



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

- Proyecto de Investigación para Acreditación del Servicio Social -

“Análisis y expresión génica de las moléculas citotóxicas y de la vía del TNF involucradas en la respuesta inmune en pacientes con tuberculosis”.

Alumno: Salazar Molina Abdi Lemuel - (M. 2193069717)

Asesora Interna: Dra. Espinosa Antúnez Violeta Karen - (No. Económico. 42345)

Asesora Externa: Dra. Ramón Luing Lucero De Los Ángeles - (No. Cédula 7889294)

Periodo: 06 de noviembre del 2023 - 06 de mayo del 2024.

Lugar de realización: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. Unidad de Investigación - Laboratorio de Inmunología Integrativa.

Calz. de Tlalpan 4502, Belisario Domínguez Secc. 16, Tlalpan, 14080, CDMX.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente los pulmones y es una de las principales muertes en todo el mundo causada por el bacilo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*), entre otras especies de micobacterias oportunistas potencialmente patógenas para el hombre. **(Natarajan et al., 2020; Kanabalan et al., 2021)**

La tuberculosis activa (TBA) es la forma clínica de la enfermedad caracterizada por la presencia de síntomas, signos y hallazgos radiológicos **(Soto, 2016)**. La tuberculosis latente (TBL) es un estado persistente de respuesta inmune a la estimulación por antígenos de *M. tuberculosis* sin evidencia clínica de enfermedad tuberculosa **(Peña, 2022)**. En 2014, se estimó a nivel mundial que aproximadamente 1,7 mil millones de personas padecen TBL, lo que representa casi una cuarta parte de la población mundial. **(Houben & Dodd, 2016)**. Entre los infectados de TBL, el 5-10% desarrollarán manifestaciones clínicas de TBA dentro de los 2 años posteriores a la exposición. **(Carranza et al., 2020)**

El bacilo es transmitido por vía aérea a través de aerosoles que contienen al agente causal, lo que permite la interacción con los macrófagos alveolares, comenzando la activación y secreción de marcadores inflamatorios como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), que inician la respuesta inflamatoria caracterizada por el reclutamiento de células al sitio de infección. **(San Juan, 2023)**

El TNF es una citocina proinflamatoria que promueve la fagocitosis, apoptosis, proliferación celular, dinámica mitocondrial y de formación de granulomas. Además, el TNF puede expresarse como una proteína de en la superficie celular (tmTNF) o en forma soluble (solTNF). Ambas formas de TNF son bioactivas cuando se unen a uno de sus dos receptores, el TNFR1 y TNFR2 **(Ruiz et al., 2021)**. Cada uno de los receptores activa una señalización específica para participar en la inmunidad protectora contra las micobacterias. El TNFR1 media la inflamación y lesión tisular, incluso señala hacia vida o muerte celular **(Chavez et al., 2019)** y el TNFR2 media

la actividad supresora para atenuar la inflamación excesiva producida por la infección micobacteriana. **(Chavez et al., 2017)**.

Por otra parte, las células NK y los linfocitos T citotóxicos (CTL) pueden eliminar células infectadas a través de la liberación de moléculas citotóxicas, como las granzimas (Gzms), granulinas (GNLYS) y perforinas formadoras de poros (PFNS) que están contenidas en los gránulos de estas células **(Dotiwala et al., 2016)**. Las Gzms y GNLYS inducen la microptosis al generar especies reactivas de oxígeno (ROS); destruyen las defensas antioxidantes microbianas y alteran las vías biosintéticas y metabólicas esenciales para su supervivencia, tales como la síntesis de proteínas, la glucólisis y el ciclo de Krebs **(Dotiwala & Lieberman, 2019)**. Las PFN integran la membrana celular e inducen la formación de poros que provocan lisis osmótica de la célula diana, provocando así la apoptosis. **(Ritter et al., 2022)**

En este proyecto se enfocará a evaluar la expresión de moléculas citotóxicas y de la vía del TNF en pacientes con TBA y TBL a través de la técnica de qPCR en tiempo real. Además, se dará seguimiento a una cohorte de pacientes del protocolo B20-22, aprobado por el comité de Ciencia y Bioética del Instituto, mediante una base de datos integral. Se extraerá células mononucleadas de sangre periférica (CMN) y plasma de individuos con TB, llevando a cabo su crio-preservación de las muestras hasta su uso. Cada participante se recluta por el laboratorio de Inmunología Integrativa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas". Los pacientes firman un consentimiento informado para utilizar el remanente de muestras para fines de investigación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Conocer la expresión a nivel transcripcional de las moléculas citotóxicas involucradas en la respuesta inmune contra la micobacteria para su eliminación, granzima A, granzima B, perforina y granulisina, así como el TNF y sus receptores; nos ayudará a comprender las diferencias que existen en la respuesta inmune de la TBA y TBL, posibilitando la exploración de enfoques terapéuticos más precisos y un mejor control en el tratamiento de la TB.

JUSTIFICACIÓN

La TB sigue siendo un problema de salud a nivel mundial, especialmente en regiones con recursos económicos y de servicios de salud escasos, presentando desafíos en su diagnóstico y tratamiento en su forma activa y latente. Por lo tanto, la evaluación de la expresión génica de la granzima A, granzima B, perforina, granulisina, TNF y sus receptores de unión; así como la destrucción de células infectadas por el *Mycobacterium* en pacientes con TB permitirán comprender los procesos inmunológicos que caracterizan dicha enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la expresión génica de moléculas citotóxicas, del TNF y sus receptores en pacientes con TBA y TBL.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dar seguimiento a una cohorte de pacientes con TBA y TBL.
- Recopilar y analizar los datos clínicos de cada paciente de la cohorte B20-22 para establecer una base de datos integral en Excel.
- Obtener células mononucleares (CMNs) de los pacientes y crio-preservarlas.
- Realizar la extracción y cuantificación de RNA de las CMN de pacientes con TB.
- Evaluar la expresión de la granzima A, granzima B, perforina, granulicina, TNF, TNFR1 y TNFR2 mediante qPCR en tiempo real.

ANTECEDENTES / MARCO TEORICO

El informe mundial sobre la TB presentado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2023, registró una recuperación significativa posterior a la pandemia causada por COVID, en los servicios de diagnóstico y tratamiento de la TB a escala mundial al diagnosticar 7,5 millones de casos en 2022, siendo la cifra más alta desde que la OMS comenzó su vigilancia mundial en 1995. Este aumento se atribuye a que las personas tienen acceso a la prestación de servicios de salud para diagnosticar la infección, mismos que se vieron afectados debido a la pandemia de COVID-19. **(OMS, 2023).**

La TB está vinculada a factores de riesgo significativos como la edad avanzada, desnutrición, tabaquismo, abuso de alcohol. Sin embargo, está relacionada a varias enfermedades como silicosis, linfomas, leucemia, hemofilia, insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus y VIH/SIDA por lo que, es crucial unir la investigación básica y clínica para mejorar las terapias adyuvantes y resultados en pacientes con TB. **(Tellez et al., 2021)**

La aparición de formas de *M. tuberculosis multirresistentes* (MDR-TB), *extremadamente resistentes* (XDR-TB), junto a la carencia de vacunas efectivas y pruebas de diagnóstico rápidas y precisas, ha comprometido gravemente al control de la TB por la resistencia a los dos fármacos antituberculosos más potentes, la isoniazida y la rifampicina **(Sultana et al., 2021)**. La MDR-TB sigue representando una grave crisis de salud pública. En 2022 se estimó que alrededor de 410,000 personas estaban afectadas, pero solo dos de cada cinco personas tenían acceso al tratamiento. Sin embargo, la probabilidad de que un individuo desarrolle TBA después de la infección es solo del 10%. **(Zhai et al., 2019; OMS, 2023)**

En la patogénesis de la infección tuberculosa intervienen diferentes células y citocinas, así como la capacidad de huésped para responder frente a la micobacteria. Los macrófagos alveolares y las células dendríticas (CD) inician la fagocitosis, estas células son presentadoras de antígeno que reconocen patrones

moleculares asociados a patógenos (PAMP) y que a su vez que unen a los receptores tipo Toll (TLR), e inician una cascada de señalización para la expresión de citocinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, $IFN-\gamma$, e IL-1, IL-6 que inducen el reclutamiento de células al sitio de infección. **(Bonavida et al., 2022)**

El TLR2 reconoce lipoproteínas, el TLR4 a lipoarábino-manano (LAM) y lipopolisacárido (LPS) en bacterias Gram negativas y el TLR9 al ADN bacteriano. La cantidad relativa de estas citocinas en el sitio de infección determina la magnitud de la respuesta inflamatoria y la evolución de la enfermedad tuberculosa. **(De Martino et al., 2019; San Juan, 2023)**

Los macrófagos infectados migran al intersticio pulmonar, formando el granuloma que brinda un entorno propicio para la supervivencia de la micobacteria **(Gern et al., 2021; Cohen et al., 2022)**, utilizado como nicho para su proliferación y diseminación que le permite persistir muchos años durante la TBL **(Ndlovu & Marakalala, 2016)**. La micobacteria es internalizada por macrófagos en los fagosomas, que deben madurar al fusionarse con lisosomas para crear un entorno ácido que contenga a la micobacteria. **(Sia & Rengarajan, 2019; Lee et al., 2020)**

Dentro del fagolisosoma, hay niveles elevados de ROS y de nitrógeno (RNS), péptidos antimicrobianos y privación de hierro **(Pacl et al., 2018)**. Sin embargo, la micobacteria puede sobrevivir utilizando diversas estrategias para suprimir cada etapa de maduración del fagosoma dentro de las células huésped: la modulación de la fusión fagosoma-lisosoma y la inhibición de la acidificación del fagosoma. Intervienen en la producción de ROS, interfiere en la presentación antigénica; regula la activación y diferenciación de linfocitos T. **(Melly & Purdy, 2019; Zhai et al., 2019)**

Algunas micobacterias escapan del sitio inicial de infección y migran hacia los ganglios linfáticos regionales, donde son recapturadas por otros macrófagos. Esto lleva a ciclos de replicación micobacteriana y rotura celular, y eventualmente, algunas entran en la circulación. Como resultado, las micobacterias se dispersan y

establecen nuevas lesiones debido a los bajos niveles de inmunidad adquirida (**San Juan, 2023**).

La inmunidad protectora en la TB depende de la liberación coordinada de moléculas efectoras citolíticas de las células T efectoras y de la posterior destrucción de las células diana infectadas asociada a los gránulos. Diversas poblaciones de linfocitos están implicadas en la respuesta inmune; las células NK, las cooperadoras CD4⁺ (Th1, Th2 y Th17), y las citotóxicas CD8⁺ (**Chai et al., 2020**). La citotoxicidad ejecutada por las células NK y por los linfocitos T CD8⁺ implica la liberación de moléculas citotóxicas como Gzms y PFN desde sus gránulos. Estos gránulos son estructuras con un núcleo electrodensito y poseen un pH ácido. La PFN crea poros en la membrana de la célula blanco, permitiendo la entrada a la Gzm para inducir la muerte celular programada. (**Prager & Watzl, 2019; Peña, S/F**). La granulicina puede desencadenar apoptosis directamente y atacar la membrana celular micobacteriana dentro de los endosomas de los macrófagos infectados. La granulicina también produce lesiones en la pared celular, promueve la lisis osmótica bacteriana y reduce el crecimiento de la micobacteria de manera dependiente de la perforina (**Andersson et al., 2007**). Por lo tanto, parece crucial la expresión coordinada de funciones efectoras como la perforina citolítica y la granulicina antimicrobiana para controlar la TB.

En un estudio desarrollado por Andersson y colaboradores investigaron la expresión de granzima A, perforina y granulicina a nivel unicelular en tejido pulmonar criopreservado de pacientes con enfermedad tuberculosa crónica y progresiva mediante qPCR en tiempo real. Se encontró una disminución en la expresión de perforina y granulicina en las células T CD3⁺ en las lesiones de tuberculosis en comparación con el tejido pulmonar sano. Además, las células T CD8⁺ que expresan estas moléculas son escasas en los granulomas. Sin embargo, se observó una regulación positiva de las células T CD3⁺ que expresan granzima A. Estos hallazgos sugieren una regulación insuficiente de la coexpresión de perforina y granulicina en las células T CD8⁺ en la tuberculosis crónica sintomática. (**Andersson et al., 2007**)

Las personas sin infección y TBL tienen células T CD8+ en la sangre que producen más granzima B por célula que aquellos con TBA (**Silva et al., 2014**). Esto sugiere que los niveles bajos de granzima B en células T podrían aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad. Además, aquellos que responden rápidamente al tratamiento farmacológico tienden a tener menos granzima B soluble en el suero en comparación con los que responden más lentamente (**Brahmbhatt et al., 2006**). Estos hallazgos sugieren que, aunque las células T citotóxicas son cruciales para controlar la TB, un exceso de granzima B extracelular puede ser un indicador negativo del pronóstico. (**Matilla et al., 2015**)

Por otra parte, el TNF es una citoquina inflamatoria pleiotrópica producida y secretada principalmente por células monocíticas y linfocitos (**Zhu et al, 2020**). Es responsable de la formación y del mantenimiento de la integridad del granuloma al restringir el crecimiento de la micobacteria dentro de los macrófagos y prevenir la necrosis del granuloma. Una producción adecuada de TNF contribuye a la defensa del huésped contra la TB; sin embargo, una deficiencia o un exceso podría provocar una respuesta inmunopatológica no deseada (**Zhou et al, 2017**).

Se han implicado varios mecanismos efectores según las interacciones de sus dos formas activas, TNF soluble (solTNF) y TNF transmembrana (tmTNF), con sus receptores TNFR1 y TNFR2. El TNFR1 participa en la citotoxicidad, mientras que TNFR2 desempeña un papel en la citotoxicidad y la proliferación. (**Ruiz et al, 2021**).

En un estudio realizado por Algood y colaboradores concluyeron que el TNF influye en la expresión de quimiocinas de macrófagos infectados por la micobacteria, lo que conduce a cambios en la formación de granulomas tanto in vivo como in vitro. Estos hallazgos permiten comprender cómo el TNF es crucial para controlar la TBL en humanos, destacando la necesidad de considerar las terapias antiinflamatorias o antiquimiocinas en el tratamiento de la TB (**Algood et al, 2004**).

El análisis de la actividad de la TNF en el suero de pacientes con TB ha demostrado que los resultados clínicos más graves en pacientes con TB están correlacionados

con niveles más altos de TNF en sangre. Andrade y colaboradores verificaron esta correlación con diferentes formas clínicas de TB con respecto a un grupo control. Se concluyó que existía una correlación entre los niveles séricos de TNF y los hallazgos radiológicos, la pérdida de peso, la prueba cutánea y la gravedad clínica de los pacientes. Sin embargo, los niveles altos de TNF no son un indicador de un resultado clínico más grave (**Andrade et al, 2008**).

Rakotosamimanana y colaboradores, mostraron que la micobacteria puede estimular la muerte apoptótica en un subconjunto de células T, al desencadenar la liberación de grandes cantidades de TNF, al tiempo que preserva su célula huésped al inhibir la respuesta al TNF y aumentar la producción de factores antiapoptóticos. Su hipótesis fue desarrollada en una cohorte de pacientes con TB de Madagascar, usando qPCR para evaluar la expresión del TNFR1, TNFR2, FLICE (enzima convertidora de interleucina-1-FADD) y FLIP (Proteína inhibidora de caspasa-8). En esta investigación se concluyó que la expresión de genes apoptóticos, como FLIP y TNFR2, está vinculada a cambios en la distribución de células inmunes en individuos infectados con TB. Esta investigación sugiere posibles marcadores y patrones que podrían vincularse con el curso de la enfermedad, lo que podría tener implicaciones significativas en el diagnóstico y tratamiento de la TB. (**Rakotosamimanana et al, 2013**).

La evaluación de la expresión génica de TNF, IL-6 e IRAK1 mediante qPCR en células mononucleares de 33 pacientes con TB comparado con 10 individuos sanos reveló diferencias significativas. Los niveles transcripcionales de TNF e IL-6 fueron más altos, mientras que el de IRAK1 fue más bajo en el grupo de TB que en el grupo control. Además, se observó una correlación positiva entre la expresión de los genes TNF e IL-6. Al analizar los parámetros clínicos, se detectaron altos niveles de mRNA de TNF en pacientes que habían recibido tratamiento durante más de 2 meses en comparación con aquellos que habían recibido el tratamiento en un lapso menor (**Buha et al, 2019**).

Por otra parte, un estudio reciente por De Sousa y colaboradores, se evaluó los niveles de expresión génica de la asociación del genotipo TNF-308G/A y el polimorfismo de la IL-10 (819C/T) en TB pulmonar y extrapulmonar a través de la qPCR. Se demostró que bajos niveles de expresión génica de TNF en pacientes con TB, presenta una mayor frecuencia del alelo polimórfico de TNF-308G/A comprobando así que esta asociación tiene una influencia menor en el desarrollo de la enfermedad de TB en comparación con los mecanismos involucrados en la activación del proceso inflamatorio resultante de la infección. Por lo tanto, se cree que la producción inadecuada de TNF promueve la formación de un microambiente antiinflamatorio, favoreciendo la persistencia de la micobacteria en el huésped, contribuyendo al establecimiento de la TB pulmonar **(De Sousa et al, 2023)**.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Reclutamiento

La evaluación de la expresión génica de las moléculas mencionadas se realizó en una cohorte de participantes del protocolo B20-22 (actualmente se realiza el reclutamiento), así como de participantes que fueron reclutados previamente en el Laboratorio de inmunología Integrativa del INER que acuden al servicio de la Clínica de TB del instituto. Los sujetos se clasificaron en 3 grupos: 1) TBA, que fueron identificadas a través de pruebas de crecimiento microbiológico (baciloscopia y de cultivo) o por métodos moleculares (GenXpert y PCR). 2) Personas con contacto y personal de salud expuesto a TB y 3) TBL, los cuales se identifican por pruebas sanguíneas de PPD y cuantificación de IFN- γ (Quantiferon-TB gold in tube) realizadas por la misma institución. Además, se incluyó un grupo de personas sanas mayores de 18 años como control.

- Dentro del protocolo B20-22, se reclutaron nuevos participantes considerando variables para el desarrollo del estudio, como la edad, género, datos clínicos y resistencia a fármacos contra TB; drogo sensibles (DS) y MDR. Además, existen criterios de inclusión, exclusión y eliminación de sujetos.

- **Criterios de inclusión:** 1) Personas mayores de 18 años con un primer diagnóstico de TB, cuyo diagnóstico confirme la presencia del complejo *M. tuberculosis* en cualquier muestra biológica de pulmón (baciloscopias o métodos moleculares). 2) Personal sanitario expuesto a micobacterias y 3) Personas sanas que convivan con una persona diagnosticada de TBA.

- **Criterios de exclusión:** 1) Sujetos con enfermedades neoplásicas. 2) Sujetos con infección por VIH, enfermedades reumatológicas en tratamiento con inmunosupresor y 3) Sujetos con COVID-19.

- **Criterios de eliminación:** 1) Sujetos que retiran su consentimiento para participar en este estudio y 2) Pacientes con datos de análisis clínicos y de laboratorio incompletos.

2) Estudios de laboratorio

El laboratorio clínico del instituto realizó a cada paciente del grupo TBA estudios de química sanguínea, electrolitos séricos, perfil de funcionamiento hepático, biometría hemática y tiempos de coagulación. Al grupo de contactos y personal de salud expuestos a TB; química sanguínea, biometría hemática y hemoglobina glicosilada. El laboratorio de microbiología es el encargado de realizar las baciloscopias y los cultivos, así como de las pruebas de Quantiferon-TB.

Con base a estas pruebas, se organizó y se construyó una base de datos integral en Excel en donde se concentran los datos personales, datos demográficos, antecedentes clínicos (enfermedades o padecimientos/síntomas), los resultados de las pruebas de laboratorio y la evolución de su tratamiento contra la TB.

3) Obtención de CMNs

El aislamiento de CMNs se realizó mediante la técnica del gradiente de densidad de Ficoll. El procedimiento parte de la toma de muestras de sangre periférica de cada paciente, recolectada en tubos BD-Vacutainer (EDTA). Inicialmente, se procedió a la separación del plasma mediante centrifugación a 1000 x g durante 10 min a temperatura ambiente (25 °C - 30 °C) para un rotor de ángulo variable, o 15 min con un rotor de ángulo fijo, manteniendo una aceleración de 9 y desaceleración de 6.

Una vez separado el plasma, se retiró y se almacenó en alícuotas a -20°C. La muestra de sangre restante se diluyó en una proporción 1:1 con PBS estéril frío. Se preparó un gradiente de densidad con Ficoll en una relación de 3:1 (muestra: Ficoll). La muestra diluida se añadió suavemente al tubo con Ficoll y se centrifuga a 550 x g durante 30 minutos a 20°C, con una aceleración de 9 y desaceleración de 3. Posteriormente, se realizaron dos lavados para eliminar eritrocitos y plaquetas,

utilizando PBS 1X y centrifugando a 300 x g durante 10 min cada vez, manteniendo una aceleración de 9 y una desaceleración de 4 como máximo. Después de cada centrifugación, el sobrenadante se decantó cuidadosamente.

En el último lavado, se realizó el conteo de número de células y se determinó su viabilidad. Luego, se centrifugaron nuevamente las células a 300 x g durante 10 min para obtener el pellet celular, que se resuspendió en el medio de preservación y/o mantenimiento adecuado a razón de 1 mL por cada 10×10^6 de células como máximo. Al finalizar, las células se crio-preservaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

4) Extracción de RNA total:

Para la extracción de RNA total de las muestras de pacientes TBA y TBL de la cohorte B20-22, se utilizó el kit comercial RNeasy Mini Kit de Qiagen que contiene el buffer RLT, RW1, RPE. Además, β -mercaptoetanol, etanol al 70% y el conjunto RNasa-Free DNasa Set de Qiagen (DNasa I / Solución RDD). Se siguieron las recomendaciones para el manejo del RNA, material nuevo, estéril y libre de nucleasas; limpieza en las superficies de trabajo y uso de guantes de nitrilo para evitar contaminaciones.

El paquete celular se resuspendió en buffer RLT con β -mercaptoetanol, usando 350 μ L de buffer para $< 5 \times 10^6$ células/mL y 600 μ L para una cantidad entre 5×10^6 y 10×10^6 células/mL. A continuación, en 500 μ L de lisado se añadieron 200 μ L de buffer RLT y un volumen igual de etanol al 70%, mezclando bien con vortex. Esta mezcla (700 μ L) se transfirió a una columna RNeasy mini spin y se centrifugó a $\geq 8,000$ x g durante 15 segundos. El filtrado fue descartado y se procedió a un lavado con 350 μ L de la solución RW1, centrifugando a $\geq 8,000$ x g por 15 segundos. Para la eliminación del DNA génomico contaminante, se preparó una mezcla de DNasa I con solución RDD (10 μ L de DNasa I y 70 μ L de solución RDD por cada reacción), la cual se mezcla suavemente y se añade directamente a la columna. Esta mezcla se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente (20-30 °C). Después de la

incubación, se realizó nuevamente un lavado con 350 μ L de solución RW1. A continuación se realizaron 2 lavados con 500 μ L de la solución RPE cada uno, centrifugando a $\geq 8,000 \times g$ por 15 segundos y posterior a estos lavados, la columna se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL y se centrifugó a $10,000 \times g$ por 1 minuto para secarla completamente, es decir para eliminar restos de la solución RPE. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL y se procedió a la elución del RNA, añadiendo 35 μ L de agua libre de nucleasas y se centrifugó a $10,000 \times g$ por 1 minuto. Este paso se repitió dos veces para maximizar la recuperación del RNA. El RNA extraído se almacenó a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$, para su cuantificación posterior.

5) Cuantificación de RNA/DNA:

La calidad y concentración del RNA total de las muestras de TBA y TBL de la cohorte B2022 se analizarán mediante fluorescencia utilizando el kit comercial QubitTM assay kit que contiene el reactivo QubitTM (RNA - HS/DNA - Br), el buffer QubitTM (RNA - HS/DNA - Br) y los estándares para RNA y DNA. La medición se realiza en el Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se preparó un número adecuado de reacciones dependiendo las muestras a cuantificar. Para la solución de trabajo de RNA, se mezcla 1 μ L de QubitTM Reagent (RNA-HS) con 199 μ L de QubitTM Buffer (RNA-HS) para una dilución de 1:200, ajustada según el número de reacciones necesarias.

Adicionalmente se prepararon los estándares de RNA I y II en tubos assay QubitTM de 0.5 mL, agregando 10 μ L del estándar I y completando con 190 μ L de la solución de trabajo para la dilución 1:200 μ L, repitiendo el mismo procedimiento para el estándar II, incubando por 2 minutos. Las muestras de RNA se prepararon agregando 1 μ L de muestra de RNA y 199 μ L de la solución de trabajo en tubos assay QubitTM de 0.5 mL para completar la dilución. El mismo procedimiento fue realizado para preparar las muestras y los estándares de DNA.

Se procedió a determinar la concentración de los ácidos nucleicos, primero leyendo cada uno de los estándares en el equipo para obtener una curva patrón y después se leyeron cada una de las muestras de RNA. Finalmente, el procedimiento de lectura se repite para los estándares y las muestras de DNA para conocer la calidad de extracción de RNA total de cada una de las muestras de TBA y TBL.

6) Evaluación de la expresión génica mediante qPCR

A partir de las células preservadas con la solución DNA/RNA shield se obtuvo el RNA total y se sintetizó el cDNA para la evaluación de la expresión a nivel de RNAm de granzima A, granzima B, perforina y granulisina, utilizando ensayos prediseñados de sondas TaqMan y el sistema de detección para qPCR StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). *Actina B* y *18S* fueron usados como controles endógenos en qPCR, debido a que son genes con expresión constitutiva y se mantiene relativamente constante en una amplia gama de condiciones experimentales, lo que los hace adecuados como controles de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se reclutaron 29 pacientes que otorgaron su consentimiento para participar en el protocolo de investigación B2022; (8 de TBA y 21 contactos de pacientes con TB; de los cuales 9 resultaron QTF (+), diagnosticados con TBL). Los pacientes fueron clasificados en 3 grupos: TBA, contactos expuestos y TBL, con base a los resultados de la prueba de QTF. Así mismo, se estableció una base de datos integral en Excel (ver tabla 1 y tabla 2) para cada grupo. Se tomaron muestras de sangre periférica en tubos BD-Vacutainer (EDTA) para posteriormente obtener CMNs por medio del gradiente de densidad de Ficoll.

Tabla 1. Características demográficas y resultados de laboratorio de pacientes con TBA.

CÓDIGO	SEXO	EDAD	CMN (células/ml)	PLASMA	SUERO	DNA	RNA	PRUEBAS REALIZADAS	
								Baciloscopia	GenXpert
TA-1	Hombre	82	1 vial=8x10 ⁶	4 viales	2 viales	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	POSITIVA	POSITIVA
TA-2	Hombre	49	2 viales=9.5x10 ⁶	3 viales	1 viales	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	POSITIVA	POSITIVA
TA-3	Hombre	52	1 vial=6x10 ⁶	3 viales	1 vial	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	POSITIVA	POSITIVA
TA-4	Hombre	39	2 viales=12.6x10 ⁶	3 viales	2 viales	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	No se realizó	POSITIVA
TA-5	Mujer	21	2 viales=12x10 ⁶	3 viales	2 viales	2 viales=1x10 ⁶	2 viales=1x10 ⁶	No se realizó	POSITIVA
TA-6	Mujer	76	1 vial=9.5x10 ⁶	5 viales	1 vial	1vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	NEGATIVA	POSITIVA
TA-7	Hombre	51	1 vial=10x10 ⁶	3 viales	2 viales	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	POSITIVA	POSITIVA
TA-8	Mujer	49	1 vial=8x10 ⁶	1 vial	2 viales	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	No se realizó	POSITIVA
TA-9	Mujer	62	2 viales=9.6x10 ⁶	4 viales	1 vial	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	No se realizó	POSITIVA
TA-10	Hombre	57	2 viales=9x10 ⁶	6 viales	1 vial	1 vial=1.5x10 ⁶	1 vial=1.5x10 ⁶	No se realizó	POSITIVA

Tabla 2. Características demográficas y resultados de laboratorio de pacientes con TBL y contactos.

CÓDIGO	SEXO	EDAD	CMN	PLASMA	SUERO	DNA	RNA	QuantiFERON
TL-1	Mujer	51	1 vial= 10x10 ⁶ y 1 vial=6x10 ⁶	3 viales	2 viales	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	Positiva
TL-2	Mujer	47	1 vial= 10x10 ⁶ , 2 viales= 7x10 ⁶	5 viales	2 viales	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	Negativa
TL-3	Hombre	18	1 vial= 10x10 ⁶ y 1 vial=5x10 ⁶	3 viales	1 vial	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	Positiva
TL-4	Mujer	70	2 viales= 10x10 ⁶	3 viales	1 vial	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	Positiva
TL-5	Mujer	47	1 vial= 7x10 ⁶	2 viales	1 vial	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	Negativa
TL-6	Hombre	35	1 vial= 9.3x10 ⁶	3 viales	2 viales	1 vial= 1.5x10 ⁶	1 vial= 1.5x10 ⁶	Positiva
TL-7	Mujer	58	2 vial= 10.2x10 ⁶ c/d	1 vial	1 vial	1 vial=1.5x10 ⁶	1 vial=1.5x10 ⁶	Negativa
TL-8	Mujer	58	1 vial= 7.9x10 ⁶	3 viales	2 viales	1 vial= 1.9x10 ⁶	1 vial= 1.9x10 ⁶	Positiva
TL-9	Hombre	35	1 vial= 2.75x10 ⁶	3 viales	2 viales	1 vial=2.15x10 ⁶	1 vial=2.15x10 ⁶	Negativa
TL-10	Mujer	37	1 vial= 10.9x10 ⁶	3 viales	2 viales	1 vial=1x10 ⁶	1 vial=1x10 ⁶	Negativa

A partir de las células preservadas con la solución DNA/RNA shield se obtuvo el RNA total y se sintetizó el cDNA para la evaluación de la expresión a nivel transcripcional de granzima A, granzima B, perforina, granzima B utilizando ensayos prediseñados de sondas TaqMan y el sistema de detección para qPCR StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Se hizo la validación de los genes con una dilución serial de 1:2, considerando a la *actina B* y *18S* como genes endógenos. Se diseñaron las placas de 96 pozos para TBA y TBL, teniendo un control de sanos (Mix HD) que resultaron negativos en la prueba de QTF (ver tabla 3), comparando los 3 grupos de la cohorte B2022 para conocer los niveles de expresión de estos genes dependiendo del estatus de la enfermedad con respecto al control de sanos (ver figura 1).

Previamente se prepararon los Cocteles Mix para cada ensayo Taqman, incluyendo los endógenos dependiendo del número de reacciones. Cada muestra se realizó por duplicado a una dilución 1:4.

Tabla 3. Ejemplo representativo del diseño para la validación de ensayos con sondas Taqman.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Grupo MIX HD											
Actina B	B											
18S	C											
Granzima A	D											
Granzima B	E											
Perforina	F											
Granzima B	G											
	H											

Nota: La fila A se consideró para el grupo Mix HD; B-H para el cDNA de los pacientes TBA y TBL.

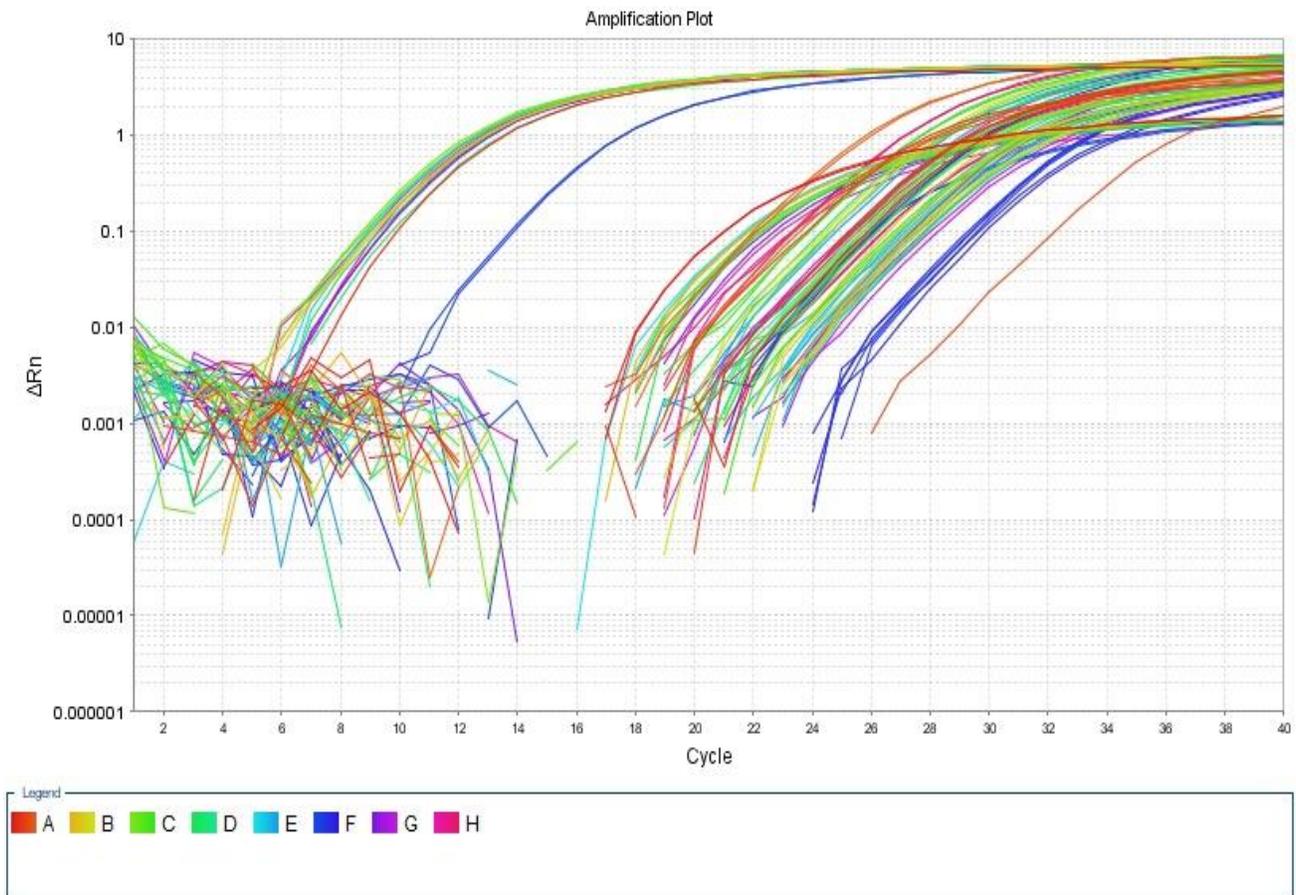


Figura 1. Ejemplo representativo de una curva de amplificación de qPCR en tiempo real para la evaluación de la expresión génica de las moléculas citotóxicas.

El valor de C_T (*cycle threshold*) representa el número de ciclos de amplificación necesarios para que la señal de fluorescencia de la muestra alcance un umbral predefinido. El valor de C_T de los endógenos (*Actina B* y *18 S*) puede variar dependiendo del tipo de muestra, así como de las condiciones experimentales (ver figura 2). Sin embargo, dependiendo de la expresión de cada gene, si los valores de C_T son relativamente bajos, indica una mayor expresión. Un valor de C_T bajo indica que el objetivo de amplificación estaba presente en la muestra en una cantidad relativamente alta al inicio del ciclo de amplificación. Esto podría ser indicativo de una alta concentración de la secuencia de interés en la muestra inicial. Por otro lado, un valor de C_T alto sugiere que el objetivo de amplificación estaba presente en

la muestra inicial en una cantidad relativamente baja. Esto podría ser indicativo de una baja concentración de la secuencia de interés en la muestra inicial (ver figura 3 y 4).

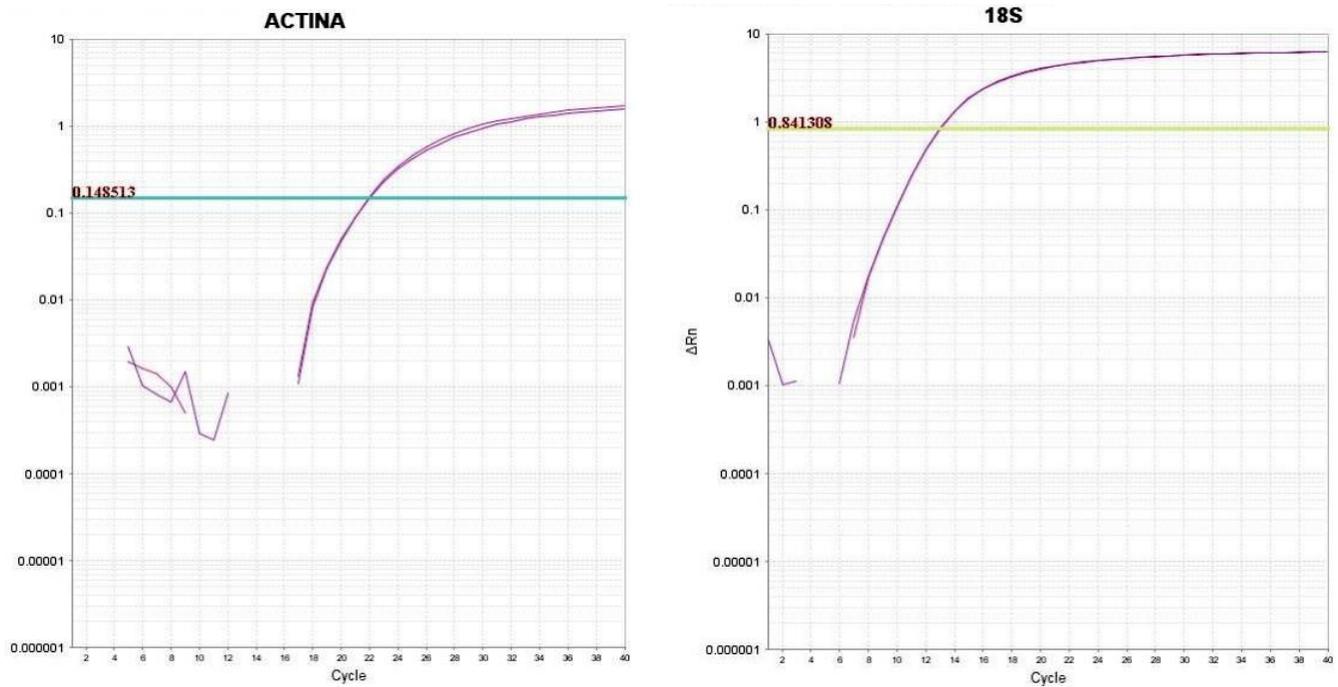


Figura 2. Gráficas de amplificación representativas de los genes endógenos, Actina B y 18s en qPCR en tiempo real.

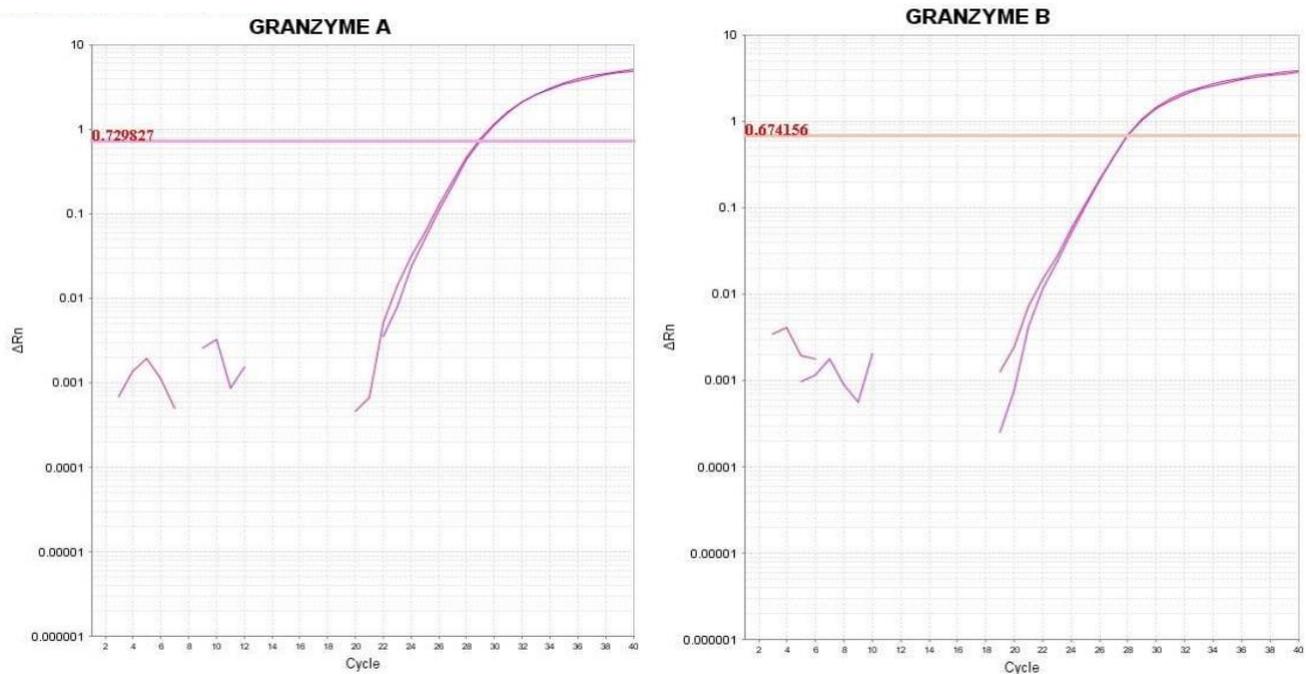


Figura 3. Gráficas de amplificación representativas de los genes granzima A y granzima B en qPCR en tiempo real.

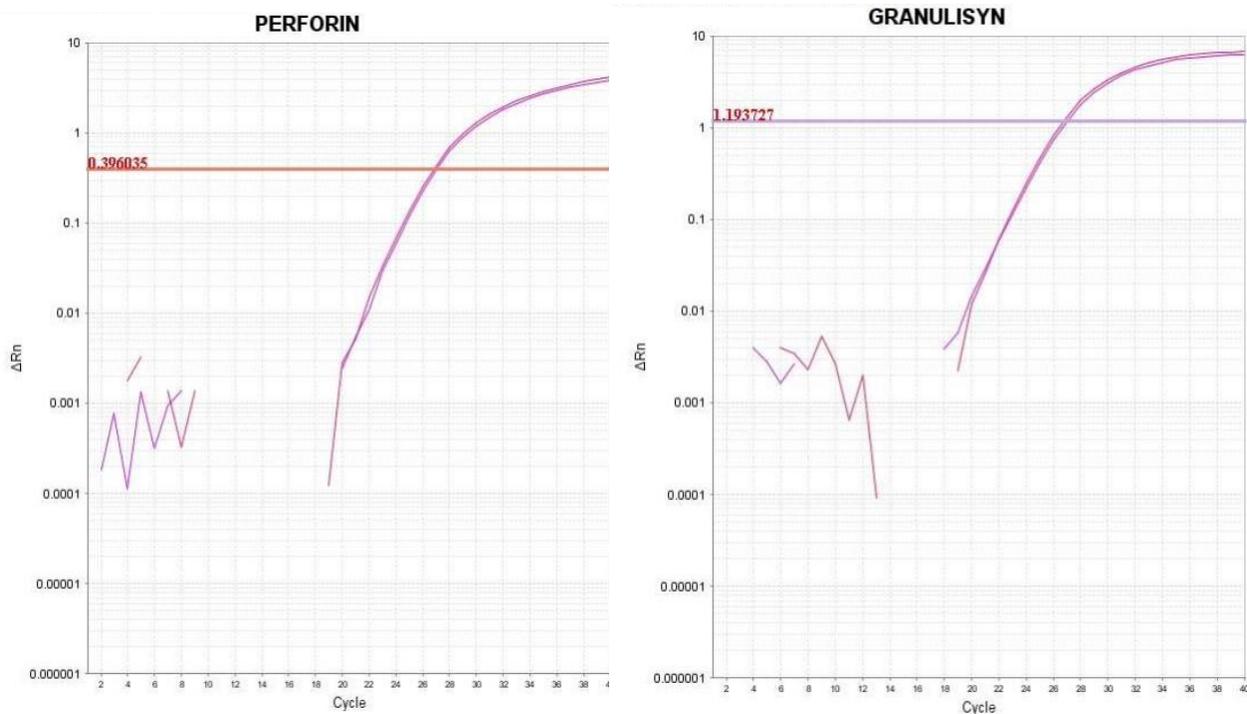


Figura 4. Gráficas de amplificación representativas de los genes perforina y granulisina en qPCR en tiempo real.

Los resultados de C_T de los endógenos y de las sondas Taqman, fueron analizados y obtenidos por medio "The StepOne™ Software v2.0.2 patch" (ver figura 5).

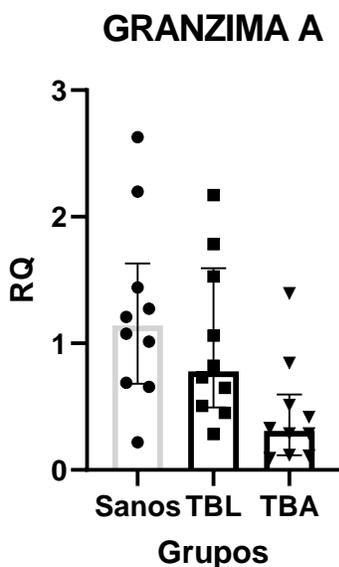
Sample	Target	Task	C_T
mix cDNA TB (5.5)	ACTINA	UNKNOWN	21.9723
mix cDNA TB (5.5)	18S	UNKNOWN	12.9598
mix cDNA TB (5.5)	GRANZYME A	UNKNOWN	28.9807
mix cDNA TB (5.5)	GRANZYME B	UNKNOWN	27.9484
mix cDNA TB (5.5)	PERFORIN	UNKNOWN	26.9831
mix cDNA TB (5.5)	GRANULISYN	UNKNOWN	26.9775
mix cDNA TB (5.5)	ACTINA	UNKNOWN	21.9036
mix cDNA TB (5.5)	18S	UNKNOWN	12.9705
mix cDNA TB (5.5)	GRANZYME A	UNKNOWN	28.8933
mix cDNA TB (5.5)	GRANZYME B	UNKNOWN	27.9663
mix cDNA TB (5.5)	PERFORIN	UNKNOWN	26.7901
mix cDNA TB (5.5)	GRANULISYN	UNKNOWN	26.7301

Figura 5. Valor de C_T de los genes endógenos y sondas Taqman en qPCR en tiempo real.

Expresión génica

Se evaluó la expresión génica de las moléculas citotóxicas utilizando qPCR en tres grupos: individuos sanos, TBA y TBL, considerando una n=10 por cada grupo. Los valores de expresión relativa (RQ) se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para comparar si las medias de dos o más muestras son significativamente diferentes.

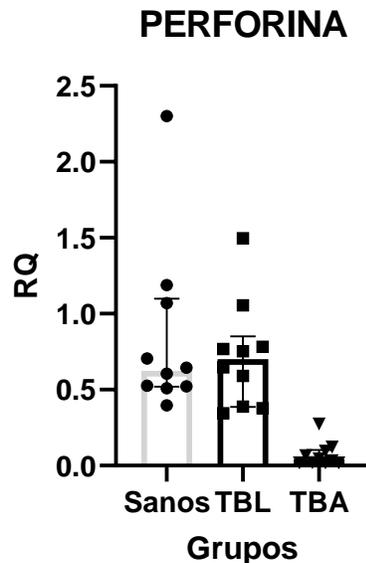
Granzima A: El análisis estadístico ANOVA reveló una diferencia significativa en la expresión de granzima A entre los individuos sanos vs TBA. No se observaron diferencias significativas en la expresión de granzima A entre individuos sanos vs TBL, ni TBL vs TBA. (ver gráfica 1)



Gráfica 1. Expresión génica de la granzima A en TBA y TBL con respecto a los sanos.

La expresión de esta granzima A en individuos sanos muestra una actividad eficiente del sistema inmunológico en comparación con la TBL y TBA, la cual puede reflejar una capacidad de vigilancia y respuesta inmunológica óptima en los individuos que no presentan esta patología. Sin embargo, la baja expresión en pacientes con TBA puede indicar un posible “agotamiento” inmunológico durante la

se “conserva” cierta capacidad de respuesta inmune similar. Sin embargo, se observó una diferencia significativa entre los grupos TBL y TBA, lo que sugiere una posible alteración en la expresión de perforina asociada con la transición de la TBL a TBA, siendo un indicativo de un compromiso progresivo en la respuesta inmune a medida que la infección por TB se vuelve más activa. (ver gráfica 3)

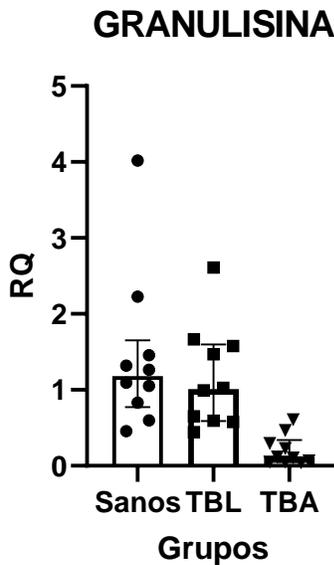


Gráfica 3. Expresión génica de la perforina en TBA y TBL con respecto a los sanos.

Granulisinina: Los resultados de la qPCR revelaron una expresión significativa de granulisinina en el grupo de sanos vs TBA, como de TBL vs TBA. (ver gráfica 4)

La diferencia significativa observada entre el grupo sano vs TBA indica una baja expresión de la granulisinina la cual podría deberse a la progresión de la TB, lo que podría comprometer la capacidad del sistema inmunológico para controlar la replicación bacteriana y limitar la progresión. Por otro lado, la diferencia significativa entre los grupos TBL y TBA sugiere una alteración en la expresión de granulisinina asociada con la transición de la TBL a TBA, mostrando cambios en la respuesta inmune a medida que la infección va progresando. Sin embargo, la falta de diferencia significativa entre el grupo de sanos y TBL podría indicar que, a nivel de expresión génica, los individuos con TBL conservan una capacidad de respuesta

inmune similar, por lo que se puede sugerir que la expresión de granulicina no se ve significativamente afectada durante el estado de latencia de la TB.



Gráfica 4. Expresión génica de la granulicina en TBA y TBL con respecto a los sanos.

CONCLUSIÓN

La baja expresión génica de estas moléculas citotóxicas en los pacientes con TBA evaluadas en este proyecto, sugiere que puedan servir como marcadores distintivos en comparación con la TBL. Esta diferenciación nos permitiría conocer el estatus de la enfermedad, lo cual es relevante para la salud general y la respuesta inmunológica de cada paciente; posibilitando la exploración de enfoques terapéuticos más precisos y un mejor control en el tratamiento de la TB, así como implementar estrategias preventivas en pacientes con riesgo de progresar de TBL a TBA, optimizando la atención sanitaria frente a la TB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Algood H. M., Lin P. L., Yankura D., Jones A., Chan J., & Flynn J. L. (2004). "*TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b+ cells in vivo during Mycobacterium tuberculosis infection*". *Journal of immunology*, 172 (11), 6846-6857.
- Andersson J., Samarina A., Fink J., Rahman S., & Grundström S. (2007). "*Impaired expression of perforin and granulysin in CD8+ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis*". *Infection and immunity*, 75(11), 5210–5222.
- Andrade Júnior D. R., Santos S. A., Castro I. D, & Andrade D. R. (2008). "*Correlation between serum tumor necrosis factor alpha levels and clinical severity of tuberculosis.*" *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 12(3), 226-233.
- Buha I., Škodrić-Trifunović V., Adžić-Vukičević T., Ilić A., Blanka-Protić A., Stjepanovic M., Anđelković M., Vreća M., Milin-Lazović J., Spasovski V., & Pavlović S. (2019). "*Relevance of TNF- α , IL-6 and IRAK1 gene expression for assessing disease severity and therapy effects in tuberculosis patients*". *Journal of infection in developing countries*, 13(5), 419-425.
- Bonavida V., Frame M., Nguyen K. H., Rajurkar S., & Venketaraman V. (2022). "*Mycobacterium tuberculosis: Implications of ageing on infection and maintaining protection in the elderly*". *Vaccines*, 10(11), 1892.
- Brahmabhatt S., Black G. F., Carroll N. M., Beyers N., Salker F., Kidd M., Lukey P. T., Duncan K., van Helden P., & Walzl G. (2006). "*Immune markers measured before treatment predict outcome of intensive phase tuberculosis therapy*". *Clinical and experimental immunology*, 146(2), 243–252.
- Carranza C., Pedraza-Sanchez S., de Oyarzabal-Mendez E., & Torres M. (2020). "*Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives*". *Frontiers in immunology*, 11, 2006.

- Chai Q., Lu Z., & Liu C. H. (2020). "Host defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*". Cellular and molecular life sciences: CMLS, 77(10), 1859–1878.
- Chavez-Galan L., Vesin D., Blaser G., Uysal H., Benmerzoug S., Rose S., Ryffel B., Quesniaux V. F. J., & Garcia I. (2019). "Myeloid cell TNFR1 signaling dependent liver injury and inflammation upon BCG infection". Scientific reports, 9(1), 5297.
- Chavez-Galan L., Vesin D., Uysal H., Blaser G., Benkhoucha M., Ryffel B., Quesniaux V. F. J., & Garcia I. (2017). "Transmembrane Tumor Necrosis Factor Controls Myeloid-Derived Suppressor Cell Activity via TNF Receptor 2 and Protects from Excessive Inflammation during BCG-Induced Pleurisy". Frontiers in immunology, 8, 999.
- Cohen S. B., Gern B. H., & Urdahl K. B. (2022). "The Tuberculous Granuloma and Preexisting Immunity". Annual review of immunology, 40, 589–614.
- De Martino M., Lodi L., Galli L., & Chiappini E. (2019). "Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review". Frontiers in pediatrics, 7, 350.
- De Sousa F. D. M., De Paula Souza I., Da Silva Graça Amoras E., Lima S. S., Cayres-Vallinoto I. M. V., Ishak R., Vallinoto A. C. R., & Queiroz M. A. F. (2023). "Low levels of TNFA gene expression seem to favor the development of pulmonary tuberculosis in a population From the Brazilian Amazon". Immunobiology, 228(2), 152333.
- Dotiwala F., & Lieberman J. (2019). "Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes". Current opinion in immunology, 60, 19–29.
- Dotiwala F., Mulik S., Polidoro R. B., Ansara J. A., Burleigh B. A., Walch M., Gazzinelli R. T., & Lieberman J. (2016). "Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites". Nature medicine, 22(2), 210–216.
- Gern B. H., Adams K. N., Plumlee C. R., Stoltzfus C. R., Shehata L., Moguche A. O., Busman-Sahay K., Hansen S. G., Axthelm M. K., Picker L. J., Estes J. D., Urdahl K. B., & Gerner M. Y. (2021). "TGF β restricts expansion, survival, and function of T cells within the tuberculous granuloma". Cell host & microbe, 29(4), 594–606.e6.

- Houben, R. M., & Dodd, P. J. (2016). *"The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling"*. PLoS medicine, 13(10), e1002152.
- Kanabalan R. D., Lee L. J., Lee T. Y., Chong P. P., Hassan L., Ismail R., & Chin V. K. (2021). *"Human tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers Discovery"*. Microbiological research, 246, 126674.
- Lee H. J., Woo Y., Hahn T. W., Jung Y. M., & Jung Y. J. (2020). *"Formation and Maturation of the Phagosome: A Key Mechanism in Innate Immunity against Intracellular Bacterial Infection"*. Microorganisms, 8(9), 1298.
- Mattila J. T., Maiello P., Sun T., Via L. E., & Flynn J. L. (2015). *"Granzyme B-expressing neutrophils correlate with bacterial load in granulomas from Mycobacterium tuberculosis-infected cynomolgus macaques"*. Cellular microbiology, 17(8), 1085–1097.
- Melly G., & Purdy G. E. (2019). *"MmpL Proteins in Physiology and Pathogenesis of M. tuberculosis"*. Microorganisms, 7(3), 70.
- Natarajan A., Beena P. M., Devnikar A. V., & Mali S. (2020). *"A systemic review on tuberculosis"*. The Indian journal of tuberculosis, 67(3), 295–311.
- Ndlovu H., & Marakalala M. J. (2016). *"Granulomas and Inflammation: Host-Directed Therapies for Tuberculosis"*. Frontiers in immunology, 7, 434.
- Organización Mundial de la Salud - OMS (2023). *"La respuesta a la tuberculosis se recupera de la pandemia, pero es necesario acelerar las actividades para cumplir las nuevas metas"*. Comunicado de prensa, Ginebra.
- Pacl H. T., Reddy V. P., Saini V., Chinta K. C., & Steyn A. J. C. (2018). *"Host-pathogen redox dynamics modulate Mycobacterium tuberculosis pathogenesis"*. Pathogens and Disease, 76(5)

- Peña Martínez J. (S/F). *"Acciones del sistema inmune"*. Asociación Progreso Inmunología. Hospital San Juan de Dios Córdoba, España.
- Peña M., Carlos. (2022). *"Tuberculosis latente: diagnóstico y tratamiento actual"*. Revista chilena de enfermedades respiratorias, 38 (2), 123-130.
- Prager I., & Watzl C. (2019). *"Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity"*. Journal of Leukocyte Biology, 105(6), 1319-1329.
- Rakotosamimanana N., Doherty T. M., Andriamihantsoa L. H., Richard V., Gicquel B., Soares J. L., Zumla A., & Razanamparany V. R. (2013). *"Expression of TNF-alpha-dependent apoptosis-related genes in the peripheral blood of Malagasy subjects with tuberculosis"*. PloS one, 8(4), e61154.
- Ritter A. T., Shtengel G., Xu C. S., Weigel A., Hoffman D. P., Freeman M., Iyer N., Alivodej N., Ackerman D., Voskoboinik I., Trapani J., Hess H. F., & Mellman I. (2022). *"ESCRT-mediated membrane repair protects tumor-derived cells against T cell attack"*. Science (New York, N.Y.), 376(6591), 377–382.
- Ruiz A., Palacios Y., Garcia I., & Chavez-Galan L. (2021). *"Transmembrane TNF and Its Receptors TNFR1 and TNFR2 in Mycobacterial Infections"*. International journal of molecular sciences, 22(11), 5461.
- San Juan N. (2023). *"Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium bovis"*. Departamento de Microbiología - Facultad De Medicina, Universidad De Buenos Aires, Argentina.
- Sia J. K., & Rengarajan J. (2019). *"Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections"*. Microbiology spectrum, 7(4), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018.
- Silva B. D. S., Trentini M. M., da Costa A. C., Kipnis A., & Junqueira-Kipnis A. P. (2014). *"Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis"*. Immunology letters, 160(1), 23–32.
- Soto Campos J. G. (2016). *"Manual de diagnóstico y terapéutica en Neumología"*. 3ª Edición. Hospital Universitario de Jerez de la Frontera, España.

- Sultana Z. Z., Hoque F. U., Beyene J., Akhlak-UI-Islam M., Khan M. H. R., Ahmed S., Hawlader D. H., & Hossain A. (2021). *"HIV infection and multidrug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis"*. BMC infectious diseases, 21(1), 51.
- Tellez-Navarrete N. A., Ramon-Luing L. A., Muñoz-Torrico M., Osuna-Padilla I. A., & Chavez-Galan L. (2021). *"Malnutrition and tuberculosis: the gap between basic research and clinical trials"*. Journal of infection in developing countries, 15(3), 310-319.
- Zhai W., Wu F., Zhang Y., Fu Y., & Liu Z. (2019). *"The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis"*. International journal of molecular sciences, 20(2), 340.
- Zhou Y., Tan C. Y., Mo Z. J., Gao Q. L., He D., Li J., Huang R. F., Li Y. B., Guo C. F., Guo Q., Wang L. J., Yang G. T., & Zhang H. Q. (2017). *"Polymorphisms in the SP110 and TNF- α Gene and Susceptibility to Pulmonary and Spinal Tuberculosis among Southern Chinese Population"*. Disease markers, 2017, 4590235.
- Zhu Q., Su J., Wang X., Tang M., Gao Y., & Zhang D. (2020). *"Serum concentrations of TNF- α and its soluble receptors in Graves' disease"*. Endocrine connections, 9(7), 736–746.