagnóstico *de novo*)<sup>143,167,174</sup>.

Aún no se ha determinado el mejor método de *screening* de DM en pacientes con TB<sup>150,173</sup>, aunque se aconseja la medición de la glucemia postprandial, por ser un método fácil, barato, rápido y fiable. La OMS recomienda la medición de la HbA1c como test diagnóstico

para la DM<sup>123</sup>. Sin embargo, se trata de una prueba cara y su utilidad como único test diagnóstico es controvertida. El nivel de glucosa en orina es poco sensible, especialmente en las etapas tempranas de la DM<sup>175</sup>. Tampoco se ha definido claramente el momento de realizarlo, si al inicio de la enfermedad o tras la instauración del tratamiento tuberculostático<sup>143,174,176</sup>. Sí se recomienda la verificación de la alteración de la glucosa después de la curación de la TB, ya que se ha demostrado que una glucemia alterada en ayunas es un fuerte predictor de DM en el futuro<sup>177</sup>.

### **4.3 Profilaxis de TB en pacientes diabéticos**

La Sociedad Torácica Americana ha recomendado la realización de la prueba de la tuberculina con derivado proteico purificado a todos los pacientes diabéticos, aconsejando la realización de quimioprofilaxis con isoniazida, durante 6-12 meses, en caso de mostrar una induración  $\geq 10$  mm<sup>178</sup>. No obstante, los protocolos vigentes en nuestro país no aceptan dicha recomendación<sup>179</sup>. No se dispone de evidencias suficientes para apoyar la profilaxis en pacientes diabéticos con infección tuberculosa latente, sin ningún otro criterio adicional. Sí se debe considerar en grupos de alto riesgo, como por ejemplo en el caso de diabéticos con contacto íntimo con pacientes tuberculosos<sup>150,166</sup>.

## 4.4 Respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* en diabéticos

Se ha observado que, tanto la hiperglucemia crónica como la transitoria, alteran de forma generalizada la inmunidad<sup>180</sup>. El aumento de la concentración intracelular de glucosa genera productos finales de glicación avanzados, que forman enlaces cruzados entre proteínas, aceleran la aterosclerosis, reducen la síntesis de óxido nítrico, inducen disfunción endotelial y alteran la composición y estructura de la matriz extracelular<sup>126</sup>. Estos productos son altamente reactivos y pueden unirse y modificar las moléculas de la respuesta inmune, como anticuerpos o proteínas del complemento<sup>181</sup>. Además, el exceso de estas moléculas produce una estimulación aberrante de los fagocitos con la activación de la NADPH oxidasa<sup>182</sup>. La excesiva actividad de esta enzima conlleva a la acumulación de ROS y, por lo tanto, al estrés oxidativo, que altera la respuesta inmune en diabéticos, generando una menor secreción de IL-12 en respuesta a *M. tuberculosis* (defecto que se corrige al administrar antioxidantes)<sup>183</sup>. En pacientes diabéticos, además de la hiperglucemia, no se puede excluir la influencia adicional de otros factores dependientes del huésped, como son la obesidad, la dislipemia, la edad avanzada, el déficit de vitamina D u otras comorbilidades que frecuentemente se asocian a la DM<sup>142</sup>.

Nagareddy *et al.* documentaron en ratones, que la hiperglucemia induce una mayor expresión de GM-CSF y de factor estimulante de colonias de macrófagos (en inglés, M-CSF), promotores de la producción de neutrófilos y monocitos<sup>184</sup>, lo cual puede influir en la excesiva inflamación característica de diabéticos infectados con *M. tuberculosis*<sup>130</sup>.

Actualmente, no hay métodos para cuantificar con precisión la carga bacilar o la inflamación en los seres humanos. Se ha inferido que los pacientes diabéticos tuberculosos presentan mayor carga bacilar, ya que son más propensos a tener un esputo positivo y se produce una demora en la negativización del mismo tras la instauración del tratamiento<sup>185</sup>.

## **Inmunidad innata frente a *M. tuberculosis* en diabéticos**

La mayor parte de los estudios se han enfocado en el análisis de las diferencias de los monocitos/macrófagos de pacientes diabéticos. Se ha observado una reducción en la unión y/o fagocitosis de *M. tuberculosis* por los monocitos de pacientes diabéticos en comparación con no diabéticos<sup>186</sup>. Esta diferencia sólo se observó en los medios con altas concentraciones de suero autólogo. Esto sugiere que el defecto de la entrada de *M. tuberculosis* en monocitos de diabéticos radica,

en parte, en opsoninas del suero que se depositan en la superficie bacteriana (C3b/iC3b o anticuerpos naturales), los cuales se unen a los receptores del complemento o del Fc $\gamma$ <sup>187</sup>. También se observó que los monocitos de pacientes diabéticos con TB tienen mayor expresión de CCR2, lo cual puede influir en la migración de monocitos de la sangre hacia el sitio de la infección de *M. tuberculosis*<sup>188</sup>.

En un seguimiento longitudinal de los individuos que evolucionaron de prediabéticos (definidos como aquellos que mostraban cifras de glucemia basal alterada) a diabéticos, se observó una reducción en la expresión de genes que codifican los productos que contribuyen a la actividad antimicobacteriana de los fagocitos. Entre ellos cabe mencionar la ATPasa vacuolar (ATP6V1H), que participa en la acidificación del fagolisosoma<sup>189</sup>; la hexoquinasa 2, enzima involucrada en la glicólisis aerobia, principal fuente energética de los macrófagos, y el CD28, molécula que participa en la coestimulación de los linfocitos T por las células presentadoras de antígenos<sup>190</sup>. Por otro lado, se ha sugerido que los pacientes diabéticos con TB latente o activa, tienen reducida la expresión de péptidos antimicrobianos como la catelicidina-LL37, cuando se comparan con controles no diabéticos<sup>191</sup>. En estudios realizados en ratones, se sugiere la hipótesis de que la función de los macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis* está alterada, dando lugar a una menor expresión de señales de reclutamiento de macrófagos *naïve*, células dendríticas y

neutrófilos<sup>130,188</sup>. También se ha observado una menor producción de óxido nítrico en macrófagos alveolares de ratones hiperglucémicos tras la infección con *M. tuberculosis*<sup>192</sup>.

## **Inmunidad adaptativa frente a *M. tuberculosis* en diabéticos**

En el plasma de pacientes tuberculosos diabéticos se han detectado mayores niveles de citocinas Th1 (como IFN $\gamma$ , interleucina-2 o TNF $\alpha$ ) y Th17 (interleucina-17), mayor cantidad de interleucina-10 (IL-10), menor nivel de interleucina-22<sup>193</sup> y menor frecuencia de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>)<sup>194,195</sup>. En el lavado broncoalveolar de pacientes diabéticos con TB se han encontrado niveles superiores de IL-10 e inferiores de IFN $\gamma$ , sugiriendo que es posible el desarrollo de una respuesta con predominio de Th2 en los pulmones de pacientes diabéticos<sup>196</sup>. En sujetos con TB y DM se produce una mayor expresión de citocinas de tipo 1, comparado con tuberculosos no diabéticos. Mediante el estímulo de sangre completa con antígenos de *M. tuberculosis*, se ha demostrado que la producción de citocinas tipo 1 (concretamente IFN $\gamma$ , interleucina-2 y GM-CSF) era significativamente mayor en los diabéticos tuberculosos y que los niveles de citocinas se correlacionaban con un peor control glucémico<sup>195</sup>. Dos estudios sugieren que la IL-10 se encuentra sobrerregulada en pacientes diabéticos tuberculosos frente a los

tuberculosos no diabéticos<sup>194,197</sup>, y uno de ellos encontró que la proporción IFN $\gamma$ /IL-10 fue significativamente más baja en pacientes diabéticos con TB<sup>197</sup>.

Se ha comparado *in vitro* la producción de citocinas por células inmunes de pacientes tuberculosos tras la estimulación con antígenos complejos o purificados de micobacterias. La sobreexpresión de citocinas por las células T en el contexto de TB y DM no se ha observado en todos los estudios clínicos. Así por ejemplo, Stalenhoef *et al.* no encontraron diferencias en la expresión de citocinas proinflamatorias, incluyendo IFN $\gamma$ , en la sangre de pacientes tuberculosos con o sin DM tras infectar con *M. tuberculosis*. La única diferencia significativa de este estudio fue la reducción en la producción de IL-10 en el grupo de diabéticos. Esto contrasta con los datos de Restrepo y Kumar<sup>194,195</sup>, posiblemente reflejando diferencias en las poblaciones estudiadas o en métodos como la fuente de *M. tuberculosis*<sup>198</sup>. La secreción de IFN $\gamma$  ha sido evaluada en múltiples trabajos, con resultados variables: para unos autores no existen diferencias<sup>198</sup>, mientras que otros detectaron que la secreción de IFN $\gamma$  era diferente en el grupo de diabéticos<sup>194,195,197,199</sup>. Por otro lado, Tsukaguchi K *et al.*, observaron una producción más baja *ex vivo* de IFN $\gamma$  en pacientes tuberculosos diabéticos, que se normalizaba a los 6 meses del tratamiento con tuberculostáticos, en pacientes diabéticos bien controlados, permaneciendo baja en aquellos con mal control

glucémico<sup>199</sup>. En otro estudio se observó una mayor secreción de IFN $\gamma$  por las células mononucleares de sangre periférica en pacientes diabéticos tuberculosos, comparado con tuberculosos no diabéticos, pero sólo en respuesta a péptidos codificados en la RD1 (región de diferencia 1) de *M. tuberculosis* (donde se codifican ESAT-6 y CFP-10). El resultado inverso (menor nivel de IFN $\gamma$  en diabéticos con TB) se observó con agrupaciones de péptidos para RD4, RD6 o RD10<sup>197</sup>.

En general, la mayoría de los estudios de respuesta inmune adaptativa, sugieren que los pacientes diabéticos con TB tienen una respuesta “hiperreactiva” a los antígenos de *M. tuberculosis* mediada por células. Esta inmunidad alterada requiere una evaluación adicional para determinar su relación con la mayor susceptibilidad de los pacientes diabéticos a la TB, su papel en la patología inmune y su ineficacia en la eliminación de *M. tuberculosis*<sup>142</sup>.

## **Contribución de los modelos de ratón con DM tipo 2 a la comprensión de la inmunidad de la TB en pacientes diabéticos**

Los hallazgos en un modelo de ratón con TB y DM-2 desarrollado por Martens *et al.* complementan y amplían las observaciones en humanos<sup>200</sup>. En este modelo, los ratones fueron tratados con estreptozotocina, sustancia que destruye las células beta de los islotes

del páncreas, e infectados posteriormente con una dosis baja de *M. tuberculosis* aerosolizado. Se encontró que la DM “crónica”, pero no la aguda, se asoció con una demora en la respuesta innata a *M. tuberculosis*, dando lugar a que las células dendríticas retrasaran la presentación antigénica a los ganglios linfáticos pulmonares. Esto aplaza el reclutamiento de linfocitos T necesarios para la restricción inicial del crecimiento de *M. tuberculosis*<sup>188</sup>. De acuerdo con esta predicción, a los dos meses de la infección de los ratones diabéticos, se desarrolló una mayor carga de *M. tuberculosis* en los pulmones y una inflamación más extensa con mayor expresión de citocinas proinflamatorias, como IFN $\gamma$ , manteniendo una histopatología del pulmón similar en los ratones hiperglucémicos frente a aquellos con cifras glucémicas normales<sup>200</sup>. Por otro lado, Saiki *et al.*, que también emplearon estreptozotocina, trataron a ratones hiperglucémicos con una dosis alta de *M. tuberculosis* intravenosa observando, a los 3 meses tras la infección, que el 90% de los ratones hiperglucémicos había fallecido, en comparación con menos de un 10% de los ratones con cifras glucémicas normales<sup>201</sup>. En otro modelo de ratón, utilizando también estreptozotocina, Yamashiro *et al.* mostraron que los ratones diabéticos eran más susceptibles a la TB, pero obtuvieron una menor expresión de IFN $\gamma$  e IL-12<sup>202</sup>. La diferencia en cuanto a citocinas Th1 entre los modelos puede ser debida a variaciones técnicas, ya que el grupo de Yamashiro infectó a los ratones después de 3-5 semanas del

tratamiento con estreptozotocina (DM aguda) y con dosis alta e intravenosa de *M. tuberculosis*<sup>202</sup>.

Estas diferencias en los estudios de los ratones, son análogas a las variaciones observadas en los estudios de pacientes descritos previamente y refuerzan el impacto de la cronicidad de la diabetes y la carga bacteriana en la respuesta inmune mal regulada observada en el huésped diabético<sup>142</sup>. En conjunto, los datos de los diferentes estudios en animales citados, confirman que la DM se asocia con una respuesta inmune celular temporalmente retardada, pero correcta, resultando una mayor carga bacilar y una amplia respuesta inflamatoria<sup>192,200-202</sup>.

# Planteamiento y objetivos



La TB es una enfermedad que dista de estar controlada. Aunque epidemiológicamente se han identificado grupos de riesgo, se desconocen las causas de la susceptibilidad de los mismos, lo cual dificulta el diseño de medidas terapéuticas. Uno de los grupos de riesgo más ampliamente descritos son los diabéticos, cuya respuesta inmune frente a determinadas infecciones es deficitaria por razones escasamente analizadas.

Se han realizado varios estudios de infecciones *in vitro* para intentar dilucidar a nivel celular y molecular las causas de esta susceptibilidad, sobre todo empleando el clásico modelo de macrófagos derivados de monocitos. Este modelo, sin embargo, no ha logrado demostrar actividad micobactericida, y nuestro grupo de trabajo se ha planteado emplear modelos más complejos, derivados de sangre. Hemos iniciado la caracterización de la respuesta inmunológica *in vitro* a la TB en distintos grupos de susceptibilidad, incluyendo personas de avanzada edad, fumadores o familiares de pacientes con TB. En el presente trabajo nos hemos enfocado en el que, posiblemente, sea el grupo que suscita mayor preocupación: los pacientes diabéticos, sobre todo los tipo 2, cuyo aumento en la población ya ha adquirido carácter de epidemia. Nos planteamos emplear el modelo de sangre completa, puesto que reúne las principales poblaciones celulares implicadas en la respuesta celular a la TB, analizado mediante las técnicas disponibles en la Unidad de

Investigación del Hospital, que incluyen cultivos celulares, citometría y análisis de proteínas.

## 1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El modelo de sangre completa, que comprende una gran proporción de las células inmunitarias y factores humorales que emplea la inmunidad innata para luchar contra *M. tuberculosis*, exhibirá una actividad antimicobacteriana distinta en muestras de voluntarios sanos y de individuos diabéticos. Por este motivo, en sangre de pacientes diabéticos, las funciones responsables de esta actividad, como la producción de ROS o la fagocitosis, se verán alteradas, permitiendo un mayor nivel de multiplicación intracelular del microorganismo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo principal

Determinar la actividad antimicobacteriana en sangre completa de individuos diabéticos y no diabéticos infectada *in vitro* con *M. tuberculosis* y activada con diferentes citocinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF e IL-15).

## 2.2 Objetivos secundarios

Comparar, en sangre completa de individuos diabéticos y no diabéticos infectada *in vitro* con *M. tuberculosis* (o con *M. bovis* BCGr), las siguientes funciones inmunológicas:

1. Actividad antimicobacteriana en macrófagos activados con IFN $\gamma$ .
2. Actividad fagocítica de monocitos y neutrófilos.
3. Producción de ROS en monocitos y neutrófilos.
4. Producción de citocinas.



# Material y métodos



## 1 Cepas bacterianas

*M. tuberculosis* HL186T fue aislada en el Servicio de Microbiología del Complejo Asistencial Universitario de León. Esta cepa se ha caracterizado por espoligotipado y el patrón se ha comparado con la base de datos del instituto Pasteur de Guadeloupe<sup>203</sup>. HL186T tiene el patrón internacional tipo 58 (familia T5\_Madrid2), con el código octal 777777557760771, incluido en el linaje Euro-Americano<sup>204</sup> y en el grupo de polimorfismo de nucleótido único 6a<sup>205</sup>. *M. bovis* BCG es una cepa RIVM derivada de la cepa 1173-P2<sup>206</sup>. Se cultivaron en medio agar 7H11 suplementado con 0,2% de glicerol y 10% de suplemento OADC (Ácido oleico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa, Becton Dickinson Microbiology Systems, Estados Unidos)<sup>207</sup>.

Para estudios de citometría no se pueden emplear micobacterias patógenas por razones de bioseguridad, por lo que *M. bovis* BCG fue transformada con el plásmido de expresión pMDsRed (BCGr), que contiene el gen de la proteína fluorescente DsRed.T3\_S4T<sup>208</sup>.

## 2 Individualización de las micobacterias

Partiendo de un cultivo fresco de micobacterias crecidas en agar 7H11 suplementado con OADC, se tomó un inóculo que se resuspendió en medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) sin suero. Para obtener las micobacterias individualizadas,

el inóculo se sonicó en hielo a una amplitud al 10% (2W) con un disruptor celular ultrasónico digital S-450 (Branson Ultrasonics, Estados Unidos) durante diez segundos. Posteriormente a la sonicación, el inóculo se centrifugó a 100 X g durante un minuto a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante en el que permanecen las bacterias individualizadas. Estos pasos se repitieron tantas veces como fue necesario para obtener un número apropiado de bacterias, generalmente de tres a cuatro ciclos. La viabilidad y el nivel de individualización de las bacterias se determinó con el kit de tinción fluorescente LIVE/DEAD BacLight bacterial, que tiñe de color verde las bacterias viables y de rojo las bacterias muertas. La mayoría de las bacterias consiguieron individualizarse y las escasas agrupaciones visibles fueron  $\leq 5$  bacterias por grupo. El almacenamiento y la conservación de las bacterias se realizó a  $-80^{\circ}\text{C}$  con un 20% de glicerol en alícuotas de un solo uso.

La cuantificación de las micobacterias se realizó mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (en inglés, CFU). Se inocularon por triplicado diluciones decimales de las micobacterias en placas de 96 pocillos en medio líquido 7H9 suplementado con OADC, que fueron posteriormente inspeccionadas bajo un microscopio invertido<sup>209</sup>. La incubación se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante seis a diez días.

### **3 Población de estudio**

Este estudio se llevó a cabo en el Complejo Asistencial Universitario de León, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki (2013), tras la aprobación del protocolo por el Comité Ético de Investigación Clínica y la recopilación de los consentimientos informados de todos los participantes.

Se compararon dos grupos de voluntarios: pacientes con DM-2 y voluntarios no diabéticos. La identificación de pacientes diabéticos se basó en criterios diagnósticos recomendados por la Asociación Americana de Diabetes de 2014<sup>210</sup>. Los criterios de exclusión fueron: pacientes con infección o enfermedad oncológica activa, tratamiento reciente con antibiótico o glucocorticoides, sufrir cualquier tipo de inmunodepresión, individuos menores de 18 años y aquellos que no firmaron el consentimiento informado.

Un total de 41 pacientes con DM-2, 9 con DM-1 y 49 sujetos no diabéticos (grupo control) participaron en el estudio (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1.** Características de pacientes con DM-2 y controles.

	DM tipo 2 (n=41)	Controles (n=40)	Valor p
Edad (años)	73,1 DE 11,2	68,4 DE 16,2	0,234
Sexo V/M	24/17	19/21	0,377
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28,1 DE 5,3	26,4 DE 3,8	0,113
HbA1c (%)	9,6 DE 1,9	5,7 DE 0,4	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa (mg/dL)	248,0 RI 266	89,0 RI 17	<b>&lt;0,001</b>
Colesterol total (mg/dL)	155,8 DE 46,2	175,5 DE 42,5	0,060
HDLc (mg/dL)	40,8 DE 17,0	52,2 DE 16,5	<b>0,005</b>
LDLc (mg/dL)	85,6 DE 39,7	105,5 DE 34,6	<b>0,028</b>
Triglicéridos (mg/dL)	106,0 RI 82	82,0 RI 39	<b>0,003</b>
Tratamiento con estatinas S/N	20/21	5/35	<b>&lt;0,001</b>
Insuficiencia renal crónica S/N	22/19	13/27	0,073
Test de interferón- $\gamma$ P/Ng	17/24	9/31	0,096

Los valores representan la media y la desviación estándar (DE), excepto la glucosa y los triglicéridos en los que se representa la mediana y el rango intercuartílico (RI). Los valores de p se calcularon mediante la t-Student, excepto para glucosa y triglicéridos (Mann-Whitney) y las variables sexo, tratamiento con estatinas, enfermedad renal crónica y test del interferón (prueba exacta de Fisher). Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ , indicado en negrita.

Definición de las abreviaciones: DE: Desviación estándar; DM: Diabetes mellitus; HbA1c: Hemoglobina glicosilada; HDLc: High density lipoproteins (en español, lipoproteínas de alta densidad); IMC: Índice de masa corporal; LDLc: Low density lipoproteins (en español, lipoproteínas de baja densidad); M: Mujer; N: No; Ng: Negativo; P: Positivo; RI: Rango intercuartílico; S: Sí; V: Varón.

**Tabla 2.** Características de pacientes con DM-1 y controles.

	DM tipo 1 (n=9)	Controles (n=9)	Valor p
Edad (años)	36,7 DE 14,3	36,6 DE 14,3	0,987
Sexo V/M	5/4	2/7	0,335
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,5 DE 3,7	23,6 DE 4,6	0,153
HbA1c (%)	7,7 DE 0,7	5,6 DE 0,4	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa (mg/dL)	205,4 RI 106	86,3 RI 18	<b>&lt;0,001</b>
Colesterol total (mg/dL)	177,3 DE 28,8	195,3 DE 29,7	0,327
HDLc (mg/dL)	62,1 DE 14,0	65,0 DE 21,3	0,774
LDLc (mg/dL)	99,1 DE 28,5	114,3 DE 42,2	0,455
Triglicéridos (mg/dL)	80,1 RI 54	79,8 RI 47	0,984
Tratamiento con estatinas S/N	2/7	0/9	0,471
Insuficiencia renal crónica S/N	0/9	0/9	1,000
Test de interferón- $\gamma$ P/Ng	3/6	4/5	1,000

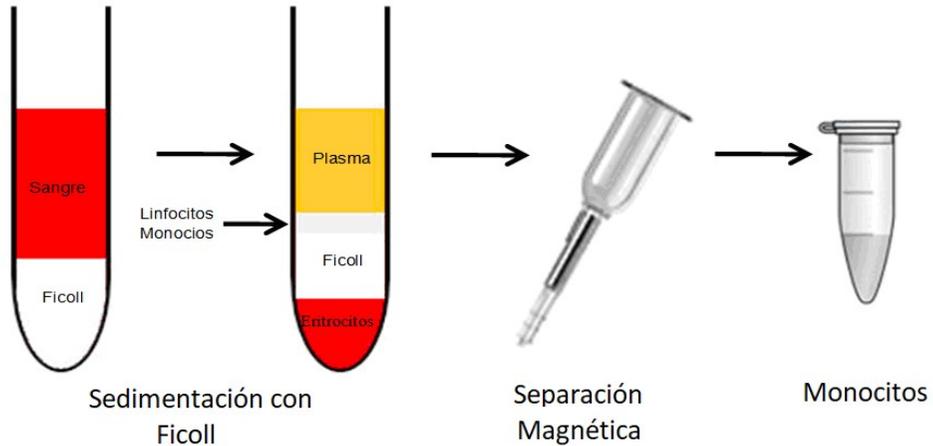
Los valores representan las medias y las DE, excepto la glucosa y los triglicéridos en los que se representa la mediana y el RI. Los valores de p se calcularon mediante la t-Student, excepto para glucosa y triglicéridos (Mann-Whitney) y las variables sexo, tratamiento con estatinas, enfermedad renal crónica y test del interferón (prueba exacta de Fisher). Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ , indicado en negrita.

Definición de las abreviaciones: DE: Desviación estándar; DM: Diabetes mellitus; HbA1c: Hemoglobina glicosilada; HDLc: High density lipoproteins (en español, lipoproteínas de alta densidad); IMC: Índice de masa corporal; LDLc: Low density lipoproteins (en español, lipoproteínas de baja densidad); M: Mujer; N: No; Ng: Negativo; P: Positivo; RI: Rango intercuartílico; S: Sí; V: Varón.

Adicionalmente, se reclutaron 9 pacientes con DM-1 que se analizaron por separado. La identificación de los pacientes y los criterios de exclusión, fueron los mismos que los empleados para los pacientes diabéticos tipo 2 (Tabla 2).

## **4 Purificación de monocitos**

La purificación de las células mononucleares, tanto en sangre de diabéticos como en la de controles, se realizó mediante un gradiente de sedimentación con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Estados Unidos), y las células CD14<sup>+</sup> (monocitos) fueron aisladas por separación magnética (Miltenyi Biotec, Alemania) y resuspendidas en el medio apropiado antes de las primeras cuatro horas tras su extracción. La pureza de los monocitos fue determinada por citometría de flujo (FacScan) usando los anticuerpos anti-CD45 (panleucocitario) y anti-CD14 (que reconocen monocitos). Se determinó que tenían una pureza > 94% en todas las purificaciones.



**Figura 4.** Purificación de monocitos. Se deposita la sangre sobre el Ficoll y, tras una centrifugación, se consiguen capas separadas: en la zona superior y de color amarillo, el plasma; a continuación, de color blanquecino, el Buffy Coat, formada por células mononucleares (linfocitos y monocitos); posteriormente el Ficoll y, en la parte inferior, neutrófilos y eritrocitos de color rojo. Se extrae el Buffy Coat, al que se le añade tampón y se centrifuga varias veces. Posteriormente, se agregan anticuerpos anti-CD14 (marcador de monocitos) y la mezcla finalmente se pone en la columna magnética en la que hay anticuerpos específicos de monocitos, uniéndose los anti-CD14 a la columna, separándose así los monocitos de los linfocitos. Por último, se separa el imán de la columna y se recogen los monocitos.

## 5 Citometría de flujo

Para el reconocimiento de los linajes celulares en los distintos análisis funcionales por citometría de flujo, las muestras se tiñeron con anticuerpos monoclonales apropiados conjugados directamente con fluorocromos (Becton Dickinson, Estados Unidos): Anti-CD66b (para neutrófilos) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (en inglés, FITC), detectado en FL1 y anti-CD14 (marcador de monocitos)

conjugado con FITC, detectable en FL1 o con el complejo proteína clorófila peridina (en inglés, PerCP), detectado en FL3. Para el análisis de muestras infectadas *in vitro* empleamos la micobacteria *M. bovis* BCG transformada (BCGr), que se detecta en FL2. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScan y los datos se analizaron con el software CellQuest (Becton Dickinson, Estados Unidos).

Para la preparación de las muestras, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de sangre, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo monoclonal de interés y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Se incubó durante 10 minutos, con 2 mL de tampón de lisis de hematíes con cloruro amónico. Se centrifugaron las células a 1.100 X g durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se mezcló con 2 mL de tampón PBS (Phosphate-buffered saline). Se centrifugaron las células a 1.100 X g durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendieron las células en 250  $\mu\text{L}$  de PBS y se analizó la muestra en un citómetro de flujo.

## **Recuento celular**

El recuento absoluto de monocitos y neutrófilos por citometría se realizó con el kit Stepcount (Immunostep, España), que proporciona microesferas fluorescentes. Como el número de partículas es conocido, se puede establecer una relación directa con cualquier población

celular identificada con los anticuerpos añadidos, siguiendo la relación:

RCA: Recuento celular absoluto (células/ $\mu\text{L}$ ).

PC: Número de eventos de la población celular.

M: Número de eventos en recuento absoluto de región de microesferas.

MT: Número de microesferas por test (número suministrado por el fabricante).

V: Volumen de la muestra.

$$\text{RCA} = \text{PC}/\text{M} \times \text{MT}/\text{V}$$

En experimentos con incubaciones de varios días, en que los marcadores inmunofenotípicos de las células cambian, el recuento de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos se realizó utilizando un sistema CELL-DYN 3700 (Abbott Diagnostics, Estados Unidos), basado en el análisis multiparamétrico de la dispersión de la luz, medida a  $0^\circ$ ,  $10^\circ$ ,  $90^\circ$  y  $90^\circ$  despolarizada.

### **Actividad fagocítica de monocitos y neutrófilos**

Sangre al 40% fue infectada con  $5 \times 10^5$  bacterias/mL de *M. bovis* BCG transformada con una proteína fluorescente roja. El cultivo se realizó en tubos de 2 mL con un volumen final de 300  $\mu\text{L}$  en medio RPMI-1640. Se incubó en un agitador rotatorio a  $37^\circ\text{C}$  durante 2

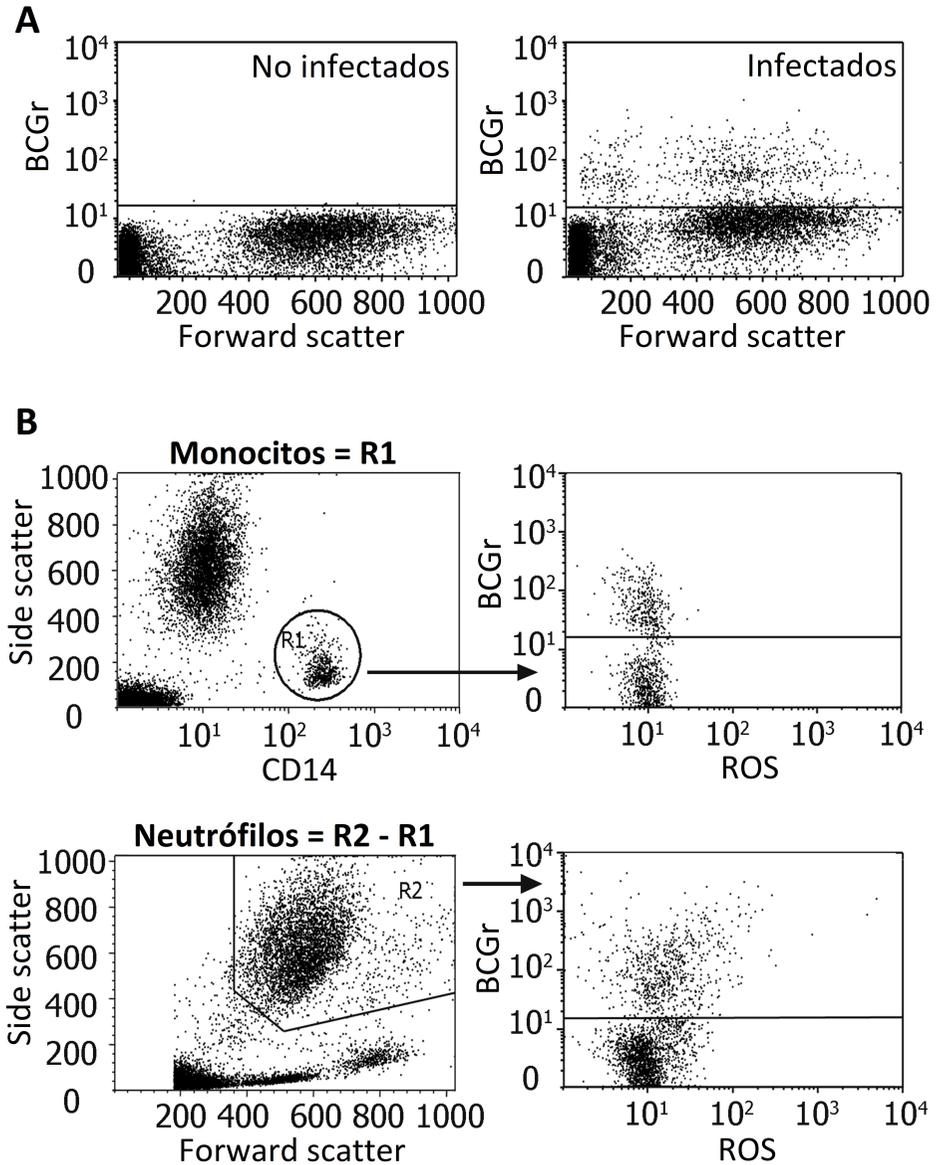
horas, y se analizaron por citometría de flujo. Los linajes celulares se tiñeron con Anti-CD66b-FITC y anti-CD14-PerCP.

La fagocitosis se midió como el índice fagocítico, determinado por el número de neutrófilos o monocitos asociados con bacterias fluorescentes, dividido por el número total de neutrófilos o monocitos.

## **Producción de ROS**

Para la detección de ROS, se infectaron 50  $\mu$ L de sangre con  $5 \times 10^5$  bacterias/mL de *M. bovis* BCG transformada durante 15 minutos a 37°C y se añadió el reactivo “CellROX Green” (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), detectable en FL1 y anti-CD14-PerCP, para identificar los monocitos en FL3, siendo incubado durante 30 minutos.

La producción de ROS se midió con el reactivo “CellROX Green”, que en estado reducido es prácticamente indetectable pero que al oxidarse aumenta dramáticamente su fluorescencia. Después de la tinción se realizó un paso de lisis con cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y se adquirieron los datos en el citómetro de flujo FACScan. Se analizaron los datos con el software CellQuest (Becton Dickinson, Estados Unidos).



**Figura 5.** Producción de ROS en fagocitos infectados con *M. bovis* BCG transformada (BCGr). **A:** Detección de células infectadas con *M. bovis* BCG transformada con el plásmido de expresión pMDsRed (BCGr). **B:** Estrategia de citometría de flujo: las células marcadas con  $CD14^+$  (R1) se consideraron monocitos. Los neutrófilos fueron identificados de acuerdo a sus propiedades de dispersión de la luz en el diagrama de puntos (en inglés, dot plot) de dispersión frontal (en inglés, Forward Scatter, FSC) y dispersión lateral (en inglés, Side Scatter, SSC), realizando un filtrado (en

inglés, gating) de la zona del dot plot característicamente ocupada por los neutrófilos. Posteriormente se restaron electrónicamente las células CD14<sup>+</sup>, para eliminar los escasos monocitos que se hubieran detectado en la región de los neutrófilos (R2-R1). El reactivo “CellROX Green” permitió el análisis de la producción de ROS.

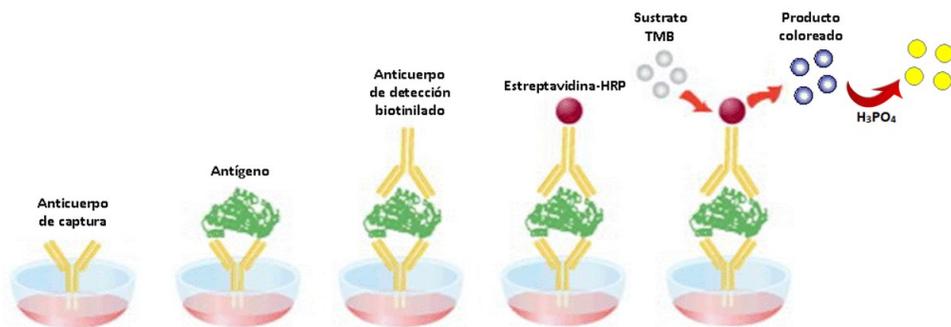
Definición de las abreviaciones: BCGr: *M bovis* BCG transformada con el plásmido de expresión pMDsRed; ROS: Reactive oxygen species (en español, especies reactivas del oxígeno).

## **6 Cuantificación de citocinas mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (en inglés, ELISA)**

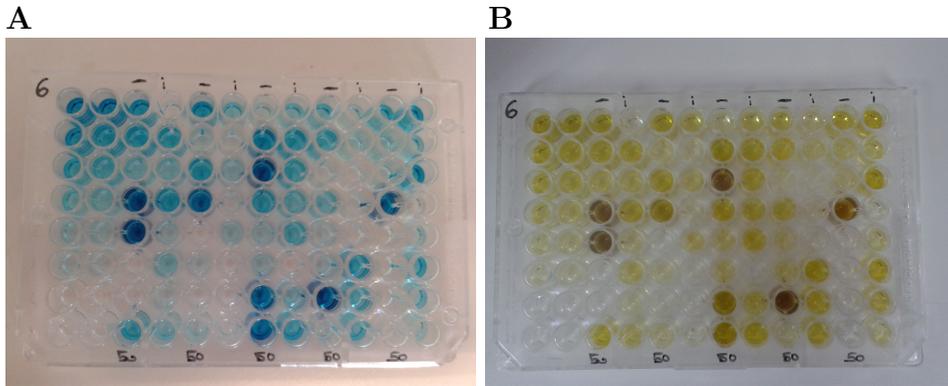
Para los estudios de cuantificación de citocinas, se obtuvieron sobrenadantes de sangre infectada al 40% con  $5 \times 10^5$  bacterias/mL de *M. tuberculosis* y el volumen se ajustó con medio RPMI-1640 para un volumen final de 300  $\mu$ L en tubos de 2 mL. Se incubó durante 2 días en agitador rotatorio a 37°C. Para la obtención de los sobrenadantes, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 16.000 X g. Para eliminar las bacterias restantes, los sobrenadantes fueron centrifugados durante 3 minutos a 10.000 X g a temperatura ambiente en filtros con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m (Ultrafree MC filter units; Millipore Iberica, España) y congelados a -80°C.

Las citocinas se cuantificaron por ELISA de tipo sándwich. Se midieron las citocinas TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF e IL-15 mediante los siguientes sets: BD OptEIA Human TNF $\alpha$  ELISA; BD OptEIA

Human IFN $\gamma$  ELISA; BD OptEIA Human GM-CSF ELISA y BD OptEIA Human IL-15 ELISA, respectivamente para cada citocina, siguiendo las instrucciones del fabricante (Becton Dickinson, Estados Unidos). Se empleó un espectrofotómetro Opsy MR (Dynex technologies, Estados Unidos). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.



**Figura 6.** Cuantificación de citocinas por ELISA tipo sándwich. En este ensayo se une un anticuerpo específico de la proteína que se analiza a la placa, se bloquea con albúmina sérica bovina el resto de sitios de la placa no ocupados por el anticuerpo, se añade la muestra, y tras un nuevo lavado se añade un segundo anticuerpo biotinilado que reconoce la misma proteína, pero en un epítipo distinto. La cuantificación de la proteína se realizará incorporando estreptavidina (que se une con gran afinidad a la biotina) acoplada a una peroxidasa (en inglés, horseradish peroxidase, HRP), que convierte el sustrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en un producto azul. Tras la adición de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 1 M, el sustrato cambia a amarillo (Fig. 7) y puede ser medido a 450 nm.



**Figura 7.** Cuantificación de citocinas por ELISA. Tras añadir ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 1 M (A), el sustrato cambia a amarillo (B).

## 7 Actividad antimicrobacteriana

### Actividad antimicrobacteriana de sangre completa

Sangre al 40% fue infectada con  $5 \times 10^5$  bacterias/mL (*M. tuberculosis* HL186T) en tubos de 2 mL. Cuando fue necesario se añadieron 25 ng/mL de IFN $\gamma$  (actividad específica  $\geq 2 \times 10^7$  unidades/mg, Peprotech, Londres, Reino Unido), TNF $\alpha$  ( $\geq 2 \times 10^7$  unidades/mg), GM-CSF ( $\geq 1 \times 10^7$  unidades/mg) o IL-15 ( $\geq 2 \times 10^6$  unidades/mg) y se incubó en un agitador rotatorio a 37°C durante 2 días. En el momento de la infección se incubó la dosis empleada en medio 7H9 para cuantificar el número de bacterias inoculadas, considerado este punto como “tiempo 0”. Tras 2 días de incubación, las células fueron lisadas por choque hiposmótico, diluyendo 10  $\mu$ L de la infección en 390  $\mu$ L de agua. Al cabo de 2 minutos, se añadieron 50  $\mu$ L de suplemento OADC y 50  $\mu$ L de medio 7H9 concentrado 10

X (Biolife italiana, Italia), para permitir el crecimiento de las micobacterias, con 2% de glicerol.

### **Actividad antimicobacteriana de monocitos**

Monocitos ( $10^5$  células) en medio RPMI-1640 con 10% de suero autólogo en un volumen final de 100  $\mu$ L fueron infectados en placas de 96 pocillos con *M. tuberculosis* ( $10^3$  bacterias) y se añadió IFN $\gamma$  (25 ng/mL) cuando fue necesario. Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C en 95% aire/5% CO<sub>2</sub> y durante este tiempo se diferenciaron espontáneamente a macrófagos. Las células infectadas se lisaron por sonicación con un ultrasonido digital S-450 con micropunta (Branson Ultrasonics, Emerson, Estados Unidos), al 10% de amplitud (2W) durante 3 segundos.

En ambos casos (sangre lisada y macrófagos derivados de monocitos), se inocularon diluciones decimales en medio completo 7H9 en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 7-9 días. Las CFU se contaron en un microscopio invertido a 100 aumentos<sup>209</sup>.

## 8 Análisis estadístico y programas informáticos

La transformación logarítmica de CFU siguió una distribución normal (Shapiro Wilks test) y las comparaciones entre los dos grupos se analizaron con el test t-Student para datos independientes. El resto de datos que se compararon entre los grupos diabéticos y no diabéticos [recuento celular, porcentaje de fagocitos infectados, mediana de intensidad de fluorescencia (en inglés, MFI) en los estudios funcionales de citometría de flujo y la concentración de citocinas] no se distribuyeron normalmente y fueron analizados usando el test no paramétrico de Mann-Whitney.

El  $\log_{10}(\text{CFU})$ , que sigue una distribución normal, se contrastó mediante un diseño factorial  $2^4$ , empleando el programa estadístico Stat-Ease. Se analizaron cuatro factores cuantitativos: Las citocinas  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-15 y GM-CSF, con los dos niveles: “bajo” (0 ng/mL) o “alto” (25 ng/mL) y un factor cualitativo (grupo de diabéticos y grupo de no diabéticos). Los diseños factoriales son eficientes porque en un solo experimento se obtienen varias estimaciones de cada factor, lo cual permite menores tamaños de muestra. Adicionalmente, estos diseños facilitan el análisis de interacciones entre factores. Cada una de las parejas (un diabético - un no diabético) constituyeron un bloque y en cada experimento se

hicieron 20 infecciones totales: 16 se corresponden con las diferentes combinaciones posibles de citocinas ( $2^4$ ), junto con 4 puntos centrales (12,5 ng/mL de todas las citocinas juntas), empleado para estimar la variabilidad de los experimentos. La variable respuesta que se analizó fue  $\log_{10}(\text{CFU})$ . Para detectar diferencias de  $0,48 \log_{10}(\text{CFU})$  (correspondiente a una variación de  $\pm 3$  veces), con 6 parejas la potencia será  $> 90\%$ .

El análisis se realizó con PASW Statistics 18 (International Business Machines, Estados Unidos). En todos los análisis estadísticos, se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .



# Resultados



# 1 DIABÉTICOS TIPO 2

## 1.1 Características de la población de estudio

Las características basales de la población de estudio se muestran en la Tabla 1. El rango de edad de los participantes osciló entre los 32 y los 96 años; no obstante, los ancianos fueron los más representados en ambos grupos, como consecuencia de las características demográficas de nuestra área, con una gran proporción de población de edad avanzada. La proporción varón/mujer fue 1,41 para el grupo de diabéticos y 0,90 para el grupo control. El índice de masa corporal (IMC) fue mayor en el grupo de diabéticos tipo 2; no obstante, el grupo control también mostró sobrepeso. La proporción de enfermedad renal crónica fue superior en el grupo de diabéticos. Sin embargo, las diferencias en estas 4 variables no llegaron a ser estadísticamente significativas.

El resultado de la prueba QuantiFERON TB Gold In-tube presentó una proporción positivo/negativo de 0,71 en el grupo de diabéticos y de 0,29 en el grupo control. Aunque el número de positivos fue comparativamente mayor en el grupo de diabéticos, la diferencia tampoco alcanzó significación estadística.

Los pacientes diabéticos mostraron un perfil lipídico característico: cifra elevada de triglicéridos y niveles de HDLc bajos<sup>211</sup>. Los niveles

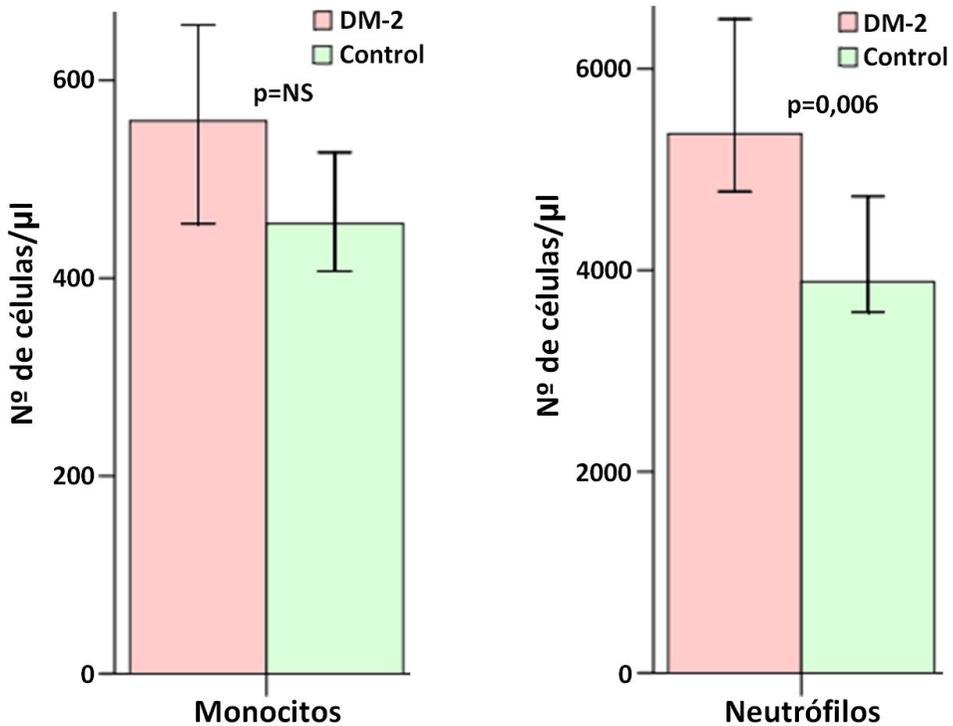
de LDLc en el grupo de DM-2 resultaron más bajos de lo esperado, debido al mayor empleo de estatinas en estos pacientes.

Se apreciaron diferencias significativas en el valor de la HbA1c y en el nivel de glucemia en ayunas, demostrando un mal control glucémico en los diabéticos.

## **1.2 Concentración de monocitos y neutrófilos**

La relación entre el recuento total y las diferentes subpoblaciones de los leucocitos en sangre de diabéticos ha sido objeto de estudio. Se ha demostrado que los individuos con recuentos totales elevados, especialmente de neutrófilos y linfocitos, tienen mayor riesgo de desarrollar diabetes<sup>212</sup>.

Previo al análisis de la respuesta inmune frente a la infección *in vitro* de la sangre, comprobamos si la muestra estudiada también tenía diferencias en el número de leucocitos, para lo cual se realizó un recuento de monocitos y neutrófilos en ambos grupos (pacientes diabéticos y controles) (Fig. 8).



**Figura 8.** Concentración de monocitos y neutrófilos en pacientes diabéticos tipo 2 y controles. Se representa el valor numérico de las medianas. Las barras de error corresponden al 95% del intervalo de confianza, que son asimétricas al no seguir una distribución normal. Las comparaciones entre los 2 grupos se realizaron con el test de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: DM-2: Diabetes mellitus tipo 2; Nº: Número; NS: No significativo.

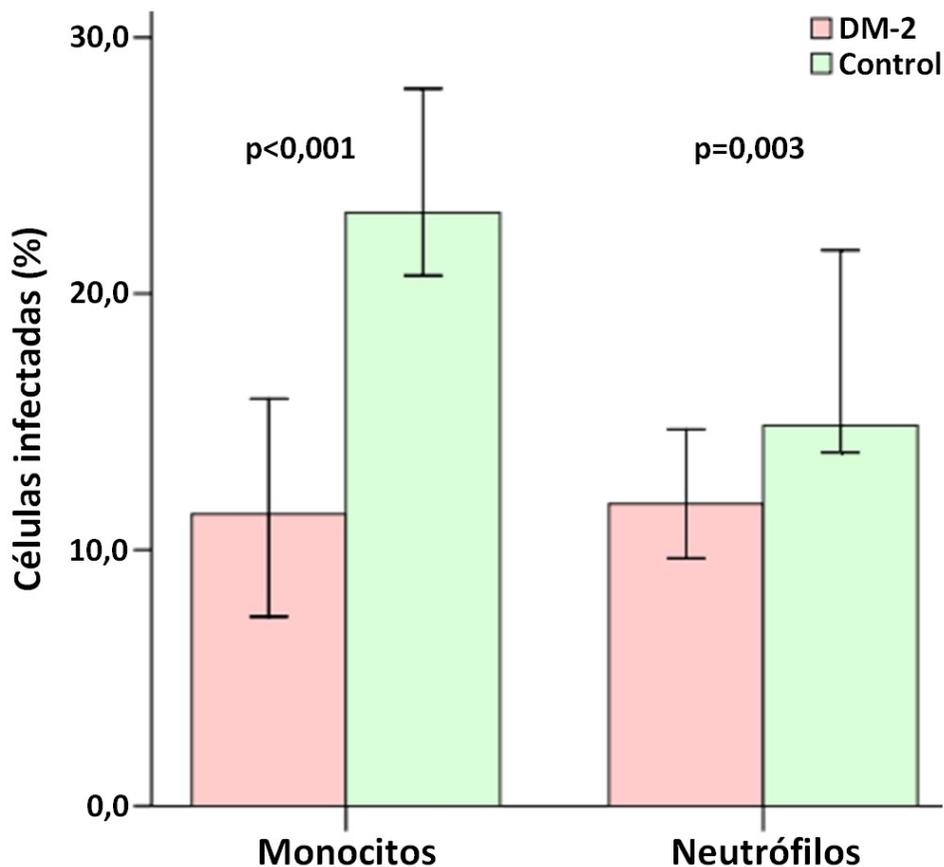
Respecto al recuento de monocitos, el valor de la mediana en pacientes diabéticos tipo 2 fue de 559 células/ $\mu\text{L}$  [rango intercuartílico (RI) 289], frente a 456 células/ $\mu\text{L}$  (RI 190) en controles. La diferencia entre ambos valores fue del 18,4%. No obstante, debido a la amplia distribución de la muestra (tal y como indica el valor del RI), no se alcanzó significación estadística.

En cuanto a los neutrófilos, la mediana en diabéticos fue de 5467 células/ $\mu$ L (RI 2638) y en controles 3887 células/ $\mu$ L (RI 1490). En este caso, la diferencia entre ambos fue del 28,9%, resultando estadísticamente significativa ( $p = 0,006$ ).

Estas diferencias en el recuento de neutrófilos podrían influir en la actividad antimicobacteriana observada *in vitro*.

### 1.3 Fagocitosis

Uno de los procesos mejor caracterizados en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* es la inhibición de la fagocitosis de monocitos en pacientes diabéticos. Se ha observado que los individuos con hiperglucemia crónica tienen un defecto funcional en las dos vías fagocíticas predominantes en éstas células, la fagocitosis mediada por receptores Fc-gamma y la fagocitosis vía complemento. Este defecto parece independiente de las opsoninas séricas del huésped y de la expresión de otros receptores<sup>213,214</sup>. Con el objeto de corroborar esta inhibición de la fagocitosis en nuestra muestra, empleamos una *M. bovis* BCG fluorescente (Fig. 9).



**Figura 9.** Actividad fagocítica de monocitos y neutrófilos de pacientes con DM-2 y controles. La actividad fagocítica se representa como una proporción: Número de células infectadas por *M. bovis*/número de células totales (monocitos o neutrófilos), expresado como porcentaje. Se representa el valor numérico de las medianas. Las barras de error corresponden al 95% del intervalo de confianza, que son asimétricas por no seguir una distribución normal. Las comparaciones entre los 2 grupos se realizaron con el test de Mann-Whitney. Se consideró significativo el valor de  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: DM-2: Diabetes mellitus tipo 2.

El análisis de la actividad fagocítica se realizó a las dos horas de la infección. Respecto a los monocitos, el porcentaje de células que presentaban bacterias fluorescentes en su interior fue del 11,4% (RI

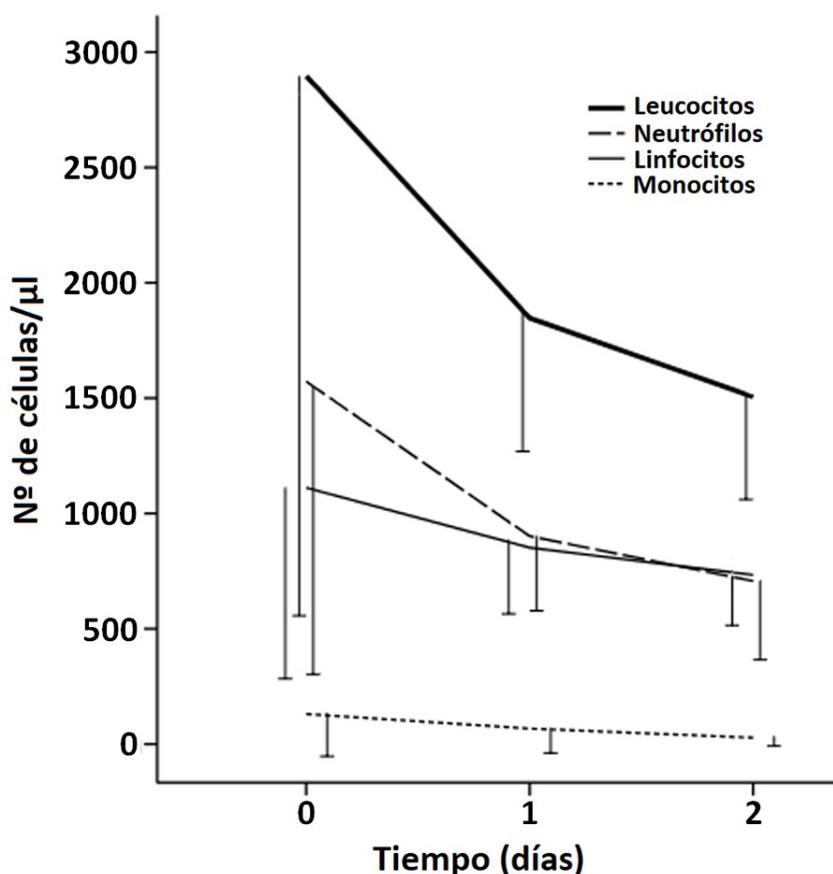
11,9%) y del 23,2% (RI 13,6%) en pacientes diabéticos tipo 2 y controles, respectivamente. Esta diferencia (prácticamente del doble entre un grupo y otro) alcanzó significación estadística ( $p < 0,001$ ), demostrando así una inhibición significativa de la fagocitosis en monocitos de diabéticos, comparado con los controles.

Por otro lado, encontramos una reducción significativa de la fagocitosis en los neutrófilos de pacientes diabéticos del 20,2% respecto a los controles [11,8% (RI 10,3%) vs 14,8% (RI 13,5%) para DM-2 y controles, respectivamente,  $p = 0,003$ ], lo cual resultó sorprendente, dado que hasta la fecha no se había documentado dicho hallazgo.

## **1.4 Viabilidad de los leucocitos en sangre**

El modelo de infección empleado es el más habitual y similar al del proyecto MGIA (Mycobacterial Growth Inhibition Assay)<sup>215</sup>. Una cuestión relevante, merecedora de estudio, es la viabilidad de las células en el ensayo que estamos empleando. La duración del mismo fue de dos días, siendo importante evaluar en ese tiempo y con las condiciones empleadas, cuál era el destino de las diferentes subpoblaciones de células blancas, ya que creemos que una diferencia importante en la concentración de las mismas podría alterar los resultados del estudio.

Para ello se midieron las variaciones en las concentraciones de los leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos a las 24 y 48 horas del experimento. Se observó que su concentración decrecía progresivamente. Esta reducción fue más pronunciada durante las primeras 24 horas, tal y como se observa en la Figura 10.



**Figura 10.** Curva de tiempo de la concentración de leucocitos en sangre completa. Sangre de sujetos sanos al 40% en medio RPMI-1640. Se incubó a 37°C en un agitador rotatorio durante 2 días y se analizó a las 24 y 48 horas mediante un analizador automático hematológico (sistema CELL-DYN 3700). Los datos representan las medias de las concentraciones con la desviación estándar (DE). Definición de abreviaciones: N<sup>o</sup>: Número.

A continuación se indican los valores correspondientes al recuento celular de cada una de las subpoblaciones leucocitarias en el momento basal, a las 24 y a las 48 horas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cuantificación de células a lo largo del tiempo.

	Leucocitos	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos
Día 0	2,90 (2,34)	1,57 (1,79)	1,11 (0,83)	0,13 (0,18)
Día 1	1,85 (0,58)	0,90 (0,32)	0,85 (0,29)	0,07 (0,11)
Día 2	1,50 (0,44)	0,71 (0,34)	0,73 (0,22)	0,03 (0,04)

Los valores representan la media de células por  $\mu\text{L}$  multiplicado por 1.000. Entre paréntesis, la desviación estándar.

Tal y como se puede apreciar tanto en la Figura 10 como en la Tabla 3, la reducción del recuento celular es más marcada en las primeras 24 horas. Desglosando por subtipos, los neutrófilos son los leucocitos que experimentan una mayor pérdida durante el primer día.

## 1.5 Citocinas

Las citocinas proinflamatorias ejercen una gran influencia en el desarrollo de la TB. Las variaciones en su producción podrían aportar información útil sobre la susceptibilidad a padecer dicha enfermedad<sup>216</sup>.  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  son citocinas relevantes implicadas en la defensa antimicrobacteriana del huésped. Los defectos genéticos o la inhibición farmacológica de estas vías de citocinas se asocian con

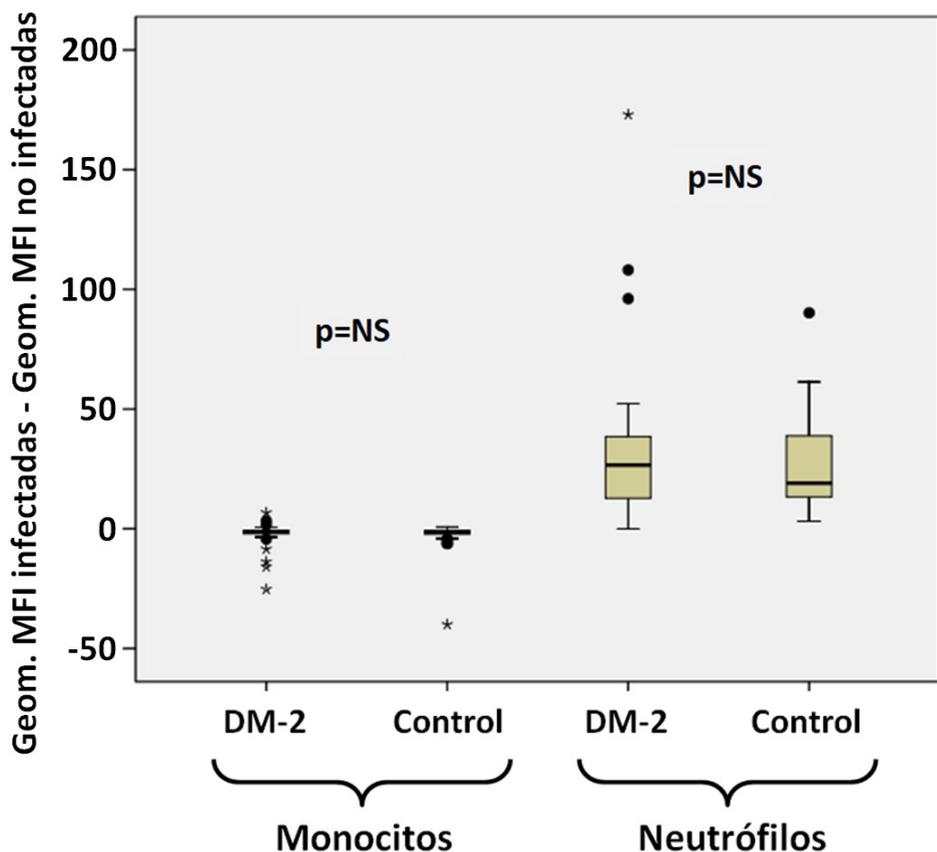
mayor susceptibilidad a padecer enfermedades por micobacterias<sup>96</sup>. Asimismo, en un estudio realizado con 28 citocinas, se ha demostrado la importancia de GM-CSF e IL-15 en la replicación de *M. tuberculosis*<sup>52</sup>. Por este motivo, se midió la concentración plasmática de estas 4 citocinas concretas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF e IL-15) en sangre infectada durante 2 días con *M. tuberculosis* en ambos grupos (diabéticos y controles).

En nuestro estudio no se detectó producción de IFN $\gamma$  ni de IL-15. En cuanto a TNF $\alpha$  y GM-CSF, se apreciaron niveles detectables tanto en pacientes diabéticos como en controles. El nivel de producción de TNF $\alpha$  fue significativamente superior en los pacientes diabéticos frente a los controles. Respecto al GM-CSF, los pacientes diabéticos mostraron concentraciones numéricamente superiores a las del grupo control, sin alcanzar significación estadística (Fig. 11).



especies reactivas del oxígeno podrían ser importantes como moléculas de señalización que coordinan la defensa antimicrobiana del huésped, controlando mecanismos cruciales como son la producción de citocinas, la autofagia y la formación de granulomas<sup>96</sup>.

En nuestro estudio, las muestras se analizaron por citometría de flujo con el reactivo CellROX verde. La producción de ROS se calculó en función de la intensidad de fluorescencia. Se examinaron muestras de sangre con BCGr analizando la producción de ROS en monocitos y neutrófilos de ambos grupos (diabéticos y controles) (Fig. 12), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.



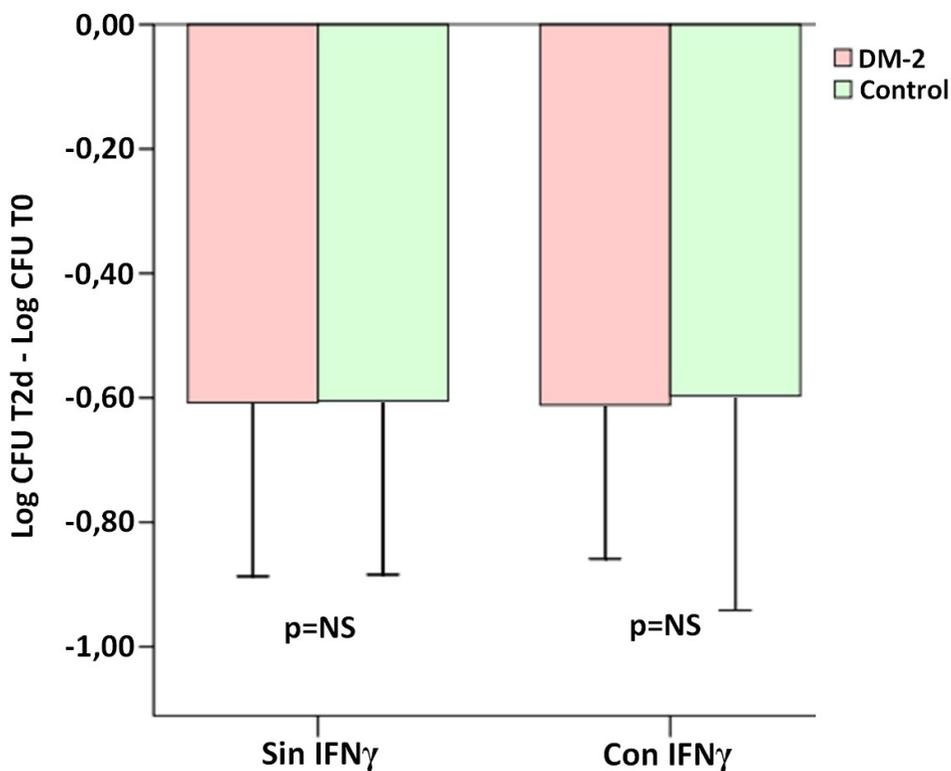
**Figura 12.** Producción de ROS en monocitos y neutrófilos de sangre infectada con BCGr en pacientes diabéticos tipo 2 y controles. Los datos corresponden a la diferencia de la media geométrica de MFI del contenido celular de ROS entre células (monocitos o neutrófilos) infectadas y sin infectar. Las comparaciones entre los 2 grupos se realizaron con el test de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: DM-2: Diabetes mellitus tipo 2; MFI: Median fluorescence intensity (en español, mediana de intensidad de fluorescencia); NS: No significativo.

## **1.7 Actividad antimicobacteriana**

El IFN $\gamma$  es una citocina clave involucrada en la actividad antimicobacteriana. Varios estudios demuestran que la deficiencia de esta citocina favorece la infección por micobacterias<sup>81,107</sup>. Por este motivo, realizamos las infecciones experimentales en presencia y ausencia de dicha molécula.

### **Modelo de sangre completa. Comparación de dos grupos**

Tras haber observado una menor fagocitosis de micobacterias por parte de los monocitos y neutrófilos en pacientes diabéticos (Fig. 9), sería esperable encontrar una actividad antimicobacteriana deficiente en estos individuos. Sin embargo, la actividad observada en sangre de pacientes diabéticos y en controles medida a las 48 horas de la infección fue similar, tanto en presencia como en ausencia de IFN $\gamma$  (Fig. 13).

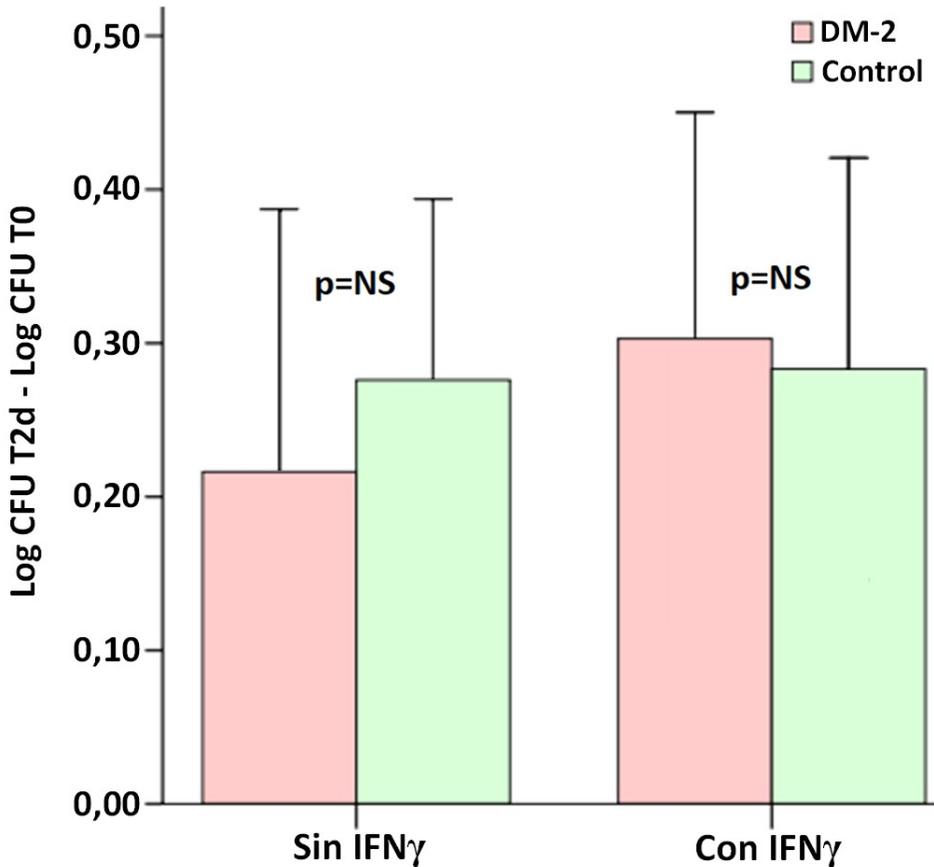


**Figura 13.** Actividad antimicobacteriana en sangre completa de pacientes diabéticos tipo 2 y controles. Los datos representan la diferencia entre el  $\text{Log}_{10}(\text{CFU})$  del inóculo y después de 2 días + DE. Los valores negativos indican actividad bactericida. Las comparaciones entre los dos grupos se realizaron con la prueba *t* de Student para datos independientes. Se consideró significativa una  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: CFU: Colony-forming units (en español, unidades formadoras de colonias); DM-2: Diabetes mellitus tipo 2; IFN $\gamma$ : Interferón gama; Log: Logaritmo; NS: No significativo; T0: Tiempo cero; T2d: Tiempo a los 2 días.

## Modelo de macrófagos derivados de monocitos.

### Comparación de dos grupos

Además de analizar la actividad antimicobacteriana en sangre, también se determinó dicha actividad en los macrófagos derivados de monocitos. En este caso, no se detectó ninguna actividad bactericida, de forma que las micobacterias se multiplicaron en el interior de los macrófagos, tanto en presencia como en ausencia de  $\text{IFN}\gamma$ , sin encontrar diferencias entre pacientes y controles (Fig. 14). A los dos días de la infección, se recuperó un número de bacterias similar al inoculado, consecuencia directa de la baja tasa de multiplicación de *M. tuberculosis*.



**Figura 14.** Actividad antimicobacteriana en macrófagos derivados de monocitos de pacientes diabéticos tipo 2 y controles. Los datos representan la diferencia entre el  $\text{Log}_{10}(\text{CFU})$  del inóculo y después de 2 días + DE. Los valores positivos indican la multiplicación intracelular. Las comparaciones entre los dos grupos se realizaron mediante la prueba t de Student para datos independientes. Se consideró significativa una  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: CFU: Colony-forming units (en español, unidades formadoras de colonias); DM-2: Diabetes mellitus tipo 2; IFN $\gamma$ : Interferón gamma; Log: Logaritmo; NS: No significativo; T0: Tiempo cero; T2d: Tiempo a los 2 días.

## Modelo de sangre completa. Diseño factorial

Para determinar la capacidad activadora de las cuatro citocinas estudiadas con anterioridad (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF e IL-15), relacionadas con el estímulo de la actividad antimicrobiana en macrófagos<sup>52</sup>, realizamos un diseño factorial evaluando el efecto de cada una de las citocinas por separado, así como el de todas las combinaciones posibles entre ellas, en sangre infectada con *M. tuberculosis*. Este experimento se utilizó para analizar la influencia de variables cuantitativas (cantidad de las diferentes citocinas) y una variable cualitativa: estado de la enfermedad (DM-2 o controles). Se infectó la sangre en presencia de cada una de las citocinas o sus combinaciones, empleándose dos valores: bajo (0 ng/mL) o alto (25 ng/mL). Las bacterias supervivientes se cuantificaron como Log<sub>10</sub>(CFU); los valores positivos indican la multiplicación intracelular de las micobacterias y los valores negativos se interpretan como actividad bactericida.

Ambos grupos (diabéticos y controles) fueron analizados con un diseño factorial 2<sup>5</sup>, consistente en cinco variables dicotómicas: las cuatro citocinas mencionadas (0 o 25 ng/mL) y el estado de la enfermedad (diabético o control). No se encontró un número superior de bacterias en sangre de pacientes diabéticos, ni se observó influencia de las citocinas en la actividad antimicrobiana al evaluar

cada una de las 32 combinaciones posibles. No se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Diseño factorial  $2^5$  (diabéticos tipo 2 – controles).

Factores	Efecto estimado	Valor p
IFN $\gamma$	-0,024 (-0,08 – 0,03)	0,3770
TNF $\alpha$	0,016 (-0,04 – 0,072)	0,5755
GM-CSF	-0,022 (-0,08 – 0,034)	0,4359
IL-15	0,018 (-0,036 – 0,076)	0,5106
Diabetes	0,016 (-0,068 – 0,036)	0,5570

Actividad antimicrobacteriana en sangre completa en pacientes diabéticos tipo 2 y controles. Ambos grupos fueron analizados juntos con el diseño factorial  $2^5$ . La sangre se infectó en presencia de cada una de las citocinas (25 ng/mL) o sus combinaciones. Las bacterias supervivientes se cuantificaron como  $\text{Log}_{10}(\text{CFU})$ . Los datos representan la estimación de los efectos principales: los valores positivos indican la multiplicación intracelular y los valores negativos indican actividad bactericida. Entre paréntesis se reflejan los valores del intervalo de confianza del 95%. Definición de abreviaciones: CFU: Colony-forming units (en español, unidades formadoras de colonias); GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (en español, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos); IFN $\gamma$ : Interferón gamma; IL-15: Interleucina-15; Log: Logaritmo; TNF $\alpha$ : Tissue necrosis factor alpha (en español, factor de necrosis tumoral alfa).

Estos datos también se analizaron como dos diseños independientes  $2^4$  para comprobar los efectos de cada una de las citocinas y sus posibles combinaciones (16 posibilidades) en pacientes diabéticos tipo 2 y controles, por separado. En ninguno de los dos análisis se

evidenció la presencia de actividad antimicobacteriana estimulada por dichas citocinas (Tabla 5).

**Tabla 5.** Diseño factorial  $2^4$  (diabéticos tipo 2 – controles).

**Diabéticos tipo 2.**

Factores	Efecto estimado	Valor p
IFN $\gamma$	-0,044 (-0,108 – 0,022)	0,1863
TNF $\alpha$	0,028 (-0,036 – 0,096)	0,3835
GM-CSF	0,016 (-0,080 – 0,048)	0,6184
IL-15	0,010 (-0,056 – 0,076)	0,7807

**Controles.**

Factores	Efecto estimado	Valor p
IFN $\gamma$	-0,006 (-0,072 – 0,060)	0,8417
TNF $\alpha$	0,002 (-0,060 – 0,068)	0,9263
GM-CSF	-0,028 (-0,092 – 0,036)	0,3950
IL-15	0,028 (-0,036 – 0,092)	0,3889

Actividad antimicobacteriana en sangre completa en pacientes diabéticos tipo 2 y controles. Los resultados de cada grupo (DM-2 y controles) se analizaron con el diseño factorial  $2^4$ . La sangre se infectó en presencia de cada una de las citocinas (25 ng/mL) o sus combinaciones. Las bacterias supervivientes se cuantificaron como  $\text{Log}_{10}(\text{CFU})$ . Los datos representan la estimación de los efectos principales: los valores positivos indican la multiplicación intracelular y los valores negativos indican actividad bactericida. Entre paréntesis se reflejan los valores del intervalo de confianza del 95%. Definición de abreviaciones: CFU: Colony-forming units (en español, unidades formadoras de colonias); GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (en español, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos); IFN $\gamma$ : Interferón gamma; IL-15: Interleucina-15; Log: Logaritmo; TNF $\alpha$ : Tissue necrosis factor alpha (en español, factor de necrosis tumoral alfa).

## 2 DIABÉTICOS TIPO 1

Durante el reclutamiento, se consiguió una pequeña muestra de 9 pacientes diabéticos tipo 1 que se analizó por separado, debido a las diferencias fisiopatológicas existentes entre ambas formas de diabetes (DM-1 y DM-2). Al igual que en la DM-2<sup>136</sup>, se ha observado que la DM-1 incrementa el riesgo de desarrollar TB<sup>217,218</sup>.

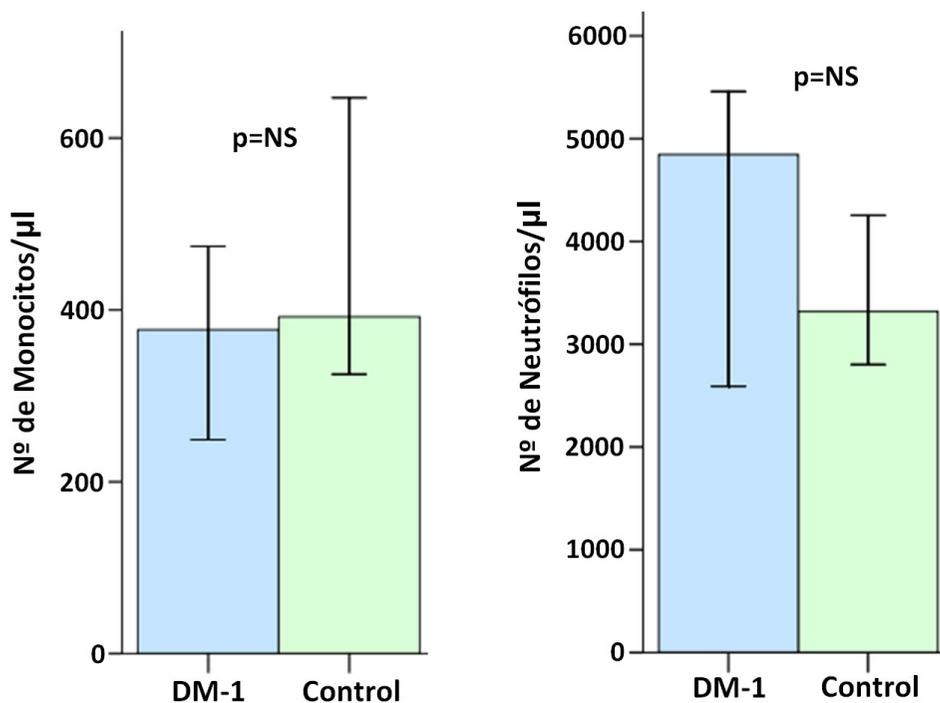
Se efectuaron análisis equivalentes a los realizados en pacientes diabéticos tipo 2. Para ello se seleccionaron 9 controles apareados (Tabla 2). El rango de edad osciló entre los 20 y los 57 años. A diferencia de los pacientes diabéticos tipo 2, la mayoría de los pacientes con DM-1 eran jóvenes.

El grupo control tenía un peso normal, a diferencia de los diabéticos tipo 1, que presentaban sobrepeso. No se detectó insuficiencia renal en pacientes ni en controles. En relación a los parámetros lipídicos, dos pacientes con DM-1 tomaban estatinas (ninguno en el grupo control). Los controles mostraron un nivel plasmático de colesterol total superior a los pacientes diabéticos, a expensas de cifras superiores de LDLc, con un valor similar de triglicéridos. No obstante, las diferencias observadas en todos los parámetros lipídicos analizados no alcanzaron significación estadística.

El resultado de la prueba QuantiFERON-TB Gold In-tube fue positivo en 3 casos y en 4 controles, sin diferencias significativas entre ellos.

Tal y como era de esperar, los niveles de glucosa en ayunas y la HbA1c fueron significativamente superiores en los pacientes con DM-1 (ambos con  $p < 0,001$ ).

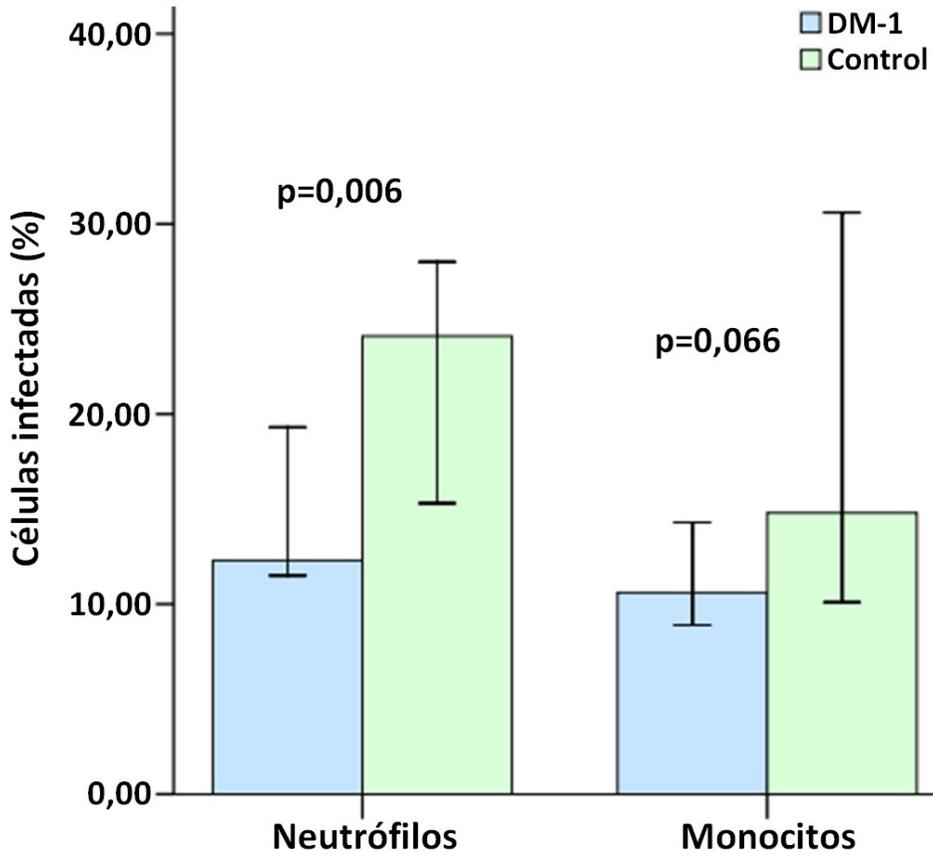
En cuanto a la concentración de monocitos y neutrófilos en estos pacientes, se realizó un recuento absoluto de éstas células en ambos grupos (diabéticos y controles) (Fig. 15).



**Figura 15.** Concentración de monocitos y neutrófilos en pacientes con DM-1 y controles. Las cajas representan el valor numérico de las medianas y las barras de error corresponden al 95% del intervalo de confianza, que son asimétricas al no seguir una distribución normal. Las comparaciones entre los 2 grupos se realizaron con el test de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: DM-1: Diabetes mellitus tipo 1; N<sup>o</sup>: Número; NS: No significativo.

Respecto al recuento de monocitos, el valor de la mediana en pacientes diabéticos tipo 1 fue de 377 células/ $\mu\text{L}$  (RI 222), frente a 392 células/ $\mu\text{L}$  (RI 246) en controles. La diferencia entre ambos valores fue del 3,82%, sin significación estadística. En cuanto a los neutrófilos, la mediana en diabéticos fue de 4845 células/ $\mu\text{L}$  (RI 2471) y en controles 3317 células/ $\mu\text{L}$  (RI 1291), lo cual supone una diferencia del 31,54%, también sin lograr diferencias significativas.

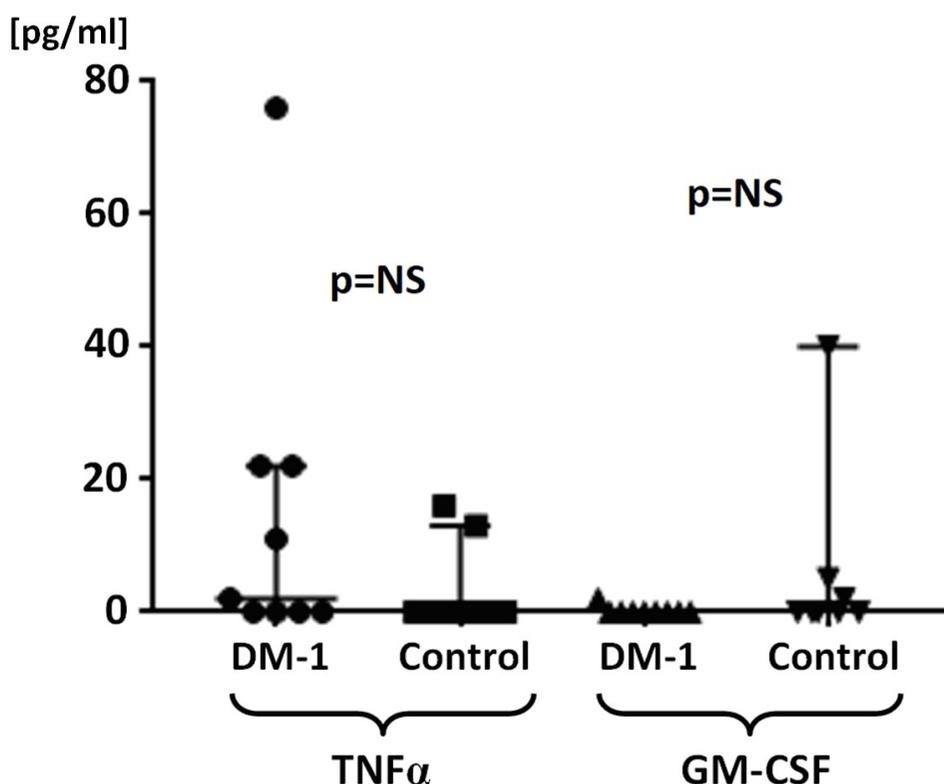
El análisis de la actividad fagocítica se realizó a las dos horas de la infección con BCGr. Respecto a los monocitos, el porcentaje de células con bacterias fluorescentes en su interior fue del 10,6% (RI 3,6%) y 14,8% (RI 17%) en pacientes diabéticos tipo 1 y controles, respectivamente, mostrando una fuerte tendencia a menor actividad en los diabéticos tipo 1 ( $p = 0,066$ ), aunque estadísticamente no significativo. Por otro lado, encontramos una reducción significativa de la fagocitosis en los neutrófilos de pacientes diabéticos del 48,96% respecto a los controles [12,3% (RI 5,6%) vs 24,1% (RI 11,5%) para DM-1 y controles, respectivamente,  $p = 0,006$ ] (Fig. 16).



**Figura 16.** Actividad fagocítica de monocitos y neutrófilos de pacientes con DM-1 y controles. La actividad fagocítica se representa como una proporción: Número de células infectadas por *M.bovis*/número de células totales (monocitos o neutrófilos), expresado como porcentaje. Los diagramas de cajas representan el valor numérico de las medianas. Las barras de error corresponden al 95% del intervalo de confianza, que son asimétricas al no seguir una distribución normal. Las comparaciones entre los 2 grupos se realizaron con el test de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: DM-1: Diabetes mellitus tipo 1.

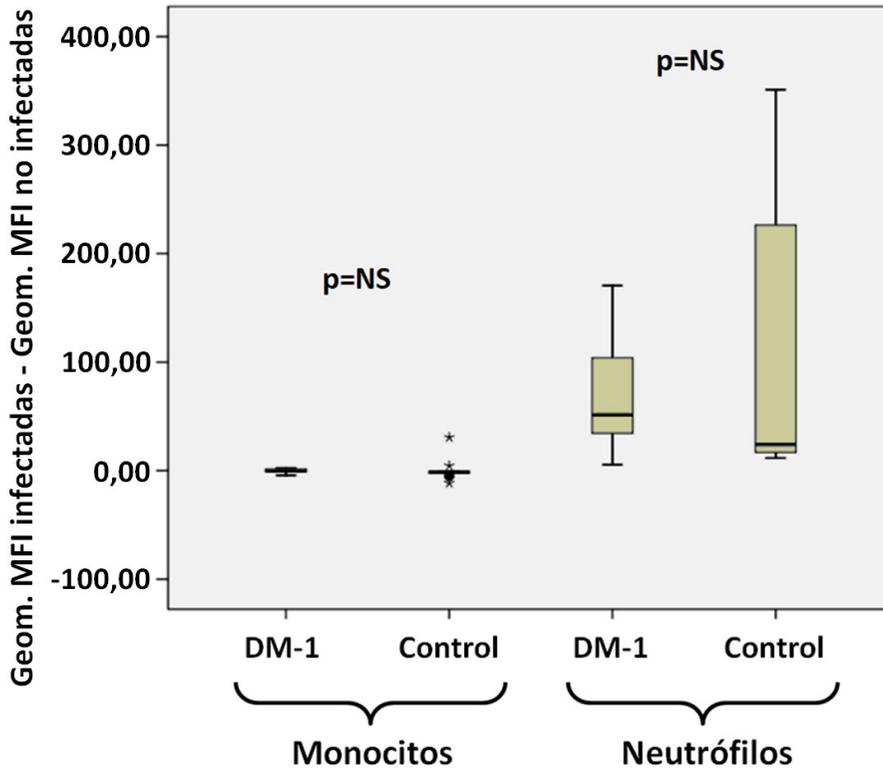
Asimismo, se cuantificó la concentración plasmática de 4 citocinas ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , GM-CSF e IL-15) en el sobrenadante de sangre infectada durante 2 días con *M. tuberculosis* en ambos grupos (DM-1

y controles). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de  $\text{TNF}\alpha$  y GM-CSF en ambos grupos (Fig. 17). Respecto a las otras dos citocinas, al igual que se había observado en muestras de pacientes con DM-2, no se apreciaron niveles detectables.



**Figura 17.** Producción de  $\text{TNF}\alpha$  y GM-CSF en el sobrenadante de sangre infectada con *M. tuberculosis* en pacientes diabéticos tipo 1 y controles. Las comparaciones entre los 2 grupos se realizaron con el test de Mann-Whitney. Se consideró significativo el valor de  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: DM-1: Diabetes mellitus tipo 1; GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (en español, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos); NS: No significativo;  $\text{TNF}\alpha$ : Tissue necrosis factor alpha (en español, factor de necrosis tumoral alfa).

Tampoco se encontraron diferencias en la producción de ROS en monocitos y neutrófilos de sangre infectada con BCGr, entre ambos grupos (Fig. 18).



**Figura 18.** Producción de ROS en monocitos y neutrófilos de sangre infectada con BCGr en pacientes con DM-1 y controles. Los datos corresponden a la diferencia de la media geométrica de MFI del contenido celular de ROS entre células (monocitos o neutrófilos) infectadas y sin infectar. Las comparaciones entre los 2 grupos se realizaron con el test de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: DM-1: Diabetes mellitus tipo 1; MFI: Median fluorescence intensity (en español, mediana de intensidad de fluorescencia); NS: No significativo.

Se utilizó un diseño factorial para analizar la influencia de variables cuantitativas: cantidad de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF e IL-15 y una variable cualitativa: estado de la enfermedad (DM-1 y controles) respecto a la actividad antimicrobiana en sangre completa. En un diseño factorial 2<sup>5</sup> se encontró un número significativamente superior de bacterias en sangre de pacientes diabéticos, sin observar influencia de las citocinas sobre la actividad antimicrobiana (Tabla 6). Al analizar los datos por separado en pacientes con DM-1 y en controles (diseño factorial 2<sup>4</sup>) se encontró que la IL-15 estimuló la actividad antimicrobiana en la sangre de los diabéticos.

**Tabla 6.** Actividad antimicrobiana en sangre completa en pacientes diabéticos tipo 1 y controles. Diseño factorial.

<b>FACTORIAL 2<sup>5</sup></b>		
Factores	Efecto estimado	Valor p
IFN $\gamma$	-0,011 (-0,062 – 0,040)	0,6803
TNF $\alpha$	0,005 (-0,046 – 0,056)	0,8489
GM-CSF	-0,011 (-0,062 – 0,040)	0,6637
IL-15	-0,007 (-0,056 – 0,048)	0,8748
Diabetes	-0,096 (-0,146 – -0,048)*	<b>0,0005</b>

## FACTORIAL 2<sup>4</sup>

### Diabéticos tipo 1

Factores	Efecto estimado	Valor p
IFN $\gamma$	-0,030 (-0,156 – 0,098)	0,6510
TNF $\alpha$	0,003 (-0,124 – 0,130)	0,9637
GM-CSF	-0,042 (-0,168 – 0,084)	0,5093
IL-15	-0,198 (-0,320 – -0,072)**	<b>0,0023</b>

### Controles

Factores	Efecto estimado	Valor p
IFN $\gamma$	0,014 (-0,048 – 0,076)	0,6577
TNF $\alpha$	-0,003 (-0,064 – 0,060)	0,9336
GM-CSF	-0,012 (-0,074 – 0,050)	0,6962
IL-15	-0,005 (-0,066 – 0,058)	0,8849

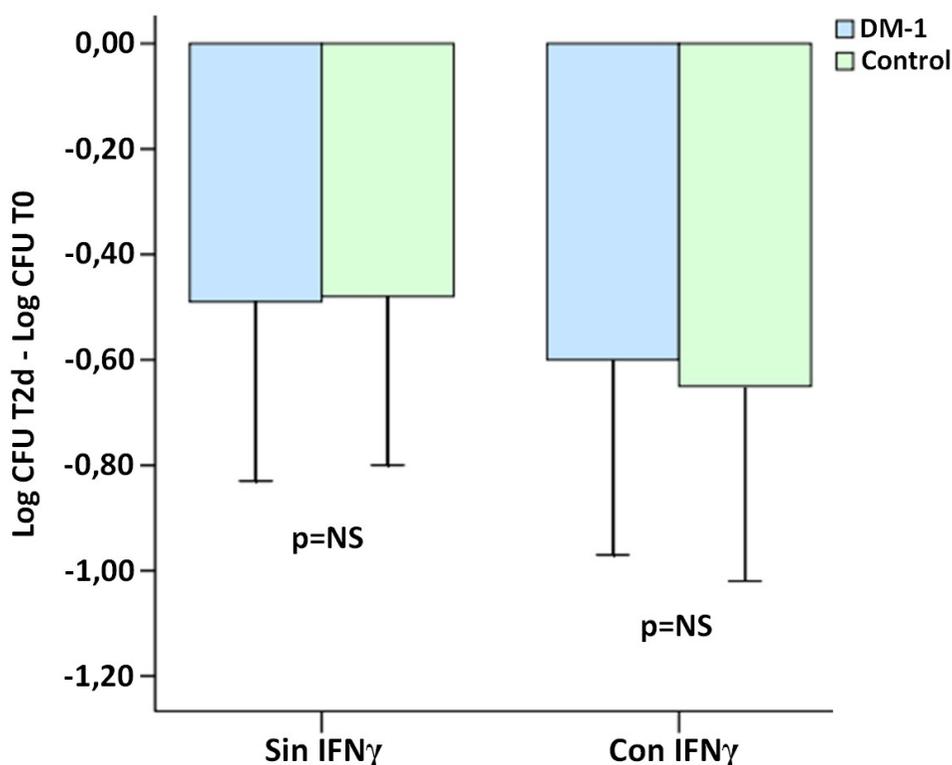
La sangre se infectó en presencia de cada una de las citocinas (25 ng/mL) o sus combinaciones. Las bacterias supervivientes se cuantificaron como Log<sub>10</sub>(CFU). Los datos representan la estimación de los efectos principales: los valores positivos indican la multiplicación intracelular y los valores negativos indican actividad bactericida. Entre paréntesis se reflejan los valores del intervalo de confianza del 95%. Ambos grupos fueron analizados juntos con el diseño factorial 2<sup>5</sup> y los resultados de cada grupo (DM-1 y controles) se analizaron, por separado, con el diseño factorial 2<sup>4</sup>.

\* Se consideró significativo un valor de  $p < 0,001$ .

\*\* Se consideró muy significativo un valor de  $p < 0,01$ .

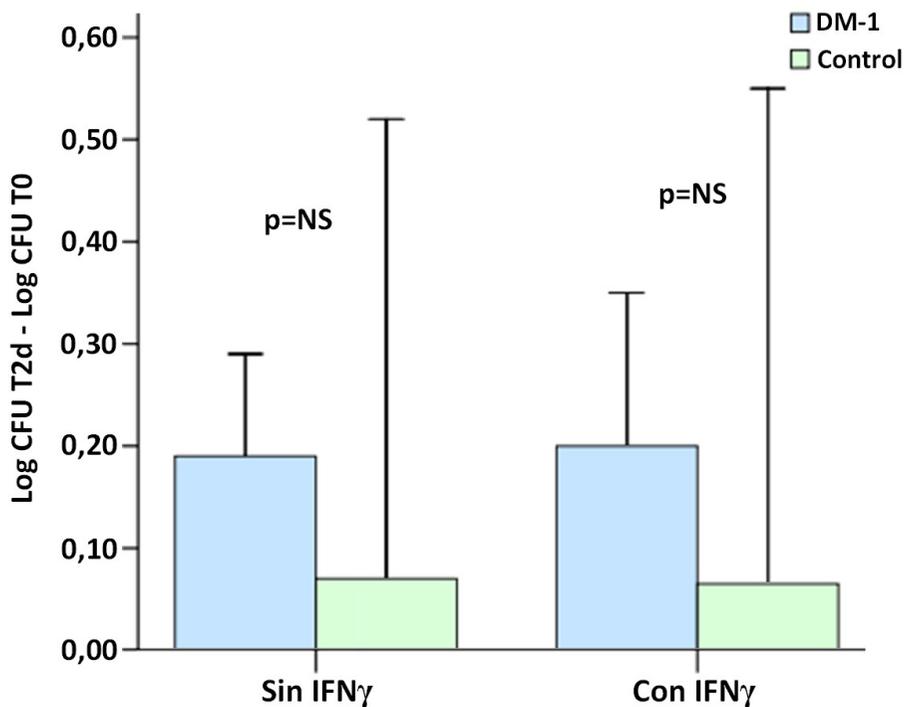
Definición de abreviaciones: CFU: Colony-forming units (en español, unidades formadoras de colonias); GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (en español, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos); IFN $\gamma$ : Interferón gamma; IL-15: Interleucina-15; Log: Logaritmo; TNF $\alpha$ : Tissue necrosis factor alpha (en español, factor de necrosis tumoral alfa).

La actividad antimicrobacteriana en sangre de pacientes con DM-1 y controles, medida a las 48 horas de la infección, fue similar tanto en presencia como en ausencia de IFN $\gamma$  (Fig. 19).



**Figura 19.** Actividad antimicrobacteriana en sangre completa de pacientes con DM-1 y controles. Los datos representan la diferencia entre el Log<sub>10</sub>(CFU) del inóculo y después de 2 días + desviación estándar (DE). Los valores negativos indican actividad bactericida. Las comparaciones entre los dos grupos se realizaron con la prueba t de Student para datos independientes. Se consideró significativa una  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: CFU: Colony-forming units (en español, unidades formadoras de colonias); DM-1: Diabetes mellitus tipo 1; IFN $\gamma$ : Interferón gamma; Log: Logaritmo; NS: No significativo; T0: Tiempo cero; T2d: Tiempo a los 2 días.

Al margen del análisis realizado en sangre completa, también se determinó la actividad antimicrobacteriana en los macrófagos derivados de monocitos. En este caso, tampoco se detectó ninguna actividad bactericida, tanto en presencia como en ausencia de IFN $\gamma$  (Fig. 20).



**Figura 20.** Actividad antimicrobacteriana en macrófagos derivados de monocitos de pacientes con DM-1 y controles. Los datos representan la diferencia entre el Log<sub>10</sub>(CFU) del inóculo y después de 2 días + DE. Los valores positivos indican la multiplicación intracelular. Las comparaciones entre los dos grupos se realizaron con la prueba t de Student para datos independientes. Se consideró significativa una  $p < 0,05$ . Definición de abreviaciones: CFU: Colony-forming units (en español, unidades formadoras de colonias); DM-1: Diabetes mellitus tipo 1; IFN $\gamma$ : Interferón gamma; Log: Logaritmo; NS: No significativo; T0: Tiempo cero; T2d: Tiempo a los 2 días.

# Discusión



La diabetes mellitus ha sido reconocida como uno de los factores de riesgo para el desarrollo de la TB<sup>133</sup>. A pesar de ello, son pocos los estudios realizados con vistas a caracterizar la respuesta inmune en diabéticos con TB.

En nuestro trabajo, nos propusimos analizar esta cuestión, partiendo de una muestra de diabéticos tipo 2 y de controles sanos. Dentro de las características clínicas, encontramos que una elevada proporción de los pacientes reclutados en nuestro estudio tenían una edad avanzada, en concordancia con lo publicado en otras poblaciones europeas<sup>219</sup>, donde se aprecia un incremento del número de pacientes diabéticos mayores.

Curiosamente, también se observó un aumento en la edad media del paciente con enfermedad tuberculosa, como consecuencia de un mayor número de infecciones y reactivaciones en los segmentos de población con más edad<sup>220</sup>. El envejecimiento se asocia con un incremento progresivo del estado inflamatorio basal y la susceptibilidad a diversas enfermedades, incluida la TB<sup>221</sup>.

En nuestro análisis, los pacientes diabéticos mostraron un índice de masa corporal superior al de los controles. En este sentido, la obesidad es un factor determinante conocido para el desarrollo de diabetes. En un trabajo realizado recientemente por Hsien-Ho Lin *et al.*, el IMC se relaciona inversamente con el riesgo de TB activa<sup>222</sup>.

Esta asociación inversa supone una paradoja con respecto a la diabetes, ya que la obesidad es un factor asociado con la diabetes y ésta, a su vez, es un factor de riesgo bien conocido para el desarrollo de la TB<sup>222</sup>. El mecanismo biológico de la disminución del riesgo de TB entre las personas con un IMC elevado es poco conocido. No obstante, se ha sugerido que el tejido adiposo se comporta como un reservorio donde *M. tuberculosis* podría permanecer latente para evitar ser detectado por el sistema inmune del huésped<sup>223</sup>. Además, la leptina, hormona relacionada con la grasa corporal, podría afectar al equilibrio del sistema inmune, ejerciendo un efecto protector sobre la infección tuberculosa<sup>224</sup>. Por otro lado, la dieta rica en colesterol parece acelerar la esterilización bacteriológica en pacientes con TB pulmonar<sup>225</sup>.

La proporción de enfermedad renal crónica fue superior en el grupo de diabéticos, como era de esperar, al ser la nefropatía una complicación vascular frecuente en estos pacientes<sup>226</sup>. Respecto al perfil lipídico, los niveles de LDLc en el grupo de DM-2 resultaron más bajos de lo esperado, consecuencia del mayor empleo de estatinas en los diabéticos, dadas las recomendaciones de las Guías de Práctica Clínica vigentes en el momento de la inclusión en el estudio. Dichos protocolos recomendaban alcanzar un nivel de LDLc inferior a 100 o 70 mg/dL, según pertenecieran al grupo de alto o muy alto riesgo cardiovascular, respectivamente<sup>227,228</sup>.

Otro aspecto a tener en cuenta es el peor control glucémico de los pacientes diabéticos, medido mediante el valor de la HbA1c y la glucosa basal en ayunas, respecto a los controles, probablemente relacionado con una inadecuada adherencia al tratamiento. Actualmente desconocemos la influencia de los niveles de glucosa en nuestro ensayo *in vitro*, que podrían afectar al metabolismo celular y bacteriano y, consecuentemente, al resultado final de los experimentos. No obstante, nuestro estudio carece de la potencia necesaria para analizar dicha relación, la cual puede ser objeto de estudio en futuras investigaciones.

Respecto a los estudios funcionales de la respuesta inmune en los pacientes diabéticos, la proporción de cada una de las subpoblaciones leucocitarias en la sangre de estos individuos ya ha sido analizada con anterioridad<sup>212</sup>. Dado que *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular, variaciones en el número de leucocitos en la sangre podrían ser relevantes para el desarrollo de la TB. En nuestro estudio, el número absoluto de monocitos en diabéticos fue comparable al del grupo control; no así el recuento absoluto de neutrófilos, que fue significativamente superior en los pacientes con DM, dato que concuerda con otros estudios publicados<sup>229,230</sup>.

Las mediciones del ensayo se realizaron a lo largo de dos días. Por ello es importante conocer la supervivencia de las diferentes

subpoblaciones leucocitarias a lo largo de ese tiempo, puesto que una diferencia significativa en la concentración de las mismas podría alterar los resultados del estudio. Se observó que la concentración de células de la serie blanca decrecía progresivamente, siendo más llamativa la pérdida durante las primeras 24 horas, especialmente en los neutrófilos, células fundamentales como primera línea de defensa<sup>54,55</sup>. Dado que una proporción importante de las micobacterias fue fagocitada por los neutrófilos, su menor viabilidad *in vitro* plantea la cuestión del destino de estas bacterias. Actualmente se desconoce si los neutrófilos necróticos liberan micobacterias intactas o si estas bacterias liberadas son fagocitadas por monocitos, junto con los restos necróticos de neutrófilos en el proceso denominado eferocitosis<sup>231</sup>, pasando así la micobacteria al interior del monocito. Esta disyuntiva deberá ser analizada en futuros trabajos.

En los pacientes diabéticos, uno de los defectos más importantes en la respuesta inmune frente a la TB es la inhibición de la fagocitosis por parte de los monocitos<sup>213</sup>. Nosotros confirmamos este hallazgo y, además, pudimos extender esta observación a los neutrófilos, que mostraron una capacidad deficitaria de fagocitar *M bovis* BCG, aunque las diferencias con los controles fueron más pequeñas que en el caso de los monocitos. Mendoza-Aguilar *et al.* analizaron la función fagocítica de los neutrófilos usando diferentes estímulos bacterianos, y encontraron que los neutrófilos aislados de pacientes con diabetes y

TB, simultáneamente, mostraban una capacidad de adherencia más baja; mientras que los neutrófilos de los pacientes con cualquiera de estas dos enfermedades por separado, presentaban niveles de adherencia normales<sup>232</sup>. En dicho estudio no se apreciaron diferencias en la activación de los neutrófilos tras la estimulación con forbol miristato. Nuestra observación respecto a la menor actividad fagocítica de neutrófilos podría estar en relación con su inferior capacidad de adherencia al plástico de cultivo de tejidos. Según nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que documenta el deterioro de la fagocitosis de micobacterias en neutrófilos de pacientes diabéticos.

Las citocinas proinflamatorias presentan un papel fundamental en el desarrollo de la TB<sup>216</sup>. Variaciones en su producción se relacionan con la susceptibilidad a padecer dicha enfermedad. El aumento en la producción de TNF $\alpha$  después de la infección *in vitro*, en pacientes diabéticos, está en línea con estudios previos realizados<sup>233</sup>. Este resultado ha causado confusión entre los investigadores, debido a que la hipótesis inicial planteaba que la diabetes inducía una depresión de la respuesta inmune, facilitando así el desarrollo de la TB<sup>130</sup>. Varios autores refieren que la estimulación *ex vivo* de la sangre o células mononucleares con antígenos de *M. tuberculosis* produce más TNF $\alpha$  en pacientes que padecen ambas enfermedades (DM y TB), respecto a aquellos que sólo han presentado TB (sin DM)<sup>194,195,233</sup>. Sin embargo,

también se ha publicado un estudio en el que no se encontraron discrepancias en la producción de citocinas entre diabéticos y controles, posiblemente debido a diferencias metodológicas<sup>198</sup>. Además, Lachmandas *et al.* estimularon células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos con lisados de *M. tuberculosis* en presencia de 40 mmol/L de glucosa y observaron un aumento en la producción de varias citocinas, incluyendo TNF $\alpha$ <sup>234</sup>. El protocolo que utilizamos tuvo una variación importante en comparación con otros autores: la estimulación se realizó con *M. tuberculosis* viva; no obstante, nuestras observaciones van en la misma dirección de lo publicado hasta la fecha.

Respecto a GM-CSF, nuestro estudio no apreció diferencias entre individuos con y sin diabetes. Este resultado no concuerda con lo publicado por Restrepo *et al.*, quienes observaron un aumento en la producción de GM-CSF en sangre completa de pacientes tuberculosos con diabetes al estimular con el derivado proteico purificado, una preparación antigénica de *M. tuberculosis*<sup>195</sup>. En cuanto a IFN $\gamma$ , no se detectó producción, resultado acorde con un artículo previo de infección en sangre completa con *M. bovis* BCG<sup>235</sup>, en el cual fueron necesarias al menos  $10^7$  bacterias/mL para inducir cantidades detectables de IFN $\gamma$ . En nuestro estudio se empleó una cantidad considerablemente inferior,  $5 \times 10^5$  bacterias/mL.

Las micobacterias inducen la activación de la NADPH oxidasa y la producción de ROS. Se piensa que estas moléculas se comportan como elementos de señalización del sistema inmune en diferentes tipos celulares. Por lo tanto, las especies reactivas del oxígeno podrían ser importantes también como moléculas de señalización que coordinan la defensa antimicobacteriana del huésped, controlando mecanismos como el proceso de autofagia y la producción de citocinas, entre otros<sup>96</sup>. En nuestro ensayo, no se encontraron diferencias significativas en la producción de ROS en monocitos y neutrófilos de ambos grupos.

La sangre completa muestra una importante actividad micobactericida frente a una cepa clínica (HL186T), una característica compartida por otros aislados de *M. tuberculosis*<sup>236</sup>. Por el contrario, existen pocas publicaciones donde se observe actividad micobactericida de macrófagos derivados de monocitos<sup>107</sup>. Es importante señalar que, a pesar de existir una inhibición de la fagocitosis en monocitos y neutrófilos de pacientes diabéticos, la actividad micobactericida de la sangre completa fue casi idéntica entre pacientes diabéticos y controles. En cualquier caso, no podemos descartar la posibilidad de que las bacterias puedan tener una mayor tasa de multiplicación intracelular en los pacientes diabéticos, independientemente del número de bacterias fagocitadas. Además, la activación celular con IFN $\gamma$ , una citocina clave en la respuesta

inmune a la TB<sup>237</sup>, tampoco indujo una diferencia significativa en la actividad antimicobacteriana. Aunque parece poco probable, podría plantearse que el mayor número de neutrófilos existente en pacientes diabéticos compense la menor actividad fagocítica de los mismos. Otra posibilidad es que parte de la actividad bactericida sea ejercida extracelularmente, lo cual podría explicar, en parte, por qué la alteración de la fagocitosis no afecta a la actividad antimicobacteriana. Por ejemplo, se sabe que los neutrófilos liberan defensinas antimicrobianas<sup>238</sup> que exhiben una actividad relevante frente a *M. tuberculosis*<sup>239</sup>. Sin embargo, es importante dar a conocer estos resultados negativos porque ambos modelos (sangre completa y macrófagos derivados de monocitos) pueden representar los principales enfoques experimentales para analizar *ex vivo* la defensa inmunológica contra la TB. De hecho, no hemos encontrado en la literatura científica ningún análisis de actividad antimicobacteriana usando sangre completa o macrófagos derivados de monocitos de pacientes diabéticos.

No hay duda de que la diabetes debilita el sistema inmune del huésped en contra de las bacterias intracelulares<sup>240</sup>. No obstante, necesitamos mejorar los modelos *in vitro* o *ex vivo* para conocer mejor los mecanismos fisiopatológicos implicados en la actividad bactericida. Ufimtseva observó en ratones que los macrófagos de los granulomas con *M. bovis* BCG controlaban la replicación

micobacteriana mejor que los macrófagos de la médula ósea o los macrófagos peritoneales<sup>241</sup>. Estos resultados sugieren que la capacidad de los macrófagos para controlar BCG depende, en gran medida, del microambiente y del grado de activación celular en el huésped.

En resumen, los parámetros inmunológicos que pueden influir en el desarrollo de la TB, tales como el recuento de neutrófilos, la fagocitosis y la expresión de TNF $\alpha$ , están alterados en pacientes con diabetes tipo 2, aunque la actividad antimicobacteriana de la sangre completa o de los macrófagos derivados de monocitos es similar en pacientes diabéticos y en controles. Estas evidencias invitan a realizar un análisis más profundo de las bases inmunológicas de la susceptibilidad a la TB en individuos con diabetes tipo 2.

## **DIABETES TIPO 1**

La edad media de los pacientes con DM-1 fue sensiblemente inferior a la de los diabéticos tipo 2, debido a que este tipo de diabetes se desarrolla desde los primeros años de vida. En la DM-1 existe un defecto relativo o absoluto en la producción de insulina por las células beta del páncreas<sup>121</sup>.

Ningún paciente presentó insuficiencia renal, acorde a lo esperado en individuos más jóvenes y con menor tiempo de evolución de la enfer-

edad. Además, tenían mejor perfil lipídico que los diabéticos tipo 2, posiblemente motivado porque este tipo de diabetes no se relaciona con la obesidad, a diferencia de lo que ocurre en la DM-2<sup>121,126</sup>.

No se hallaron diferencias en la concentración de monocitos ni neutrófilos en los pacientes diabéticos respecto a controles. En un artículo reciente de Fitas *et al.* se documentó que existían variaciones en el nivel de neutrófilos en función del tiempo de evolución de la diabetes. De esta manera, se observó que al comienzo de la enfermedad había un descenso en el recuento de estas células en la sangre periférica, posiblemente debido a la migración de los neutrófilos al páncreas como lugar inflamatorio. A medida que avanzaba la enfermedad, el nivel de neutrófilos en sangre periférica se recuperaba hasta alcanzar las cifras basales<sup>242</sup>.

Respecto a la cuantificación de citocinas en el sobrenadante de sangre infectada con *M. tuberculosis*, no se encontraron diferencias significativas en la producción de TNF $\alpha$  ni de GM-CSF y, al igual que en DM-2, no se hallaron niveles detectables de IFN $\gamma$  ni de IL-15. Esto concuerda con un artículo reciente de Lachmandas *et al.*, en el que se examinó la influencia de la hiperglucemia en la producción de citocinas en pacientes con DM-1 infectados con *M. tuberculosis*. En este trabajo, la producción de IFN $\gamma$  estaba disminuida, mientras que el TNF $\alpha$  mostraba niveles normales<sup>243</sup>.

Al igual que en la DM-2, los neutrófilos de los pacientes con DM-1 fagocitaban menos bacterias que las células de los controles. En lo referente a la producción de ROS, no se apreciaron diferencias en los monocitos ni en los neutrófilos de ambos grupos, resultados que coinciden con lo publicado por Serlenga *et al.*<sup>244</sup>. Respecto a los monocitos, se observó un resultado similar en ambos grupos, con una fuerte tendencia a menor fagocitosis en los diabéticos. Köhler *et al.* demostraron una diferencia significativa en este aspecto, por lo que la ausencia de significación en nuestro estudio podría deberse al escaso tamaño muestral<sup>245</sup>.

En el diseño factorial  $2^4$ , al analizar los datos por separado en pacientes con DM-1 y en controles, se encontró que la IL-15 estimuló la actividad antimicobacteriana en la sangre de diabéticos. Este resultado no se apreció con ninguna de las interleucinas restantes analizadas.

Estos resultados en los individuos con DM-1 son llamativos. No obstante, dado el escaso tamaño muestral de nuestro estudio, será muy interesante realizar un experimento confirmatorio con mayor número de pacientes.



# Conclusiones



**Primera:** El modelo de sangre completa obtenido de pacientes con diabetes tipo 2, y posiblemente en diabéticos tipo 1, muestra una actividad micobactericida que no difiere de la observada en el grupo control, ni de forma basal, ni tras la activación con las citocinas activadoras  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , GM-CSF e IL-15, pese a que estudios clínicos previos demuestran mayor riesgo de TB en pacientes diabéticos. Debe tenerse en cuenta que la muestra analizada es de avanzada edad y se desconoce la influencia de este factor en los estudios *in vitro*. Por otro lado, encontramos evidencias de que, en pacientes diabéticos tipo 1, la IL-15 es capaz de estimular la actividad antimicobacteriana en sangre completa.

**Segunda:** No se observan diferencias en la actividad antimicobacteriana basal de los macrófagos derivados de monocitos entre pacientes diabéticos y grupo control. Tampoco se aprecian diferencias tras la activación con  $\text{IFN}\gamma$ .

**Tercera:** Se ha comprobado que el número de neutrófilos es significativamente superior en los pacientes diabéticos tipo 2, tal y como está descrito en la literatura científica. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias significativas en el recuento de monocitos entre ambos grupos.

**Cuarta:** La actividad fagocítica de micobacterias en diabéticos tipo 2 es inferior tanto en neutrófilos como en monocitos. También se presentan evidencias de la menor actividad de neutrófilos en pacientes diabéticos tipo 1.

**Quinta:** Se considera poco probable que la presencia de ROS influya en la susceptibilidad a la TB en diabéticos. Este razonamiento surge tras comprobar que la producción de ROS en monocitos y neutrófilos de diabéticos infectados con *M. bovis* BCGr, no varía significativamente respecto a los controles.

**Sexta:** En sangre infectada por *M. tuberculosis* se detecta TNF $\alpha$  y GM-CSF, tanto en pacientes diabéticos tipo 2 como en controles, siendo el nivel de producción de TNF $\alpha$  significativamente superior en los pacientes diabéticos. Sin embargo, esto no parece afectar a la actividad antimicobacteriana. Por el contrario, no se aprecia producción de IFN $\gamma$  ni de IL-15.

**Séptima:** Con los modelos empleados no se ha conseguido reproducir fielmente *in vitro* la realidad clínica de la susceptibilidad de los diabéticos a la TB. Por consiguiente, deben ser mejorados.

# Resumen/Summary



La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas con mayor morbilidad y la patología de origen bacteriano con mayor mortalidad global. A su vez, la diabetes mellitus (DM) ha sido reconocida como factor de riesgo para el desarrollo de TB. Los pacientes diabéticos muestran una respuesta inmune deficitaria por razones insuficientemente analizadas. Nos planteamos caracterizar la respuesta inmunológica a infecciones *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis*, mediante el modelo de sangre completa y el de macrófagos derivados de monocitos, comparando los datos obtenidos en pacientes diabéticos y voluntarios no diabéticos. Esta respuesta se inmunomoduló añadiendo cuatro citocinas: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF e IL-15, que parecen influir en la evolución de la TB. Asimismo, se cuantificó la producción de dichas citocinas en sangre infectada y se analizaron dos actividades fundamentales en la defensa frente a la bacteria: la fagocitosis y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Se incluyeron 41 pacientes diabéticos tipo 2 (DM-2) con sus correspondientes controles. No se apreciaron diferencias en la actividad antimicobacteriana de sangre completa ni de macrófagos derivados de monocitos. Tras la infección *in vitro*, se detectó producción de TNF $\alpha$  y GM-CSF en pacientes y controles, siendo el nivel de TNF $\alpha$  significativamente superior en diabéticos. Se apreció un mayor número de neutrófilos en sangre de pacientes con DM-2.

En este grupo, tanto los monocitos como los neutrófilos mostraron una menor actividad fagocítica. La producción de ROS detectada en monocitos y neutrófilos fue similar en ambos tipos celulares.

Paralelamente, se realizaron los mismos experimentos en una pequeña muestra de 9 pacientes diabéticos tipo 1 (DM-1), con sus respectivos controles. A diferencia de lo observado en DM-2, el número de neutrófilos no fue diferente al de los controles. No obstante, estas células mostraron una reducción significativa de la fagocitosis. El resultado más relevante obtenido en este grupo fue la demostración de una mayor actividad antimicobacteriana en sangre completa al ser estimulada con IL-15.

En conclusión, la actividad antimicobacteriana de sangre completa fue similar tanto en diabéticos como en controles. No obstante, se apreciaron diferencias significativas en la producción y respuesta a distintas citocinas y, sobre todo, en la capacidad fagocítica de monocitos y neutrófilos. Estos déficits inmunitarios detectados *in vitro* podrían estar relacionados con la mayor susceptibilidad de los pacientes diabéticos a desarrollar TB.

Tuberculosis (TB) is one of the infectious diseases with higher levels of morbidity and the most lethal bacterial disease. On the other hand, diabetes mellitus (DM) has been recognized as a risk factor for TB. Diabetes patients display an impaired immune response that has been little analyzed. We decided to characterize the immune response to *in vitro* infection with *Mycobacterium tuberculosis*, using the whole blood and the macrophage derived monocytes models, to compare the results in diabetic and non-diabetic volunteers. The response was immunomodulated by adding four cytokines: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF e IL-15, that seems to influence the evolution of TB. Additionally, the production of these cytokines was quantified in infected blood as well as two activities involved in bacterial defence: phagocytosis and production of reactive oxygen species (ROS).

41 diabetes patients and their corresponding controls were recruited. No differences were observed in the antimycobacterial activity in either whole blood or monocyte derived macrophages. After the *in vitro* infections it was detected the production of TNF $\alpha$  and GM-CSF in both, patients and controls, although the amount of TNF $\alpha$  was higher in diabetes patients. It was observed a higher number of neutrophils in DM-2 patients, although both neutrophils and monocytes exhibited a lower phagocytosis activity. ROS production detected in either monocytes or neutrophils was similar in both cell types.

Simultaneously, the same experiments were performed in a small size sample (9 individuals) of type 1 diabetes patients (DM-1), and their respective controls. In contrast with DM-2 patients, the number of neutrophils was similar to those of controls. Nevertheless, these cells showed a reduced phagocytic activity. The most relevant result in this group was the stronger antimycobacterial activity in whole blood stimulated with IL-15.

In conclusion, the whole blood antimycobacterial activity was similar in both patients and controls. However, significant differences were observed in the production and response to various cytokines as well as in the phagocytic activity of both monocytes and neutrophils. These immune deficits detected *in vitro* may be related to the higher susceptibility of diabetes patients to develop TB.

# Abreviaciones



**ADC:** Albúmina, dextrosa y catalasa.

**BCG:** Bacilo de Calmette-Guérin.

**BCGr:** *M bovis* BCG transformada con el plásmido de expresión pMDsRed.

**CD4:** Linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

**CD8:** Linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

**Células T $\gamma\delta$ :** Células T gamma/delta.

**CFU:** Colony-forming units (en español, unidades formadoras de colonias).

**DC:** Dendritic cell (en español, célula dendrítica).

**DE:** Desviación estándar.

**DM:** Diabetes mellitus.

**DM-1:** Diabetes mellitus tipo 1.

**DM-2:** Diabetes mellitus tipo 2.

**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay (en español, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

**Fig.:** Figura.

**FITC:** Fluorescein isothiocyanate (en español, isotiocianato de fluoresceína).

**GM-CSF:** Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (en español, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos).

**HbA1c:** Hemoglobina glicosilada.

**HDLc:** High density lipoproteins (en español, lipoproteínas de alta densidad).

**IFN $\gamma$ :** Interferón gamma.

**IL-10:** Interleucina-10.

**IL-12:** Interleucina-12.

**IL-15:** Interleucina-15.

**IMC:** Índice de masa corporal.

**LDLc:** Low density lipoproteins (en español, lipoproteínas de baja densidad).

***M. bovis:*** *Mycobacterium bovis*.

**M-CSF:** Macrophage colony-stimulating factor (en español, factor estimulante de colonias de macrófagos).

**MFI:** Median fluorescence intensity (en español, mediana de intensidad de fluorescencia).

***M. tuberculosis:*** *Mycobacterium tuberculosis*.

**NADPH oxidasa:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa.

**NK:** Células “natural killers”.

**OADC:** Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**RI:** Rango intercuartílico.

**RNI:** Reactive nitrogen intermediates (en español, radicales intermediarios del nitrógeno).

**ROS:** Reactive oxygen species (en español, especies reactivas del oxígeno).

**TB:** Tuberculosis.

**TB-MDR:** Tuberculosis multidrug resistance (en español, tuberculosis multirresistente).

**TB-XDR:** Tuberculosis xtremedrug resistance (en español, tuberculosis extremadamente resistente).

**TNF $\alpha$ :** Tissue necrosis factor alpha (en español, factor de necrosis tumoral alfa).

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana.

# Índice de tablas



<b>Tabla 1:</b> Características de pacientes con DM-2 y controles .....	<b>68</b>
<b>Tabla 2:</b> Características de pacientes con DM-1 y controles .....	<b>69</b>
<b>Tabla 3:</b> Cuantificación de células a lo largo del tiempo .....	<b>92</b>
<b>Tabla 4:</b> Diseño factorial $2^5$ (diabéticos tipo 2 – controles) .....	<b>102</b>
<b>Tabla 5:</b> Diseño factorial $2^4$ (diabéticos tipo 2 – controles) .....	<b>103</b>
<b>Tabla 6:</b> Actividad antimicobacteriana en sangre completa en pacientes diabéticos tipo 1 y controles. Diseño factorial .....	<b>111</b>



# Índice de figuras



<b>Figura 1:</b> Mapa de la incidencia de tuberculosis por países en 2015 .....	<b>10</b>
<b>Figura 2:</b> Granuloma tuberculoso .....	<b>29</b>
<b>Figura 3:</b> Activación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa .....	<b>31</b>
<b>Figura 4:</b> Purificación de monocitos .....	<b>71</b>
<b>Figura 5:</b> Producción de ROS en fagocitos infectados con <i>M. bovis</i> BCG transformada (BCGr) .....	<b>75</b>
<b>Figura 6:</b> Cuantificación de citocinas por ELISA tipo sándwich .....	<b>77</b>
<b>Figura 7:</b> Cuantificación de citocinas por ELISA .....	<b>78</b>
<b>Figura 8:</b> Concentración de monocitos y neutrófilos en pacientes diabéticos tipo 2 y controles .....	<b>87</b>
<b>Figura 9:</b> Actividad fagocítica de monocitos y neutrófilos de pacientes con DM-2 y controles .....	<b>89</b>
<b>Figura 10:</b> Curva de tiempo de la concentración de leucocitos en sangre completa .....	<b>91</b>
<b>Figura 11:</b> Producción de TNF $\alpha$ y GM-CSF en el sobrenadante de sangre infectada con <i>M. tuberculosis</i> en pacientes con DM-2 y controles .....	<b>94</b>
<b>Figura 12:</b> Producción de ROS en monocitos y neutrófilos de sangre infectada con BCGr en pacientes diabéticos tipo 2 y controles .....	<b>96</b>
<b>Figura 13:</b> Actividad antimicobacteriana en sangre completa de pacientes diabéticos tipo 2 y controles .....	<b>98</b>

<b>Figura 14:</b> Actividad antimicobacteriana en macrófagos derivados de monocitos de pacientes diabéticos tipo 2 y controles .....	<b>100</b>
<b>Figura 15:</b> Concentración de monocitos y neutrófilos en pacientes con DM-1 y controles .....	<b>106</b>
<b>Figura 16:</b> Actividad fagocítica de monocitos y neutrófilos de pacientes con DM-1 y controles .....	<b>108</b>
<b>Figura 17:</b> Producción de TNF $\alpha$ y GM-CSF en el sobrenadante de sangre infectada con <i>M. tuberculosis</i> en pacientes diabéticos tipo 1 y controles .....	<b>109</b>
<b>Figura 18:</b> Producción de ROS en monocitos y neutrófilos de sangre infectada con BCGr en pacientes con DM-1 y controles ....	<b>110</b>
<b>Figura 19:</b> Actividad antimicobacteriana en sangre completa de pacientes con DM-1 y controles .....	<b>113</b>
<b>Figura 20:</b> Actividad antimicobacteriana en macrófagos derivados de monocitos de pacientes con DM-1 y controles .....	<b>114</b>

# Bibliografía



1. González-Martin J, García-García JM, Anibarro L et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Arch Bronconeumol 2010; 46(5):255-274.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2016. Switzerland, WHO/HTM/TB/2016.13.
3. McGrath M, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Warner DF. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2014; 69(2):292-302.
4. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 2003; 16(3):463-496.
5. Thomas MD. Captain of death. The story of tuberculosis. University of Rochester Press: 1997.
6. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe sobre la situación de la Tuberculosis. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Págs 1-21. España. 2017.
7. Enarson DA, Seita A, Fujiwara P. Global elimination of tuberculosis: implementation, innovation, investigation. Int J Tuberc Lung Dis 2003; 7(12 Suppl 3):S328-S332.
8. Informe epidemiológico sobre la situación de la Tuberculosis en España, año 2014. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III 2015.
9. Boletín epidemiológico semanal. Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III 2017.

10. Red de Vigilancia Epidemiológica de Castilla y León. Informe epidemiológico sobre la Tuberculosis en Castilla y León. Año 2015. Junta de Castilla y León 2016.
11. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. Clin Microbiol Rev 2014; 27(4):727-752.
12. Tarhan G, Ordulu L, Gumuslu F, Ceyhan I, Cesur S. [Comparison of auramine-rhodamine and Erlich-Ziehl-Neelsen staining methods for the diagnosis of tuberculosis]. Mikrobiyol Bul 2003; 37(2-3):131-136.
13. Sethi S, Sharma M, Sengupta C, Mohandas K, Sharma SK. Enhanced detection of Mycobacteria stained with rhodamine auramine at 37 degrees C. Indian J Pathol Microbiol 2003; 46(3):521-523.
14. Boddingtonhaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1990; 28(8):1751-1759.
15. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(18):9869-9874.
16. Mostowy S, Behr MA. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Chest Med 2005; 26(2):207-216.
17. Nebreda T, Álvarez-Prida E, Blanco B, Remacha MA, Samper S, Jiménez MS. Peritoneal tuberculosis due to *Mycobacterium caprae*. IDCases 2016; 4:50-52.

18. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 2013; 4(1):3-66.
19. Leung AN. Pulmonary tuberculosis: the essentials. *Radiology* 1999; 210(2):307-322.
20. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández de Larrea C, Rivas-Santiago B. [Immunitary response in tuberculosis and the role of *Mycobacterium tuberculosis* secretion antigens in its protection, pathology and diagnosis. Review]. *Invest Clin* 2008; 49(3):411-441.
21. Harrison. *Principios de Medicina Interna*. Capítulo 202. Tuberculosis. Págs. 1102-1121. 19<sup>a</sup> Ed. McGraw Hill. 2016.
22. Houben RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med* 2016; 13(10):e1002152.
23. Milburn HJ. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7(3):133-141.
24. Horsburgh CR Jr. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med* 2004; 350(20):2060-2067.
25. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):294-309.
26. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27:474-480.
27. Narasimhan P, Wood J, Macintyre CR, Mathai D. Risk factors for tuberculosis. *Pulm Med* 2013; 2013:828939.

28. Baker MA, Lin HH, Chang HY, Murray MB. The risk of tuberculosis disease among persons with diabetes mellitus: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2012; 54(6):818-825.
29. Caws M, Thwaites G, Dunstan S et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2008; 4(3):e1000034.
30. Lin PL, Flynn JL. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J Immunol* 2010; 185(1):15-22.
31. Pasquinelli V. Contribución de la respuesta inmune del huésped al control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Química Viva* 2008; 2:135-159.
32. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120(4):213-232.
33. Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 2007; 27(4):347-362.
34. Leemans JC, Thepen T, Weijer S et al. Macrophages play a dual role during pulmonary tuberculosis in mice. *J Infect Dis* 2005; 191(1):65-74.
35. Tan BH, Meinken C, Bastian M et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol* 2006; 177(3):1864-1871.
36. Ehrt S, Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol* 2009; 11(8):1170-1178.
37. Russell DG. Of microbes and macrophages: entry, survival and persistence. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(4):479-484.

38. Ma J, Chen T, Mandelin J et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(11):2334-2346.
39. Reyes-Ruvalcaba D, González-Cortés C, Rivero-Lezcano OM. Human phagocytes lack the ability to kill *Mycobacterium gordonae*, a non-pathogenic mycobacteria. *Immunol Lett* 2008; 116(1):72-78.
40. Cheon SH, Kampmann B, Hise AG et al. Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(4):901-907.
41. Al-Attayah R, El-Shazly A, Mustafa AS. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients. *Scand J Immunol* 2012; 75(6):623-632.
42. Mendelson M, Walters S, Smith I, Kaplan G. Strain-specific mycobacterial lipids and the stimulation of protective immunity to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2005; 85(5-6):407-413.
43. Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology* 1986; 59(3):333-338.
44. Saunders BM, Briscoe H, Britton WJ. T cell-derived tumour necrosis factor is essential, but not sufficient, for protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol* 2004; 137(2):279-287.
45. Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM et al. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression

- of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol* 2007; 178(11):7190-7198.
46. Rook GA, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* 1987; 62(2):229-234.
  47. Garg SK, Volpe E, Palmieri G et al. Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 2004; 189(11):2129-2138.
  48. Kusner DJ, Adams J. ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. *J Immunol* 2000; 164(1):379-388.
  49. Warwick-Davies J, Dhillon J, O'Brien L, Andrew PW, Lowrie DB. Apparent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by cytokine-activated human monocytes can be an artefact of a cytotoxic effect on the monocytes. *Clin Exp Immunol* 1994; 96(2):214-217.
  50. Bonay M, Bouchonnet F, Pelicic V et al. Effect of stimulation of human macrophages on intracellular survival of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. Evaluation with a mycobacterial reporter strain. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(5 Pt 1):1629-1637.
  51. Robertson AK, Andrew PW. Interferon gamma fails to activate human monocyte-derived macrophages to kill or inhibit the replication of a non-pathogenic mycobacterial species. *Microb Pathog* 1991; 11(4):283-288.
  52. Vogt G, Nathan C. In vitro differentiation of human macrophages with enhanced antimycobacterial activity. *J Clin Invest* 2011; 121(10):3889-3901.

53. Reljic R, Stylianou E, Balu S, Ma JK. Cytokine interactions that determine the outcome of Mycobacterial infection of macrophages. *Cytokine* 2010; 51(1):42-46.
54. Appelberg R. Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils. *J Leukoc Biol* 1992; 51(5):472-477.
55. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 2007; 219:88-102.
56. Appelberg R, Silva MT. T cell-dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. *Clin Exp Immunol* 1989; 78(3):478-483.
57. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 2007; 28(8):340-345.
58. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89(10):3503-3521.
59. N'Diaye EN, Darzacq X, Astarie-Dequeker C, Daffé M, Calafat J, Maridonneau-Parini I. Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J Immunol* 1998; 161(9):4983-4991.
60. Eum SY, Kong JH, Hong MS et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* 2010; 137(1):122-128.
61. Lyadova IV. Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way? *Mediators Inflamm* 2017; 2017:8619307.

62. Kisich KO, Higgins M, Diamond G, Heifets L. Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils. *Infect Immun* 2002; 70(8):4591-4599.
63. Jones GS, Amirault HJ, Andersen BR. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. *J Infect Dis* 1990; 162(3):700-704.
64. Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest* 2007; 117(7):1988-1994.
65. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK et al. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun* 2005; 73(3):1744-1753.
66. Denis M. Human neutrophils, activated with cytokines or not, do not kill virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1991; 163(4):919-920.
67. Corleis B, Korbel D, Wilson R, Bylund J, Chee R, Schaible UE. Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cell Microbiol* 2012; 14(7):1109-1121.
68. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2009; 89(1):29-37.
69. Cardona PJ. The Progress of Therapeutic Vaccination with Regard to Tuberculosis. *Front Microbiol* 2016; 7:1536.
70. Ehlers S, Schaible UE. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol* 2012; 3:411.

71. Mapother ME, Songer JG. In vitro interaction of *Mycobacterium avium* with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1984; 45(1):67-73.
72. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* 1996; 64(4):1400-1406.
73. Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C et al. Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 2005; 73(8):4505-4511.
74. Brill KJ, Li Q, Larkin R et al. Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infect Immun* 2001; 69(3):1755-1765.
75. Korbel DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect* 2008; 10(9):995-1004.
76. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997; 159(2):635-643.
77. Satthaporn S, Eremin O. Dendritic cells (I): Biological functions. *J R Coll Surg Edinb* 2001; 46(1):9-19.
78. Reis e Sousa, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(4):392-399.
79. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:93-129.

80. Rook GA, Seah G, Ustianowski A. M. tuberculosis: immunology and vaccination. *Eur Respir J* 2001; 17(3):537-557.
81. Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 2005; 85(1-2):53-64.
82. Hoft DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet* 2008; 372(9633):164-175.
83. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112(5):1570-1580.
84. Rivero-Lezcano OM. Cytokines as immunomodulators in tuberculosis therapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2008; 3(3):168-176.
85. Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol* 2009; 157(2):235-243.
86. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(9):578-590.
87. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 2004; 204(2):217-228.
88. Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol* 2004; 113(2):130-136.
89. Algood HM, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of

- granulomas in tuberculosis. Clin Infect Dis 2005; 41 Suppl 3:S189-S193.
90. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. Virulence 2010; 1(5):440-464.
  91. Ratledge C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2004; 84(1-2):110-130.
  92. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. J Clin Invest 2002; 109(6):699-705.
  93. Babior BM. NADPH oxidase: an update. Blood 1999; 93(5):1464-1476.
  94. Deleo FR, Allen LA, Apicella M, Nauseef WM. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. J Immunol 1999; 163(12):6732-6740.
  95. Segal AW. How neutrophils kill microbes. Annu Rev Immunol 2005; 23:197-223.
  96. Deffert C, Cachat J, Krause KH. Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. Cell Microbiol 2014; 16(8):1168-1178.
  97. González-Cortés C, Reyes-Ruvalcaba D, Díez-Tascón C, Rivero-Lezcano OM. Apoptosis and oxidative burst in neutrophils infected with *Mycobacterium* spp. Immunol Lett 2009; 126(1-2):16-21.
  98. Darwich L, Coma G, Peña R et al. Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. Immunology 2009; 126(3):386-393.

99. Ellis TN, Beaman BL. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology* 2004; 112(1):2-12.
100. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75(2):163-189.
101. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178(6):2249-2254.
102. Wallis RS. Reconsidering adjuvant immunotherapy for tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41(2):201-208.
103. Condos R, Raju B, Canova A et al. Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients. *Infect Immun* 2003; 71(4):2058-2064.
104. Park SK, Cho S, Lee IH et al. Subcutaneously administered interferon-gamma for the treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *Int J Infect Dis* 2007; 11(5):434-440.
105. Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 1998; 19(11):491-494.
106. Blanchard DK, Michelini-Norris MB, Djeu JY. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by large granular lymphocytes stimulated with *Candida albicans*: role in activation of human neutrophil function. *Blood* 1991; 77(10):2259-2265.

107. Rivero-Lezcano OM. In vitro infection of human cells with *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) 2013; 93(2):123-129.
108. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity 1995; 2(6):561-572.
109. Algood HM, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 14(6):467-477.
110. Bean AG, Roach DR, Briscoe H et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. J Immunol 1999; 162(6):3504-3511.
111. Dinarello CA. Anti-cytokine therapeutics and infections. Vaccine 2003; 21 Suppl 2:S24-S34.
112. Winthrop KL. Update on tuberculosis and other opportunistic infections associated with drugs blocking tumour necrosis factor {alpha}. Ann Rheum Dis 2005; 64 Suppl 4:iv29-iv30.
113. Maini R, St Clair EW, Breedveld F et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. Lancet 1999; 354(9194):1932-1939.
114. Szeliga J, Daniel DS, Yang CH, Sever-Chroneos Z, Jagannath C, Chronesos ZC. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor-mediated innate responses in tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2008; 88(1):7-20.

115. Greenhill SR, Kotton DN. Pulmonary alveolar proteinosis: a bench-to-bedside story of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor dysfunction. *Chest* 2009; 136(2):571-577.
116. Rothchild AC, Jayaraman P, Nunes-Alves C, Behar SM. iNKT cell production of GM-CSF controls *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2014; 10(1):e1003805.
117. Di SA, Calarota SA, Vidali F, MacDonald TT, Corazza GR. Role of IL-15 in immune-mediated and infectious diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22(1):19-33.
118. Maeurer MJ, Trinder P, Hommel G et al. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 2000; 68(5):2962-2970.
119. Perera PY, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect* 2012; 14(3):247-261.
120. Sánchez-Rivero G. Historia de la diabetes. *Gaceta médica boliviana* 2007; 30(2):74-78.
121. Harrison. *Principios de Medicina Interna*. Capítulo 417. Diabetes mellitus: diagnóstico, clasificación y fisiopatología. Págs. 2399-2406. 19ª Ed. McGraw Hill. 2016.
122. Standards of Medical Care in Diabetes - 2017. *Diabetes Care* 2017; 40(Supplement 1):S1-S135.
123. Global report on diabetes. World Health Organization 2016.
124. Ruslami R, Aarnoutse RE, Alisjahbana B, van der Ven AJ, van Crevel R. Implications of the global increase of diabetes for tuberculosis control and patient care. *Trop Med Int Health* 2010; 15(11):1289-1299.

125. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med 2006; 3(11):e442.
126. Harrison. Principios de Medicina Interna. Capítulo 419. Diabetes mellitus: complicaciones. Págs. 2422-2429. 19<sup>a</sup> Ed. McGraw Hill. 2016.
127. Harrison. Principios de Medicina Interna. Capítulo 418. Diabetes mellitus: control y tratamiento. Págs. 2407-2421. 19<sup>a</sup> Ed. McGraw Hill. 2016.
128. Jee SH, Golub JE, Jo J, Park IS, Ohrr H, Samet JM. Smoking and risk of tuberculosis incidence, mortality, and recurrence in South Korean men and women. Am J Epidemiol 2009; 170(12):1478-1485.
129. Talat N, Perry S, Parsonnet J, Dawood G, Hussain R. Vitamin d deficiency and tuberculosis progression. Emerg Infect Dis 2010; 16(5):853-855.
130. Martinez N, Kornfeld H. Diabetes and immunity to tuberculosis. Eur J Immunol 2014; 44(3):617-626.
131. Martens GW, Arikan MC, Lee J, Ren F, Vallerskog T, Kornfeld H. Hypercholesterolemia impairs immunity to tuberculosis. Infect Immun 2008; 76(8):3464-3472.
132. Repasy T, Lee J, Marino S et al. Intracellular bacillary burden reflects a burst size for *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. PLoS Pathog 2013; 9(2):e1003190.
133. Pavlovic JM, Pavlovic AD, Bulajic MV, Pesut DP. Prevalence of diabetes mellitus (DM) in tuberculosis (TB) patients: clinical and radiologic features in the TB-DM association based on a five-year hospital study. Infez Med 2018; 26(1):22-27.

134. Martinez L, Zhu L, Castellanos ME et al. Glycemic Control and the Prevalence of Tuberculosis Infection: A Population-based Observational Study. *Clin Infect Dis* 2017; 65(12):2060-2068.
135. Kumar Nathella P, Babu S. Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis. *Immunology* 2017; 152(1):13-24.
136. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med* 2008; 5(7):e152.
137. Leung CC, Lam TH, Chan WM et al. Diabetic control and risk of tuberculosis: a cohort study. *Am J Epidemiol* 2008; 167(12):1486-1494.
138. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 8(4):228-236.
139. Webb EA, Hesselting AC, Schaaf HS et al. High prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13(7):868-874.
140. Faurholt-Jepsen D, Range N, PrayGod G et al. Diabetes is a strong predictor of mortality during tuberculosis treatment: a prospective cohort study among tuberculosis patients from Mwanza, Tanzania. *Trop Med Int Health* 2013; 18(7):822-829.
141. Baghaei P, Marjani M, Javanmard P, Tabarsi P, Masjedi MR. Diabetes mellitus and tuberculosis facts and controversies. *J Diabetes Metab Disord* 2013; 12(1):58.
142. Restrepo BI, Schlesinger LS. Host-pathogen interactions in tuberculosis patients with type 2 diabetes mellitus. *Tuberculosis (Edinb)* 2013; 93 Suppl:S10-S14.

143. Jeon CY, Harries AD, Baker MA et al. Bi-directional screening for tuberculosis and diabetes: a systematic review. *Trop Med Int Health* 2010; 15(11):1300-1314.
144. Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 2006; 367(9514):938-940.
145. Jorgensen ME, Faurholt-Jepsen D. Is there an effect of glucose lowering treatment on incidence and prognosis of tuberculosis? A systematic review. *Curr Diab Rep* 2014; 14(7):505.
146. Singla R, Khan N, Al-Sharif N, Ai-Sayegh MO, Shaikh MA, Osman MM. Influence of diabetes on manifestations and treatment outcome of pulmonary TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(1):74-79.
147. Wang JY, Lee LN, Hsueh PR. Factors changing the manifestation of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(7):777-783.
148. Alkabab YM, Enani MA, Indarkiri NY, Heysell SK. Performance of computed tomography versus chest radiography in patients with pulmonary tuberculosis with and without diabetes at a tertiary hospital in Riyadh, Saudi Arabia. *Infect Drug Resist* 2018; 11:37-43.
149. Viswanathan V, Kumpatla S, Aravindalochanan V et al. Prevalence of diabetes and pre-diabetes and associated risk factors among tuberculosis patients in India. *PLoS One* 2012; 7(7):e41367.
150. Ottmani SE, Murray MB, Jeon CY et al. Consultation meeting on tuberculosis and diabetes mellitus: meeting summary and recommendations. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14(12):1513-1517.
151. Pérez-Guzman C, Torres-Cruz A, Villarreal-Velarde H, Salazar-Lezama MA, Vargas MH. Atypical radiological images

- of pulmonary tuberculosis in 192 diabetic patients: a comparative study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(5):455-461.
152. Umut S, Tosun GA, Yildirim N. Radiographic location of pulmonary tuberculosis in diabetic patients. *Chest* 1994; 106(1):326.
  153. Chiang CY, Lee JJ, Chien ST et al. Glycemic control and radiographic manifestations of tuberculosis in diabetic patients. *PLoS One* 2014; 9(4):e93397.
  154. Alisjahbana B, Sahiratmadja E, Nelwan EJ et al. The effect of type 2 diabetes mellitus on the presentation and treatment response of pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007; 45(4):428-435.
  155. Ocal S, Saka D, Ogretensoy M. Mild and severe forms of tuberculosis in diabetic and non-diabetic patients. *J Diabetes* 2009; 1(2):107-111.
  156. Shaikh MA, Singla R, Khan NB, Sharif NS, Saigh MO. Does diabetes alter the radiological presentation of pulmonary tuberculosis. *Saudi Med J* 2003; 24(3):278-281.
  157. Park SW, Shin JW, Kim JY et al. The effect of diabetic control status on the clinical features of pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(7):1305-1310.
  158. Bacakoglu F, Basoglu OK, Cok G, Sayiner A, Ates M. Pulmonary tuberculosis in patients with diabetes mellitus. *Respiration* 2001; 68(6):595-600.
  159. Chang JT, Dou HY, Yen CL et al. Effect of type 2 diabetes mellitus on the clinical severity and treatment outcome in patients with pulmonary tuberculosis: a potential role in the emergence of multidrug-resistance. *J Formos Med Assoc* 2011; 110(6):372-381.

160. Morsy AM, Zaher HH, Hassan MH, Shouman A. Predictors of treatment failure among tuberculosis patients under DOTS strategy in Egypt. *East Mediterr Health J* 2003; 9(4):689-701.
161. Fielder JF, Chaulk CP, Dalvi M, Gachuhi R, Comstock GW, Sterling TR. A high tuberculosis case-fatality rate in a setting of effective tuberculosis control: implications for acceptable treatment success rates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6(12):1114-1117.
162. Zhang Q, Xiao H, Sugawara I. Tuberculosis complicated by diabetes mellitus at shanghai pulmonary hospital, china. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62(5):390-391.
163. Gwilt PR, Nahhas RR, Tracewell WG. The effects of diabetes mellitus on pharmacokinetics and pharmacodynamics in humans. *Clin Pharmacokinet* 1991; 20(6):477-490.
164. Bashar M, Alcabes P, Rom WN, Condos R. Increased incidence of multidrug-resistant tuberculosis in diabetic patients on the Bellevue Chest Service, 1987 to 1997. *Chest* 2001; 120(5):1514-1519.
165. Mboussa J, Monabeka H, Kombo M, Yokolo D, Yoka-Mbio A, Yala F. [Course of pulmonary tuberculosis in diabetics]. *Rev Pneumol Clin* 2003; 59(1):39-44.
166. World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Collaborative framework for care and control of tuberculosis and diabetes. World Health Organization 2011.
167. Singh MM, Biswas SK, Ashok S, Ashok KR, Singh PP. Impaired glucose tolerance in active pulmonary tuberculosis. *Ind J Tub* 1984; 31(3):118-121.

168. Pimazoni A. The impact of tuberculosis treatment on glycaemic control and the significant response to rosiglitazone. *BMJ Case Rep* 2009; 2009.
169. Riza AL, Pearson F, Ugarte-Gil C et al. Clinical management of concurrent diabetes and tuberculosis and the implications for patient services. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2(9):740-753.
170. Young F, Critchley JA, Johnstone LK, Unwin NC. A review of co-morbidity between infectious and chronic disease in Sub Saharan Africa: TB and diabetes mellitus, HIV and metabolic syndrome, and the impact of globalization. *Global Health* 2009; 5:9.
171. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(3):813-823.
172. Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(9):819-850.
173. Harries AD, Lin Y, Satyanarayana S et al. The looming epidemic of diabetes-associated tuberculosis: learning lessons from HIV-associated tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15(11):1436-44, i.
174. Dooley KE, Chaisson RE. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(12):737-746.
175. Pablos-Méndez A, Blustein J, Knirsch CA. The role of diabetes mellitus in the higher prevalence of tuberculosis among Hispanics. *Am J Public Health* 1997; 87(4):574-579.
176. Harries AD, Murray MB, Jeon CY et al. Defining the research agenda to reduce the joint burden of disease from diabetes

- mellitus and tuberculosis. *Trop Med Int Health* 2010; 15(6):659-663.
177. Baldé NM, Camara A, Camara LM, Diallo MM, Kaké A, Bah-Sow OY. Associated tuberculosis and diabetes in Conakry, Guinea: prevalence and clinical characteristics. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(9):1036-1040.
  178. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(4 Pt 2):S221-S247.
  179. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2010; 28(5):297.e1-297.e20.
  180. Nandy D, Janardhanan R, Mukhopadhyay D, Basu A. Effect of hyperglycemia on human monocyte activation. *J Investig Med* 2011; 59(4):661-667.
  181. Niemann MA, Bhowan AS, Miller EJ. The principal site of glycation of human complement factor B. *Biochem J* 1991; 274 (Pt 2):473-480.
  182. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414(6865):813-820.
  183. Tan KS, Lee KO, Low KC et al. Glutathione deficiency in type 2 diabetes impairs cytokine responses and control of intracellular bacteria. *J Clin Invest* 2012; 122(6):2289-2300.

184. Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab* 2013; 17(5):695-708.
185. Jiménez-Corona ME, Cruz-Hervert LP, García-García L et al. Association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes. *Thorax* 2013; 68(3):214-220.
186. Gomez DI, Twahirwa M, Schlesinger LS, Restrepo BI. Reduced *Mycobacterium tuberculosis* association with monocytes from diabetes patients that have poor glucose control. *Tuberculosis (Edinb)* 2013; 93(2):192-197.
187. Schlesinger LS. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 215:71-96.
188. Vallerskog T, Martens GW, Kornfeld H. Diabetic mice display a delayed adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2010; 184(11):6275-6282.
189. Molina MF, Qu HQ, Rentfro AR et al. Decreased expression of ATP6V1H in type 2 diabetes: a pilot report on the diabetes risk study in Mexican Americans. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412(4):728-731.
190. Qu HQ, Rentfro AR, Lu Y et al. Host susceptibility to tuberculosis: insights from a longitudinal study of gene expression in diabetes. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16(3):370-372.
191. Gonzalez-Curiel I, Castañeda-Delgado J, Lopez-Lopez N et al. Differential expression of antimicrobial peptides in active and latent tuberculosis and its relationship with diabetes mellitus. *Hum Immunol* 2011; 72(8):656-662.

192. Sugawara I, Mizuno S. Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tohoku J Exp Med* 2008; 216(4):363-370.
193. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008; 14(3):275-281.
194. Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, Jawahar MS, Nutman TB, Babu S. Expansion of pathogen-specific T-helper 1 and T-helper 17 cells in pulmonary tuberculosis with coincident type 2 diabetes mellitus. *J Infect Dis* 2013; 208(5):739-748.
195. Restrepo BI, Fisher-Hoch SP, Pino PA et al. Tuberculosis in poorly controlled type 2 diabetes: altered cytokine expression in peripheral white blood cells. *Clin Infect Dis* 2008; 47(5):634-641.
196. Sun Q, Zhang Q, Xiao H, Cui H, Su B. Significance of the frequency of CD4+CD25+CD127- T-cells in patients with pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus. *Respirology* 2012; 17(5):876-882.
197. Al-Attayah RJ, Mustafa AS. Mycobacterial antigen-induced T helper type 1 (Th1) and Th2 reactivity of peripheral blood mononuclear cells from diabetic and non-diabetic tuberculosis patients and *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin (BCG)-vaccinated healthy subjects. *Clin Exp Immunol* 2009; 158(1):64-73.
198. Stalenhoef JE, Alisjahbana B, Nelwan EJ et al. The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(2):97-103.
199. Tsukaguchi K, Okamura H, Matsuzawa K et al. [Longitudinal assessment of IFN-gamma production in patients with

- pulmonary tuberculosis complicated with diabetes mellitus]. *Kekkaku* 2002; 77(5):409-413.
200. Martens GW, Arikian MC, Lee J, Ren F, Greiner D, Kornfeld H. Tuberculosis susceptibility of diabetic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(5):518-524.
  201. Saiki O, Negoro S, Tsuyuguchi I, Yamamura Y. Depressed immunological defence mechanisms in mice with experimentally induced diabetes. *Infect Immun* 1980; 28(1):127-131.
  202. Yamashiro S, Kawakami K, Uezu K et al. Lower expression of Th1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 2005; 139(1):57-64.
  203. Demay C, Liens B, Burguiere T et al. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 2012; 12(4):755-766.
  204. Gagneux S, DeRiemer K, Van T et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(8):2869-2873.
  205. Cabal A, Strunk M, Domínguez J et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis used for the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on a pyrosequencing assay. *BMC Microbiol* 2014; 14:21.
  206. vd Meijden AP, Steerenberg PA, de Jong WH et al. The effects of intravesical and intradermal application of a new B.C.G. on the dog bladder. *Urol Res* 1986; 14(4):207-210.

207. Cohn ML, Waggoner RF, McClatchy JK. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1968; 98(2):295-296.
208. Guerra-Laso JM, González-García S, González-Cortés C, Diez-Tascón C, López-Medrano R, Rivero-Lezcano OM. Macrophages from elders are more permissive to intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*. *Age (Dordr)* 2013; 35(4):1235-1250.
209. Fazal N, Bartlett R, Lammas DA, Kumararatne DS. A comparison of the different methods available for determining BCG-macrophage interactions in vitro, including a new method of colony counting in broth. *FEMS Microbiol Immunol* 1992; 5(5-6):355-362.
210. Standards of Medical Care in Diabetes - 2014. *Diabetes Care* 2014; 37(Supplement 1):S14-S80.
211. Wu L, Parhofer KG. Diabetic dyslipidemia. *Metabolism* 2014; 63(12):1469-1479.
212. Lorenzo C, Hanley AJ, Haffner SM. Differential white cell count and incident type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetologia* 2014; 57(1):83-92.
213. Restrepo BI, Twahirwa M, Rahbar MH, Schlesinger LS. Phagocytosis via complement or Fc-gamma receptors is compromised in monocytes from type 2 diabetes patients with chronic hyperglycemia. *PLoS One* 2014; 9(3):e92977.
214. Liu BF, Miyata S, Kojima H et al. Low phagocytic activity of resident peritoneal macrophages in diabetic mice: relevance to the formation of advanced glycation end products. *Diabetes* 1999; 48(10):2074-2082.

215. Brennan MJ, Tanner R, Morris S et al. The Cross-Species Mycobacterial Growth Inhibition Assay (MGIA) Project, 2010-2014. *Clin Vaccine Immunol* 2017; 24(9).
216. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:475-527.
217. Nair A, Guleria R, Kandasamy D et al. Prevalence of pulmonary tuberculosis in young adult patients with Type 1 diabetes mellitus in India. *Multidiscip Respir Med* 2016; 11:22.
218. Shen TC, Lin CL, Wei CC et al. Increased risk of tuberculosis in patients with type 1 diabetes mellitus: results from a population-based cohort study in Taiwan. *Medicine (Baltimore)* 2014; 93(16):e96.
219. Rees P, van der Gaag N, de Beer J, Heins F. European Regional Populations: Current Trends, Future Pathways, and Policy Options. *Eur J Popul* 2012; 28(4):385-416.
220. Mori T, Leung CC. Tuberculosis in the global aging population. *Infect Dis Clin North Am* 2010; 24(3):751-768.
221. Piergallini TJ, Turner J. Tuberculosis in the elderly: Why inflammation matters. *Exp Gerontol* 2018; 105:32-39.
222. Lin HH, Wu CY, Wang CH et al. Association of Obesity, Diabetes, and Risk of Tuberculosis: Two Population-Based Cohorts. *Clin Infect Dis* 2018; 66(5):699-705.
223. Neyrolles O, Hernández-Pando R, Pietri-Rouxel F et al. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLoS One* 2006; 1:e43.
224. Wieland CW, Florquin S, Chan ED et al. Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in leptin-deficient ob/ob mice. *Int Immunol* 2005; 17(11):1399-1408.

225. Pérez-Guzmán C, Vargas MH, Quiñonez F, Bazavilvazo N, Aguilar A. A cholesterol-rich diet accelerates bacteriologic sterilization in pulmonary tuberculosis. *Chest* 2005; 127(2):643-651.
226. Levey AS, Coresh J, Balk E et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003; 139(2):137-147.
227. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011; 32(14):1769-1818.
228. Perk J, De Backer G, Gohlke H et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 2012; 33(13):1635-1701.
229. Woo SJ, Ahn SJ, Ahn J, Park KH, Lee K. Elevated systemic neutrophil count in diabetic retinopathy and diabetes: a hospital-based cross-sectional study of 30,793 Korean subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(10):7697-7703.
230. Xu B, Li H. Brain mechanisms of sympathetic activation in heart failure: Roles of the reninangiotensin system, nitric oxide and proinflammatory cytokines (Review). *Mol Med Rep* 2015; 12(6):7823-7829.
231. Karaji N, Sattentau QJ. Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. *Front Immunol* 2017; 8:1863.

232. Mendoza-Aguilar M, García-Elorriaga G, Arce-Paredes P, González-Bonilla C, Del Rey-Pineda G, Rojas-Espinosa O. Functional state analysis of phagocytic cells of patients with type 2 diabetes and pulmonary tuberculosis. *Clin Lab* 2012; 58(3-4):299-305.
233. Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV et al. Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary tuberculosis is associated with heightened systemic type 1, type 17, and other proinflammatory cytokines. *Ann Am Thorac Soc* 2013; 10(5):441-449.
234. Lachmandas E, Vrieling F, Wilson LG et al. The effect of hyperglycaemia on in vitro cytokine production and macrophage infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2015; 10(2):e0117941.
235. van Crevel R, van der Ven-Jongekrijg, Netea MG, de Lange W, Kullberg BJ, van der Meer JW. Disease-specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production: applications in the study of tuberculosis. *J Immunol Methods* 1999; 222(1-2):145-153.
236. Janulionis E, Sofer C, Schwander SK et al. Survival and replication of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the context of human innate immunity. *Infect Immun* 2005; 73(5):2595-2601.
237. Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(4):374-380.
238. Ganz T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1987; 55(3):568-571.

239. Fu LM. The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7(11):1027-1032.
240. Hodgson K, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology* 2015; 144(2):171-185.
241. Ufimtseva E. Differences between Mycobacterium-Host Cell Relationships in Latent Tuberculous Infection of Mice Ex Vivo and Mycobacterial Infection of Mouse Cells In Vitro. *J Immunol Res* 2016; 2016:4325646.
242. Fitas AL, Martins C, Borrego LM et al. Immune cell and cytokine patterns in children with type 1 diabetes mellitus undergoing a remission phase: A longitudinal study. *Pediatr Diabetes* 2018.
243. Lachmandas E, Thiem K, van den Heuvel C et al. Patients with type 1 diabetes mellitus have impaired IL-1beta production in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37(2):371-380.
244. Serlenga E, Garofalo AR, De Pergola G, Ventura MT, Tortorella C, Antonaci S. Polymorphonuclear cell-mediated phagocytosis and superoxide anion release in insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytobios* 1993; 74(298-299):189-195.
245. Kohler E, Bock U, Knospe S, Michaelis D, Rjasanowski I. Phagocytic activity of blood cells in diabetic risk probands and newly diagnosed type 1 diabetics. *Exp Clin Endocrinol* 1988; 91(3):259-264.



# Publicaciones





Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/immlet](http://www.elsevier.com/locate/immlet)

## Immunological response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in blood from type 2 diabetes patients



Sara Raposo-García<sup>a</sup>, José Manuel Guerra-Laso<sup>a</sup>, Silvia García-García<sup>b</sup>, Javier Juan-García<sup>b</sup>, Eduardo López-Fidalgo<sup>c</sup>, Cristina Díez-Tascón<sup>d,e</sup>, Teresa Nebreda-Mayoral<sup>f</sup>, Ramiro López-Medrano<sup>g</sup>, Octavio Miguel Rivero-Lezcano<sup>c,e,h,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Medicina Interna, Complejo Asistencial Universitario de León, Altos de Nava s/n, 24008 León, Spain

<sup>b</sup> Servicio de Neumología, Complejo Asistencial Universitario de León, Altos de Nava s/n, 24008 León, Spain

<sup>c</sup> Unidad de Investigación, Complejo Asistencial Universitario de León, Altos de Nava s/n, 24008 León, Spain

<sup>d</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Asistencial Universitario de León, Altos de Nava s/n, 24008 León, Spain

<sup>e</sup> Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, León, Spain

<sup>f</sup> Servicio de Microbiología Clínica, Complejo Asistencial Universitario de León, Altos de Nava s/n, 24008 León, Spain

<sup>g</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Comarcal El Bierzo, León, Spain

<sup>h</sup> Fundación Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León, Soria, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Type 2 diabetes  
*Mycobacterium tuberculosis*  
 Neutrophils  
 Macrophages  
 Tumor necrosis factor alpha  
 Antimycobacterial activity

### ABSTRACT

The convergence of tuberculosis and diabetes represents a co-epidemic that threatens progress against tuberculosis. We have investigated type 2 diabetes as a risk factor for tuberculosis susceptibility, and have used as experimental model whole blood infected in vitro with *Mycobacterium tuberculosis*. Blood samples from diabetic patients were found to have a higher absolute neutrophil count than non-diabetic controls, but their immune functionality seemed impaired because they displayed a lower capacity to phagocytose *M. tuberculosis*, a finding that had been previously reported only for monocytes. In contrast, an increased production of TNF $\alpha$  was detected in infected blood from diabetic patients. Despite the altered phagocytic capacity showed by cells from these patients, the antimicrobial activity measured in both whole blood and monocyte derived macrophages was similar to that of controls. This unexpected result prompts further improvements in the whole blood model to analyze the immune response of diabetes patients to tuberculosis.

### 1. Introduction

Many evidence show that diabetes is an important risk factor for active tuberculosis disease. Patients with diabetes have about a three-fold increase risk of developing tuberculosis compared with individuals without diabetes. Furthermore, a 1.89 times increase in the risk of death has been calculated for tuberculosis patients with diabetes [1]. It is also possible that tuberculosis may cause diabetes [2]. Tuberculosis and diabetes represent two of the main global health challenges of our time, and their convergence represents a co-epidemic that threatens progress against tuberculosis [3]. It is necessary to understand how diabetes and the immune response participate in a harmful interaction. We have known for some time that activated innate immunity is a factor in the pathogenesis of type 2 diabetes [4]. On the other hand, diabetes might change the appropriate coordination of immunological factors that maintain host defenses to infectious agents like cellular and humoral immunity, production of cytokines and chemokines, and

production of reactive oxygen species [5]. Nevertheless, relatively few studies have addressed the immunological mechanisms against tuberculosis affected by diabetes.

The human innate immune response to tuberculosis in type 2 diabetes patients is altered because their monocytes show a reduced binding and/or phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* [6]. Furthermore, there is also a lower expression of genes encoding for products that contribute to anti-mycobacterial activities like the vacuolar ATPase, the hexokinase 2 or CD28 [7]. Regarding the adaptive immune response, the reported data is not consistent. Some authors have detected higher plasma levels of IFN $\gamma$ , IL2, IL5 or IL17A cytokines in diabetes patients and an increased production of IFN $\gamma$ , IL2, TNF $\alpha$  and GM-CSF after stimulation of peripheral blood mononuclear cells from diabetes mellitus patients with *Mycobacterium tuberculosis* antigens. Others found no difference in the cytokine production in whole blood from tuberculosis patients with or without diabetes mellitus after activation with lipopolysaccharide, phytohemagglutinin or an *M.*

\* Corresponding author at: Unidad de Investigación, Complejo Asistencial Universitario de León, Altos de Nava s/n, 24008 León, Spain.  
 E-mail address: [omrivero@icesyl.com](mailto:omrivero@icesyl.com) (O.M. Rivero-Lezcano).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.03.017>

Received 18 January 2017; Received in revised form 30 March 2017; Accepted 31 March 2017

Available online 01 April 2017

0165-2478/© 2017 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Table 1**  
Characteristics of type 2 diabetes patients and controls.

	Type 2 Diabetes (n = 41)	Control (n = 40)	P value
Age (yr)	73.1 SD 11.2	68.4 SD 16.2	0.234
Sex M/F	24/17	19/21	0.377
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.1 SD 5.3	26.4 SD 3.8	0.113
HbA1c (%)	9.6 SD 1.9	5.7 SD 0.4	< <b>0.001</b>
Glucose (mg/dL)	248.0 IR 266	89.0 IR 17	< <b>0.001</b>
Total cholesterol (mg/dL)	155.8 SD 46.2	175.5 SD 42.5	0.060
HDL cholesterol (mg/dL)	40.8 SD 17.0	52.2 SD 16.5	<b>0.005</b>
LDL cholesterol (mg/dL)	85.9 SD 39.7	105.5 SD 34.6	<b>0.028</b>
Triglycerides (mg/dL)	106.0 IR 82	82.0 IR 39	<b>0.003</b>
Statin treatment Y/N	20/21	5/35	< <b>0.001</b>
Chronic kidney disease Y/N	22/19	13/27	0.073
Interferon-release assay P/N	17/24	9/31	0.096

Definition of abbreviations: F = Female; M = Male; BMI = Body Mass Index; HbA1c = Glycated hemoglobin; HDL = High Density Lipoprotein; LDL = Low Density Lipoprotein; Y = Yes; N = No; P = Positive; N = Negative. Values represent means and standard deviations (SD), except for glucose and triglycerides in which they represent median and interquartile range (IR). P values were calculated by Student's *t*-test except for glucose and triglycerides (Mann-Whitney) and sex, statin treatment, chronic kidney disease and interferon-release assay (Fisher's exact test). \* *P* < 0.05 was considered significant, indicated in boldface.

#### tuberculosis sonicate [8].

To investigate whether diabetes mellitus may influence anti-mycobacterial activity, we have infected blood from type 2 diabetes patients with *M. tuberculosis* and analyzed immunological parameters like phagocytosis and cytokine production.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Study population

This study was carried out at the Complejo Asistencial Universitario de León in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (2013), following approval of the protocol by the Hospital of León Clinical Research Ethics Board and collection of informed consent from all of the participants. The identification of diabetes was based on the diagnostic criteria recommended by the American Diabetes Association in 2014 [9]. A total of 41 consecutive patients with type 2 diabetes and 40 subjects without diabetes (control group) participated in the study (Table 1). The adherence of patients with diabetes to treatment was inadequate, and their blood glucose levels were not well controlled. Exclusion criteria were: recent antibiotic or glucocorticoid treatments, oncologic disease patients, individuals less than 18 years old and those who did not provide informed consent. All volunteers were tested by an interferon release assay (QuantiFERON TB Gold In-Tube, Cellestis, Australia).

### 2.2. Bacterial strains

*M. tuberculosis* HL186T was isolated at the Hospital de León (Servicio de Microbiología) and kindly provided by Julio Blanco and Manuela Caño. *Mycobacterium bovis* BCG was the RIVM strain derived from the 1173-P2 strain. Bacteria were grown on 7H11 agar supplemented with 0.2% glycerol and 10% Middlebrook enrichment OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase, Becton Dickinson Microbiology Systems, USA). For detection of bacteria by flow cytometry *M. bovis* BCG was transformed with the expression plasmid pMDsRed, constructed as described elsewhere [10] that contains the gene of the fluorescent protein DsRed. T3\_S4T. Flow cytometry with *M. tuberculosis* was precluded for biosafety reasons. Bacteria were individualized as described elsewhere [10]. After addition of glycerol to 20%, single use

aliquots were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Phagocytosis and absolute count of cells by flow cytometry

Infections with *M. bovis* BCG transformed with pMDsRed ( $5 \times 10^5$  bacteria/ml) were performed in 40% blood, and volume was adjusted with RPMI-1640 medium to 300  $\mu\text{l}$  in 2 ml tubes. They were incubated in a rotary shaker at  $37^{\circ}\text{C}$  for two hours. Cell lineages were stained with appropriate monoclonal antibodies conjugated directly to fluorochromes: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD66b (for neutrophils) and peridinin chlorophyll-protein complex (PerCP)-conjugated anti-CD14 (for monocytes, Becton Dickinson, USA). Phagocytosis was measured as a phagocytic index, determined by the number of neutrophils or monocytes associated with fluorescent bacteria divided by the total number of neutrophils or monocytes. Absolute count of neutrophils and monocytes was performed using the Stepcount kit (Immunostep, Spain) following manufacturer's instructions. Samples were analyzed on a FACScan flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson, USA). Simultaneous count of leukocytes, neutrophils, lymphocytes and monocytes were performed using a CELL-DYN 3700 instrument system (Abbott Diagnostics, USA).

### 2.4. Quantification of cytokines in blood

After blood was infected as described above and incubated for two days, samples were centrifuged for 5 min at  $16,000 \times g$  and plasma was recovered. To remove remaining bacteria from plasma, samples were centrifuged for 3 min at  $10,000 \times g$  at room temperature in ultrafree MC filter units (Millipore Iberica, Spain) of 0.45  $\mu\text{m}$  pore size and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . TNF $\alpha$  was quantified by ELISA using BD OptEIA Human TNF ELISA Set or BD OptEIA GM-CSF ELISA Set (Becton Dickinson, USA), following manufacturer's instructions.

### 2.5. Antimycobacterial activity

Blood was infected with *M. tuberculosis* HL186T ( $5 \times 10^5$  bacteria/ml) as described above. IFN $\gamma$  (25 ng/ml;  $\geq 2 \times 10^7$  units/mg, Peprotech, UK) was added when indicated. After two days, 10  $\mu\text{l}$  was diluted in water (390  $\mu\text{l}$ ) to lyse cells. After 2 min, 50  $\mu\text{l}$  of Middlebrook enrichment supplement ADC (albumin, dextrose, catalase, Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) and 50  $\mu\text{l}$  of concentrated 7H9 medium ( $\times 10$ , Biolife italiana, Italy) with 2% glycerol were added.

For the purification of monocytes, mononuclear cells were isolated by Ficoll-Paque Plus density gradient sedimentation (GE Healthcare, USA), and CD14<sup>+</sup> cells (monocytes) were purified by magnetic cell separation (Miltenyi Biotec, Germany).  $10^5$  monocytes per well in RPMI-1640 medium/10% autologous serum were seeded in 96-well plates and infected with  $10^5$  bacteria in the presence of IFN $\gamma$  when indicated, and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in 95% air/5% CO $_2$  for two days while they differentiated to monocyte derived macrophages. Infected cells were lysed by sonication with a Branson S-450 digital ultrasonic cell disruptor microtip (Branson, Emerson, USA), at 10% amplitude (2 W) for 3 s. In both cases (lysed blood and monocyte derived macrophages), decimal dilutions in 7H9 complete medium were inoculated into 96-well plates and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 7 days. Colony-forming units (CFU) were counted under an inverted microscope at  $\times 100$  magnification [11].

### 2.6. Statistical analysis

Log transformed CFU followed a normal distribution (Shapiro Wilks test), and were analyzed by paired Student's *t*-test. The rest of data were not normally distributed and were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test. Analysis was performed with PASW Statistics 18 (International Business Machines, USA). In all statistical analysis, a *P* value < 0.05 was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Study population characteristics

The baseline characteristics of the study population are shown in Table 1. Although the age of participants ranged from 32 to 96 years old, elders were most represented in both the diabetes and control groups as a consequence of the demographic characteristics of our area, with a large proportion of aged population. The male-to-female ratio was 1.41 for the diabetes group and 0.90 for the control group. The proportion of chronic kidney disease in the type 2 diabetes patients were larger than in the control group. Additionally, the control group was slightly overweighted, but the body mass index was larger for the type 2 diabetes group. Nevertheless, differences for all these four parameters did not reach statistical significance. Type 2 diabetes patients exhibit their characteristic dyslipidemia: elevated triglycerides and low HDL-cholesterol [12]. LDL-cholesterol level for the type 2 diabetes group was lower than expected, a consequence of their general use of statins, that were not taken by most of the control individuals. The IFN $\gamma$  release assay positive-to-negative ratio was 0.71 for the diabetes group and 0.29 for the control group and the difference did not reach statistical significance either.

#### 3.2. Phagocytosis is inhibited in both monocytes and neutrophils from diabetes patients

Several evidences show relationships between absolute and differential white cell count and diabetes [13]. Before analyzing the immune response to in vitro infection of blood we measured the absolute count of monocytes and neutrophils in both diabetes patients and controls (Fig. 1a). We did not observe significant statistical differences in the number of monocytes between both groups, but the number of neutrophils was significantly higher in diabetes patients.

One of the best characterized deficiencies in the immune response to *M. tuberculosis* in diabetes patients is the inhibition of monocyte phagocytosis [6]. We confirmed this result in our blood samples using fluorescent *M. bovis* BCG, because a highly significant inhibition of phagocytosis was detected in monocytes from diabetes patients as compared with controls (Fig. 1b). Furthermore, also neutrophils exhibited a diminished capacity to phagocytose the fluorescent mycobacteria, an observation that we have not found reported before.

Because the duration of the assay was two days, we decided to characterize the fate of leukocytes in our experimental conditions. We observed that the concentration of all measured leukocytes was lower after two days, although the steepest decrease was after the first day. Loss of leukocytes paralleled that of neutrophils and changes were not as dramatic for both lymphocytes and monocytes (Fig. 2).

#### 3.3. Lower production of TNF $\alpha$ in blood infected with *M. tuberculosis*

Proinflammatory cytokines have a major influence in the development of tuberculosis [14], and variations in their production may provide useful information regarding tuberculosis susceptibility. Therefore, we measured three cytokines, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  and GM-CSF, in the supernatant of blood from both diabetes patients and controls, infected for two days with *M. tuberculosis*. We did not detect the production of INF $\gamma$ , a result that agrees with a previous report of whole blood infection with *M. bovis* BCG [15], in which at least  $10^7$  bacteria/ml was necessary to induce detectable amounts of INF $\gamma$ , and we used  $5 \times 10^5$  bacteria/ml. We did detect both TNF $\alpha$  and GM-CSF, but the level of production of TNF $\alpha$  was significantly higher in diabetes patients. Median (pg/ml) [interquartile range], diabetes patients: 5 [24], n = 41, controls: 0 [10], n = 40,  $P^* = 0.003$  (Mann-Whitney's test). In contrast, differences in GM-CSF production (diabetes patients: 0 [5], n = 41, controls: 0 [0], n = 40,  $P = 0.363$ ) were not statistically significant.

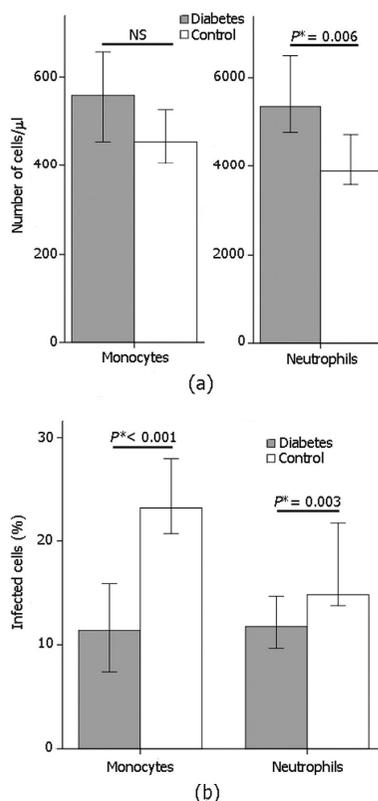


Fig. 1. Phagocyte concentration in blood and phagocytic activity. (a) Concentration of monocytes and neutrophils in type 2 diabetes patients and controls. (b) Phagocytic activity is represented as the proportion: number of *M. bovis* BCG infected cells/total number of cells (monocytes or neutrophils), expressed as percentage. Data are medians and error bars correspond to 95% confidence interval, which are asymmetric because they do not follow a normal distribution. Two-group comparisons were performed by the Mann-Whitney's test.  $P^* < 0.05$  was considered significant.

#### 3.4. There is no difference in the antimycobacterial activity of blood between diabetes patients and controls

A lower phagocytic index in both monocytes and neutrophils from diabetes patients prompted the hypothesis that blood from diabetes patients would show an impaired antimycobacterial activity. It was therefore surprising to find that the activities observed in blood from diabetes patients and controls, in the presence or absence of IFN $\gamma$ , were nearly identical (Fig. 3a). A comparable result, concerning a similar antimycobacterial activity, was obtained for isolated monocyte derived macrophages (Fig. 3b). In this case no killing activity was detected and mycobacteria multiplied intracellularly, as reported before [16]. This observation was, however, less unexpected given the recognized difficulties to activate monocyte derived macrophages against *M. tuberculosis* in vitro [16].

### 4. Discussion

Despite the recognized importance of diabetes as a risk factor for tuberculosis, few studies deal with the characterization of the immune

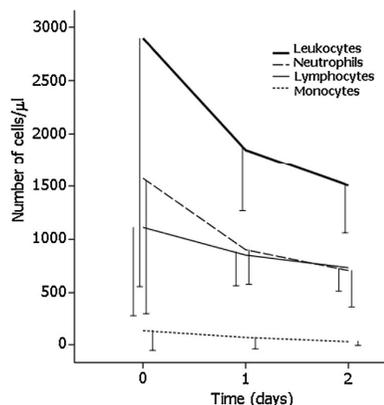


Fig. 2. Time curve of leukocyte concentration in diluted whole blood. 40% blood from healthy controls in RPMI-1640 medium was incubated at 37 °C in a rotary shaker for two days and analyzed at the indicated time points with an automated hematology analyzer (CELL-DYN 3700 instrument system). Data represent the mean of concentrations with standard deviations ( $n = 6$ ).

response in the susceptible group of type 2 diabetes patients. We have analyzed a group of patients with an important proportion of elders, representative of aged populations in European countries [17] that reflects the increasing number of diabetes patients with advanced age in Europe [18]. Interestingly, there is a patient aging as a consequence of the concentration of the infected into the older age segments of the population [19]. Another relevant question is that diabetic patients had poor glycemic control, and blood glucose concentration varied among volunteers. At this moment we do not know the influence of glucose in our *in vitro* assay but it may affect the cellular and bacterial metabolism and, consequently, the final outcome of the experiments.

Because *M. tuberculosis* is an intracellular pathogen, variations in white cell count in blood from diabetes patients may be relevant to the development of tuberculosis. We have found that absolute monocyte counts were comparable to the control group, but neutrophil absolute count was higher in diabetes patients. Thus, our results agree with the few accounts that have also reported an increased number of neutrophils in these patients [20,21].

In diabetes patients one of the most remarkable defects detected in the immune response to tuberculosis is the phagocytosis inhibition in monocytes [6]. We have confirmed this finding and extended this observation to neutrophils, which also showed an impaired ability to phagocytose *M. bovis* BCG, although differences with controls were lower than in the case of monocytes. In a recent report, Mendoza-Aguilar et al. analyzed the phagocytic function of neutrophils using stimulus other than bacteria [22]. They found that neutrophils isolated from patients with concurrent type 2 diabetes and tuberculosis exhibited a lower adherence capacity, while neutrophils from patients with either disease showed normal levels of adherence. They did not find differences in neutrophil activation after phorbol myristate stimulation. Our observation regarding the neutrophil lower phagocytic activity might be related to their weaker adherence to tissue culture plastic detected by these authors. We are not aware of any other study that has reported the mycobacteria phagocytosis impairment of neutrophils from diabetes patients.

The increased production of TNF $\alpha$  after *in vitro* infection in diabetes patients is in line with previous reports, and has caused confusion among researchers because the initial hypothesis was that diabetes induced an immune depression that would facilitate tuberculosis development [8]. Several authors have observed, however, that blood or peripheral blood mononuclear cells stimulated with *M. tuberculosis*

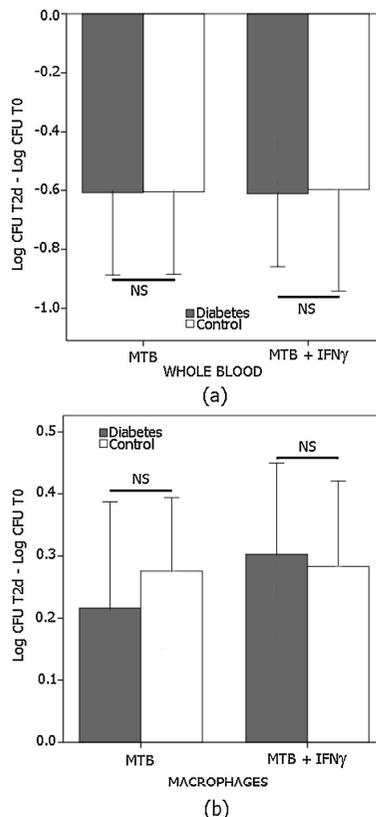


Fig. 3. Antimycobacterial activity of whole blood and monocyte derived macrophages from type 2 diabetes patients and controls. Data represent the difference between the  $\log_{10}$  CFU of the inoculum and after 2 days + standard deviation (SD). Negative values in whole blood indicate bactericidal multiplication. Positive values in monocyte derived macrophages indicate intracellular multiplication. Two-group comparisons were performed by the Student's *t*-test.  $P^* < 0.05$  was considered significant.

antigens from patients that suffered both diabetes and tuberculosis produced more TNF $\alpha$  *ex vivo* than those that only had tuberculosis [23–25]. Nevertheless, there is a study in which no differences were found, probably because of methodological differences [26]. Additionally, Lachmandas et al. stimulated peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers with *M. tuberculosis* lysate in the presence of 40 mmol/L glucose and observed an increased production of several cytokines, including TNF $\alpha$  [27]. Our protocol had a major variation when compared with others, the stimulation with live *M. tuberculosis*, but our observations go in the same direction. Regarding GM-CSF, we did not detect differences between individuals with and without diabetes. This result is more conflicting, because Restrepo et al. observed an increased production in whole blood from tuberculosis patients with diabetes stimulated with purified protein derivative (PPD), a *M. tuberculosis* antigenic preparation.

Whole blood exhibits a significant mycobactericidal activity against a clinical strain (HL186T), a characteristic shared by some other *M. tuberculosis* isolates [28]. In contrast, there are few reports of mycobacterial killing by monocyte derived macrophages, and the only variability reported relates to the level of intracellular multiplication

[16]. It is remarkable that despite impaired phagocytosis by both monocytes and neutrophils from diabetes patients (Fig. 1), blood mycobactericidal activity was nearly identical between diabetes patients and controls. Nevertheless, we may not rule out the possibility that although fewer bacteria were phagocytosed they may have a higher intracellular multiplication rate in diabetes patients. Additionally, cellular incubation with IFN $\gamma$ , a critical cytokine in the immune response to tuberculosis [29], did not induce a significant difference in antimycobacterial activity. Although it seems unlikely, it is possible that the higher neutrophil count in diabetes patients compensates the lower phagocytic activity. Another possibility is that some of the killing activity is exerted extracellularly, which would partially explain why impaired phagocytosis does not affect antimycobacterial activity. For example, neutrophils are known to release antimicrobial defensins [30] which exhibit a significant activity against *M. tuberculosis* [31]. Nevertheless, it is important to report these negative results because both models (blood and isolated monocyte derived macrophages) may represent the main experimental approaches for analyzing ex-vivo the immunological defense against tuberculosis. In fact, we have not found in the scientific literature any analysis of antimycobacterial activity using blood or monocyte derived macrophages from diabetes patients. There is little doubt that diabetes weakens the host immune system against intracellular bacteria [32], but we need to improve the in vitro or ex vivo models. In an interesting attempt to reproduce the hyperglycaemic condition of diabetes patients, macrophages from healthy volunteers were infected with *M. tuberculosis* in 40 mmol/L glucose, but their antimycobacterial activity was not affected. On the other hand, Ufimtseva observed that mice macrophages from *M. bovis* BCG granulomas control mycobacterial replication better than mouse bone marrow and peritoneal macrophages [33], which suggests that the ability of macrophages to control BCG depends largely on the micro-environment and the degree of cellular activation in the host.

In conclusion, immunological parameters that may influence the development of tuberculosis like neutrophil count, phagocytosis and TNF $\alpha$  expression, are altered in Type 2 diabetes patients, but the antimycobacterial activity of either blood or monocyte derived macrophages is similar in both patients and controls. These evidences prompt a deeper analysis of the immunological basis of the susceptibility to tuberculosis exhibited by individuals with type 2 diabetes.

#### Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

We thank the nurses who helped us with the blood collection. This work was supported by Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León 2013 [GR5721/A/13] and by Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (31/2012) and Sociedad Castellano-Leonesa y Cántabra de Patología Respiratoria (SOCALPAR). Dr. Rivero-Lezcano is a member of the Fundación Instituto Ciencias de la Salud de Castilla y León and participates in the SACYL Research Programme. López-Fidalgo was supported by a grant from MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad, subprogram of technical support staff, 2012).

#### References

- [1] P. Narasimhan, J. Wood, C.R. MacIntyre, D. Mathai, Risk factors for tuberculosis, *Pulm. Med.* 2013 (2013) 828939.
- [2] L. Broxmeyer, Diabetes mellitus, tuberculosis and the mycobacteria: two millennia of enigma, *Med. Hypotheses* 65 (2005) 433–439.
- [3] Bali declaration on the looming TB-diabetes co-epidemic. <http://www.theunion.org/bali-declaration.pdf> (Accessed 30 March 2017).
- [4] J.M. Fernández-Real, J.C. Pickup, Innate immunity: insulin resistance and type 2 diabetes, *Diabetologia* 55 (2012) 273–278.
- [5] J. Pearson-Stuttard, S. Blundell, T. Harris, D.G. Cook, J. Critchley, Diabetes and infection: assessing the association with glycaemic control in population-based studies, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 4 (2016) 148–158.
- [6] B.I. Restrepo, M. Twahirwa, M.H. Rahbar, L.S. Schlesinger, Phagocytosis via complement or Fc-gamma receptors is compromised in monocytes from type 2 diabetes patients with chronic hyperglycemia, *PLoS One* 9 (2014) e92977.
- [7] B.I. Restrepo, L.S. Schlesinger, Host-pathogen interactions in tuberculosis patients with type 2 diabetes mellitus, *Tuberculosis (Edinb.)* 93 (Suppl. 1) (2013) S10–S14.
- [8] N. Martínez, H. Kornfeld, Diabetes and immunity to tuberculosis, *Eur. J. Immunol.* 44 (2014) 617–626.
- [9] Standards of medical care in diabetes-2014, *Diabetes Care* 37 (Suppl. 1) (2014) S14–S80.
- [10] J.M. Guerra-Laso, S. González-García, C. González-Cortés, C. Díez-Tascón, R. López-Medrano, O.M. Rivero-Lezcano, Macrophages from elders are more permissive to intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*, *Age (Dordr)* 35 (2013) 1235–1250.
- [11] N. Fazal, R. Bartlett, D.A. Lammas, D.S. Kumararatne, A comparison of the different methods available for determining BCG-macrophage interactions in vitro, including a new method of colony counting in broth, *FEMS Microbiol. Immunol.* 5 (1992) 355–362.
- [12] L. Wu, K.G. Parhofer, Diabetic dyslipidemia, *Metabolism* 63 (2014) 1469–1479.
- [13] C. Lorenzo, A.J. Hanley, S.M. Haffner, Differential white cell count and incident type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study, *Diabetologia* 57 (2014) 83–92.
- [14] A. O'Garra, P.S. Redford, F.W. McNab, C.I. Bloom, R.J. Wilkinson, M.P. Berry, The immune response in tuberculosis, *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013) 475–527.
- [15] R. van Grevel, J. van der Ven-Jongekrijg, M.G. Netea, W. de Lange, B.J. Kullberg, J.W.M. van der Meer, Disease-specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production: applications in the study of tuberculosis, *J. Immunol. Methods* 222 (1999) 145–153.
- [16] O.M. Rivero-Lezcano, In vitro infection of human cells with *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis (Edinb.)* 93 (2013) 123–129.
- [17] P. Rees, N. van der Gaag, J. de Beer, F. Heins, European regional populations: current trends future pathways, and policy options, *Eur. J. Popul.* 28 (2012) 385–416.
- [18] The DECODE Study Group, Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts, *Diabetes Care* 26 (2003) 61–69.
- [19] T. Mori, C.C. Leung, Tuberculosis in the global aging population, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24 (2010) 751–768.
- [20] S.J. Woo, S.J. Ahn, J. Ahn, K.H. Park, K. Lee, Elevated systemic neutrophil count in diabetic retinopathy and diabetes: a hospital-based cross-sectional study of 30,793 Korean subjects, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (2011) 7697–7703.
- [21] W. Xu, H.F. Wu, S.G. Ma, F. Bai, W. Hu, Y. Jin, et al., Correlation between peripheral white blood cell counts and hyperglycemic emergencies, *Int. J. Med. Sci.* 10 (2013) 758–765.
- [22] M. Mendoza-Aguilar, G. García-Elorriaga, P. Arce-Paredes, C. González-Bonilla, G. Del Rey-Pineda, O. Rojas-Espinoza, Functional state analysis of phagocytic cells of patients with type 2 diabetes and pulmonary tuberculosis, *Clin. Lab.* 58 (2012) 299–305.
- [23] B.I. Restrepo, S.P. Fisher-Hoch, P.A. Pino, A. Salinas, M.H. Rahbar, F. Mora, et al., Tuberculosis in poorly controlled type 2 diabetes: altered cytokine expression in peripheral white blood cells, *Clin. Infect. Dis.* 47 (2008) 634–641.
- [24] N.P. Kumar, R. Sridhar, V.V. Banurekha, M.S. Jawahar, M.P. Fay, T.B. Nutman, et al., Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary tuberculosis is associated with heightened systemic type 1, type 17, and other proinflammatory cytokines, *Ann. Am. Thorac. Soc.* 10 (2013) 441–449.
- [25] N.P. Kumar, R. Sridhar, V.V. Banurekha, M.S. Jawahar, T.B. Nutman, S. Babu, Expansion of pathogen-specific T-helper 1 and T-helper 17 cells in pulmonary tuberculosis with coincident type 2 diabetes mellitus, *J. Infect. Dis.* 208 (2013) 739–748.
- [26] J.E. Stalenhoef, B. Alisjahbana, E.J. Nelwan, J. van der Ven-Jongekrijg, T.H. Ottenhoff, J.W.M. van der Meer, et al., The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (2008) 97–103.
- [27] E. Lachmandas, F. Vrieling, L.G. Wilson, S.A. Joosten, M.G. Netea, T.H. Ottenhoff, et al., The effect of hyperglycaemia on in vitro cytokine production and macrophage infection with *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS One* 10 (2015) e0117941.
- [28] E. Janulionis, C. Sofer, S.K. Schwander, D. Nevels, B. Kreiswirth, E. Shashkina, et al., Survival and replication of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the context of human innate immunity, *Infect. Immun.* 73 (2005) 2595–2601.
- [29] P. Salgame, Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 374–380.
- [30] T. Ganz, Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes, *Infect. Immun.* 55 (1987) 568–571.
- [31] L.M. Fu, The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (2003) 1027–1032.
- [32] K. Hodgson, J. Morris, T. Bridson, B. Govan, C. Rush, N. Kethesnan, Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections, *Immunology* 144 (2015) 171–185.
- [33] E. Ufimtseva, Differences between *Mycobacterium*-host cell relationships in latent tuberculous infection of mice ex vivo and *Mycobacterium* infection of mouse cells in vitro, *J. Immunol. Res.* 2016 (2016) 4325646.

# Antimycobacterial activity in whole blood from type I diabetes patients

S. Raposo-García<sup>1</sup>, S. García-García<sup>2</sup>,  
J. Guerra-Laso<sup>1</sup>, J. Juan-García<sup>2</sup>, C. Diez-Tascón<sup>3</sup>,  
T. Nebreda-Mayoral<sup>4</sup>, E. López-Fidalgo<sup>5</sup>, R.  
López-Medrano<sup>6</sup> and O. Rivero-Lezcano<sup>5,7</sup>

<sup>1</sup>Medicina Interna, <sup>2</sup>Neumología, <sup>3</sup>Anatomía Patológica, <sup>4</sup>Microbiología, <sup>5</sup>Unidad de Investigación. Complejo Asistencial Universitario de León, León. Spain.

<sup>6</sup>Microbiología. Hospital El Bierzo, Ponferrada, León. Spain.

<sup>7</sup>Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León, Soria. Spain.

## INTRODUCTION

Type 2 diabetic patients have about a threefold increase risk of developing tuberculosis compared with non-diabetic [1], but susceptibility seems to be also increased in type 1 diabetes [2]. The most widespread model used in tuberculosis is the infection of isolated cells, (monocytes or neutrophils), but they show little antimycobacterial activity [3]. As an alternative, whole blood has been successfully used to analyze the activity of antibiotics or changes in the immunity of vaccinated individuals. We have applied a factorial design to analyze the effect of several cytokines on the mycobactericidal activity of whole blood from both type 1 diabetes patients and non-diabetic controls.

## METHODS

**Table 1.** Characteristics of type 1 diabetic patients and controls

	Type 1 Diabetes (n = 9)	Control (n = 9)	P value	Definition of abbreviations: BMI = Body Mass Index; F = Female; M = Male; P = Positive; N = Negative; ND = Not Determined. Values represent means and standard deviations. P values were calculated by Student's t-test except for sex and interferony-release assay that were tested by Fisher exact test. *P < 0.05 was considered significant.
Age (yr)	36.7 SD 14.3	36.6 SD 14.3	0.987	
Sex M/F	5/4	2/7	0.335	
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	26.5 SD 3.7	23.6 SD 4.6	0.153	
Glycated hemoglobin (%)	7.7 SD 0.7	5.6 SD 0.4	< 0.001	
Interferony-release assay P/N	3/6	4/5	1.000	

**Anti-mycobacterial activity.** Infections with a clinical isolate (HL186T,  $5 \times 10^5$  bacteria/ml) were performed in 40% blood in RPMI medium. Cytokines (25 ng/ml) were added, incubated in a rotary shaker at 37°C for two days, and cells were lysed by hypotonic shock. Decimal dilutions in 7H9 complete medium were inoculated into 96-well plates and incubated at 37° for 7 days. Colony-forming units (CFU) were counted under an inverted microscope at  $\times 100$  magnification.

**Phagocytosis.** Infections with *M. bovis* BCG transformed with pMDsRed, with the gene of a red fluorescent protein, were performed for two hours. Cell lineages were stained FITC-conjugated anti-CD66b for neutrophils and PerCP-conjugated anti-CD14 for monocytes. Phagocytosis was measured as a phagocytic index, determined by the number of neutrophils or monocytes associated with fluorescent bacteria divided by the total number of neutrophils or monocytes.

## RESULTS

***Lower mycobactericidal activity of whole blood from type 1 diabetes patients.*** We used a factorial design to analyze the influence of quantitative variables: amount of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF and IL-15, and a qualitative variable: disease status, diabetes patients and controls. In a 2<sup>5</sup> factorial design a significantly higher number of bacteria was found in blood from diabetes patients, but no differences in the activity of cytokines were detected (Table 2). If we split the data between patients and controls, IL-15 was found to stimulate the activity in blood from patients.

**Table 2.** Whole blood antimycobacterial activity

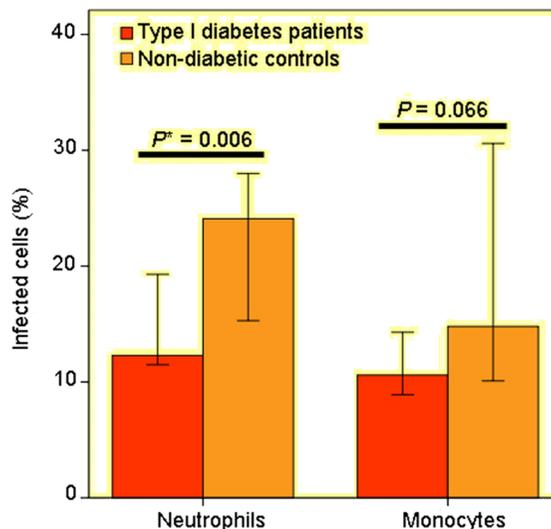
Factors	Effect estimates	P
<b>2<sup>5</sup> Design</b>		
IFN $\gamma$	- 0.011 (- 0.062 – 0.040)	0.6803
TNF $\alpha$	0.005 (- 0.046 – 0.056)	0.8489
GM-CSF	- 0.011 (- 0.062 – 0.040)	0.6637
IL-15	- 0.007 (- 0.056 – 0.048)	0.8748
Diabetes	- 0.096 (- 0.146 – - 0.048)***	<b>0.0005</b>
<b>2<sup>4</sup> Design</b>		
<b>Diabetic patients</b>		
IFN $\gamma$	- 0.030 (- 0.156 – 0.098)	0.6510
TNF $\alpha$	0.003 (- 0.124 – 0.130)	0.9637
GM-CSF	- 0.042 (- 0.168 – 0.084)	0.5093
IL-15	- 0.198 (- 0.32 – - 0.072)**	<b>0.0023</b>
<b>Controls</b>		
IFN $\gamma$	0.014 (- 0.048 – 0.076)	0.6577
TNF $\alpha$	- 0.003 (- 0.064 – 0.060)	0.9336
GM-CSF	- 0.012 (-0.074 – 0.050)	0.6962
IL-15	- 0.005 (- 0.066 – 0.058)	0.8849

Blood was infected in the presence of each of the cytokines (25 ng/mL) or their combinations. Surviving bacteria were quantitated as log CFU. Data represent the estimate of the main effects (95% confidence interval). The results from either patients or controls were analysed in 2<sup>4</sup> designs. Both groups together were analysed in the 2<sup>5</sup> design. No interactions were significant.

\*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  were considered significant

**Phagocytosis inhibition in cells from type 1 diabetes patients.** It was observed that both neutrophils and monocytes from patients phagocytosed less bacteria than cells from controls, although the difference was not significant for monocytes (Figure 1). A similar finding has been reported for other bacteria [4].

**Figure 1.** Phagocytosis.



Data are medians of phagocytic activity, expressed as percentage. Error bars correspond to 95% confidence interval. The Mann-Whitney test was used for comparisons.

## CONCLUSIONS

1. Antimycobacterial activity is lower in blood from diabetes patients.
2. IL-15 stimulates the antimycobacterial activity of diabetes patients.
3. Neutrophils from diabetes patients phagocytose less mycobacteria.

## REFERENCES

- [1] P. Narasimhan, J. Wood, C. R. MacIntyre, and D. Mathai, "Risk factors for tuberculosis," *Pulm.Med.*, vol. 2013, pp. 828939, 2013
- [2] A. Nair, R. Guleria, D. Kandasamy, R. Sharma, N. Tandon, U. B. Singh and R. Goswami, "Prevalence of pulmonary tuberculosis in young adult patients with Type 1 diabetes mellitus in India," *Multidiscip. Respir. Med.*, vol. 11, pp. 22, 2016
- [3] O. M. Rivero-Lezcano, "In vitro infection of human cells with *Mycobacterium tuberculosis*," *Tuberculosis.(Edinb.)*, vol. 93, pp. 123-129, 2013
- [4] J. Huang, Y. Xiao, A. Xu and Z. Zhou, "Neutrophils in type 1 diabetes," *J. Diabetes Investig.*, vol. 7, pp. 652-663, 2016