



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DETERMINACIÓN DE LA
FAGOCITOSIS CELULAR MEDIADA
POR ANTICUERPOS ESPECÍFICOS A *M.*
tuberculosis EN PLASMA DE PACIENTES
CON TUBERCULOSIS PULMONAR
ACTIVA BAJO TRATAMIENTO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA

JUAN DIEGO JIBAJA ZAPATA

LIMA – PERÚ

2025

ASESOR

DRA. ISKRA TUERO OCHOA

CO ASESOR

DRA. SANDRA PALMA ALBORNOZ

JURADO DE TESIS

MG. LEANDRO HUAYANAY FALCONI

PRESIDENTE

MG. JOSE LUIS AGUILAR OLANO

VOCAL

MG. MANUEL TOMAS CASTILLO PORTILLA

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A Selene, mi hija amada.

A Nirvana, mi novia que se bancó con nuestra hija desde el día uno.

A mi madre, que con su ejemplo me ha enseñado sobre amor, trabajo y a no
rendirme.

Y por supuesto a todos los pacientes que decidieron aportar a la generación de
conocimiento científico.

AGRADECIMIENTOS.

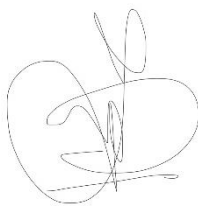
A mis mentoras Dra. Iskra Tuero, Dra. Sandra Palma, por la infinita paciencia.

Transmitiré lo aprendido por ustedes a los siguientes.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Este trabajo fue subvencionado por el CONCYTEC a través del programa PROCIENCIA en el marco del concurso “PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN BÁSICA” E041 2023 01”, según contrato PE501082183-2023.

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	06	SEPTIEMBRE	2025
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	JUAN DIEGO JIBAJA ZAPATA		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2023		
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	DETERMINAR LA FAGOCITOSIS CELULAR MEDIADA POR ANTICUERPOS ESPECÍFICOS A <i>M. tuberculosis</i> EN PLASMA DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA BAJO TRATAMIENTO		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	Tesis		
Declaración del Autor El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	938-903-779		
E-mail	juan.jibaja@upch.pe		



Firma del Egresado

DNI. 47822664

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	2
II. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo General	4
2.2 Objetivos Específicos	4
III. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Epidemiología de la tuberculosis (TB).....	5
3.2 Seguimiento al tratamiento de la tuberculosis.....	6
3.3 Respuesta inmune a tuberculosis	8
3.4 Antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
3.5 Anticuerpos y su rol en la tuberculosis	13
IV. METODOLOGÍA	20
4.1 Tipo de la Investigación	20
4.2 Población.....	20
4.2.1 Criterios de inclusión del proyecto base.....	20
4.2.2Criterios de exclusión del proyecto base	21
4.3 Muestra.....	21
4.4 Tamaño muestral.....	21
4.5 Línea celular y antígeno de <i>M. tuberculosis</i>	22
4.6 Fagocitosis mediada por anticuerpos-ADCP	22
4.6.1 Biotinilación del antígeno.....	22
4.6.2 Revestimiento de perlas fluorescente con Ag85A de <i>M. tuberculosis</i>	23
4.6.3 Ensayo de fagocitosis	23
4.6.4 Determinación del puntaje fagocítico.....	24
4.6.5 Análisis estadístico	24
V. RESULTADOS	25
5.1 Características clínicas de los pacientes.....	25
5.2 Estrategia de análisis de fagocitosis evaluada por citometría de flujo .	26
5.3 Optimización de la concentración de Ag85A a usar con las muestras de plasma de pacientes.....	26
5.4 Determinación de la dilución óptima de plasma	28
5.5 Ensayo de ADCP con muestras de pacientes con TB pulmonar bajo tratamiento.	30

5.6 Asociación entre puntaje fagocítico, edad, resultados de baciloscopia durante el tratamiento y tiempo en tratamiento	31
5.7 Asociación entre la edad de los pacientes con tuberculosis activa bajo tratamiento y el puntaje fagocítico	33
5.8 Asociación entre los resultados de baciloscopia durante el tratamiento y el puntaje fagocítico	34
VI. DISCUSION	36
VII. CONCLUSIONES.....	41
VIII. RECOMENDACIONES	42

RESUMEN

La tuberculosis (TB) sigue siendo un importante problema de salud pública, que causa millones de muertes al año. La mayoría de las investigaciones se han centrado en las respuestas de las células T, mientras el papel de los anticuerpos en la inmunidad contra la TB ha sido históricamente poco explorado. El objetivo del estudio fue determinar la fagocitosis mediada por anticuerpos contra *M. tuberculosis* en pacientes con TB pulmonar activa a largo de tratamiento por seis meses. Para el estudio se enroló 20 pacientes con diagnóstico de TB pulmonar activa de los cuales se obtuvo muestras de plasma. Mediante citometría de flujo se evaluó la habilidad de anticuerpos contra Ag85A de *M. tuberculosis* de mediar fagocitosis bajo condiciones *in vitro*. Las muestras de plasma se obtuvieron antes del inicio del tratamiento (T0), a los dos meses (T2) y a los seis meses (T6) después del inicio del tratamiento.

De los resultados obtenidos, se observa que al culminar el tratamiento el paciente presenta anticuerpos con una alta habilidad de inducir fagocitosis sugiriendo su potencial contribución en la cura de la enfermedad.

Este estudio contribuye al entendimiento de la respuesta inmune en TB en tratamiento y proveería las bases para la identificación de biomarcadores de monitoreo que serían de utilidad en la clínica en el futuro.

PALABRAS CLAVES

Tuberculosis, fagocitosis mediada por anticuerpos, Ag85A

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a significant public health problem, causing millions of deaths per year. Most research has focused on T cell responses, while the role of antibodies in immunity against tuberculosis has been historically underexplored. The aim of the study was to determine antibody-mediated cellular phagocytosis against *M. tuberculosis* in patients with active pulmonary TB throughout six months of treatment. For the study, 20 patients diagnosed with sensitive active pulmonary TB were enrolled, from whom plasma samples (source of antibodies) were obtained. Flow cytometry was used to evaluate the ability of antibodies against *M. tuberculosis* Ag85A to mediate phagocytosis under in vitro conditions. Plasma samples were obtained before treatment initiation (T0), at two months (T2), and at six months (T6) after treatment initiation.

From the results obtained, it was observed that upon completion of treatment, patients present antibodies with a high ability to induce phagocytosis, suggesting their potential contribution to disease cure.

This study contributes to the understanding of the immune response in TB under treatment and provides the basis for identifying monitoring biomarkers that would be useful in clinical practice.

KEYWORDS

Tuberculosis, antibody-mediated phagocytosis, Ag85A

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa, causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). La TB se transmite cuando una persona infectada tose o estornuda, liberando al aire pequeñas gotas que contienen a la bacteria. Al ser inhaladas por otras personas, la bacteria puede alojarse en los pulmones manteniéndose ahí en estado latente y posteriormente activar la enfermedad (1).

En el año 2023, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que 10,8 millones de personas en todo el mundo contrajeron TB (2). Por tanto, para eliminar/controlar la TB, se están evaluando estrategias para la prevención, tratamiento y hacer un mejor seguimiento de esta enfermedad. La única vacuna disponible hasta la fecha es la BCG (Bacillus de Calmette-Guérin) en base a *Mycobacterium bovis*, la que, proporciona una protección parcial en la infancia; sin embargo, su eficacia disminuye con la adultez (3).

Para el desarrollo de vacunas se están realizando investigaciones con diferentes antígenos de *Mtb*. Uno de los más prometedores es la proteína Ag85A, considerada uno de los antígenos más importantes secretados por *Mtb*. Esta proteína tiene un papel clave en la virulencia de la bacteria al facilitar la adhesión y la invasión a los macrófagos y es considerada un objetivo prometedor debido a su capacidad para estimular respuestas inmunitarias, que podrían aprovecharse en nuevas estrategias de prevención (4).

Aunque tradicionalmente se ha enfatizado en el papel de las células T en la inmunidad celular, estudios recientes exploran el rol crucial de los anticuerpos en la respuesta al tratamiento. Los anticuerpos pueden mediar la protección a través de diversos

mecanismos que se extienden desde funciones clásicas, como la opsonización, hasta funciones no clásicas, como la señalización a través de receptores Fc (FcR), activación del complemento, citotoxicidad y la modulación de la respuesta inflamatoria del huésped. Dentro de estos, mecanismos importantes también está la fagocitosis mediada por anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés, *antibody-dependent cellular phagocytosis*) (5).

La ADCP emerge como uno de los mecanismos en la respuesta inmune descritos contra la TB. En este proceso, los anticuerpos específicos a *Mtb*, principalmente los IgG, reconocen y se unen a las células infectadas o a los bacilos para su eliminación por parte de los macrófagos y otros fagocitos (6). Para ello, la interacción entre los anticuerpos y los Fc receptores en la superficie de los macrófagos activa una serie de señales que promueven la internalización y destrucción de las bacterias. Este mecanismo no solo facilita la eliminación de *Mtb*, sino que también potencia la capacidad de los macrófagos para presentar antígenos a las células T, lo que refuerza la respuesta inmune adaptativa (7).

En este contexto, aunque se conoce sobre la importancia de la ADCP en la respuesta inmune en TB, aún existe una brecha significativa en la comprensión de cómo los anticuerpos específicos contra el antígeno Ag85A contribuyen en la progresión de la enfermedad. El presente trabajo buscó determinar la fagocitosis mediada por anticuerpos en la TB pulmonar activa, evaluando su potencial contribución en la eliminación del patógeno durante del tratamiento. Asimismo, posterior a una validación este parámetro inmune podría contribuir al monitoreo del tratamiento anti-TB y la progresión de la enfermedad. Esta investigación no solo proporciona información valiosa sobre la respuesta inmune humoral en la TB, sino que también

contribuye con las bases para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, diseño de vacunas e identificación de inmuno biomarcadores basados en anticuerpos.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la fagocitosis mediada por anticuerpos específicos a *Mycobacterium tuberculosis* en plasma de pacientes con TB pulmonar activa bajo tratamiento.

2.2 Objetivos Específicos

- Optimizar el ensayo de fagocitosis mediada por anticuerpos específicos a *M. tuberculosis*.
- Evaluar la fagocitosis mediada por anticuerpos a *M. tuberculosis* en plasma de pacientes con TB pulmonar activa durante el tratamiento.
- Evaluar la asociación entre la capacidad fagocítica de los anticuerpos específicos a *M. tuberculosis* y factores demográficos (edad) y datos clínicos (tratamiento y baciloscopia del paciente).

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Epidemiología de la tuberculosis (TB).

La TB está asociada con la pobreza y las condiciones de vida precarias, por ello que continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, especialmente en países en desarrollo como el Perú (8). A pesar de acciones tomadas para controlar esta enfermedad, la incidencia de casos de TB permanece alarmantemente alta con tasas que superan los 173 casos por cada 100,000 habitantes en 2023, según reportes de la OMS (9).

La OMS estimó que 10,8 millones de personas en todo el mundo contrajeron TB en el año 2023 de los cuales 6,0 millones fueron hombres, 3,6 millones mujeres y 1,3 millones de niños. Además, la TB es la principal causa de muerte entre las personas con otras comorbilidades como la infección por el VIH (2).

En las Américas, el 87% de los casos de TB se encuentran en diez países; sin embargo, poco más de la mitad se concentran en Brasil, Perú y México (10). En el Perú anualmente se reportan miles de casos, tan solo en el 2023 los casos de TB reportados ascendieron a 33,113 casos, además de ello los casos por TB multidrogo resistente (TB-MDR) fueron de 1,424 con el 53% de casos concentrados en las regiones de Lima y Callao (11). Esta situación crítica se ve agravada por la aparición de cepas extremadamente resistentes a los medicamentos (TB- XDR), lo que plantea un desafío significativo para la salud pública y requiere una atención urgente (12). La complejidad de este panorama epidemiológico resalta la importancia de analizar los

determinantes patogénicos y factores inmunológicos que modulan la progresión de la TB para que a futuro se diseñen herramientas de prevención/ terapéuticas o monitoreo.

3.2 Seguimiento al tratamiento de la TB

El tratamiento farmacológico de la TB está establecido con un régimen estandarizado de seis meses de duración. En el contexto peruano la norma técnica indica una etapa inicial de dos meses, con la administración diaria de cuatro medicamentos: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) y etambutol (E). Esta combinación farmacológica está diseñada para maximizar la actividad bactericida temprana y reducir la carga bacilar rápidamente (13,14). La segunda etapa del tratamiento es de cuatro meses de duración, en la cual la administración es inter diaria (tres veces por semana) de H y R (13).

La eficacia terapéutica de este esquema está condicionada por factores como la susceptibilidad antimicrobiana de la cepa infectante, la adherencia al tratamiento, la disponibilidad de los medicamentos, el abandono al tratamiento, presencia de comorbilidades del paciente o enfermedades preexistentes (13, 14) que puede conducir al desarrollo de resistencia antimicrobiana o fracaso del tratamiento.

La norma técnica peruana establece un sistema estructurado de registro que facilita la identificación temprana de irregularidades en la toma de medicamentos, factor crítico considerando que el abandono al tratamiento es la principal causa de desarrollo de resistencia antimicrobiana (15). En ese contexto, el seguimiento al tratamiento de la TB constituye un pilar fundamental en el control efectivo de esta enfermedad, requiriendo un abordaje que garantice la adherencia terapéutica y la curación definitiva

del paciente. Este seguimiento incluye la monitorización bacteriológica periódica mediante baciloscopias, cultivos, evaluación clínica, control de efectos adversos y vigilancia de comorbilidades, especialmente en pacientes con diabetes o VIH, donde la tasa de fracaso terapéutico puede incrementarse hasta un 28% sin un seguimiento adecuado (16). Pese a la utilidad clínica de estos métodos, estos presentan limitantes que pueden comprometer la efectividad del control terapéutico. La baciloscopia de esputo, aunque accesible y económica, presenta una sensibilidad reducida (45-60%) generando hasta un 30% de falsos negativos (no permite diferenciar especies de *Mycobacterium*) que pueden conducir a interpretaciones erróneas sobre la respuesta al tratamiento (12). Por otro lado, los cultivos toman mucho tiempo entre 2-8 semanas para obtener resultados, mientras que y el diagnóstico mediante GenXpert, aunque es rápida y precisa, aun no se encuentra disponible en todas las regiones del país (17). Por lo tanto, surge la necesidad de encontrar mejores biomarcadores para optimizar el seguimiento del estado de la enfermedad, efecto del tratamiento y quizá poder predecir la respuesta al tratamiento anti -TB.

En ese contexto, la contribución de la presente tesis radica en evaluar la habilidad de los anticuerpos específicos-*Mtb* de mediar la fagocitosis, un parámetro inmunológico-durante el tratamiento de la TB pulmonar activa. Esto proporcionará las bases para identificar potenciales biomarcadores más efectivos y rápidos para monitorear la respuesta al tratamiento, superando las limitaciones actuales de la baciloscopia y cultivos, permitiendo ajustes terapéuticos más oportunos y mejorando los resultados del tratamiento.

3.3 Respuesta inmune a *M. tuberculosis*.

La TB tiene dos estados distintos: latente y activa. La transmisión ocurre principalmente a través de la inhalación de pequeñas gotas que contienen la bacteria, las cuales son expulsadas cuando personas infectadas, tosen o estornudan. La forma latente ocurre cuando el bacilo está presente en el organismo, pero el individuo no presenta síntomas y no puede transmitir la enfermedad. La prevalencia para este estado de latencia es alta en muchas poblaciones, y se estima que alrededor de un cuarto de la población mundial está infectada con *Mtb* y presenta el estado latente (9).

En contraste, la TB activa presenta síntomas y es responsable de la propagación de la enfermedad. Se denomina activa porque las micobacterias han superado la contención inmunológica y están en replicación, lo que resulta en la destrucción progresiva del tejido pulmonar. La activación puede ocurrir directamente tras la infección inicial o después de la reactivación debido a una inmunodeficiencia, lo que conduce a una enfermedad sintomática y a la transmisión a un nuevo huésped para iniciar un nuevo ciclo de infección (10), véase Figura 1 (18).

Los pulmones, son el órgano comúnmente afectado por la infección con *Mtb*, lo que se conoce como TB pulmonar; sin embargo, la bacteria también puede diseminarse y afectar otros órganos a través del torrente sanguíneo, dando lugar a la TB extrapulmonar (6).

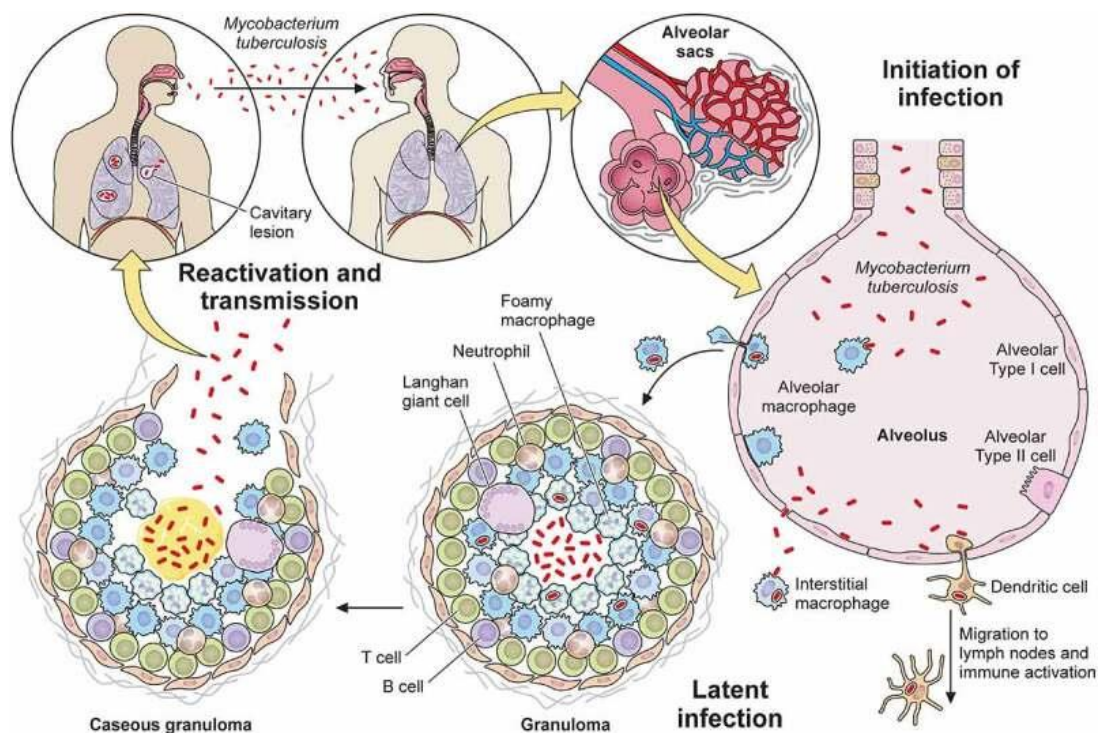


Figura 1. Descripción general de la infección por *Mtb*. La transmisión ocurre cuando una persona infectada tose o estornuda, liberando pequeñas gotas que contienen la bacteria. Al ser inhaladas, la bacteria se aloja en el parénquima pulmonar, iniciando la infección y activando las células del sistema inmune. Sin embargo, las bacterias pueden contenerse dentro de la acumulación de células inmunes formando granulomas (fase latencia) y por diversos factores (inmunológicos, genéticos, sociales) pueden activarse y reactivar la infección. **Fuente:** *Pathogenicity and virulence of Mycobacterium tuberculosis* (18).

Para sobrevivir y establecer la infección, *Mtb* invade más allá del epitelio mucoso o alveolar y a medida que fluye a través de las vías respiratorias superiores e inferiores, va infectando células epiteliales (19). En el pulmón, durante la infección por *Mtb*, la respuesta inmune es inicialmente mediada por macrófagos, lo que lleva al reclutamiento de neutrófilos, células dendríticas y otras células de la respuesta inmune

innata. Posteriormente se desencadena una respuesta inmune adaptativa, mediada principalmente por células T y células B, que producen mediadores inflamatorios y en conjunto forman el granuloma. El granuloma es una estructura organizada que se forma en respuesta a la infección y juega un papel importante en el control de la carga bacteriana actuando como un sitio de contención (20) Figura 1.

Se sabe que las células T contribuyen en el control de la infección por *Mtb*, principalmente por su producción de IFN- γ . Se ha demostrado en estudios que ratones deficientes en IFN- γ o en humanos con deficiencias genéticas en la vía de señalización del IFN- γ /IL-12 muestran una capacidad reducida de controlar la infección por *Mtb*. Es por lo que la inmunidad mediada por células ha sido considerada el principal mecanismo protector contra la TB, con énfasis particular en las células T (CD4⁺) (21,22,23).

Si bien la respuesta mediada por células T que producen IFN-g es fundamental en TB (24), investigaciones recientes han revelado la importancia de otros mecanismos inmunológicos en el control de la TB debido a que las vacunas diseñadas para inducir respuestas de células T no han sido del todo protectoras contra la infección (6). Estudios como el de **Lu y colaboradores** (25) señalan que los anticuerpos de pacientes con TB latente mostraban una mayor capacidad para mediar ADCP en comparación con los anticuerpos de pacientes con TB activa. Esta diferencia sugiere que la ADCP podría desempeñar un papel protector en la contención de la infección y la prevención de la progresión a enfermedad activa. Por otro lado, **Melkie y colaboradores** (26) sugieren que los anticuerpos podrían ser herramientas en el diagnóstico, profilaxis y

terapia de la TB. Su revisión además resalta la identificación de antígenos de *Mtb* que inducen una respuesta inmune y que sean de utilidad en lo antes mencionado.

La ADCP emerge como un mecanismo crucial en la respuesta inmune contra la TB. En este proceso, los anticuerpos, particularmente las subclases IgG1 e IgG3, reconocen células infectadas o a los antígenos de *Mtb*, para su eliminación por parte de los macrófagos u otros fagocitos. La interacción entre los anticuerpos y los receptores Fc gamma (FcγR) en la superficie de los macrófagos activa una serie de señales intracelulares que promueven la internalización y destrucción de las bacterias. Este mecanismo no solo facilita la eliminación de *Mtb*, sino que también contribuye al procesamiento de antígenos por macrófagos para presentar antígenos a las células T lo que refuerza la respuesta inmune adaptativa y la formación de memoria inmunológica (25, 26).

La fagocitosis mediada por anticuerpos ha sido descrita de jugar un rol protector en muchas enfermedades como HIV (27). La ADCP es especialmente relevante en el contexto de la TB, como lo resaltado por **Wang y colaboradores** (28), señalando que los anticuerpos generados durante la infección y que muestran la habilidad de ADCP, podrían contribuir a la contención de la infección en TB. Asimismo, resalta que la capacidad de los anticuerpos para mediar fagocitosis está asociada con la progresión de la enfermedad, sugiriendo que la optimización de la respuesta de anticuerpos ya sea mediante vacunación o la ingeniería de anticuerpos con potentes funciones efectoras, podría ser una estrategia prometedora para mejorar los resultados terapéuticos en pacientes con TB.

3.4 Antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

Los antígenos de *Mtb* constituyen un conjunto diverso de biomoléculas que incluyen proteínas, lipoproteínas, glicolípidos y complejos proteína-carbohidrato (29). Estos antígenos desempeñan roles fundamentales en la patogénesis bacteriana y en la interacción con el sistema inmunológico del hospedero. Estas moléculas son reconocidas por el sistema inmune adaptativo e innato, desencadenando respuestas celulares y humorales específicas que determinan el curso de la infección (30). Para *Mtb* se han identificado más de 300 antígenos con diversas funciones biológicas. Estos pueden clasificarse principalmente en tres categorías según su expresión durante el ciclo de vida del patógeno: antígenos asociados al estado de latencia, antígenos asociados con el crecimiento o antígenos asociados con la reactivación. Esta diversidad antigénica refleja la compleja adaptación del bacilo a diferentes microambientes dentro del hospedero, permitiéndole persistir en estado latente o reactivarse bajo condiciones específicas, lo que constituye un desafío significativo para el diagnóstico diferencial entre infección tuberculosa latente y enfermedad activa (29). La relevancia patológica de estos antígenos radica en su capacidad para modular la respuesta inmunitaria del hospedero, contribuyendo tanto a los mecanismos de protección como a la inmunopatología característica de la TB (31).

Los antígenos que han sido ampliamente estudiados son los antígenos secretados, entre ellos el complejo antígeno 85, los cuales participan en la interacción hospedero-patógeno- juntamente con la fibronectina, facilitando la adherencia bacteriana a células epiteliales (31, 32). Entre los componentes del complejo antígeno 85, destacan los Ag85A, Ag85B y Ag85C. El Ag85A (también denominado MPT44 o proteína de 31

kDa) la cual muestra alta inmunogenicidad y tiene potencial como candidato a vacuna (33). Estudios inmunológicos han demostrado que el Ag85A induce potentes respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ con producción de interferón gamma en individuos con infección tuberculosa, y que estas respuestas podrían ayudar en el control de la replicación bacteriana (33,34).

El perfil antigénico específico expresado por *Mtb* durante diferentes fases de infección (latente versus activa) determina en gran medida la naturaleza de la respuesta inmunitaria y, consecuentemente, la progresión de la enfermedad (35), lo que posiciona a estos antígenos como dianas clave para el desarrollo de estrategias diagnósticas, terapéuticas y profilácticas.

3.5 Anticuerpos y su rol en la tuberculosis.

Los anticuerpos son un tipo de proteínas producidas por los linfocitos B, denominadas inmunoglobulinas, que constan de una región constante y una región variable. La región variable es la que concede la especificidad al anticuerpo al unirse de manera altamente específica a los determinantes antigénicos que reconoce (6, 36). Los linfocitos B se activan en los ganglios linfáticos al interactuar con linfocitos CD4 cooperadores, induciendo su proliferación y diferenciación en linfocitos de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos. En los órganos linfoides secundarios, los linfocitos B adquieren un fenotipo de memoria y células plasmática para producir anticuerpos específicos contra *Mtb* (37). Las células B secretan diferentes isotipos de inmunoglobulinas (Ig), comenzando con IgM, que se detectan en las primeras 1-2 semanas de ocurrida la infección, seguidas por IgG, que son más eficaces en la

neutralización de patógenos y tienen mayor afinidad por los antígenos, pero aparecen entre dos y doce semanas. Tras la resolución de la infección, los linfocitos B de memoria persisten y pueden producir IgG específica rápidamente en caso de reinfección, en un plazo de 48-72 horas (38).

La inmunoglobulina G (IgG) comprenden cuatro variantes estructural y funcionalmente distintas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que representan aproximadamente el 75% de las inmunoglobulinas séricas totales (39). Cada subclase exhibe características únicas en términos de activación del complemento, unión a receptores Fc y vida media sérica, siendo la IgG1 la más abundante (60-70%) y versátil, particularmente efectiva contra patógenos proteicos y en la opsonización (40). La IgG2 predomina en la respuesta a antígenos polisacáridos capsulares, mientras que la IgG3, a pesar de su corta vida media (7 días), destaca por su superior capacidad de activación del complemento y citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (41). La IgG4, la menos abundante, posee propiedades antiinflamatorias únicas y la capacidad de intercambiar fragmentos Fab, características que la hacen relevante en respuestas alérgicas y exposición crónica a antígenos (42).

La diversidad estructural y funcional de las inmunoglobulinas (Figura 2) contribuye al repertorio de respuestas inmunes humorales, donde estas desempeñan roles específicos en la defensa del organismo y sus funciones protectoras en múltiples niveles anatómicos y etapas de una infección.

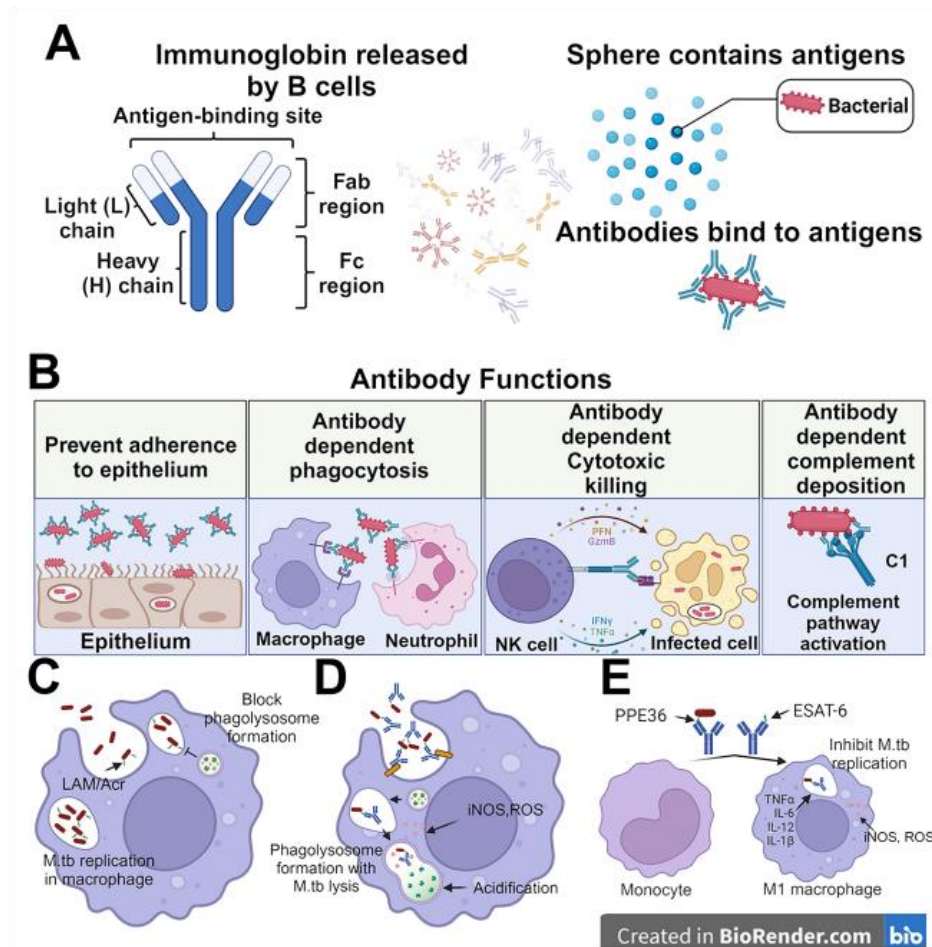


Figura 2. Funciones de los anticuerpos. Las funciones que desempeñan los anticuerpos ocurren en diversos compartimentos anatómicos y etapas de la infección. **A)** Los anticuerpos están conformados por una región variable Fab y su región constante Fc, mediante su región Fab pueden reconocer patógenos y neutralizarlos. **B)** Dentro de las funciones de los anticuerpos están: prevenir la adherencia de los patógenos al epitelio y evitar la infección. Macrófagos y neutrófilos pueden fagocitar patógenos, las células infectadas son destruidas (citotoxicidad) por células NK que liberan gránulos que abren poros en la membrana de células infectadas y ocurre la citólisis y finalmente activan complemento para que se forme el complejo de ataque a la membrana. **C, D)** Las bacterias son fagocitadas e internalizadas en el fagosoma que

se fusiona con el lisosoma y se forma el complejo fagolisosoma en el cual se destruyen las bacterias. E) Los anticuerpos específicos a ESAT6 reconocen a la proteína en la bacteria y bloquea/inhíbe la infección de macrófagos el cual contribuye con la producción de citocinas que promoverán la respuesta inmune.

Fuente: Wang Q. Antibodies as key mediators of protection against *Mycobacterium tuberculosis*. Front Immunol. 2024 (28).

Sin embargo, la funcionalidad de los anticuerpos puede ser afectada por el envejecimiento. Debido a este proceso, la producción de inmunoglobulinas se ve comprometida por una disminución en la diferenciación de células B de memoria y plasmáticas, así como alteraciones en la hipermutación somática y la glucosilación de inmunoglobulinas. Estas modificaciones afectan las funciones biológicas de las inmunoglobulinas como la unión a receptores Fc y la activación del complemento (43).

En la infección por *Mtb*, en las lesiones cavitarias los anticuerpos influyen decisivamente en la dinámica inflamatoria local y en la arquitectura del granuloma, ejerciendo efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios. Los granulomas mejor estructurados se asocian con menor diseminación bacteriana y mejor contención de la infección, sugiriendo que la calidad de la respuesta humoral podría ser determinante en la evolución clínica de la enfermedad (Figura 3) (44).

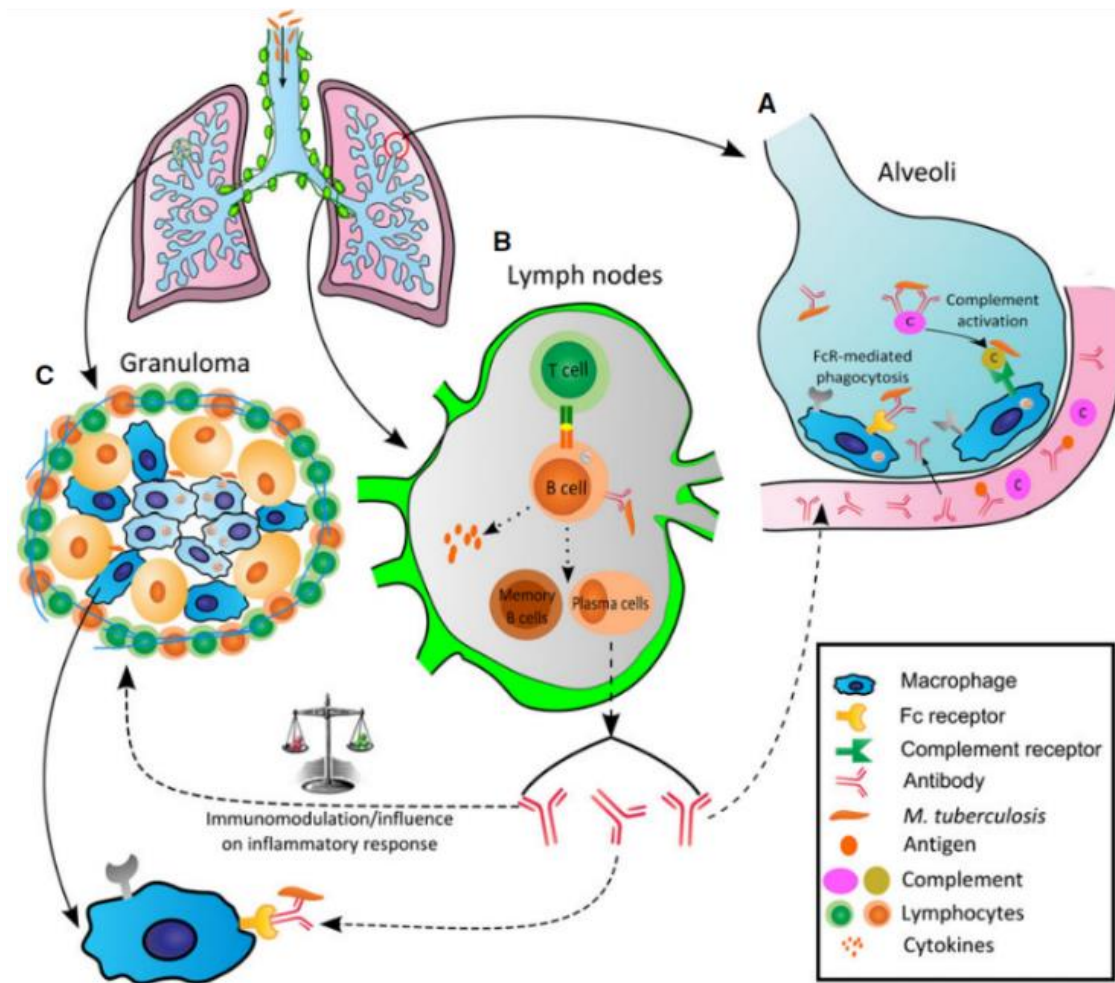


Figura 3. Patogénesis de la tuberculosis, participación de los anticuerpos y células

B. A) Los anticuerpos contra *Mycobacterium tuberculosis* facilitan la opsonización bacteriana, activan el complemento y promueven la fagocitosis mediada por receptores Fc. **B)** Las células B, en órganos linfoides, como células presentadoras de antígeno, producen citoquinas y anticuerpos para eliminar antígenos Mtb como respuesta inflamatoria, **C)** Modulan la arquitectura del granuloma, inmunomoduladores mediante inmunocomplejos, contribuyendo significativamente a la defensa del hospedero.

Fuente: Achkar JM, Chan J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection (44).

Se ha estudiado el rol de los anticuerpos utilizando transferencia pasiva y se ha demostrado que sueros inmunes pueden reducir la carga bacteriana de *Mtb*. De igual manera, anticuerpos monoclonales han mostrado un potencial significativo en la mejora de la supervivencia en modelos murinos de TB, sugiriendo su potencial terapéutico en la tuberculosis (45).

La comprensión de los mecanismos inmunológicos contra la TB ha estado históricamente sesgada hacia la inmunidad celular, relegando el estudio de la respuesta humoral a un segundo plano. Sin embargo, una evidencia emergente sugiere que los anticuerpos desempeñan funciones cruciales en la defensa con *Mtb*, que trascienden la clásica neutralización directa (24, 28, 45). Se ha propuesto que la fagocitosis y la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, así como la activación del complemento representan mecanismos efectores que podrían modificar significativamente el curso de la infección (28, 38).

La determinación de las respuestas mediadas por anticuerpos durante el curso del tratamiento antituberculoso proporcionará una herramienta ideal para monitorear la respuesta al tratamiento y que pueda ayudar al clínico en toma de decisiones. Estos parámetros necesitarán ser validados en cohortes de pacientes grandes para su uso en la clínica como biomarcadores. En particular, la fagocitosis se presenta como un parámetro determinante, ya que refleja directamente la capacidad funcional de los anticuerpos para mediar la eliminación del patógeno y podría ser un indicador robusto de la eficacia del tratamiento. Este conocimiento resulta particularmente relevante dado que los biomarcadores actuales son limitados. La evidencia generada en este estudio no solo respalda la necesidad de reconsiderar el papel de los anticuerpos en la

respuesta inmune contra la TB, sino que también sugiere su potencial como herramienta pronóstica en el manejo clínico de la enfermedad.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de la Investigación.

Experimental y longitudinal.

4.2 Población.

Las muestras de plasma fueron obtenidas de pacientes diagnosticados con TB pulmonar activa, pertenecientes al proyecto con código SIDISI: 211318 (Caracterización funcional de anticuerpos específicos contra M. tuberculosis en pacientes con tuberculosis pulmonar activa bajo tratamiento). Dicho proyecto contó con la aprobación del comité de ética de la UPOCH para almacenar muestras de plasma con autorización del consentimiento informado de los pacientes. Las muestras presentaron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

4.2.1 Criterios de inclusión del proyecto base.

- Adultos entre los 18 a 60 años.
- Pacientes con diagnóstico a TB pulmonar activa confirmados por evaluación clínica, baciloscopia, cultivo bacteriológico o rayos X.
- Pacientes que no hayan recibido tratamiento al momento de la colecta de la primera muestra.

4.2.2 Criterios de exclusión del proyecto base.

- Gestantes
- Pacientes que hayan recibido tratamiento anti-TB.
- Pacientes con enfermedades autoinmunes u otras infecciones.
- Pacientes con TB pulmonar, extrapulmonar y resistente.
- Pacientes que no deseen formar parte al estudio.

4.3 Muestra

Para el presente estudio se usaron muestras de plasma de pacientes diagnosticados con TB pulmonar activa provenientes del proyecto base, que fueron almacenadas a -20°C hasta antes de su uso. Cada muestra fue identificada con un código numérico que incluía el código del proyecto y la abreviatura del tiempo de muestreo: T0: previo al inicio del tratamiento, T2: a los dos meses de tratamiento y T6: a los seis meses de completar el tratamiento. Los códigos no contenían información alguna que identifique al paciente, garantizando así la confidencialidad. En el laboratorio, las muestras se manipularon por códigos y para uso antes del ensayo se inactivaron a 56°C por 30 minutos.

4.4 Tamaño muestral.

Para el cálculo del tamaño de muestra se usó el software G* Power (Versión 3.9.61). Se estimó que se podía enrolar 15 pacientes (n=15) para obtener un poder estadístico

(1- β) del 0.99, con efecto de tamaño igual 1 y un error tipo 1 (α) de 0.05. Sin embargo, considerando que este es un estudio longitudinal se decidió un muestreo por conveniencia, incluyendo un total de 20 muestras de plasma. Los parámetros considerados para el cálculo del tamaño de muestra fueron sugeridos por diversos investigadores (46,47).

4.5 Línea celular y antígeno de *Mtb*

Las células monocíticas humanas THP-1 se adquirieron de *Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository* (BEI Resources) y se cultivaron en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina y 2 mM de L-glutamina a 37°C al 5% de CO₂. Para los ensayos el antígeno utilizado fue el recombinante Ag85A (PA5-117516) de *Mtb* obtenido también de BEI Resources.

4.6 Fagocitosis mediada por anticuerpos (ADCP)

Para el ensayo de fagocitosis se siguió el protocolo publicado por Musich (48) con algunas modificaciones indicadas en el protocolo.

4.6.1 Biotinilación del antígeno

El antígeno Ag85A fue biotinilado siguiendo las instrucciones del kit de marcaje de proteínas *Biotin-XX Microscale Protein Labeling Kit* (Molecular Probes™ B30010). En resumen, para 100 µg de proteína Ag85A se utilizó 3.7 µL de reactivo de biotina y

10 μ L de 1M de bicarbonato de sodio, y se incubó durante 15 minutos. Tras la incubación, se purificó la proteína biotinilada en una columna de resina incluida en el kit. La concentración de proteína obtenida se verificó usando *Nanodrop* 2000 (Thermo Fisher Scientific): obteniéndose la cantidad de 2.5 μ g/ μ L de proteína Ag85A biotinilada. La proteína Ag85A biotinilada fue almacenada a -20°C hasta su uso.

4.6.2 Revestimiento de perlas fluorescentes con antígeno Ag85A de *Mtb*.

Las perlas fluorescentes – FITC de *FluoSpheres*TM *NeutrAvidin*TM (Thermo Fisher Scientific) se diluyeron (se ensayó dos diluciones 1:100 y 1:250) para ser recubiertas con el antígeno Ag85A biotinilado. Previamente, las perlas fluorescentes fueron lavadas con PBS-0.1% de albúmina de suero bovina (BSA) centrifugando a 13000 rpm. Posteriormente, se adicionó la proteína Ag85A biotinilada y se incubó por 2h a temperatura ambiente. Luego, mediante centrifugación se precipitó el complejo perlas-Ag85A y se bloqueó con 5% de BSA a 4 °C por toda la noche. Tras la incubación, se lavó el complejo perlas-Ag85A y se mantuvo en RPMI, sin suero fetal bovino, con penicilina/estreptomicina, 2 mM de glutamina y 1mM de piruvato de Na hasta el ensayo de fagocitosis.

4.6.3 Ensayo de fagocitosis

La habilidad de los anticuerpos para mediar la fagocitosis se evaluó utilizando la citometría de flujo. El plasma se adicionó a los pozos de placas de 96 pozos (se evaluó diferentes diluciones 1:50, 1:100, 1:200) y se incubó con el complejo de perlas – Ag85A (preparado previamente) durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Esto permitió

que los anticuerpos presentes en el plasma reconozcan al antígeno Ag85A, generando un inmunocomplejo. Luego, se añadió a cada pozo 150 μ L de células THP-1 (equivalente a 50,000 células) en RPMI con piruvato de Na y se incubó durante 3 horas a 37°C. En este tiempo las células fagocitan el complejo anticuerpos-Ag85A-perlas. Finalmente, las células se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II, recolectando 20,000 eventos por muestra.

4.6.4 Determinación del puntaje fagocítico

Los datos obtenidos del citómetro de flujo para cada muestra fueron analizados utilizando el software FlowJo v10.10. Del análisis se obtiene el % de células que fagocitaron el complejo anticuerpos-Ag85A-perlas y los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) de la fluorescencia de las perlas para cada muestra. El puntaje fagocítico se calculó como sigue: % fagocitosis multiplicado por MFI para cada muestra y a los diferentes tiempos de muestreo: T2, T2 y T6.

4.6.5 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre los diferentes tiempos del tratamiento T0, T2, T6, se realizó el análisis pareado de las muestras en los tres tiempos mediante la prueba no paramétrica de Friedman mediante Graph Pad Prism v 10.4.1 y la corrección de los datos se realizó con la prueba de Nemenyi usando el programa RStudio 2023.12.1. Las correlaciones entre las variables mediante Spearman usando el programa Graph Pad Prism v 10.4.1.

V. RESULTADOS

5.1 Características clínicas de los pacientes

Para evaluar la fagocitosis mediada por anticuerpos específicos a *Mtb* se usaron muestras de plasma de 20 pacientes que siguieron el tratamiento estándar anti-TB.

Tabla 1. Resultados de baciloscopia y sexo de los pacientes.

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

T0: antes de iniciar tratamiento. **T2:** dos meses de iniciado el tratamiento. **T6:** seis meses de tratamiento. **F=** Femenino, **M=** Masculino *= con Dx clínico, **Nº:** Número de pacientes (n=20).

La **Tabla 1** muestra los resultados de baciloscopia en esputo durante del tratamiento (**T0**, **T2**, **T6**).

5.2 Estrategia de análisis de fagocitosis evaluada por citometría de flujo

Para el análisis de datos de citometría de flujo, se utilizó la siguiente estrategia de selección (Figura 4).

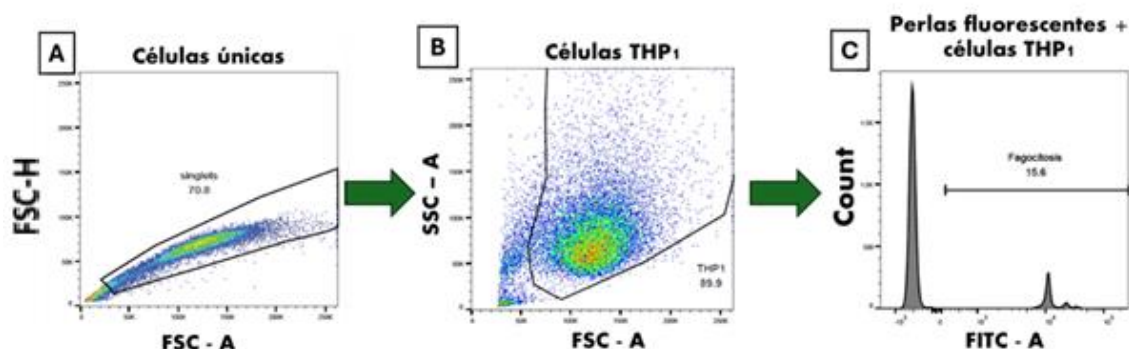


Figura 4. Estrategia de selección para definir la fagocitosis. (A) Gráfica de densidad (o de puntos) de FSC - H vs. FCS - A. Cada punto representa una única célula THP1. (B) Selección para identificar la población de células THP1 (C) Histograma que muestra el (%) de células THP1 que fagocitaron el complejo Ag85A - perlas (Fagocitosis).

5.3 Optimización de la concentración de Ag85A para ensayos con plasma de pacientes.

Se evaluaron diferentes concentraciones de la proteína Ag85A para revestir las perlas fluorescentes con el fin de generar una curva de fagocitosis expresada como puntaje fagocítico, y determinar la concentración óptima de antígeno para los ensayos con muestras de pacientes. Para establecer la concentración óptima de la proteína Ag85A, se evaluaron las siguientes concentraciones por pozo: 0.600µg, 0.300 µg, 0.150 µg, 0.075 µg, 0.037 µg, 0.018 µg de Ag85A. La optimización se realizó utilizando dos

diluciones de perlas fluorescentes (1:100 y 1:250), revestidas con las diferentes concentraciones de antígeno (Figura 5).

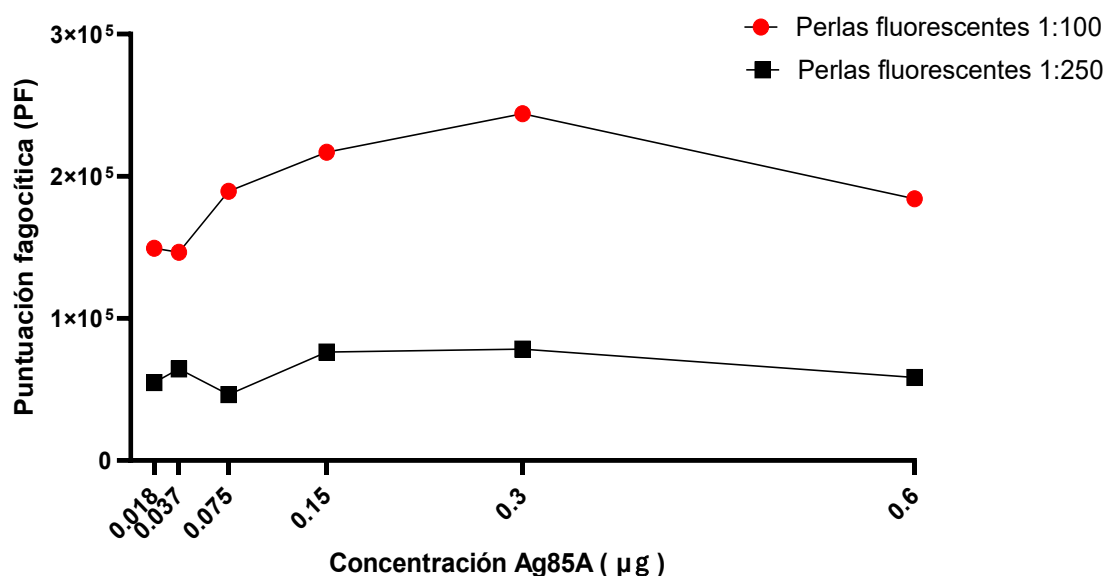


Figura 5. Optimización de la concentración optima de Ag85A a diferentes diluciones de perlas fluorescentes. Los puntos que se muestran representan la media de un experimento por duplicado.

En la Figura 5 se observa que la puntuación fagocítica cambia a diferentes concentraciones de Ag85A. Respecto a la dilución de perlas fluorescente, a una dilución de 1:100, la concentración de 0.3 µg de Ag85A presenta un valor más alto de fagocitosis, mientras que la fagocitosis disminuye a una concentración de 0.6 µg de Ag85A. Es importante resaltar que concentraciones más altas (0.6 µg) resultaron en una disminución de la actividad fagocítica, lo que sugiere que a concentraciones menores de Ag85A serían las apropiadas. Sin embargo, consideramos que 0.037 µg, es una concentración menor de antígeno y proporciona las condiciones ideales para la

interacción entre los anticuerpos, el antígeno y las células fagocíticas. Esto debido a que Ag85A es una proteína secretada por *Mtb* y no se encuentra saturante en la superficie de la bacteria (simulado por las perlas decoradas con Ag85A).

Por otro lado, a una dilución de perlas fluorescente de 1:250 se observa una menor fagocitosis comparado la dilución 1:100 en todas las concentraciones de Ag85A. Asimismo, consideramos que la dilución 1:250 no es una dilución saturante que permitirá la interacción entre los anticuerpos de plasma y las perlas fluorescentes con proteína.

5.4 Determinación de la dilución óptima de plasma

Se optimizó la dilución de plasma para utilizar en el ensayo final de fagocitosis. Para ello, se consideró la concentración de proteína previamente establecida (0.037 µg) y una dilución de perlas 1:100. En la Figura 6, se muestra el puntaje fagocítico obtenido a 3 diluciones de plasma (1:50, 1:100, 1:200) correspondiente a un paciente con TB pulmonar activa.

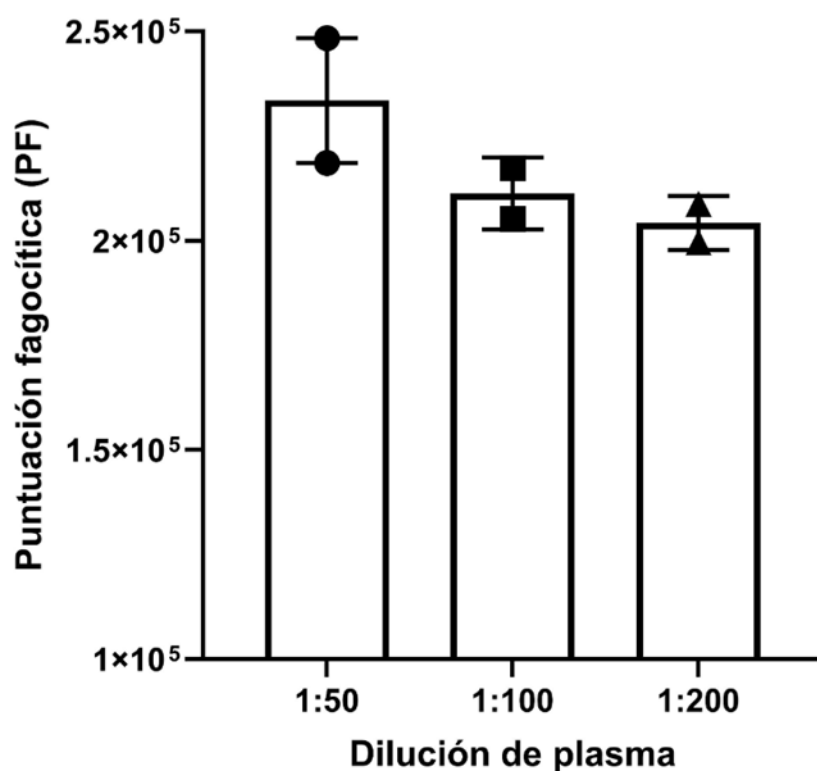


Figura 6. Optimización de la dilución de plasma para evaluar fagocitosis. Puntaje fagocítico evaluado a 3 diluciones de plasma; 1:50, 1:100 y 1:200. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Muestra representativa.

En la Figura 6 se observa que las diferentes diluciones seriadas evaluadas exhibieron índices fagocíticos comparables. No obstante, se seleccionó la dilución 1:50 del plasma como condición óptima, considerando que diluciones superiores podrían resultar en una reducción significativa de la concentración de inmunoglobulinas plasmáticas (dada la heterogeneidad en los títulos de anticuerpos entre los pacientes), lo cual podría comprometer la detección de la actividad fagocítica mediada por anticuerpos.

5.5 Ensayo de ADCP con muestras de pacientes con TB pulmonar bajo tratamiento.

En la figura 7, se observa que el puntaje fagocítico incrementa significativamente durante el tratamiento, mostrando valores más elevados a los seis meses (T6) comparado con el inicio (T0, $p=0.000028$) y los dos meses (T2, $p=0.01967$). Estos resultados sugieren una mayor habilidad de los anticuerpos de mediar fagocitosis luego del tratamiento por seis meses.

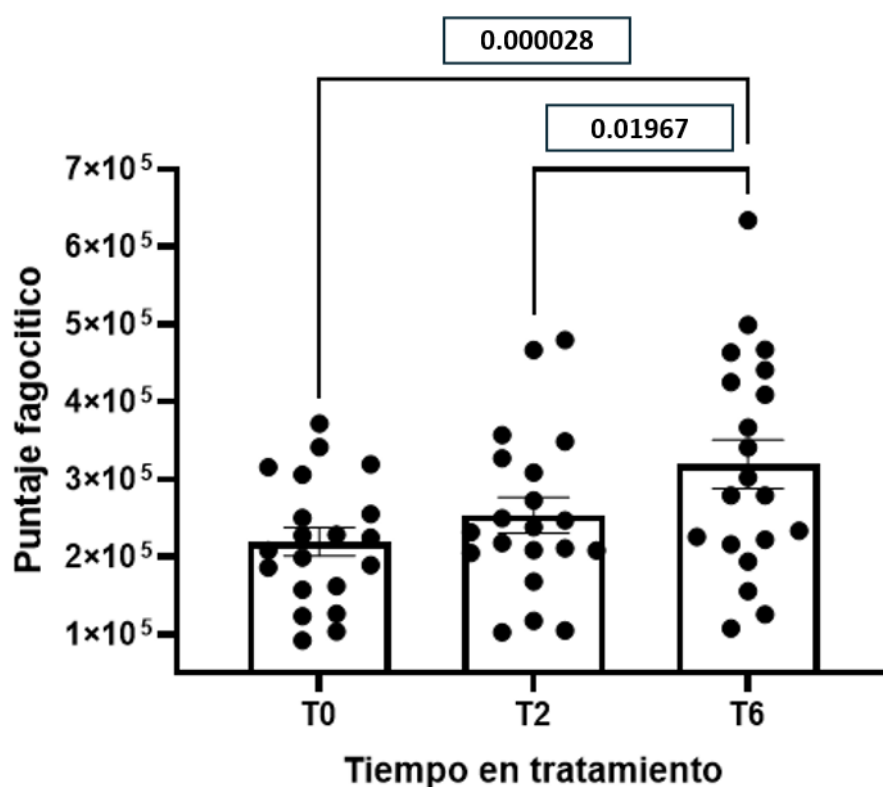


Figura 7. Fagocitosis mediada por anticuerpos específicos a *Mycobacterium tuberculosis* en plasma de pacientes durante el tratamiento. Las condiciones de fagocitosis fueron: 0,037 μ g de Ag85A, 1:50 de dilución de plasma, y 1:100 de

dilución de perlas. Los datos muestran la media $\pm$ SEM, n=20. T0: antes del tratamiento, T2: a los dos meses del tratamiento, T6: a los seis meses del tratamiento.

5.6 Asociación entre puntaje fagocítico, edad, resultados de baciloscopia y tiempo en tratamiento.

El análisis de correlación (Figura 8) muestra asociaciones entre las variables estudiadas (puntaje fagocítico, edad, resultados de baciloscopia durante el tratamiento y tiempo en tratamiento).

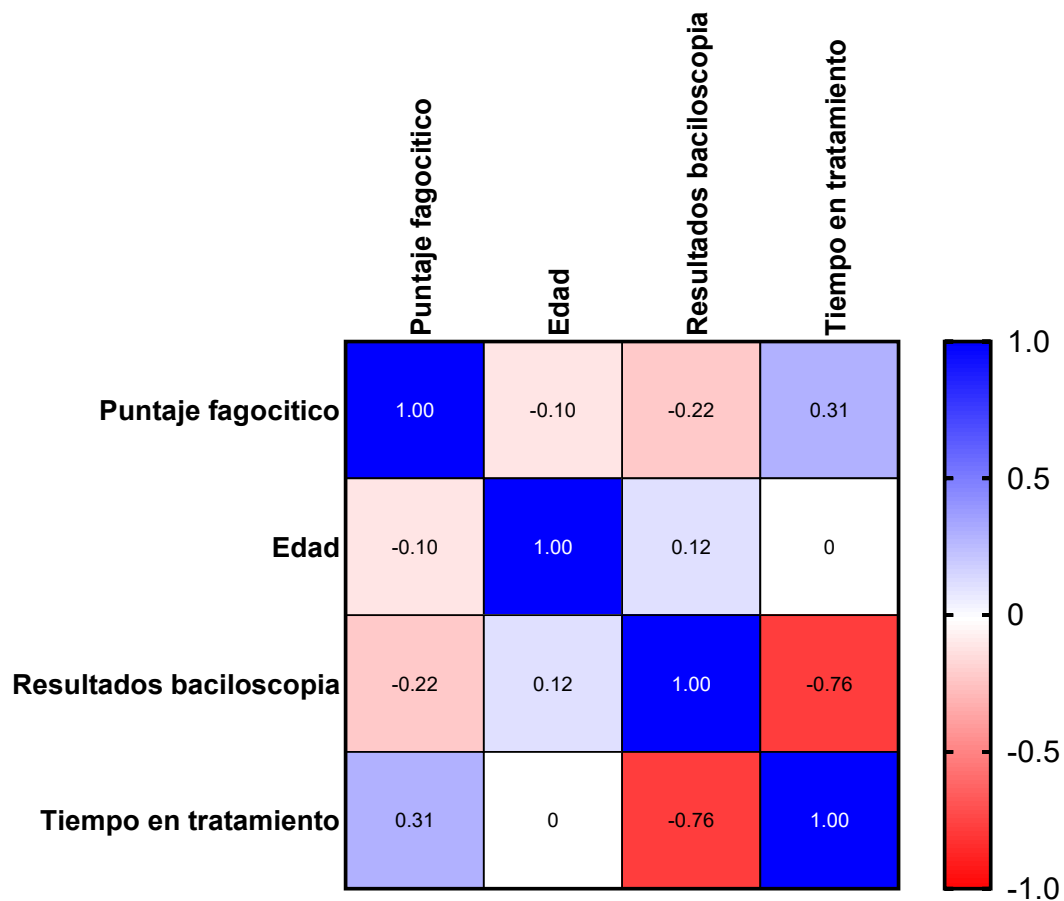


Figura 8. Asociación entre puntaje fagocítico, edad, resultados de baciloscopia y tiempo en tratamiento. La escala cromática representa la intensidad y dirección de las correlaciones (valores r) desde -1.0 (rojo intenso) hasta 1.0 (azul intenso).

Tabla 2. Valores de p obtenidos en el análisis de correlación entre puntaje fagocítico, edad, resultados de baciloscopia y tiempo en tratamiento.

Valores P	Puntaje fagocítico	Edad	Resultados baciloscopia	
Puntaje fagocítico				
Edad	0.435			
Resultados baciloscopia	0.099	0.356		0.0000000004319
Tiempo en tratamiento	0.017	1.0	0.0000000004319	

En la Tabla 2, se muestra los valores de p obtenidos en el análisis de correlaciones entre puntaje fagocítico, edad, tiempo en tratamiento y los resultados de baciloscopia durante el tratamiento. Se observa que no hay correlación estadísticamente significativa entre puntaje fagocítico, edad y resultados de baciloscopia sugiriendo que estas variables operan de manera independiente en el contexto estudiado.

Sin embargo, se evidenció una correlación positiva estadísticamente significativa ($p=0,017$) entre tiempo en tratamiento y puntaje fagocítico (Figura 9, Tabla 2). La pendiente ascendente del coeficiente de correlación sugiere un incremento progresivo en la capacidad fagocítica del plasma al completar el tratamiento. Estos hallazgos respaldan lo observado en la figura 7, donde se evidencia un aumento en la actividad fagocítica de los anticuerpos al finalizar el tratamiento y con una carga bacteriana controlada.

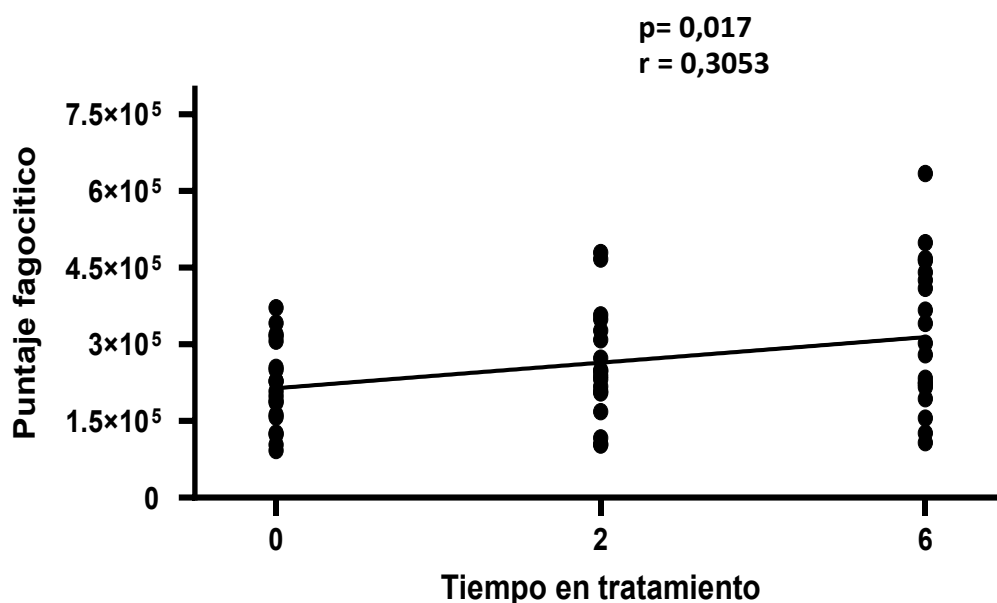


Figura 9. Asociación entre el tiempo en tratamiento y el puntaje fagocítico. Los datos muestran una correlación entre los tratamientos la T0: antes del tratamiento, T2: a los dos meses del tratamiento, T6: a los seis meses del tratamiento y el puntaje fagocítico. N=20.

5.7 Asociación entre la edad de los pacientes con tuberculosis activa bajo tratamiento y puntaje fagocítico.

Posteriormente, se realizó una correlación para conocer si la edad de los pacientes era un factor determinante en la habilidad de los anticuerpos de mediar fagocitosis. En la Figura 10, no se evidencia una correlación entre la edad de los pacientes y el puntaje fagocítico. Sin embargo, se observa una tendencia a una correlación negativa, lo que sugiere que podría haber un declive de la función fagocítica relacionado con el tiempo en tratamiento.

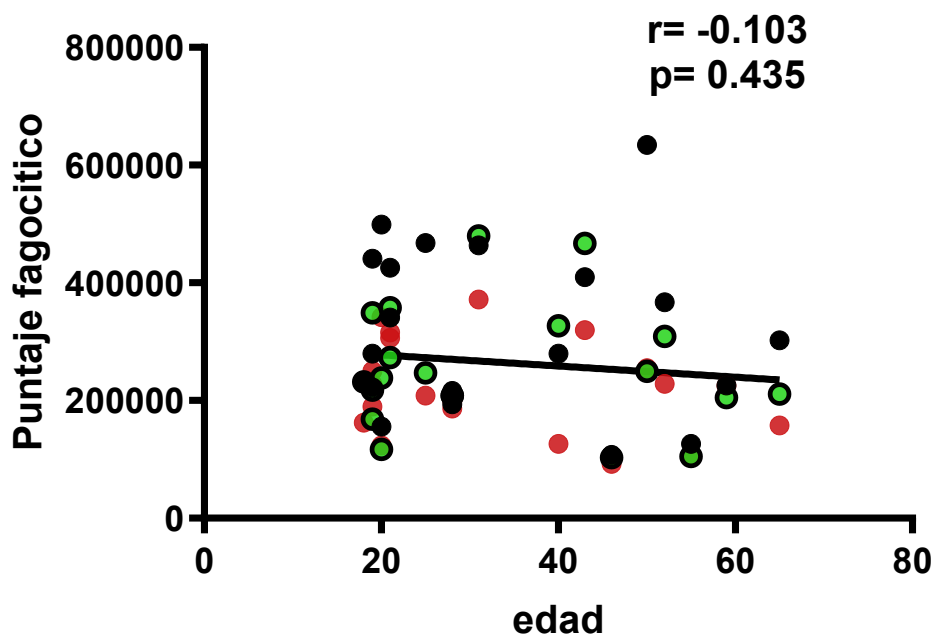


Figura 10. Asociación entre las edades de los pacientes con tuberculosis pulmonar activa bajo tratamiento y el puntaje fagocítico. Análisis de correlación entre las edades de los pacientes (Tabla 1) y el puntaje fagocítico al T0: antes del tratamiento (círculos rojos), T2: a los dos meses del tratamiento (círculos verdes), T6: a los seis meses del tratamiento (círculos negros). N=20.

5.8 Asociación entre los resultados de baciloscopia y el puntaje fagocítico.

Para evaluar la posible relación entre la carga bacteriana durante el tratamiento y el puntaje fagocítico, se realizó un análisis de correlación entre ambas variables en los tres tiempos del tratamiento (Figura 11).

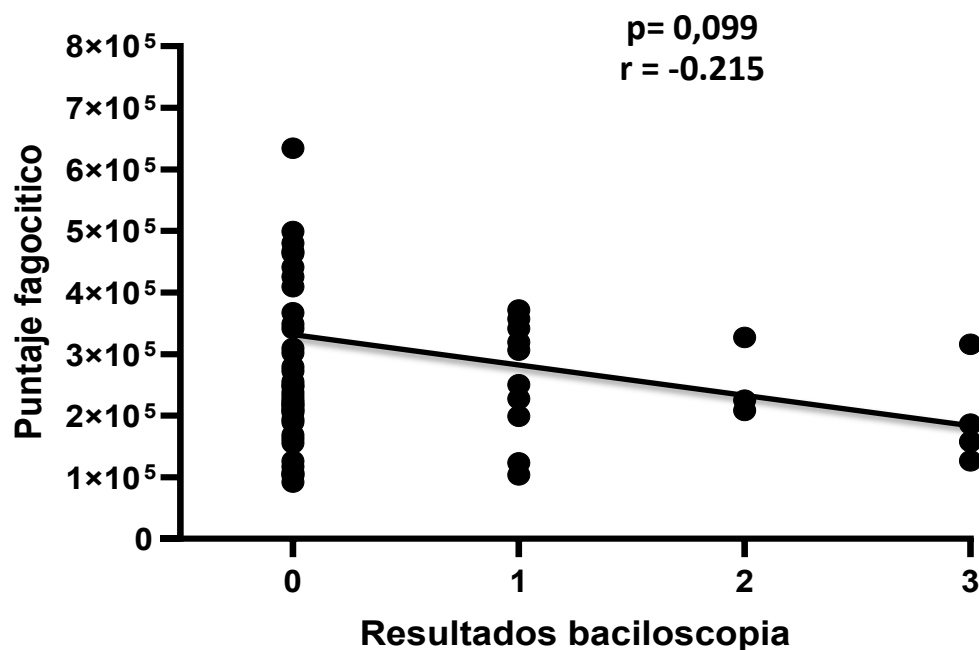


Figura 11. Asociación entre los resultados de baciloscopia (BK) y el puntaje fagocítico. En el eje x: 0= BK negativo 1= BK una cruz, 2= BK dos cruces, 3= BK tres cruces.

El análisis de la relación entre el puntaje fagocítico y los resultados de baciloscopia durante el tratamiento muestra una tendencia de una correlación negativa ($p = 0.099$). Estos resultados, podrían sugerir que un mayor puntaje fagocítico estaría asociado a una carga bacteriana controlada. Sin embargo, consideramos se debe verificar los resultados con un tamaño de muestra mayor.

VI. DISCUSION

La tuberculosis persiste como un desafío para la salud pública global, requiriendo abordajes innovadores para su control efectivo. La falta de herramientas de seguimiento con una sensibilidad alta, además de biomarcadores predictivos de respuesta terapéutica constituyen una limitación sustancial en el manejo clínico de esta patología infecciosa, evidenciando la necesidad de generar conocimiento inmunológico acerca de la evolución del tratamiento antituberculoso.

La contribución de los anticuerpos en la defensa contra patógenos ha sido documentada en múltiples patologías infecciosas como VIH y Ébola (5,7). Lo que ha facilitado el desarrollo de inmunoterapias basadas en anticuerpos monoclonales con funciones efectoras específicas. No obstante, en TB, el conocimiento sobre la relevancia funcional de los anticuerpos permanece limitado. En TB bajo tratamiento persiste un vacío de conocimiento respecto a la dinámica de la respuesta inmune humoral, funciones efectoras de los anticuerpos y su contribución al éxito terapéutico y resolución de la infección.

La presente investigación se centró en evaluar la fagocitosis mediada por anticuerpos (ADCP) en pacientes con tuberculosis pulmonar activa durante tratamiento. La hipótesis del estudio plantea que la reducción progresiva de la carga bacteriana inducida por el tratamiento con antibióticos conllevaría a una modulación en la habilidad de los anticuerpos de mediar funciones en células inmunes.

Para responder la hipótesis del estudio, se evaluó, la fagocitosis mediada por anticuerpos de pacientes con TB en tratamiento por 6 meses. Se realizó un ensayo experimental utilizando como fuente de anticuerpos plasma de pacientes los cuales reconocían el antígeno Ag85A decorado en las perlas fluorescentes y este complejo era fagocitado por células THP1. Inicialmente se procedió con la estandarización del ensayo de ADCP (50). Y se evaluaron diferentes condiciones de concentración de Ag85A, dilución de perlas fluorescentes y plasma. De los resultados, se determinó una concentración de 0.037 µg de Ag85A, dilución de perlas fluorescentes de 1:1000 y dilución de plasma de 1:50 para los ensayos finales.

De acuerdo con los parámetros establecidos, se evaluaron 20 muestras de plasma de pacientes en tres tiempos (T0; antes de iniciar al tratamiento; T2: después de dos meses y T6: y seis meses de tratamiento). Se observó un aumento estadísticamente significativo en el puntaje fagocítico al completar el tratamiento (T6) comparado al antes del tratamiento (T0) y a los dos meses de iniciado el tratamiento (T2). Estos resultados sugieren un cambio en la habilidad de los anticuerpos específicos a *Mtb* de mediar la función efectora de fagocitosis por células inmunes al completarse el tratamiento anti-TB y con una carga bacteriana controlada.

En concordancia con estos hallazgos, **Lu LL y colaboradores** (51) documentaron que, durante la fase activa de la TB, los pacientes presentan una disfunción significativa de células B, caracterizada por un incremento en poblaciones de células B atípicas y una reducción en la capacidad de producción de anticuerpos funcionales. De manera complementaria, **Chen y colaboradores** (52) reportaron que los títulos de anticuerpos

específicos contra antígenos micobacterianos presentan inicialmente niveles elevados, pero con baja funcionalidad efectora durante la fase activa de la enfermedad.

Estos datos respaldan nuestros hallazgos, debido a que antes de iniciar tratamiento (T0), se evidenció una reducida capacidad fagocítica, sugiriendo una habilidad disminuida de los anticuerpos de mediar fagocitosis en la fase activa de la infección y probablemente debido a una disfunción de células B por el entorno inflamatorio a consecuencia de la infección. Así, una vez controlada la infección (T6), las células B recuperarían sus funciones y se generarían anticuerpos con habilidades funcionales.

Del mismo modo, **Joosten SA y colaboradores** (53) señalan que, tras el inicio del tratamiento antituberculoso, se observa una normalización progresiva del fenotipo de células B productoras de anticuerpos, con recuperación de subpoblaciones de células B de memoria, y reducción de células B atípicas. Los cambios de esos fenotipos de las células B se asocian con una mejora en la calidad funcional de los anticuerpos en el transcurso del tratamiento. Dichos resultados, se asocian con los hallados en el presente estudio, que muestran un aumento significativo en el puntaje fagocítico a la cura del paciente, sugiriendo un incremento en la habilidad de los anticuerpos específicos a Ag85A de mediar fagocitosis.

El rol protector de los anticuerpos fue reportado por **Li y colaboradores** (54). Anticuerpos provenientes de trabajadores de salud que estaban expuestos a *Mtb* pero que no presentaban síntomas mostraron capacidad de limitar el crecimiento de *Mtb* in vitro. A pesar de estas evidencias aún queda mucho por entender el papel de los anticuerpos en la respuesta inmune a TB en tratamiento.

Dentro de las modificaciones de los anticuerpos está la glicosilación de la región Fc. La glicosilación de las inmunoglobulinas modula la interacción con los receptores Fc en células inmunes y por tanto las funciones efectoras. Se ha reportado **Alter y colaboradores** (55), que los anticuerpos agalactosilados incrementan con la edad y favorecen una respuesta inflamatoria. En esa línea, se exploró si la edad de los pacientes con TB tiene un impacto sobre la capacidad de los anticuerpos de mediar fagocitosis. Si bien en nuestro estudio no se observó una asociación entre la edad de los pacientes y la puntuación fagocítica. Este es un aspecto por explorar para entender la inmunobiología de la enfermedad. Incluir una cohorte de mayor tamaño muestral que considere diferentes edades podría generar luces sobre este aspecto. Adicionalmente es importante considerar que la inmunosenescencia, está documentada por **Ventura y colaboradores** (56) y **Pera y colaboradores** (57) y describe el deterioro del sistema inmunitario asociado al envejecimiento. En esta investigación, la ausencia de correlación directa sugiere que la capacidad fagocítica podría estar influenciada por otros factores inmunológicos más allá de la edad como las alteraciones en la función de células T helper, la reducción en la diversidad de inmunoglobulinas y la disminución de títulos de anticuerpos. Estos hallazgos resaltan la necesidad de considerar múltiples parámetros inmunológicos al evaluar la respuesta inmune en pacientes con TB, especialmente en poblaciones geriátricas donde la respuesta inmune presenta mayor complejidad.

Consideramos que uno de los principales aportes de este estudio es el conocimiento sobre la cinética de la fagocitosis mediada por anticuerpos en el tratamiento de TB. Uno de los aspectos preocupantes en el monitoreo de la respuesta al tratamiento es la falta de herramientas eficientes que ayuden en la decisión clínica. En ese sentido, el

incremento de la fagocitosis al completarse el tratamiento anti-TB podría ser un potencial biomarcador del éxito del tratamiento que necesita ser evaluado en cohorte con mayor número de pacientes para su validación. El uso de biomarcadores ofrece información sobre el estado inmunológico del paciente y puede ayudar en las decisiones clínicas (58).

La TB es una enfermedad que es un problema de salud pública en nuestro país y a nivel mundial. Su control es urgente para evitar el desarrollo de resistencia a los antibióticos. Conocer más sobre la respuesta inmune en los diferentes contextos de la enfermedad ayudara en el desarrollo de biomarcadores inmunológicos, terapias y vacunas más racionales.

VII. CONCLUSIONES

1. La estandarización del ensayo de fagocitosis mediada por anticuerpos demostró condiciones óptimas bajo los siguientes parámetros: perlas fluorescentes en una dilución de 1:100, decoradas con una concentración 0.037 μ g de antígeno Ag85A en una dilución de plasma 1:50.
2. El análisis longitudinal de la fagocitosis mediada por anticuerpos en muestras de plasma de pacientes con TB activa, reveló un incremento estadísticamente significativo en la capacidad fagocítica al T6, sexto mes de tratamiento antituberculoso, en comparación con los valores basales antes del tratamiento (T0) y al segundo mes (T2) de terapia, sugiriendo una posible contribución en la cura del paciente.
3. La correlación entre el tiempo en tratamiento y el puntaje fagocítico muestran una asociación significativa entre ambos parámetros, lo que respalda que, al finalizar el tratamiento, los anticuerpos cambiarían sus características hacia mejorar su capacidad de mediar fagocitosis.

VIII. RECOMENDACIONES

La evidencia obtenida en este estudio sobre la fagocitosis mediada por anticuerpos en pacientes con TB pulmonar activa resalta la importancia de comprender la dinámica de la respuesta inmune durante el tratamiento. Los hallazgos indican que la capacidad de los anticuerpos para mediar la fagocitosis mejoraría a medida que se cumple el tratamiento, lo que sugiere un ajuste favorable en la respuesta inmune ante la reducción de la carga bacteriana. Así mismo es recomendable trabajar con un mayor número de muestras para confirmar nuestros resultados y como otros factores biológicos pueden influir en la progresión de la enfermedad o en la cura del paciente.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. Nat Rev Dis Primer. 27 de octubre de 2016;2:16076.
2. Tuberculosis [Internet]. [citado 16 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
3. Irvine EB, O'Neil A, Darrah PA, Shin S, Choudhary A, Li W, et al. Robust IgM responses following intravenous vaccination with Bacille Calmette-Guérin associate with prevention of Mycobacterium tuberculosis infection in macaques. Nat Immunol. diciembre de 2021;22(12):1515-23.
4. Karbalaei Zadeh Babaki M, Soleimanpour S, Rezaee SA. Antigen 85 complex as a powerful Mycobacterium tuberculosis immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. Microb Pathog. noviembre de 2017;112:20-9.
5. Gunn BM, Alter G. Modulating Antibody Functionality in Infectious Disease and Vaccination. Trends Mol Med. 1 de noviembre de 2016;22(11):969-82.
6. Jacobs AJ, Mongkolsapaya J, Sreaton GR, McShane H, Wilkinson RJ. Antibodies and tuberculosis. Tuberc Edinb Scotl. diciembre de 2016;101:102-13.
7. Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. Nat Rev Immunol. enero de 2018;18(1):46-61.
8. Fuentes-Tafur LA. Enfoque sociopolítico para el control de la tuberculosis en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. julio de 2009;26(3):370-9.

9. Global Tuberculosis Report 2024 [Internet]. [citado 29 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>
10. Situación de la Tuberculosis en las Américas - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado 27 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis/situacion-tuberculosis-americas>
11. Minsa intensifica búsqueda de casos de tuberculosis en poblaciones vulnerables [Internet]. [citado 24 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/996224-minsa-intensifica-busqueda-de-casos-de-tuberculosis-en-poblaciones-vulnerables>
12. Tabernero Huguet E. Avances y desafíos en el control de la tuberculosis multirresistente (TB-MDR). Open Respir Arch. 1 de mayo de 2024;6(3):100333.
13. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-susceptible tuberculosis treatment [Internet]. [citado 16 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/Z>i/item/9789240048126>
14. Resolución Ministerial N.º 894-2024-MINSA [Internet]. [citado 16 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/6313958-894-2024-minsa>
15. CDCespanol. Tuberculosis (TB). 2025 [citado 16 de mayo de 2025]. Cómo tratar la enfermedad de tuberculosis activa. Disponible en: <https://www.cdc.gov/tb/es/treatment/la-enfermedad-de-tuberculosis-activa.html>
16. Alipanah N, Jarlsberg L, Miller C, Linh NN, Falzon D, Jaramillo E, et al. Adherence interventions and outcomes of tuberculosis treatment: A systematic review

and meta-analysis of trials and observational studies. PLoS Med. julio de 2018;15(7):e1002595.

17. Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. Lancet Infect Dis. enero de 2018;18(1):76-84.

18. Rahlwes KC, Dias BRS, Campos PC, Alvarez-Arguedas S, Shiloh MU. Pathogenicity and virulence of Mycobacterium tuberculosis. Virulence. 14(1):2150449.

19. Rodrigues TS, Conti BJ, Fraga-Silva TF de C, Almeida F, Bonato VLD. Interplay between alveolar epithelial and dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis. J Leukoc Biol. octubre de 2020;108(4):1139-56.

20. Ravesloot-Chávez MM, Dis EV, Stanley SA. The Innate Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection. Annu Rev Immunol. 26 de abril de 2021;39(Volume 39, 2021):611-37.

21. Urdahl KB, Shafiani S, Ernst JD. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. Mucosal Immunol. mayo de 2011;4(3):288-93.

22. Mogues T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. J Exp Med. 5 de febrero de 2001;193(3):271-80.

- 23.** Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1 de diciembre de 1993;178(6):2243-7.
- 24.** 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.* 1 de diciembre de 1993;178(6):2249-54.
- 25.** Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell.* 6 de octubre de 2016;167(2):433-443.e14.
- 26.** Melkie ST, Arias L, Farroni C, Jankovic Makek M, Goletti D, Vilaplana C. The role of antibodies in tuberculosis diagnosis, prophylaxis and therapy: a review from the ESGMYC study group. *Eur Respir Rev.* 9 de marzo de 2022;31(163):210218.
- 27.** Tay MZ, Wiehe K, Pollara J. Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses. *Front Immunol* [Internet]. 28 de febrero de 2019 [citado 16 de mayo de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.00332/full>
- 28.** Frontiers | Antibodies as key mediators of protection against *Mycobacterium tuberculosis* [Internet]. [citado 16 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1430955/full>

29. Meier NR, Jacobsen M, Ottenhoff THM, Ritz N. A Systematic Review on Novel Mycobacterium tuberculosis Antigens and Their Discriminatory Potential for the Diagnosis of Latent and Active Tuberculosis. *Front Immunol.* 2018;9:2476.
30. Sharma AK, Dhasmana N, Dubey N, Kumar N, Gangwal A, Gupta M, et al. Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. *Indian J Microbiol.* marzo de 2017;57(1):1-10.
31. Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I. Proteins released from Mycobacterium tuberculosis during growth. *Infect Immun.* junio de 1991;59(6):1905-10.
32. Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, Harboe M, Bennedsen J, Rook GA. Characterization of fibronectin-binding antigens released by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun.* diciembre de 1988;56(12):3046-51.
33. Launois P, DeLeys R, Niang MN, Drowart A, Andrien M, Dierckx P, et al. T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. *Infect Immun.* septiembre de 1994;62(9):3679-87.
34. McShane H, Pathan AA, Sander CR, Keating SM, Gilbert SC, Huygen K, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med.* noviembre de 2004;10(11):1240-4.
35. Demissie A, Leyten EMS, Abebe M, Wassie L, Aseffa A, Abate G, et al. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and

latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Vaccine Immunol CVI. febrero de 2006;13(2):179-86.

36. Jacobs A. The role of antibodies in tuberculosis. 2024 [citado 16 de mayo de 2025]; Disponible en: <http://hdl.handle.net/11427/40943>

37. Maglione PJ, Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Immunol. 2009;39(3):676-86.

38. Glatman-Freedman A. The role of antibody-mediated immunity in defense against *Mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy. Tuberc Edinb Scotl. 2006;86(3-4):191-7.

39. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front Immunol. 2014;5:520.

40. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol. enero de 2008;8(1):34-47.

41. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. Immunol Rev. noviembre de 2015;268(1):25-51.

42. French MA, Tjiam MC, Abudulai LN, Fernandez S. Antiviral Functions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific IgG Antibodies: Effects of Antiretroviral Therapy and Implications for Therapeutic HIV-1 Vaccine Design. Front Immunol. 4 de julio de 2017;8:780.

43. Wu Y, Zhang Z, Chen L, Sun S. Immunoglobulin G glycosylation and its alterations in aging-related diseases. Acta Biochim Biophys Sin. 8 de agosto de 2024;56(8):1221-33.

44. Achkar JM, Chan J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev.* marzo de 2015;264(1):167-81.
45. Kawahara JY, Irvine EB, Alter G. A Case for Antibodies as Mechanistic Correlates of Immunity in Tuberculosis. *Front Immunol* [Internet]. 9 de mayo de 2019 [citado 28 de abril de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.orghttps://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.00996/full>
46. (PDF) Metodología de los tipos y diseños de estudio más frecuentemente utilizados en investigación clínica. ResearchGate [Internet]. [citado 16 de mayo de 2025]; Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/330783393_Metodologia_de_los_tipos_y_disenos_de_estudio_mas_frecuentemente_utilizados_en_investigacion_clinica
47. Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. *Biochem Medica.* 15 de febrero de 2021;31(1):010502.
48. Musich T, Rahman MA, Mohanram V, Miller-Novak L, Demberg T, Venzon DJ, et al. Neutrophil vaccination dynamics and their capacity to mediate B-cell help in Rhesus Macaques. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de octubre de 2018;201(8):2287-302.
49. Nabel GJ. Vaccine for AIDS and Ebola virus infection. *Virus Res.* 1 de abril de 2003;92(2):213-7.

- 50.** McAndrew EG, Dugast AS, Licht AF, Eusebio JR, Alter G, Ackerman ME. Determining the Phagocytic Activity of Clinical Antibody Samples. *J Vis Exp JoVE*. 30 de noviembre de 2011;(57):e3588.
- 51.** Lu LL, Smith MT, Yu KKQ, Luedemann C, Suscovich TJ, Grace PS, et al. IFN- γ -independent immune markers of *Mycobacterium tuberculosis* exposure. *Nat Med*. junio de 2019;25(6):977-87.
- 52.** Chen T, Blanc C, Eder AZ, Prados-Rosales R, Souza ACO, Kim RS, et al. Association of Human Antibodies to Arabinomannan With Enhanced Mycobacterial Opsonophagocytosis and Intracellular Growth Reduction. *J Infect Dis*. 15 de julio de 2016;214(2):300-10.
- 53.** Joosten SA, Meijgaarden KE van, Nonno F del, Baiocchi A, Petrone L, Vanini V, et al. Patients with Tuberculosis Have a Dysfunctional Circulating B-Cell Compartment, Which Normalizes following Successful Treatment. *PLOS Pathog*. 15 de junio de 2016;12(6):e1005687.
- 54.** Li H, Wang XX, Wang B, Fu L, Liu G, Lu Y, et al. Latently and uninfected healthcare workers exposed to TB make protective antibodies against *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 de mayo de 2017;114(19):5023-8.
- 55.** Alter G, Ottenhoff THM, Joosten SA. Antibody glycosylation in inflammation, disease and vaccination. *Semin Immunol*. octubre de 2018;39:102-10.
- 56.** Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation - PubMed [Internet]. [citado 17 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29259496/>

- 57.** Pera A, Campos C, López N, Hassouneh F, Alonso C, Tarazona R, et al. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas*. septiembre de 2015;82(1):50-5.
- 58.** Adekambi T, Ibegbu CC, Cagle S, Kalokhe AS, Wang YF, Hu Y, et al. Biomarkers on patient T cells diagnose active tuberculosis and monitor treatment response. *J Clin Invest*. 1 de mayo de 2015;125(5):1827-38.