



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

**ESTUDIO DE GENES DE AUTOFAGIA Y LA
SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS EN
ESPAÑÓLES**

Giselle Castillo Villa

FACULTAD DE MEDICINA

2021



EL DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “Estudio de genes de autofagia y su asociación con la susceptibilidad a tuberculosis en españoles”, que presenta la Médico Dña. Giselle Castillo Villa ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca a 17 de marzo de 2021.

FDO. Dr. D. Rogelio González Sarmiento

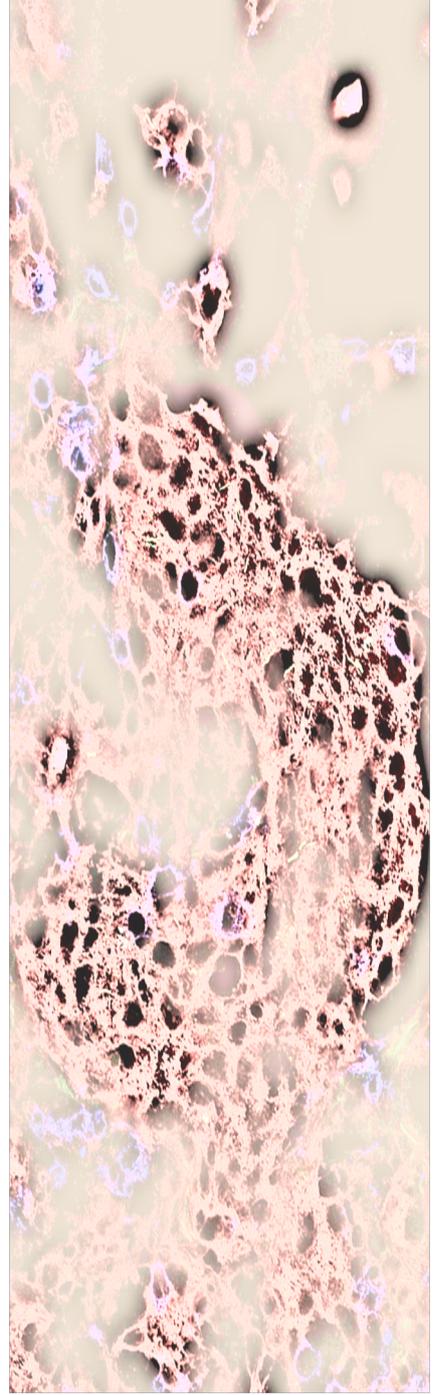
A mi familia

RESUMEN

Estudios recientes han demostrado que la susceptibilidad a tuberculosis se encuentra parcialmente influenciada por autofagia y los diferentes alelos polimórficos en genes relacionados con la autofagia (ATG) tiene un papel determinante en la respuesta del huésped hacia la infección por *Mtb*. Analizamos las muestras de DNA de 54 individuos con tuberculosis latente, 78 con enfermedad tuberculosa y 230 controles de origen español. Realizamos un análisis por genotipos de los SNP (single nucleotide polymorphisms) ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 and ATG16L1 rs2241880 mediante sondas TaqMan.

Hemos observado que la distribución de genotipos entre los individuos sanos y pacientes con tuberculosis ha arrojado diferencias significativas para los portadores del genotipo GG de ATG2B rs3759601, pues estos individuos podrían tener un menor riesgo de desarrollar la enfermedad. Individuos portadores del alelo ATG10 rs1864183 T podrían tener una menor susceptibilidad a la infección, si bien, tendría un rol protector a la infección tuberculosa en este grupo poblacional.

Existen diferencias en la distribución de genotipos y alelos de variantes genéticas de autofagia y estas diferencias podrían afectar, al menos de forma parcial, el riesgo y progresión de la infección tuberculosa. Nuestros hallazgos podrían tener relevancia en la comprensión que tenemos del control genético de la respuesta inmune contra micobacterias, y sobre la progresión de infección a enfermedad activa.



ÍNDICES

ABREVIATURAS.....	19
INTRODUCCIÓN	27
1. TUBERCULOSIS	30
1.1. LA EPIDEMIA POR TUBERCULOSIS	30
1.1.1. LA BRECHA DIAGNÓSTICA	32
1.2. HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD	33
1.3. PATOGÉNESIS.....	34
1.4. EL ESPECTRO DE LA INFECCIÓN A ENFERMEDAD TUBERCULOSA	37
1.4.1. TUBERCULOSIS LATENTE	37
1.4.2. ENFERMEDAD TUBERCULOSA.....	37
1.4.2.1. TUBERCULOSIS PULMONAR	37
1.4.2.2. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR.....	38
1.5. DIAGNÓSTICO	40
1.5.1. FACTORES DE RIESGO DEL HUESPED	40
1.5.2. DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS LATENTE	41
1.5.3. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD TUBERCULOSA	42
1.5.3.1. RADIOLOGÍA Y TÉCNICAS DE IMAGEN	42
1.5.3.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	44
1.6. TRATAMIENTO	45
2. LA AUTOFAGIA	47
2.1. MECANISMO MOLECULAR DE AUTOFAGIA	48
2.1.1. ORÍGENES DE LA MEMBRANA DE AISLAMIENTO.....	50
2.1.2. INICIACIÓN Y NUCLEACIÓN DEL FAGOSFORO.....	50
2.1.3. EXPANSIÓN DE LA MEMBRANA DEL AUTOFAGOSOMA POR SISTEMAS DE	
CONJUGACIÓN	51
2.1.4. CIERRE AUTOFAGOSOMA Y FUSIÓN CON LISOSOMAS	53
2.1.5. AUTOFAGIA SELECTIVA	55
3. AUTOFAGIA Y TUBERCULOSIS	57
3.1. AUTOFAGIA, INMUNIDAD Y TUBERCULOSIS	57
3.2. LA DEFENSA DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> FRENTE A LA AUTOFAGIA	60
3.3. TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO BASADO EN LA AUTOFAGIA	61
4. GENÉTICA HUMANA Y SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS	64
4.1. TUBERCULOSIS COMO ENFERMEDAD POLIGÉNICA EN HUMANOS.....	65
4.2. EL PAPEL DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA TUBERCULOSIS.	
.....	66
4.3. GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA EN LA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS	
.....	69
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	73
HIPOTESIS	76

OBJETIVOS GENERALES	76
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	76
SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS	79
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	81
2. MUESTRA	81
2.1. DEFINICIÓN DE CASOS.....	82
2.1.1. SUJETOS SANOS (GRUPO CONTROL)	82
2.1.2. PACIENTES (GRUPO TB)	82
2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	84
3. RECOLECCIÓN DE DATOS.....	85
3.1. DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS Y ANTECEDENTES PERSONALES	85
3.2. VARIABLES CLÍNICAS.....	86
3.3. RESPUESTA A TRATAMIENTO DE TUBERCULOSIS	87
4. ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES	89
4.1. EXTRACCIÓN DE DNA.....	89
4.2. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA.....	91
4.3. DISCRIMINACION ALELICA MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN™	91
4.4. INMUNOENSAYOS.....	93
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	94
6. ASPECTOS ÉTICOS E INFORMACIÓN DE PACIENTES.....	95
RESULTADOS.....	97
1. PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO Y CLÍNICO.....	99
1.1. PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO Y CLÍNICO DEL GRUPO B-TB	100
1.2. DATOS ANALÍTICOS PARA EL GRUPO A-ILTB Y EL GRUPO B-TB	103
2. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON AUTOFAGIA Y SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS	104
2.1. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS PARA ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 EN EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO TB.....	105
2.2. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS PARA ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 EN EL GRUPO CONTROL, Y LOS SUBGRUPOS A-ILTB Y B-TB.	107
3. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS PARA LOS POLIMORFISMOS ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 Y SU ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS.....	111
3.1. POLIMORFISMOS, TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR Y CAVITACIONES.....	111
3.2. POLIMORFISMOS Y PRESENCIA DE GRANULOMAS EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS.	112
DISCUSIÓN.....	115
1. POLIMORFISMOS DE AUTOFAGIA Y SU ASOCIACIÓN CON LA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS EN UNA POBLACIÓN CAUCÁSICA.....	117

2. CORRELACIONES CLÍNICAS Y GENÉTICAS DE LA TUBERCULOSIS EN UNA POBLACIÓN CASTELLANO LEONESA.....	119
2.1 ANÁLISIS, EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS, DE LA PRESENTACIÓN CLÍNICA DE TUBERCULOSIS SEGÚN LA DISTRIBUCION DE LOS GENOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS DE ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880.	120
2.2 ANÁLISIS, EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS, DE LA EVOLUCIÓN Y RESPUESTA A TRATAMIENTO PARA TUBERCULOSIS SEGÚN LA DISTRIBUCION DE LOS GENOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS DE ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880.	122
2.3 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 EN LA SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIÓN TUBERCULOSA	124
2.4 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 EN LA PROGRESIÓN DE INFECCIÓN A ENFERMEDAD TUBERCULOSA	126
3. LA TUBERCULOSIS COMO ENFERMEDAD AUTOFAGO-POLIGÉNICA	128
4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	131
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA.....	137
ANEXOS.....	167
ANEXO 1. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	169
ANEXO 2. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE.....	170
ANEXO 3. FORMULARIO DE CONSULTA	173
ANEXO 4. TABLA DE DATOS CLÍNICOS Y MOLECULARES DE LOS PARTICIPANTES	175
ANEXO 5. RESULTADOS ESTADÍSTICOS.....	179

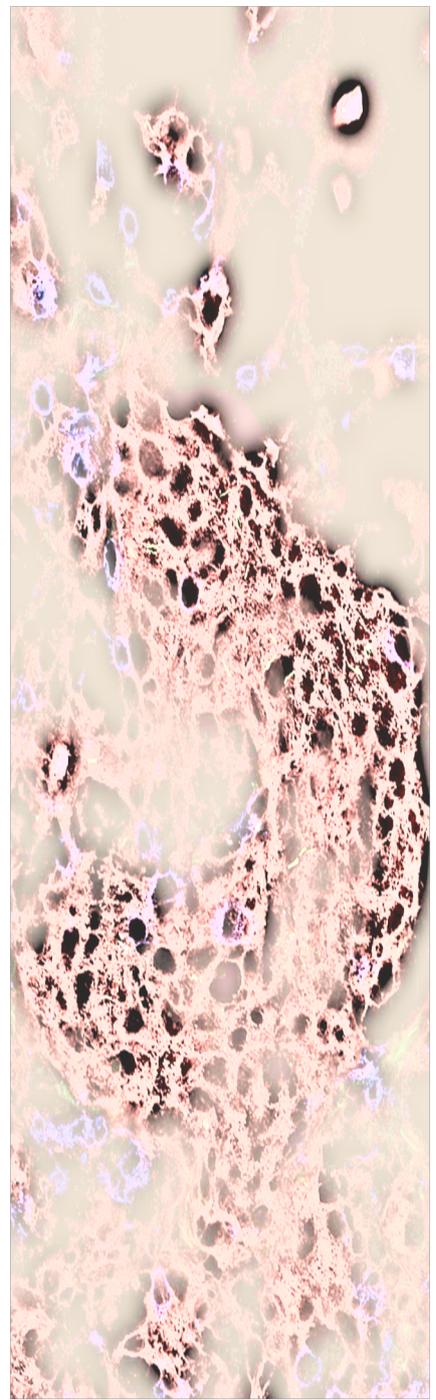
INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. INCIDENCIA MUNDIAL DE TUBERCULOSIS.	31
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN GLOBAL DE MORTALIDAD EN TUBERCULOSIS POR GRUPO DE EDAD Y SEXO (ROJO: FEMENINO; VERDE: MASCULINO).	32
FIGURA 3. TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS EN HUMANOS.	34
FIGURA 4. ENVOLTURA LIPÍDICA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.	35
FIGURA 5. FAGOCITOSIS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.	35
FIGURA 6. EL GRANULOMA.: LESIÓN MORFOLÓGICA CARACTERÍSTICA DE LA TUBERCULOSIS:	36
FIGURA 8. FRECUENCIA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR.	39
FIGURA 9. LINFADENOPATÍA CERVICAL IZQUIERDA CON NECROSIS CENTRAL.	39
FIGURA 10. ALGORITMO PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS LATENTE. PASOS PARA DESCARTAR EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR TUBERCULOSIS, CON EL USO DE LA PRUEBA DE TUBERCULINA E IGRAs. MODIFICADA DEL CONSENSO PARA TUBERCULOSIS DE LA SEPAR 41	41
FIGURA 11. TC DE TÓRAX MOSTRANDO MÚLTIPLES OPACIDADES REDONDEADAS, MILIMÉTRICAS, EN RELACIÓN CON PATRÓN MILIAR ⁵³	43
FIGURA 12. TAC DE TÓRAX CON CONTRASTE. CONSOLIDACIONES EN VÉRTICES PULMONARES Y CAVITACIONES.	44
FIGURA 13. RUTA DE LA AUTOFAGIA Y PROCESOS MOLECULARES EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS.	49
FIGURA 14. FORMACIÓN Y EXPANSIÓN DE LA MEMBRANA DEL AUTOFAGOSOMA.	52
FIGURA 15. FACTORES IMPLICADOS EN LA FUSIÓN DEL AUTOFAGOSOMA CON LISOSOMAS.	54
FIGURA 16. EN LA AUTOFAGIA SELECTIVA, LOS RECEPTORES DE AUTOFAGIA SE UNEN SELECTIVAMENTE A LA CARGA PARA SU TRANSPORTE A EL AUTOFAGOSOMA AL UNIRSE A ATG8.	56
FIGURA 17. ELIMINACIÓN DE M. TUBERCULOSIS MEDIANTE AUTOFAGIA.	58
FIGURA 18. FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS EN LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA.	62
FIGURA 19. DISTRIBUCIÓN DE PARTICIPANTES POR GRUPO.	81
FIGURA 20. FASES DE LA EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA.	90
FIGURA 21. EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DEPENDIENTE DE LA HIBRIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS DE ALELO MEDIANTE UN ENSAYO DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA TAQMAN TM	93
FIGURA 22. DISTRIBUCIÓN DEL TOTAL DE LOS INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO SEGÚN EL GRUPO AL QUE PERTENECEN.	99
FIGURA 23. DATOS DEMOGRÁFICOS EN PACIENTES DEL GRUPO TB.	100
FIGURA 24. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS AL COMPARAR LOS GRUPOS B-TB Y A-ILTB EN PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.	103
FIGURA 25. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS PARA ATG2B RS3759601 EN INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON TUBERCULOSIS.	110
FIGURA 26. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS EN EL MODELO DOMINANTE DE LOS POLIMORFISMOS DE ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 Y LA PRESENCIA DE CAVITACIONES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TUBERCULOSA.	111

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A INFECCIÓN POR MTB O PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN A ENFERMEDAD.....	40
TABLA 2. RIESGO RELATIVO PARA TUBERCULOSIS COMORBILIDADES (COMPARADO CON INDIVIDUOS SANOS).....	41
TABLA 3. HALLAZGOS RADIOLÓGICOS Y ASOCIACIÓN CON ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA.....	43
TABLA 4. RÉGIMEN DE TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO SEGÚN CONDICIÓN CLÍNICA.....	46
TABLA 5. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA AUTOFAGIA EN MAMÍFEROS Y SUS HOMÓLOGOS EN LEVADURAS.....	48
TABLA 6. DATOS PERSONALES Y ANTECEDENTES MÉDICOS.....	85
TABLA 7. VARIABLES CLÍNICAS Y DE LABORATORIO.....	86
TABLA 8. RESULTADOS DE TRATAMIENTO.....	88
TABLA 9. POLIMORFISMOS ESTUDIADOS EN ESTE TRABAJO.....	89
TABLA 10. SONDAS SON UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS MEDIANTE PCR, IDENTIFICADAS COMO FLUOROCROMOS VIC Y FAM.	92
TABLA 11. DATOS DEMOGRÁFICOS EN PACIENTES DEL GRUPO B-TB.....	102
TABLA 12. VALORES ANALÍTICOS DE LOS GRUPOS B-TB Y A-ILTB.....	104
TABLA 13. DISTRIBUCIÓN DE ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 Y ATG16L1 rs2241880 EN LOS GRUPOS CONTROL Y TB CON RELACIÓN AL RIESGO DE ADQUIRIR TUBERCULOSIS.....	105
TABLA 14. FRECUENCIAS DE GENOTIPOS EN DIFERENTES MODELOS PARA ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 Y ATG16L1 rs2241880 EN INDIVIDUOS SANOS Y GRUPO TB.....	106
TABLA 15. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS PARA LOS SNPs ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 Y ATG16L1 rs2241880 EN LOS GRUPOS CONTROL, A-ILTB Y B-TB.....	107
TABLA 16. DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA DE LOS POLIMORFISMOS ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 Y ATG16L1 rs2241880 EN PACIENTES CON INFECCIÓN (GRUPO A-ILTB) Y TUBERCULOSIS ACTIVA (GRUPO B-TB) CON RELACIÓN AL RIESGO DE PROGRESIÓN A ENFERMEDAD TUBERCULOSA.....	108
TABLA 17. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 Y ATG16L1 rs2241880 EN PACIENTES ESPAÑOLES CON TB ACTIVA COMPARADO CON CONTROLES SANOS.....	109
TABLA 18. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE LA TUBERCULOSIS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TUBERCULOSA (GRUPO B- TB, N=78) Y SU RELACIÓN CON LOS POLIMORFISMOS ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 Y ATG16L1 rs2241880.....	111
TABLA 19. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS EN EL MODELO DOMINANTE DE LOS POLIMORFISMOS DE ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 Y ATG16L1 rs2241880 Y PRESENCIA DE GRANULOMAS EN IMAGEN Y ANATOMÍA PATOLÓGICA EN SUJETOS DEL GRUPO TB.....	113
TABLA 20. DATOS CLÍNICOS Y RESULTADOS DE GENOTIPADO DE PACIENTES EN GRUPO TB.....	175
TABLA 21. DISTRIBUCIÓN DEL TOTAL DE LOS INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO SEGÚN EL GRUPO AL QUE PERTENECEN.	179
TABLA 22. DATOS DEMOGRÁFICOS DE LOS GRUPOS B-TB Y A-ILTB.....	179
TABLA 23. DESCRIPCIÓN DE LA DURACIÓN Y RESPUESTA A TRATAMIENTO EN PACIENTES CON RESULTADOS DE CULTIVOS EN EL GRUPO DE B-TB.....	180
TABLA 24. DATOS DEMOGRÁFICOS EN PACIENTES DEL GRUPO TB.....	180

TABLA 25. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS EN EL MODELO DOMINANTE DE LOS POLIMORFISMOS DE ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 Y LA PRESENCIA DE CAVITACIONES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TUBERCULOSA.	181
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----



ABREVIATURAS

AMBRA1: Activating Molecule in BECN1- Regulated Autophagy
AMC: Autofagia mediada por chaperonas
AMPK: AMP-activated Protein Kinase
ATG: Autophagy related Gene
ATP: Adenosin Triphosphate
BECN1: Beclin1, autophagy related
CCL2: C-C Motif Chemokine Ligand 2
cGAMP: Cyclic GMP-AMP
cGAS: Cyclic GMP-AMP synthase
CIAA: Cloroformo:alcohol isoamílico
CTSB: Cathepsins B
DC-SIGN: DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin
DC: Dendritic cells
DNA: Desoxyribonucleic Acid
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
Eis: Enhances intracellular survival
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ESAT-6: The *Mycobacterium tuberculosis* early secreted Ag of 6 kDa
ESCRT: Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
ESX-1: ESAT-6 system 1
FBS: Fetal Bovine Serum
FIP200: Focal adhesion kinase family-interacting protein 200kD
GABARAP: Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GABARAPL2 (GATE16): GABA Type A Receptor Associated Protein Like 2
GTPasas: Guanosina trifosfatasas
GWAS: Genome-wide association study
HER2 (ERBB2): Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HLA-DR2: Human Leukocyte Antigen – DR isotype
HLA: Human leukocyte antigen
HMGB1: High-mobility group protein 1
HOPS: Homotypic fusion and protein sorting complex
Hsp90: Heat Shock Protein 90
IBD: Inflammatory bowel disease

IC: Intervalo de Confianza

IFN- γ : Interferon-gamma

IFNGR: IFN-g receptor gene

IGRA: Interferon-gamma release assay

IL-12R β 1: Interleukin 12 receptor β 1

IL-8: Interleucina-8

ILT6: infección latente por tuberculosis

IQR: Rango intercuartílico

IRGM1: Immunity- related GTPase 1

JNK: JUN N-terminal Kinase

LAM: Lipoarabinomannan

LAMP1: Lysosomal-associated membrane protein 1

LAP: LC3-associated phagocytosis

LC3-II: LC3-phosphatidyl- ethanolamine

LC3: Ubiquitin-like microtubule- associated protein 1 light chain 3

LIR: LC3-interacting Region

MBL: Mannose-binding lectin

MDGs: Millennium Development Goals

MDR-TB: Multidrug-resistant TB

MHC II: Class II major histocompatibility complex molecules

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin

mTORC1/2: mTOR Complex 1/2

MyD88: Myeloid differentiation primary response 88

NBR1: Neighbor of the BRCA gene 1

NLRP3: NLR Family Pyrin Domain Containing 3

NOD2: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odd Ratio

P2X7R: ATP receptor

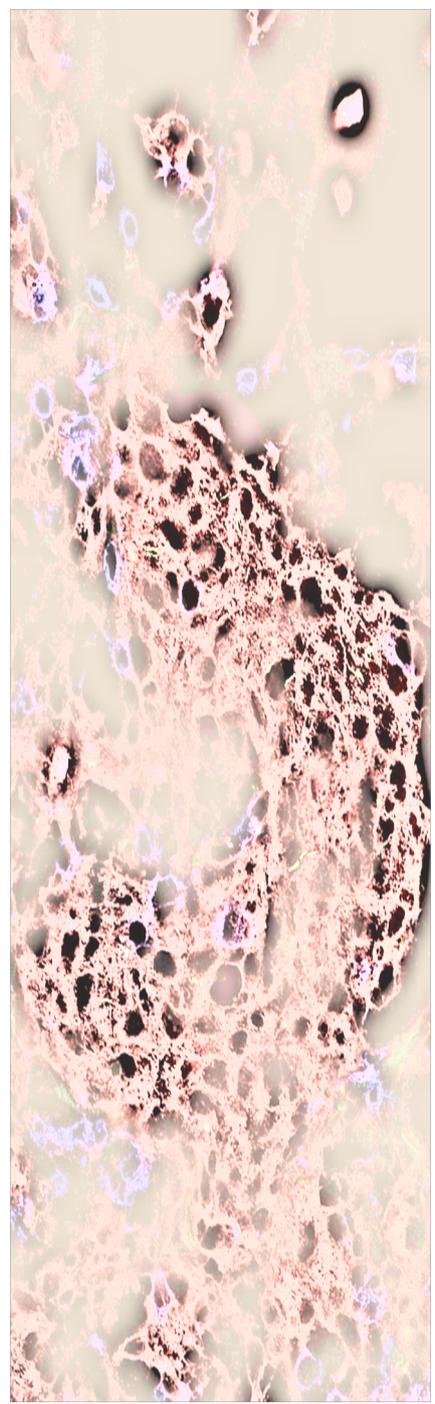
PARK2: Regulating ubiquitin ligase 2

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction
PE: Fosfatidiletanolamida
PI: Phosphatidylinositol
PI(3)P: Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate
PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PIM: phosphatidyl-myo-inositol mannosides
PRRs: Pattern-recognition receptors
Rab7: RAS-associated protein 7
RAP: Rapamicina
RE: Retículo endoplasmático
RIPK2: Receptor-interacting-serine/threonine-protein kinase 2
RLRs: RIG-I-like receptors
RNA: Ribonucleic Acid
ROS: Reactive Oxygen Species
RR-TB: Rifampicin-resistant TB
SLC11A1: Solute carrier family 11-member a1 protein
SLRs: Sequestosome 1/p62-like receptors
SNARE: SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SP-A: Surfactant protein A
SP-D: Surfactant protein D
SQSTM1 (p62): Sequestosome 1
STAT6: Signal Transducer And Activator Of Transcription 6
STING: Sensor stimulator of IFN genes
STX17: t-SNARE syntaxin 17
t-SNARE: N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TBK1: TANK-binding kinase 1
Th1: Type 1 T helper
Th2: Type 2 T helper
TIRAP: TIR Domain Containing Adaptor Protein
TLR: Toll-like Receptor
TLR8: Toll-like receptors 8

TNF: Tumor Necrosis Factor
TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor
TP53: Tumor Protein 53
TRAF6: TNF Receptor-Associated Factor 6
TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UBA: Ubiquitin-associated domain
Ubl: Ubiquitin-like
UDVP: Uso de drogas por via parenteral
ULK1/2: Unc-51-like Kinase $\frac{1}{2}$
UVRAG: Ultraviolet irradiation Resistance-associated Gene
VAMP-3: Vesicle-associated membrane protein 3
VAP: Vesicle-associated membrane protein
VDR: Vitamin D3
VIH/SIDA: Virus de la Inmunodeficiencia Humana/ Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
VPS34: Phosphatidylinositol 3-kinase, Catalytic Subunit Type 3
WHO: World Health Organization
WIPI1/2: WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 1/2
 α 1-ATZ: Mutant α 1- antitrypsin Z



INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades infecciosas que más ha influenciado la historia de la humanidad es la Tuberculosis (TB). De este modo, continúa afectando la salud de millones de individuos y sigue siendo la causa de miles de muertes, por lo que se considera un problema de salud global, sobretodo en países con bajos recursos ¹.

El agente causal de la tuberculosis en humanos es *M. tuberculosis (Mtb)*. Esta enfermedad produce un amplio espectro de presentaciones clínicas ²⁻⁴. Pese a su alta incidencia, la mayoría de las infecciones permanecen en un estado de respuesta inmune persistente a la micobacteria sin presencia de manifestaciones clínicas, que se denomina infección latente por tuberculosis (ILTB) ⁵.

La autofagia es una compilación de procesos de homeostasis presente en células eucariotas que entrega porciones del citoplasma u otros elementos citoplasmáticos a los lisosomas para su destrucción o eliminación. Como consecuencia, la inducción de la autofagia en macrófagos es un mecanismo altamente efectivo en la eliminación de *Mtb* a nivel intracelular. Asimismo, se ha descubierto que la capacidad de este patógeno para secretar efectores e inhibir este mecanismo es muy importante para su supervivencia ⁶⁻¹³. En todo caso, la autofagia puede superar el bloqueo que *Mtb* impone en la maduración del fagosoma y entrega al lisosoma ^{6,8,14,15}.

La autofagia, desde la perspectiva genética, es un mecanismo que depende de genes relacionados con la autofagia (ATG) ^{16,17,14,18-20,6}. Diferentes estudios genéticos han observado que existen tasas más altas de tuberculosis en gemelos monocigóticos en comparación con gemelos dicigóticos o hermanos, además de la presencia de diferencias raciales en la resistencia y progresión a la enfermedad ^{21,22}. La susceptibilidad a la tuberculosis podría estar determinada por factores hereditarios en el huésped, como la presencia de variantes en genes que afectan la interacción entre el huésped y las micobacterias ²³⁻³¹.

Actualmente, muchos de los mecanismos implicados en la eliminación de *Mtb* continúan sin ser dilucidados por completo y no han sido confirmadas diferencias en la susceptibilidad genética entre individuos con infección o enfermedad tuberculosa.

Nos proponemos examinar a una población española de individuos sanos, y pacientes con tuberculosis para determinar la asociación entre polimorfismos de ATGs y la susceptibilidad a infección latente o enfermedad. Al mismo tiempo, este estudio incluye el análisis de las características demográficas de la población y el estudio

descriptivo de las posibles interacciones entre ambiente y genes que podrían predecir la progresión de la enfermedad. Así pues, el análisis de ATGs sobre la susceptibilidad podría ayudar a descifrar otros mecanismos implicados en la respuesta a micobacterias, con la posibilidad de generar herramientas efectivas para la prevención y control de esta enfermedad.

1. TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad que ha hecho parte de la historia de la humanidad desde la antigüedad y continúa siendo una causa principal de muerte en países en vía de desarrollo entre los adultos jóvenes e individuos con VIH¹. El impacto que ha tenido la epidemia en diferentes comunidades, sumado a la preocupación mundial por el incremento del número de casos de tuberculosis multirresistente (MDR-TB), han acentuado la necesidad de mejorar la prevención y el control de la tuberculosis³².

1.1. LA EPIDEMIA POR TUBERCULOSIS

Aproximadamente 1.3 millones (rango, 1.2–1.4 millones) de muertes por tuberculosis se presentaron entre las personas VIH negativo en 2017, y unos 300 000 (rango, 266 000–335 000) muertos entre la población con diagnóstico de VIH. Cerca de un tercio de la población global ha sido expuesta a *Mtb* y potencialmente infectada¹. Y solo un porcentaje de ellos adquiere la infección y una tasa aún más baja presenta progresión a la enfermedad³³. Sin embargo, existe un riesgo mayor si las personas padecen TB-VIH, uso de corticoides o inhibidores de TNA- α , diabetes, insuficiencia renal y silicosis.

La tuberculosis es la causa décima causa de muerte a nivel mundial y desde el 2011 ha sido la causa de muerte principal por enfermedad infecciosas, por encima de VIH/SIDA. Muchas de estas muertes se podrían prevenir con el diagnóstico y tratamiento adecuado. Positivamente, se ha reportado que la población que ha recibido tratamiento ha tenido una tasa global de éxito del 82% en el año 2016 y los países con un sistema de salud universal y adecuada cobertura tienen un porcentaje menor del 5% de muertes³⁴.

Un alto porcentaje (82%) de las muertes en pacientes sin VIH fue referido en 2017, en regiones africanas y del Sudeste asiático vigiladas por la OMS. Además, un 85% de todas las muertes por TB-VIH correspondió a estas regiones. La India fue el país con tasas más elevadas, con un 32% para personas TB-VIH positivo y un 27% de la población TB-VIH negativo dentro de la tasa global. Entre los sujetos infectados con VIH, el riesgo de muerte a 10 años por enfermedad se encontró entre un 53% y un 86%, comparados con los individuos con TB-VIH negativo con una expectativa menor de 3% ³⁵.

La severidad de la epidemia varía radicalmente entre países. En los países ricos en recursos, se observaron menos de 10 casos por 100 000 personas, unos 150 a 400 en los 30 países con alta incidencia de tuberculosis, y cerca de 500 casos en países como Sudáfrica, Lesoto, Mozambique y Filipinas, como se describe en la figura 1.

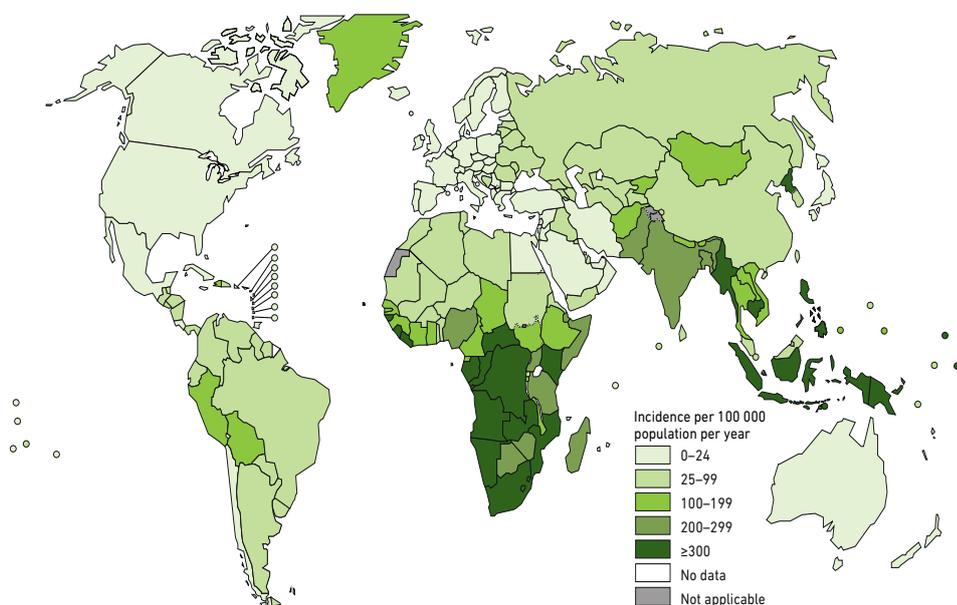


Figura 1. Incidencia mundial de tuberculosis.

El riesgo de desarrollar la enfermedad para los individuos con VIH fue 20 veces mayor, comparado con el resto de la población a nivel mundial. La incidencia por sexo y edad se muestra en la figura 2. La incidencia de casos se presentó con más frecuencia en individuos del sexo masculino (64%), siendo más alta para las personas mayores de 55 años, y solo un 36% para mujeres y niñas.

1.1.1. LA BRECHA DIAGNÓSTICA

Aunque el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis evita numerosas muertes, existen dificultades en la detección y tratamiento de esta enfermedad. Dentro del listado de los 30 países con mayor incidencia de la OMS, con una incidencia total del 87% de los casos a nivel mundial, se encuentran India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (5%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%).

La incidencia de tuberculosis es más alta en hombres. En este grupo poblacional se presentan las mayores dificultades en el diagnóstico y detección de la enfermedad. Alrededor de 10 millones de individuos desarrollaron enfermedad tuberculosa en 2017: con un total de 5.8 millones de hombres, 3.2 millones de mujeres y 1 millón de niños. La mayoría de la población afectada corresponde a adultos y niños mayores de 15 años (90%), 9% de ellos con diagnóstico de TB-VIH. La mayoría de los nuevos casos ocurrieron en la región del Sudeste Asiático (44%) África (25%) y el oeste de la región Pacífica (18%); Europa y América reportaron un 6% y 3% de la tasa global respectivamente ³⁵.

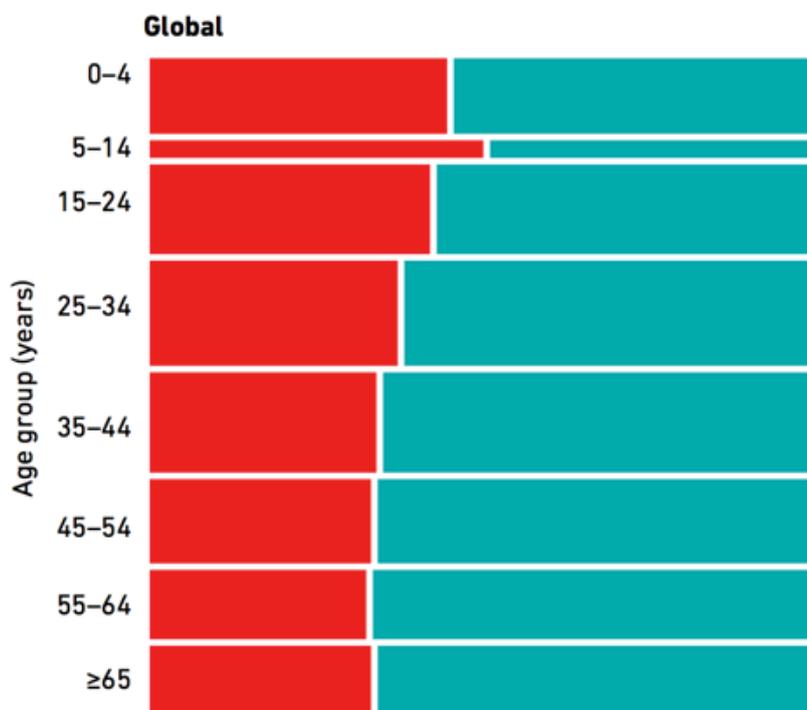


Figura 2. Distribución global de mortalidad en tuberculosis por grupo de edad y sexo (rojo: femenino; Verde: masculino).

En 2017, se determinó que un número de 558.000 personas (rango de 483 000–639 000) desarrollaron tuberculosis resistente a tratamiento con rifampicina (el medicamento más efectivo de primera línea), y 82% de esta población presentó MDR-TB (multidrug-resistant TB) ³⁴. Muchos de estos casos (18%) se observan en individuos que han sido tratados por tuberculosis en el pasado y se ha notado en un 3.5% de nuevos casos. Los países con la incidencia más alta de MDR-TB corresponden a India (24%), China (13%) y Rusia (10%), para un total de 50% de todos los casos globales de MDR-TB. Dentro de los pacientes que presentaron MDR-TB en 2017, 8.5% (95% IC, 6.2–11%) se estimó que tiene XDR-TB (extensively drug-resistant TB) ³⁴.

En 2018, se ha puesto en marcha una iniciativa conjunta («Find. Treat. All.») con el Fondo Mundial y la Alianza Alto a la tuberculosis para acelerar la respuesta al aumento de casos y para mejorar el acceso a la atención, en consonancia con los esfuerzos generales de la OMS para lograr la cobertura sanitaria universal. Como parte de los Objetivos de Desarrollo del Milenio, MDGs por sus siglas en inglés, se han establecido metas a nivel global para detectar y tratar 40 millones de personas con tuberculosis en el periodo comprendido entre 2018-2022 ¹, y reducir dramáticamente el número de casos para el año 2030.

Dentro de objetivos más relevantes se encuentra el desarrollo de vacunas para prevenir la adquisición de la infección o desarrollo de la enfermedad, la creación de nuevos tratamientos y métodos diagnósticos asequibles para poblaciones con bajos recursos y disminuir la duración del tratamiento estándar en individuos enfermos. En la actualidad existen 12 vacunas, 20 drogas nuevas, junto con diferentes regímenes de tratamiento en ensayos clínicos ³².

1.2. HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

En la figura 3, podemos observar el ciclo de transmisión de la tuberculosis en humanos vía aerosol. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es inhalado a partir de microgotas suspendidas en el aire, que contienen de uno a tres microorganismos ³⁶. Después del contacto inicial entre *Mtb* y las vías respiratorias de otro huésped, pueden presentarse tres diferentes situaciones: la erradicación completa a través del sistema inmune, adquirir la infección tuberculosa o la progresión a enfermedad activa ³⁷.

Durante la infección, *Mtb* permanecerá en un estado metabólicamente latente, manteniendo una relación dinámica con el huésped a través de la regulación de los

nutrientes disponibles. Por otra parte, aproximadamente el 5% de las personas infectadas progresan rápidamente a tuberculosis primaria ³⁸. En estos individuos, los bacilos se pueden replicar y propagar mecánicamente gracias a la erosión de las lesiones caseificantes en las vías respiratorias. En este punto, existe un mayor riesgo de la transmisión de la enfermedad para los convivientes y contactos cercanos del paciente. En ausencia de tratamiento, se produce la muerte en hasta el 80 por ciento de los casos ¹.

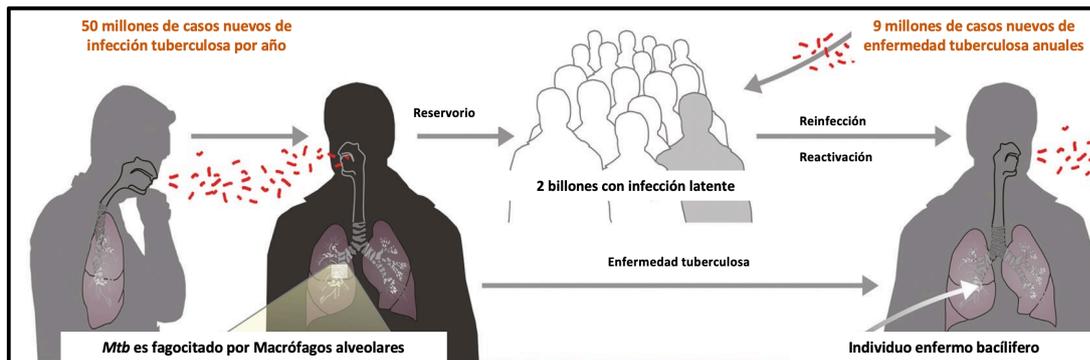


Figura 3. Transmisión de la tuberculosis en humanos.

La posibilidad de transmisión de la infección estará determinada por el grado de replicación bacteriana, duración de la enfermedad y el número de contactos susceptibles expuestos ³⁸. La reactivación de la tuberculosis resulta de la proliferación de bacterias latentes adquiridas durante la infección primaria; Se ha estimado que el riesgo de por vida de reactivación es del 5% al 10% en la población general ³⁷.

1.3. PATOGÉNESIS

Las capas externas de la envoltura compleja de las micobacterias están constituidas en un 60% por una bicapa lipídica, que es altamente hidrofóbica y es un determinante en su capacidad de virulencia ³⁹. Los ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena larga 3-hidroxi, son el sello de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 4). La pared celular contiene además peptidoglicano, arabinogalactano, ácido micólico y lipoarabinomanano (LAM) ³⁶.

Una vez en la vía aérea del huésped, los bacilos se distribuyen en las áreas de mayor ventilación pulmonar, particularmente en campos medios, más comúnmente en el lóbulo medio derecho, segmentos superiores de los lóbulos inferiores y segmentos

anteriores de los lóbulos superiores donde serán fagocitados por macrófagos alveolares ³⁶.

Los bacilos capturados por fagocitosis son sometidos al efecto de una acidificación progresiva (Figura 5). Este pH ácido dentro del fagosoma en maduración activa las enzimas hidrolíticas, péptidos antimicrobianos catiónicos y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS), que finalmente degradarán los lípidos y proteínas bacterianas ³⁶.

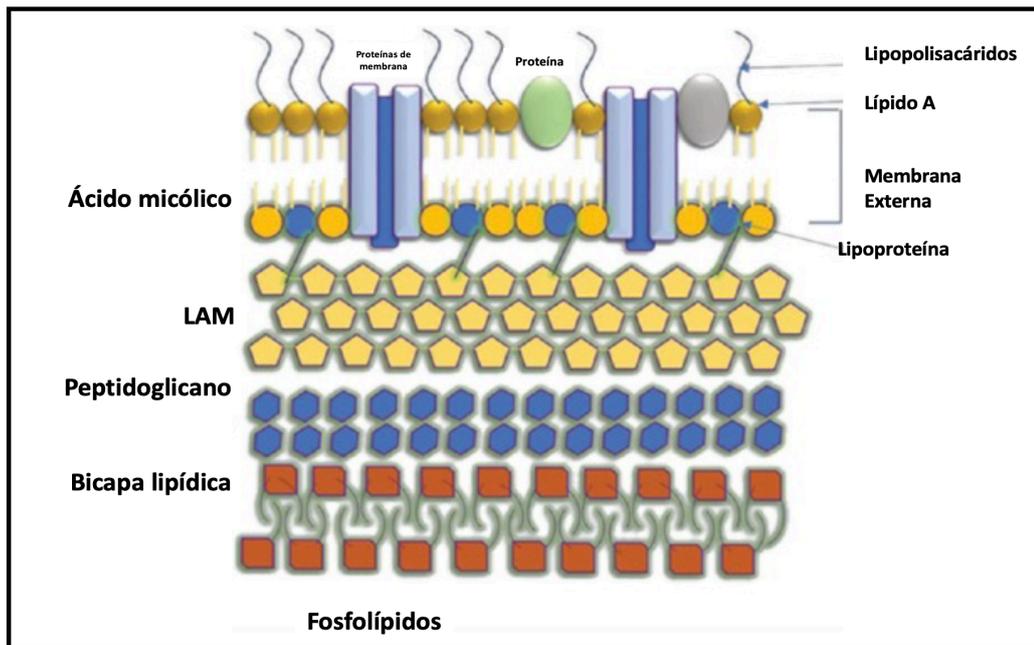


Figura 4. Envoltura lipídica de *Mycobacterium tuberculosis*.

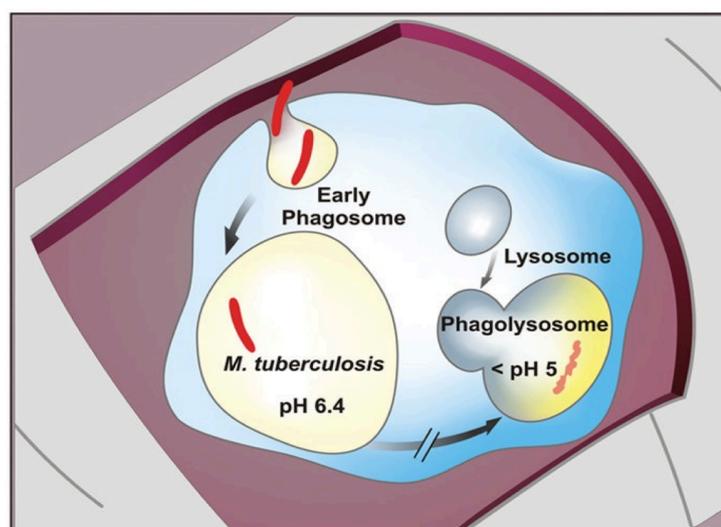


Figura 5. Fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis*.

Mtb puede evitar la erradicación mediada por macrófagos y residir en las células desprovistas de contenido lisosómico debido a un bloqueo en los flujos de Ca^{2+} , recibiendo nutrientes por activación selectiva de la vía dependiente de Rab. Dos fosfatidilinositoles glicosilados de *M. tuberculosis*, lipoarabinomanano (LAM) y phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIM), dirigen estos procesos. LAM inhibe la adquisición de componentes endosómicos/lisosómicos tardíos, mientras que PIM activa la fusión con compartimentos endosómicos tempranos ⁴⁰.

Ernst et al., han detallado los receptores de superficie de macrófagos involucrados en la captación de *M. tuberculosis*. Han demostrado que el ingreso a los macrófagos mediante el empleo de múltiples receptores como los receptores Fc y DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) determinará su capacidad de supervivencia ⁴¹.

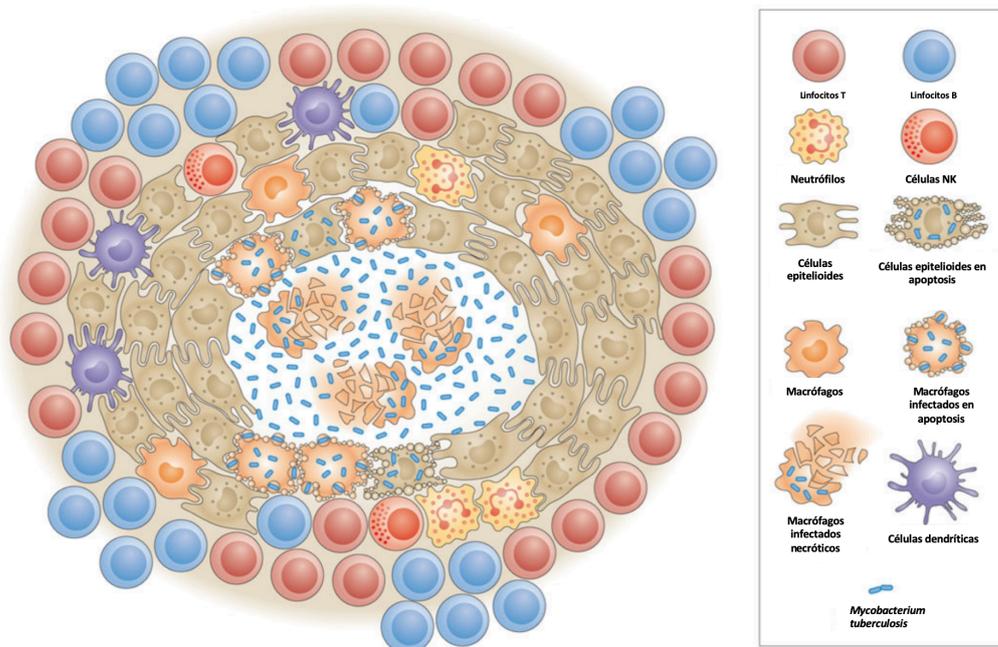


Figura 6. El granuloma.: lesión morfológica característica de la tuberculosis: Consistente en una colección organizada y localizada de células inmunes situadas alrededor de un centro necrótico. Modificado de Cadena

Los macrófagos infectados migran y, por lo tanto, transportan *Mtb* a diferentes sitios de las vías aéreas y tejido pulmonar (cadena), generando una respuesta proinflamatoria localizada que dará lugar a la formación de los granulomas, el sello distintivo anatómico-patológico de la tuberculosis ⁴¹ (Figura 6). Dentro de su arquitectura se encuentran un núcleo necrótico acelular central, denominado *caseum*, rodeado principalmente de macrófagos que se encuentran en diversas etapas de activación, y

una cubierta linfocítica de células T CD4 + y CD8 +, células B, además de neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos con un borde fibrótico externo ⁴².

En los casos donde existe reactivación, los granulomas también pueden contribuir a la proliferación y diseminación temprana de *M. tuberculosis*, pues la maduración del granuloma (sólido, necrótico, caseoso) ocurre a diferentes velocidades y típicamente culmina en la coexistencia de todas las formas de lesión durante la tuberculosis activa ³⁶.

1.4. EL ESPECTRO DE LA INFECCIÓN A ENFERMEDAD TUBERCULOSA

1.4.1. TUBERCULOSIS LATENTE

La tuberculosis latente se define como un estado de respuesta inmune persistente a *M. tuberculosis*, sin evidencia clínica de enfermedad activa, con el potencial de progresión o reactivación de la tuberculosis en cualquier momento durante la vida de un individuo infectado ³⁸.

Los individuos con tuberculosis latente pueden contener la propagación de la infección mediante la formación de granulomas, donde los bacilos subsistirán en estado inactivo hasta que se presenten las condiciones fisiológicas adecuadas para su replicación. Por ejemplo, en los granulomas caseosos, las micobacterias experimentan un incremento de su metabolismo y replicación dentro del granuloma. Por tanto, la identificación y el tratamiento de la tuberculosis latente puede reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad hasta en un 90 por ciento de individuos y proteger la salud de las personas y del público en general al reducir la cantidad de posibles fuentes futuras de infección ⁴³.

1.4.2. ENFERMEDAD TUBERCULOSA

1.4.2.1. TUBERCULOSIS PULMONAR

La tuberculosis pulmonar exhibe un cuadro clínico clásico que se caracteriza por la presencia de disnea, tos, esputo, hemoptisis, fiebre, sudoración nocturna, pérdida

de apetito y peso ⁴⁴. Aunque las manifestaciones clínicas varían según la edad del individuo y la carga de *M. tuberculosis* en los pulmones puede correlacionarse con la presencia de síntomas, la tos y la disnea son los más comunes ³. Los individuos sintomáticos tienen más probabilidades de tener esputo con una baciloscopia positiva.

La tos puede indicar el grado de progresión de la enfermedad, en etapas iniciales puede estar ausente o tener una presentación matutina insipiente y puede ser no productiva. Con el avance de la enfermedad, se vuelve persistente durante todo el día hasta tener un predominio nocturno y se acompaña de la producción de esputo amarillo o amarillo verdoso. La erosión endobronquial y el desprendimiento de *caseum* generan hemoptisis, que no suele ser masiva y se presenta en estadios avanzados de la enfermedad ⁴⁵.

En cuanto a la fiebre, suele tener una presentación diurna con un período afebril temprano en la mañana y un aumento gradual de la temperatura durante todo el día, alcanzando un pico al final de la tarde o la noche. La presencia de sudores nocturnos es más común en formas avanzadas de la enfermedad ⁴⁶. En caso de lesiones extensas del parénquima pulmonar o neumotórax, se suele presentar disnea. Además, si existe lesión o invasión de la pleural estará acompañada de dolor torácico que empeora durante la respiración. Ocasionalmente, este tipo de presentación puede progresar a un empiema franco ³.

1.4.2.2. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

La enfermedad tuberculosa suele estar confinada a tórax, pero también puede tener una localización ósea, gastrointestinal, linfática, sistema nervioso central, cabeza y cuello, genitourinaria y cardiovascular. La tuberculosis miliar, tuberculosis diseminada, se produce por el crecimiento exponencial de la micobacteria y su propagación hematogena. Alrededor del 15% de los casos comprometen cabeza y el cuello, con lesiones cervicales bilaterales indoloras, denominado escrófula ⁴⁷. La figura 7 muestra las diferentes localizaciones de tuberculosis extrapulmonar y los porcentajes de frecuencia según el CDC ⁴⁸.

La tuberculosis extrapulmonar tiene una presentación clínica heterogénea pues afecta a cualquier órgano del cuerpo, con hallazgos clínicos que dependen de diferentes patrones de progresión y a menudo puede imitar a otras enfermedades, por eso su importancia como diagnóstico diferencial ⁴. Esta forma de tuberculosis depende de la

edad, grupo étnico, cepa de *M. tuberculosis*, y es especialmente frecuente en huéspedes inmunocomprometidos.

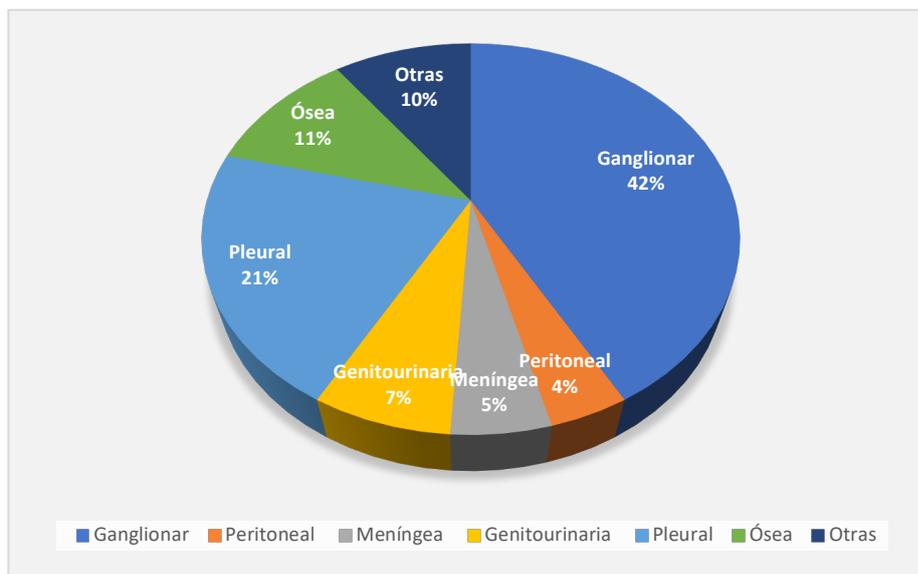


Figura 7. Frecuencia de las diferentes formas de tuberculosis extrapulmonar.

Generalmente, la mayoría de los niños con *M. Tuberculosis* pueden ser asintomáticos o pueden tener adenopatías retroauriculares ⁴⁹. La forma ganglionar de la tuberculosis (Figura 8), es la más frecuente dentro de las localizaciones extrapulmonares.

Habitualmente, los pacientes desarrollan fatiga, pérdida de peso, sudores nocturnos, tos y fiebre. La anorexia, y el malestar son manifestaciones comunes y pueden ser las únicas características de presentación en algunos individuos con tuberculosis extrapulmonar. En individuos inmunocomprometidos puede ser asintomática, rápidamente progresiva y fatal ³.



Figura 8. Linfadenopatía cervical izquierda con necrosis central.

1.5. DIAGNÓSTICO

1.5.1. FACTORES DE RIESGO DEL HUESPED

En los países con menores tasas de incidencia de tuberculosis, se han observado disminuciones sustanciales en los niveles de morbilidad y mortalidad como resultado de la mejora en las condiciones generales de vida de los individuos. Por tanto, las condiciones socioeconómicas influyen considerablemente en el riesgo de enfermarse de tuberculosis⁵⁰. En este sentido, la identificación de los factores de riesgo asociados a la tuberculosis constituye un aspecto central en los esfuerzos para prevenir infección y enfermedad (Tabla 1).

Uno de los aspectos clínicos determinantes al momento de padecer tuberculosis es la presencia de infección por VIH, en particular, los individuos con un recuento de CD4 inferior a 200 células/ml se encuentran en mayor riesgo de adquirir la infección. Los pacientes de edad avanzada (disminución de la inmunidad celular asociada con el envejecimiento), y los individuos en tratamiento con inmunosupresores (especialmente pacientes con artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn en uso prolongado de anti TNF y esteroides) constituyen un grupo especialmente vulnerable a la enfermedad⁵¹.

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a infección por Mtb o progresión de la infección a enfermedad.

Factores de riesgo	
~ Ancianos	~ Fumadores
~ Uso de inmunosupresores	~ Trabajadores sanitarios
~ Diabéticos	~ Infección por VIH y SIDA
~ Enfermedad renal crónica	~ Enfermedad pulmonar preexistente
~ Patologías hemato-oncológicas	~ Individuos procedentes de regiones en las que la tuberculosis es endémica*
~ Antecedentes de trasplante de órganos	~ Individuos Institucionalizados (Residencia de ancianos)
~ Indigentes	~ Usuarios de drogas por vía parenteral

* El CDC incluye a la mayoría de los países de América Latina y el Caribe, África, Asia, Europa del Este y Rusia⁴⁸.

La diabetes mellitus es de especial interés, pues La Organización Mundial de la Salud y la Federación Internacional de Diabetes consideran que es una pandemia mundial; por tanto, sus implicaciones en la incidencia de tuberculosis son significativas¹. En la tabla 2, observamos el valor de riesgo relativo para tuberculosis en individuos

según su condición clínica, independientemente de los resultados obtenidos en la prueba de tuberculina ⁴⁸. Los pacientes con antecedentes de bypass yeyunoileal y silicosis tendrían un mayor riesgo de adquirir la enfermedad. La determinación de estos antecedentes médicos es crucial durante la evaluación clínica de pacientes con sospecha de tuberculosis en las áreas de atención primaria y en unidades de urgencias hospitalaria ³.

Tabla 2. Riesgo relativo para tuberculosis comorbilidades (comparado con individuos sanos).

Condición clínica	Riesgo relativo
VIH/sida	100-500
Gastrectomía	2-5
Cortocircuito yeyunoileal	27-63
Trasplante de órgano sólido	
Renal	37
Cardíaco	20-74
Carcinoma de cabeza o cuello	16
Silicosis	30
Diabetes mellitus	2,0-4,1
Insuficiencia renal crónica, hemodiálisis	10,0-25,3

Entre otros, se ha determinado que algunos factores de riesgo socioeconómicos modificables, como la poca ventilación, contaminación del aire en la vivienda, y antecedentes de tuberculosis pueden ser predictores de infección y tuberculosis activa, exacerbando aún más el círculo vicioso que existe entre de la pobreza y la enfermedad ⁵².

1.5.2. DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS LATENTE

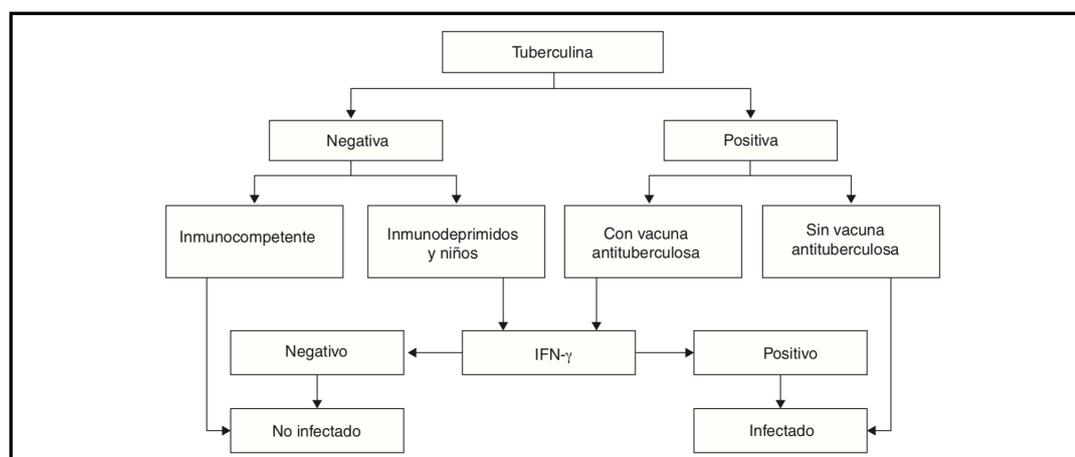


Figura 9. Algoritmo para el diagnóstico de tuberculosis latente. Pasos para descartar el diagnóstico de infección por tuberculosis, con el uso de la prueba de tuberculina e IGRAs. Modificada del consenso para tuberculosis de la SEPAR

En relación con el diagnóstico de la infección tuberculosa se utilizan pruebas que evalúan principalmente la inmunidad celular: la prueba cutánea de tuberculina (TST) y el análisis de sangre del ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA) (Figura 9). Las indicaciones para la elección de una de estas pruebas están definidas según las diferentes guías clínicas en cada país ³⁴.

En regiones con recursos limitados, se prefiere el uso de la prueba cutánea de tuberculina, pues esta supone un coste menor y tiene una sensibilidad similar a los IGRAs aunque es inferior en especificidad ⁴⁴.

El uso de pruebas para el diagnóstico de tuberculosis latente estará indicado en individuos con factores de riesgo para desarrollar la enfermedad y aquellos grupos poblacionales donde la prevalencia de la infección es alta. Conjuntamente, se incluirá a pacientes que reciben terapia inmunosupresora y con infección por VIH, dado su elevado riesgo de reactivación ⁴⁴.

Es de destacar que la enfermedad puede ser asintomática en pacientes con VIH, y todos los pacientes que presentan pruebas positivas para tuberculosis latente requieren de un estudio previo al inicio del tratamiento. Este estudio incluiría la elaboración de una historia clínica completa, examen físico exhaustivo, pruebas microbiológicas y radiológicas ³⁴.

1.5.3. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD TUBERCULOSA

1.5.3.1. RADIOLOGÍA Y TÉCNICAS DE IMAGEN

Los pacientes que cumplan criterios compatibles con tuberculosis, posterior a la realización de la historia clínica y exploración física, deberían someterse a estudios radiológicos como parte de la aproximación inicial mandatoria en casos con sospecha de infección o enfermedad.

La radiografía de tórax es una prueba esencial en el estudio de pacientes sintomáticos y con presencia de factores de riesgo epidemiológicos asociados a tuberculosis ⁵³. Los hallazgos observados en las pruebas de imagen permitirían determinar la extensión y actividad de la enfermedad tuberculosa (Tabla 3).

Tabla 3. Hallazgos radiológicos y asociación con actividad de la enfermedad tuberculosa.

Criterios radiológicos	
Criterios de actividad	Criterios de inactividad
~ Cavitaciones	~ Fibrosis
~ Nódulos miliares	~ Bronquiectasias
~ Signos de diseminación brocógena	~ Granulomas calcificados
~ Adenopatías mediastínicas	~ Ganglios calcificados
~ Derrame pleural	~ Engrosamiento o retracción pleural
~ Consolidaciones	~ Patrón de destrucción pulmonar
~ Opacidades en vidrio deslustrado	~ Patrón enfisematoso

Otras pruebas de imagen utilizadas, como la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RM), pueden ser necesarias en los casos donde hay sospecha clínica, no se puede descartar tuberculosis por pruebas microbiológicas o la radiografía de tórax tiene resultados no concluyentes, así como en las formas extrapulmonares. La TAC de tórax (Figura 10 y 11), puede efectivamente confirmar el diagnóstico de hasta un 89% de los casos con tuberculosis asintomática ⁵³.



Figura 10. TC de tórax mostrando múltiples opacidades redondeadas, milimétricas, en relación con patrón miliar ⁵³.

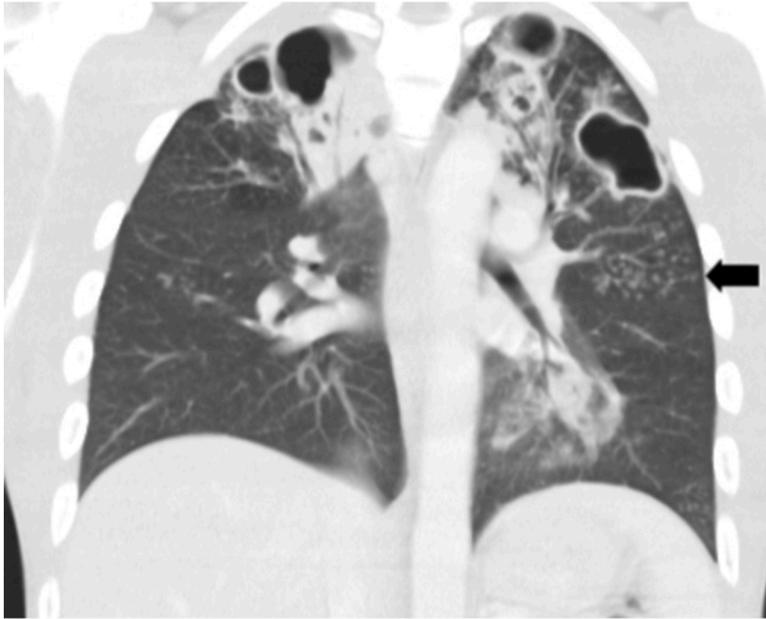


Figura 11. TAC de tórax con contraste. Consolidaciones en vértices pulmonares y cavitaciones. Se objetiva diseminación endobronquial, por la presencia de nodulillos y lesiones ramificadas centrolobulillares (flecha negra).

1.5.3.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Cuando las pruebas de imagen sugieren diagnóstico de tuberculosis pulmonar se procederá a la toma de 3 muestras de esputo, tomadas en días distintos o separadas al menos por 8 horas de diferencia, para realizar diagnóstico por medios microbiológicos ⁴⁸.

La técnica más utilizada para el diagnóstico rápido de la tuberculosis es la tinción ácido-alcohol resistente, por ser un método simple, accesible y rápido ³⁵. La detección de bacilos ácido-alcohol resistentes es sinónimo de tuberculosis activa, un individuo es considerado bacífero con un resultado de la prueba positivo, un porcentaje variable (30–50%) de los pacientes no será bacífero, por lo que una baciloscopia negativa nunca puede descartar la enfermedad.

Las tinciones más utilizadas son las tinciones de Ziehl-Neelsen y la fluorescente de Auramina-Rodamina, con una especificidad similar para ambas. Las tinciones permiten la identificación de todos los miembros del género *Mycobacterium* en muestras orgánicas ⁵⁴.

El diagnóstico definitivo de tuberculosis pulmonar se establece con el aislamiento de *M. tuberculosis* por el cultivo en muestras esputo, líquido pleural o

lavado bronco alveolar, entre otras, además de el aislamiento en otros tejidos corporales^{46,54}. El cultivo de muestras constituye la prueba cardinal para el diagnóstico, es la herramienta más sensible y puede resultar positivo con tan solo 10 bacterias/ml. Las micobacterias son microorganismos de crecimiento lento y requieren de 2-6 semanas para presentar un crecimiento visible, y aquí radica una de las dificultades en el uso de los cultivos⁵⁴.

Una vez se confirma la enfermedad con el aislamiento de la micobacteria, el uso del antibiograma es esencial para determinar la susceptibilidad a isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol (tratamiento antituberculoso de primera línea), además de la identificación de la cepa y establecer el curso de tratamiento adecuado. Al mismo tiempo, las técnicas microbiológicas son herramientas esenciales para valorar la buena respuesta clínica, cuando se confirma la negativización de los cultivos y se ratifica la eficacia del tratamiento antituberculoso utilizado⁵⁵.

El uso de técnicas moleculares de amplificación está indicado como adyuvante en el diagnóstico de la tuberculosis al permitir un diagnóstico rápido (24-48 horas). Estas amplifican una secuencia específica de ácido nucleico que se puede detectar mediante sondas. La obtención de una prueba de amplificación positiva (con o sin positividad de baciloscopia) en un paciente con sospecha de clínica se considera suficiente para el diagnóstico de tuberculosis⁵⁵.

1.6. TRATAMIENTO

En individuos con infección latente por *M. tuberculosis*, se utiliza la isoniazida como tratamiento preventivo para el desarrollo de la enfermedad. El uso de un régimen profiláctico en pacientes con pruebas de tuberculina positiva ha disminuido las tasas de tuberculosis activa y muerte en países con alta incidencia de la enfermedad. El curso de este tratamiento tiene una duración de 9 meses y puede prolongarse en personas infectadas por el VIH en regiones con una alta incidencia de tuberculosis⁴⁴.

Dentro de las recomendaciones de la OMS, todas las personas infectadas por el VIH y con una prueba cutánea de tuberculina positiva recibirán terapia preventiva con isoniácida durante al menos 6 meses³⁴.

Tabla 4. Régimen de tratamiento antituberculoso según condición clínica.

Condición clínica y comorbilidades	Riesgo relativo
Pulmonar y extrapulmonar	2HRZE/4HR
Régimen alternativo	2HRZS/4HR*
Hepatopatía crónica grave	2HRE/7HR
Meningitis, tuberculomas	2HRZE/10HR
Silicosis, espondilitis TB con afección neurológica	2HRZE/7HR

E: etambutol; H: isoniazida; R: rifampicina; S: estreptomycin; TB: tuberculosis; Z: pirazinamida.

* Etambutol puede sustituirse por estreptomycin (2HRZS/4HR)

El esquema farmacológico estándar para la tuberculosis activa incluye cuatro medicamentos de primera línea (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol). El régimen antituberculoso tiene una duración habitual de seis meses y constan de dos fases: una fase intensiva, seguida de una fase de continuación (Tabla 4) ³⁴. La mayoría de los pacientes reciben los cuatro fármacos en la fase intensiva durante dos meses (R, H, Z y E); se utiliza para disminuir las probabilidades de desarrollar resistencia secundaria a la rifampicina en poblaciones con una alta tasa de resistencia primaria a la isoniazida.

La adherencia a el tratamiento pautado es fundamentales durante la fase intensiva, pues la carga bacteriana es elevada y la posibilidad de desarrollar resistencia a los medicamentos es más alta. La etapa de continuación tiene una duración de cuatro a siete meses, incluye el uso de isoniazida y rifampicina (4RH) ³⁴. Una vez *M. tuberculosis* es aislado en cultivos y se determine su sensibilidad a estos fármacos mediante antibiograma, se podrá proceder con la suspensión de etambutol ⁴⁴.

El tipo de resistencia puede ser primaria, cuando existe resistencia a uno o más de los diferentes tratamientos antituberculosos en cepas obtenidas de pacientes no tratados previamente, y la resistencia secundaria se ha definido como la presencia de resistencia a tratamiento antituberculoso en pacientes que habían recibido tratamiento previo para tuberculosis ³⁴.

El tratamiento de la TB susceptible a los medicamentos suele ser satisfactorio, aunque pueden presentarse recaídas en individuos que presentan cavitaciones, enfermedad extensa, inmunosupresión y persistencia de cultivos positivos después de 2 meses de tratamiento. En este sentido, los pacientes que tendrán una extensión de hasta 9 meses de tratamiento ^{34,44}. El tratamiento integral de la tuberculosis activa deberá incluir la detección de resistencia a los medicamentos y el VIH, y apoyo al paciente para la adecuada adherencia al tratamiento.

2. LA AUTOFAGIA

El descubrimiento de la macroautofagia, denominada simplemente autofagia, es un evento importante en el esclarecimiento de los diferentes mecanismos de homeostasis celular ^{56,57}. Su gran impacto científico fue reconocido en 2016, cuando se otorgó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a Yoshinori Ohsumi, gracias a su innovador trabajo sobre los diferentes mecanismos de autofagia básica. En particular, fueron identificados y caracterizados los genes relacionados con la autofagia (ATG), implicados en la nucleación, iniciación y maduración de los autofagosomas ^{58,59}.

Las células experimentan cambios rápidos para adaptar su metabolismo y protegerse frente posibles daños, utilizando múltiples vías celulares que involucran la acción concreta de diversas vías de respuesta ante el estrés. Tras la activación de la autofagia, se forman vesículas de doble membrana, conocidas como autofagosoma, que secuestran orgánulos, proteínas o porciones del citoplasma, para su degradación ^{57,60,61}. Aunque se han observado diferentes vías de eliminación, los autofagosomas capturan los elementos citoplasmáticos para la degradación de la carga ⁶².

La autofagia puede ser modulada por diferentes factores metabólicos, fisiológicos, inmunológicos (citoquinas e inmunidad innata) y/o farmacológicos (por ejemplo, rapamicina). En concreto, el agotamiento de nutrientes en células de mamíferos *in vitro* induce la autofagia en minutos, siendo conocido como su inductor fisiológico más potente ⁶³. Conjuntamente, existen diferentes moléculas que regulan la autofagia inducida por inanición; entre las cuales, mTOR (*mammalian target of rapamycin*) y AMPK (*AMP-activated Ser/Thr protein kinase*) han sido las proteínas más caracterizadas.

La autofagia es un componente central en la respuesta integrada frente al estrés celular ⁶³, permitiendo que la célula sobreviva ante diferentes estímulos nocivos. Por consiguiente, funciona como un proceso de localización y degradación de contenidos citoplasmáticos en respuesta a la inanición o el estrés proteotóxico y oxidativo, además de enfermedades degenerativas, inflamatorias, neoplásicas e infecciosas ^{64,65}.

2.1. MECANISMO MOLECULAR DE AUTOFAGIA

Tabla 5. Proteínas relacionadas con la autofagia en mamíferos y sus homólogos en levaduras.

Mamíferos	Levaduras	Función/complejo
ULK1/2	Atg1	Serina/Treonina quinasa. Complejo Atg1/ULK
ATG2	Atg2	Proteína de membrana. Sistema ATG9
ATG3	Atg3	Enzima tipo E2, esencial para la conjugación de Atg8
ATG4 A-D	Atg4	Cistein proteinasa que activa y deslipida Pro-LC3
ATG5	Atg5	Complejo ATG12-ATG5
Beclin1	Vps30/Atg6	Complejo Vps34 PI3P quinasa
ATG7	Atg7	Enzima tipo E1. Conjugación tipo ubiquitina
LC3A,B,B2,C, GABARAP,L1,L2	Atg8	Tiene conjugación tipo ubiquitina con PE
ATG9	Atg9	Proteína transmembrana, parte del sistema ATG9
ATG10	Atg10	Enzima tipo E2 para la conjugación de Atg12
ATG12	Atg12	Complejo ATG12-ATG5
ATG13	Atg13	Complejo Atg1/ULK
ATG14L	Atg14	Subunidad del Complejo PI3K de clase III
ATG16L	Atg16	Proteína implicada en la conjugación ATG8-PE
FIP200	Atg17	Complejo Atg1/ULK
WIPI1/2	Atg18, Atg21	Proteína de membrana periférica
P150	Vps15	Proteína serina/treonina quinasa. Complejo PI3K de clase III
VPS34	Vps34	Complejo PI3K de clase III

Nuestra comprensión básica del mecanismo molecular de la formación de autofagosomas proviene principalmente del estudio de los ATGs, identificados inicialmente en levaduras ^{17,66-68}. En consecuencia, la regulación de este proceso molecular depende de las ATGs, con un total de 30 proteínas que coordinan múltiples modificaciones post-traslacionales en todas las fases a través de una gran variedad de vías ⁶⁹⁻⁷¹. Muchas de las ATGs involucradas en la formación de nuevos autofagosomas, se pueden separar en 5 grupos organizados jerárquicamente en complejos funcionales ¹⁷ (Tabla 5):

1. Complejo tetramérico ULK (*the unc-51-like kinase complex*): formado por ULK1, ATG13, FIP200 (*focal adhesion kinase family- interacting protein 200kD*) y la proteína ATG10, regulado por AMPK y mTOR.
2. ATG9: proteína que proporciona las bicapas lipídicas en el proceso de formación de autofagosomas.
3. Complejo proteico PI3K de clase III (*class III phosphatidylinositol 3-kinase complex*): compuesto por VPS34 (*Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic unit 3*), ATG6 (*Beclin-1*), ATG14 y VPS15. Estas ATGs dependen de la fosforilación por complejo ULK.

4. Complejo ATG12-ATG5/ATG16L1: posterior a la expansión de la membrana. Se requiere de una reacción similar a la ubiquitinación para el enlace covalente de Atg12 con Atg5, seguido de una asociación con ATG16L1.

5. En mamíferos, existen cuatro Atg4 (Atg4A-B) y al menos seis ortólogos de Atg8, entre los cuales LC3, GABARAP y GATE16 han sido los más estudiados ⁷².

AMPK regula positivamente autofagia mediante la fosforilación de ULK1 (*Unc-51-like kinase 1*) en los sitios de activación ⁷³. Además, controla el estado energético de la célula determinando el AMP: ATP ratio. Así, durante la inanición y bajos niveles de energía, AMPK actúa como elemento esencial al integrar varios estímulos de estrés con el inicio de la autofagia. Varias quinasas “aguas arriba” pueden activar la AMPK mediante la fosforilación de un residuo de treonina en su subunidad α catalítica ⁷⁴.

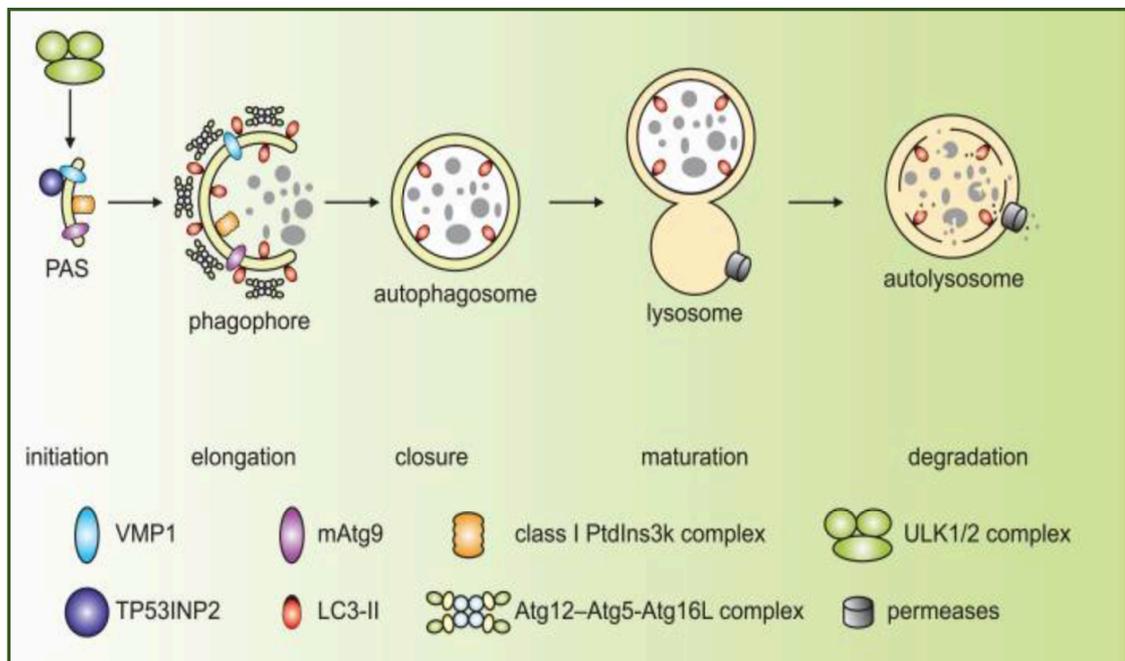


Figura 12. Ruta de la autofagia y procesos moleculares en células de mamíferos. Modificado de Yang et al., 2010

La proteína mTOR controla negativamente la mayor parte de las ATGs, mediante la fosforilación en los sitios de inactivación. mTOR regula el complejo ULK1 quinasa para su unión con el complejo mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) ⁷⁵. Este complejo está formado por mTOR, Raptor (*Rapamycin-sensitive adapter protein of mTOR*) y la proteína LST8. Los aminoácidos activan mTORC1, a través de la familia Rag de GTPasas, que interactúan directamente con Raptor y reclutan mTORC1 a la superficie lisosomal ⁷⁶. Además de ser inhibido por AMPK y

condiciones de inanición, mTORC1 también se inhibe en ausencia de factores de crecimiento como la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina ⁷⁷.

2.1.1. ORÍGENES DE LA MEMBRANA DE AISLAMIENTO

El mecanismo central de autofagia comienza con la formación de una membrana de aislamiento, también llamada fagosforo ⁷⁸. Dentro de las posibles fuentes de membrana para la nucleación inicial del fagosforo se incluyen las vesículas COPII (*Coat complex protein II*), reclutamiento de lípidos por ATG9, la membrana mitocondrial externa ⁷⁹, la membrana plasmática ⁸⁰ y las membranas que se originan a partir de estructuras del omegasoma (subdominios de especializados de RE) ^{60,68,79-84} (Figura 12).

2.1.2. INICIACIÓN Y NUCLEACIÓN DEL FAGOSFORO

Primeramente, la activación del complejo ULK quinasa lidera la iniciación de fagosforo. ULK1 y ULK2 desempeñan un papel clave en la inducción de autofagia, actuando como inhibidores de mTORC1 ⁷⁶. Tras la inhibición de mTORC, por inanición u otros estímulos, se disocia del complejo ULK quinasa, iniciando así el ensamblaje del fagosforo ⁷². ULK1 puede fosforilar Ambra1 (*activating molecule in BECN1 regulated autophagy*) ⁸⁵, logrando la liberación del complejo PI3K Clase III/Beclin 1 e iniciar la biogénesis ⁸⁶.

Simultáneamente, dos proteínas VAP (*vesicle-associated membrane protein*), VAPA y VAPB, interactúan con FIP200 y ULK1, lo que contribuye a la estabilización del complejo ULK1/FIP200 (el complejo Atg1 de mamífero) en los sitios de formación de autofagosomas ⁶⁸. La interacción entre FIP200 y WIPI2 (*WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 2*) también favorece la iniciación del fagosforo ⁶⁸ (Figura 13).

Los subdominios de especializados de RE, denominados omegasomas, proporcionan plataformas para la nucleación del fagosforo ⁸¹, que empieza cuando el complejo proteico PI3K de clase III es activado. El complejo ULK1/FIP200 se encarga de interactuar con el complejo PI3K para la generación de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) por fosforilación de Vps34. Posteriormente, PI3P se encarga de marcar el lugar

para la nucleación del fagosforo, para que se convierta en un autofagosoma completo ⁶⁸.

Los adaptadores de TLR (*toll-like receptor*), MyD88 y TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), también pueden interactuar con Beclin 1, lo que reduce la unión de Beclin 1 a Bcl-2 promoviendo la autofagia. Igualmente, TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6*), media la ubiquitinación de Beclin 1 ligada a K63 durante la autofagia inducida por TLR4, incrementando la actividad de PI3K clase III ⁸⁷.

Por otra parte, Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1, son proteínas reguladoras negativas de la autofagia a través de la interacción inhibitoria de su surco de unión a BH3 con el dominio BH3 de Beclin 1 ⁸⁸. Entonces, cuando produce la disociación Beclin 1/Bcl-2, se activa la nucleación ⁸⁹, fase necesaria para la formación final del autofagosoma.

2.1.3. EXPANSIÓN DE LA MEMBRANA DEL AUTOFAGOSOMA POR SISTEMAS DE CONJUGACIÓN

Seguido de la inclusión de las partículas a degradar, empieza la expansión de la membrana ⁶⁶. Después de la elongación, la membrana se fusiona consigo misma para formar una doble membrana ⁹⁰. Dos sistemas de ubiquitina han sido relacionados con el proceso de expansión (Figura 13):

El primer sistema involucra el complejo multimérico ATG12-ATG5/ATG16L1, conformado por la conjugación covalente de Atg12 a Atg5, con la ayuda de Atg7 y Atg10, al asociarse con Atg16 de manera no covalente, necesario para la formación del pre-autofagosoma y que funciona como la ligasa E3 de LC3 ⁷⁸.

La reducción del Ca^{2+} citosólico produce un aumento de los niveles celulares de Atg5 y del conjugado pro-autofágico Atg12-Atg5 ⁹¹. El segundo, es el sistema de conjugación de ATG8: incluye la lipidación de LC3 para generar LC3-1, la versión citoplasmática de LC3, por medio de la proteasa Atg4. Posteriormente, las proteínas ATG7 y ATG3 efectúan la conjugación de LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-II (*LC3-phosphatidylethanolamine*) ⁹⁰.

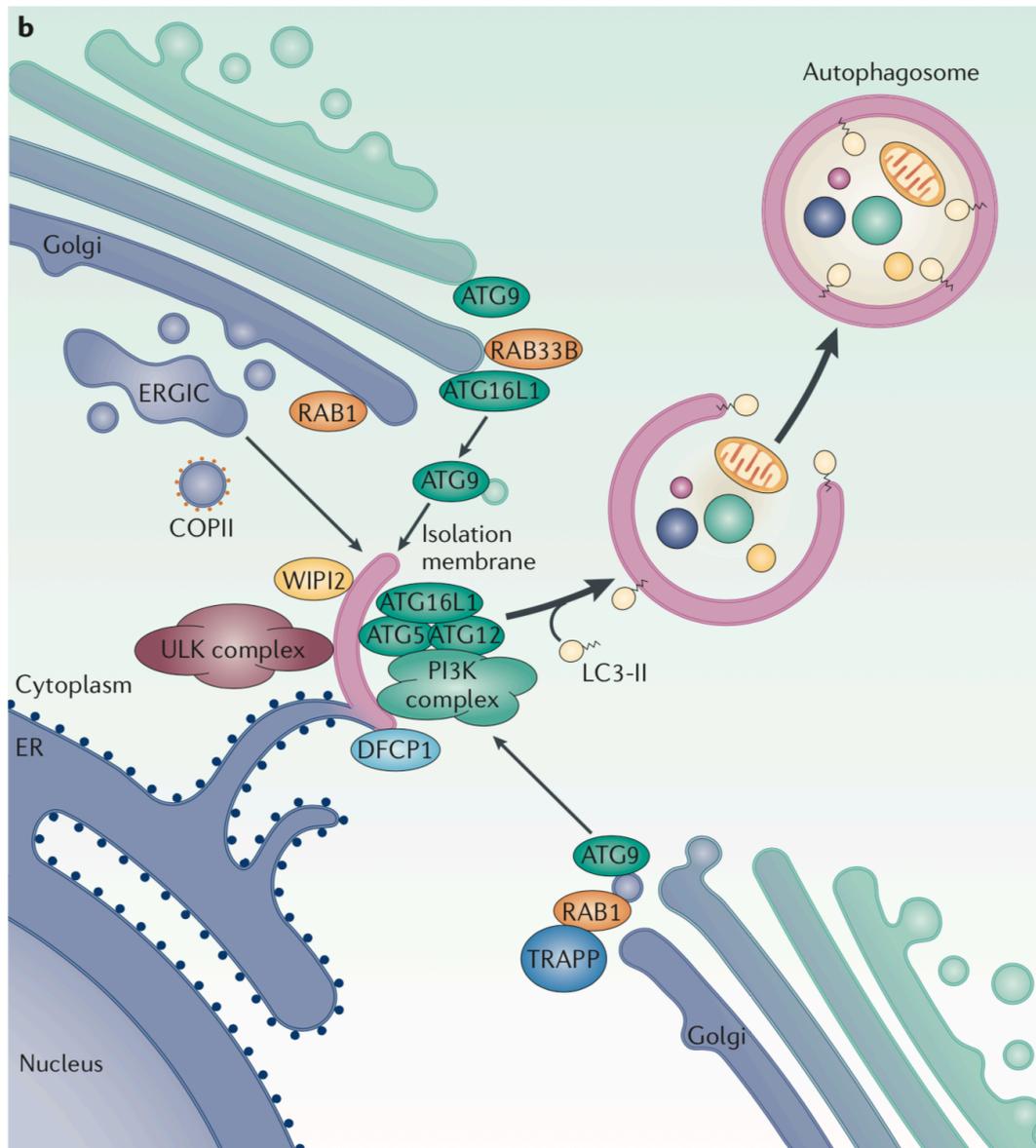


Figura 13. Formación y expansión de la membrana del autofagosoma.

La proteína LC3-II se considera necesaria para la elongación y el cierre de la membrana, y permanecerá en la capa interna autofagosómica hasta el momento de la degradación. La detección bioquímica y microscópica de LC3-II se usa ampliamente para medir la actividad autofágica⁹². También, es un fundamental para el reclutamiento de la carga por un mecanismo dependiente de proteínas ubiquitinadas que identifican sustratos a través de sus dominios UBA, y el dominio LIR servirá como adaptador al momento de la eliminación^{7,93}.

En contraste con la mayoría de las otras proteínas ATGs, ATG9 es la única proteína transmembrana que se puede mover rápidamente entre numerosos compartimentos distintos a través del citoplasma^{83,84}. ATG9 proporciona lípidos y

otros reguladores para la membrana del fagosforo, requiriendo de Atg1/ULK1 y la actividad de la proteína quinasa Vps34^{83,84,94}. ATG2 se une los bordes de la membrana en crecimiento con el RE, y simultáneamente, conecta ATG9 con los extremos del fagosforo^{95,96}.

2.1.4. CIERRE AUTOFAGOSOMA Y FUSIÓN CON LISOSOMAS

Algunas de las proteínas mencionadas actúan en múltiples pasos de la vía de autofagia, y su función tardía durante la maduración del autofagosoma puede enmascararse por su papel en los pasos anteriores de la formación del fagosforo. Por ejemplo, ATG8, ATG14 y PI3P desempeñan papeles importantes en la formación y maduración del autofagosoma^{67,97}.

Rab2 está involucrado en la maduración autofagosoma. Se encarga de localizar autofagosomas e interactúa con el complejo HOPS (*Homotypic fusion and protein sorting*) para promover el proceso de maduración⁹⁸. Otra GTPasa, Rab7, promueve la maduración en autofagosomas, conformando el conjugado Mon1-Ccz1-Rab7 para completar el reclutamiento del complejo HOPS^{99,100}. Además, PI3P facilita la utilización de Mon1/Ccz1 y estabiliza la unión con Rab7 en autofagosomas, ayudando en el reclutamiento de la proteína WIPI en la membrana del fagosforo^{97,100}. Fosfolípidos como PI3P, son utilizados para fijar el complejo HOPS a la membrana¹⁰⁰.

Miembros de la familia ATG8, GTPasas de Rab, el complejo UVRAG (*UV radiation resistance- associated gene protein*) y las proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) actúan de manera coordinada para mediar el proceso de cierre y fusión del autofagolisosoma^{101,102}.

El cierre final del fagosforo parece completarse por el complejo proteico ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)¹⁰³, y se acompaña de un cambio en la morfología elíptica de las membranas a la forma esférica sellada de los autofagosomas¹⁰³.

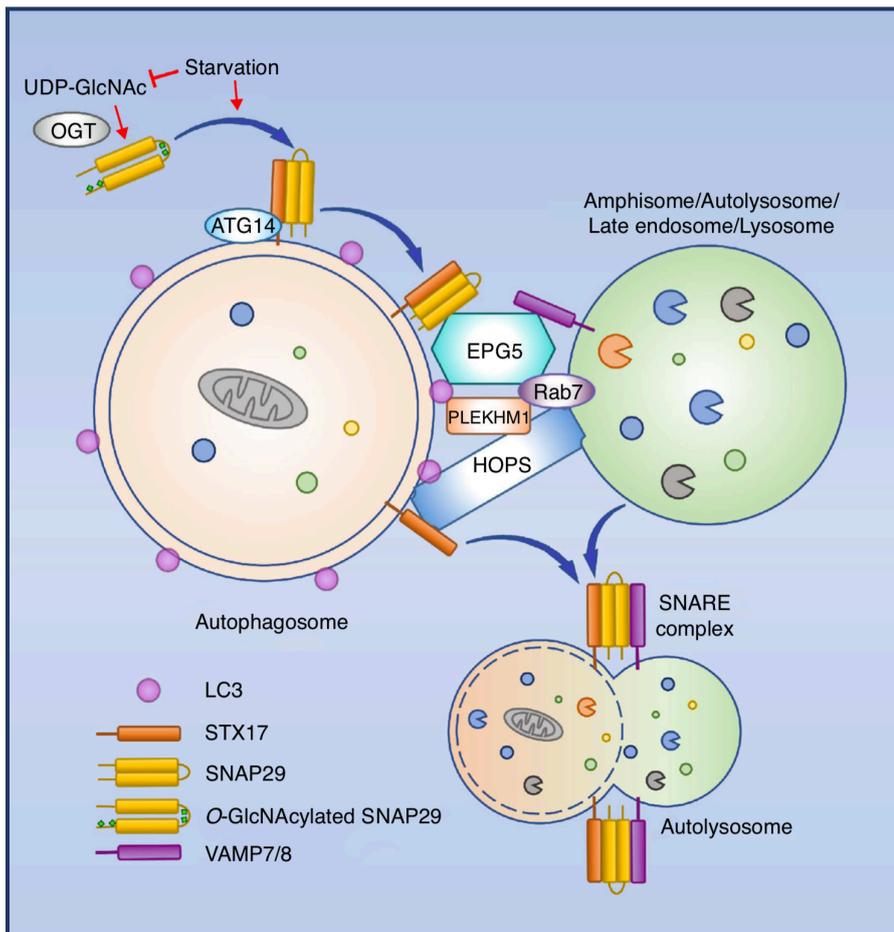


Figura 14. Factores implicados en la fusión del autofagosoma con lisosomas.

La proteína UVRAG, compete con Atg14 por unirse a Beclin 1 y puede promover la actividad del complejo PI3K de clase III, originando la fusión del autofagosoma con el lisosoma tardío ⁷⁸. La proteína ATG14, también se localiza en autofagosomas sellados y se une al dominio central SNARE STX17 para estabilizar el complejo STX17-SNAP29 favoreciendo el proceso de fusión ⁹⁷. LAMP2 promueve la fusión de lisosomas con autofagosomas ¹⁰¹ (Figura 14).

Rab7 interactúa con factores de anclaje en lisosomas, como EPG5, PLEKHM1 y HOPS, para promover el ensamblaje de complejos t-SNARE durante la fusión con los autofagosomas ⁹⁹. Recientemente, ha sido informado que los complejos SNARE pueden promover la eficacia de la fusión con diferentes poblaciones de lisosomas que contienen niveles variables de VAMP7/8 (VAMP-3 (*vesicle-associated membrane protein 7/8*) y STX7 ¹⁰⁴ (Figura 14). Finalmente, el desmontaje del complejo SNARE en membranas postfusión es un proceso esencial catalizado por NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) y α SNAP, para completar el proceso de fusión ¹⁰⁵.

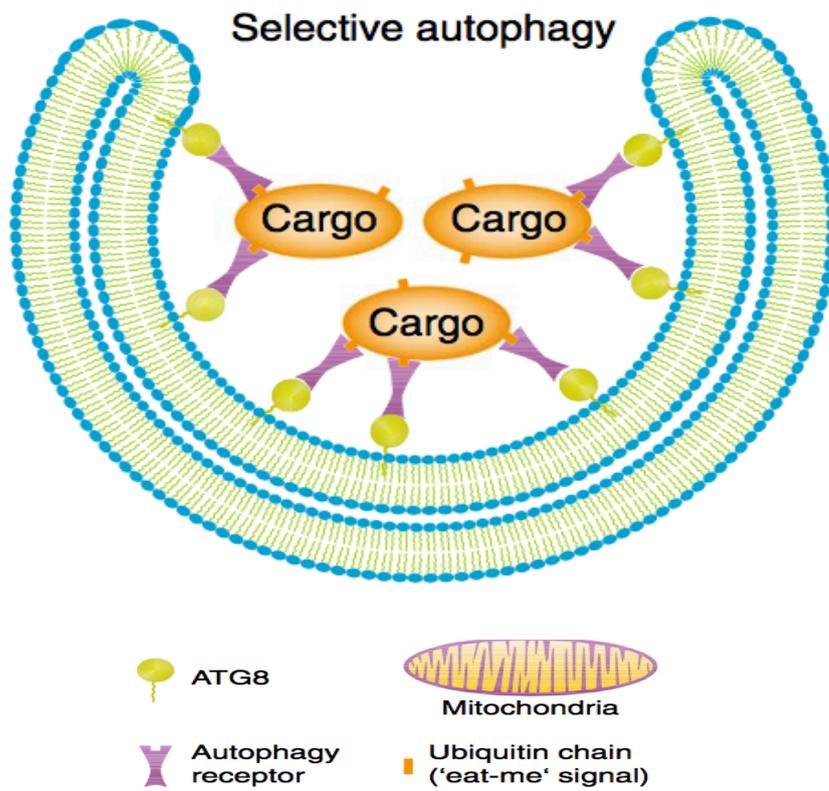
El ambiente ácido de los lisosomas no es esencial para la fusión autofagosoma-lisosoma. Una vez finalizada la fusión, la capa interna decorada con LC3 y los contenidos se liberan para su degradación por enzimas hidrolíticas, que sirve como plataforma para la activación de mTORC1 ¹⁰⁶. A continuación, los productos de la descomposición se transportan nuevamente al citoplasma para ser reutilizados por la célula ¹⁰⁷.

2.1.5. AUTOFAGIA SELECTIVA

Christian de Duve, uno de los investigadores pioneros en el estudio de la autofagia, fue uno de los primeros en sugerir la existencia de un mecanismo cuya finalidad es la eliminación de carga citoplasmática ¹⁰⁸. Una de las funciones de la autofagia es la eliminación de sustratos citosólicos ubiquitinados o agregados proteicos ¹⁰⁹. La autofagia selectiva es el mecanismo que utilizan las células para el marcaje y degradación de partículas citoplasmáticas, orgánulos dañados, agregados proteicos o patógenos intracelulares, contribuyendo a la homeostasis celular al deshacerse de elementos nocivos en el citoplasma ^{18,110}.

La vía de autofagia selectiva se ha vinculado con diferentes enfermedades e infecciones en humanos; También, al igual que la autofagia no selectiva, es activada por estímulos externos como estrés oxidativo, hipoxia o ayuno prolongado ¹¹¹. Las proteínas receptoras específicas (SLR) se encuentran implicadas en la defensa contra patógenos en el citosol celular. Estas proteínas se unen a la carga a degradar (Figura 15), y la entregan a la membrana del autofagosoma que se encuentra en formación ^{112,113}.

En resumen, los receptores selectivos de autofagia se dividen esencialmente en dos grupos: dependientes e independientes de ubiquitina. Las bacterias y mitocondrias comparten el sistema de reconocimiento por receptores dependientes de ubiquitina ¹¹⁴. Esto quiere decir que son reconocidas a través de cadenas de poliubiquitina unidas a ellas a través de su UBD (dominio de asociación a ubiquitina) ¹¹⁵. Precisamente, el receptor más estudiado de este tipo es p62 (también conocido como SQSTM1: *sequestosome 1*) que tiene diferentes dominios implicados en varios mecanismos celulares ¹¹⁶, e interactúa con LC3 permitiendo unir el sustrato con el autofagosoma para su consecuente degradación ^{117,118}.



*Figura 15. En la autofagia selectiva, los receptores de autofagia se unen selectivamente a la carga para su transporte a el autofagosoma al unirse a ATG8.
Modificado de Christian Münch and Ivan Dikic, 2018*

3. AUTOFAGIA Y TUBERCULOSIS

Mycobacterium tuberculosis, fue uno de los dos primeros patógenos cuya degradación fue vinculada con en el proceso de eliminación autofágica ¹⁰². La autofagia suministra componentes citoplasmáticos para la degradación lisosomal ¹¹⁸y se involucra en la defensa de la tuberculosis generando respuestas de inmunidad innata y citoquinas ⁶. Conjuntamente, puede capturar y eliminar bacilos de *Mtb* a través de las propiedades líticas y antimicrobianas exclusivas de los autofagosomas ¹¹².

La capacidad de *Mtb* de replicarse y sobrevivir en los macrófagos del huésped es central para su patogénesis, y su virulencia está asociada directamente con su crecimiento intracelular ^{10,11,119}. Precisamente, *Mtb* ha desarrollado diferentes mecanismos para evitar su eliminación intracelular, uno de esto es el bloqueo la maduración del fagosoma ^{119,120}.

Por otra parte, Deretic y colaboradores han demostrado que la maduración del fagosoma y la eliminación de la micobacteria pueden ser restaurados con la inducción exógena de la autofagia, convirtiéndolos en organelas micobactericidas ^{102,121} con el uso de sistemas de eliminación asociados a LC3 ¹²².

Los bacilos presentes en el citosol se erradican mediante autofagia selectiva, independientemente de corresponder a una pequeña proporción de la carga total intracelular de *Mtb* ¹²³. En definitiva, la autofagia degrada bacilos de *Mtb* intracelulares funcionando como un efector innato fundamental contra la infección micobacteriana ^{121,124,125}.

3.1. AUTOFAGIA, INMUNIDAD Y TUBERCULOSIS

Algunos de los mecanismos implicados en la activación de la autofagia después de una infección bacteriana no se han podido entender íntegramente ¹²². Diferentes autores han descrito la regulación que ejerce la autofagia sobre la respuesta inflamatoria, pues contribuye tanto a la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1a, IL-1b, y IL-18), como a la secreción de las proteínas citosólicas conocidas como "alarminas" ^{7,20,126}.

En cuanto a las citoquinas, las respuestas Th1 y Th2 tienen efectos opuestos en la formación de fagosomas ¹²⁰; mientras que las citoquinas de tipo Th2 bloquean la formación de autofagosomas, las citoquinas de tipo Th1 la incrementan ⁷. IFN-g, una

citoquina Th1 primordial, puede activar la autofagia en macrófagos a través de IRGM1 (miembro de la familia las GTPasas) ¹²⁷. Asimismo, TNF-a parece favorecer las respuestas antimicrobianas y autofágicas desencadenadas por el IFN-g ^{15,128}, en conjunto con otras citoquinas como IL-2, IL-6, CCL2, que favorecen positivamente la respuesta autofágica contra micobacterias ¹²⁸.

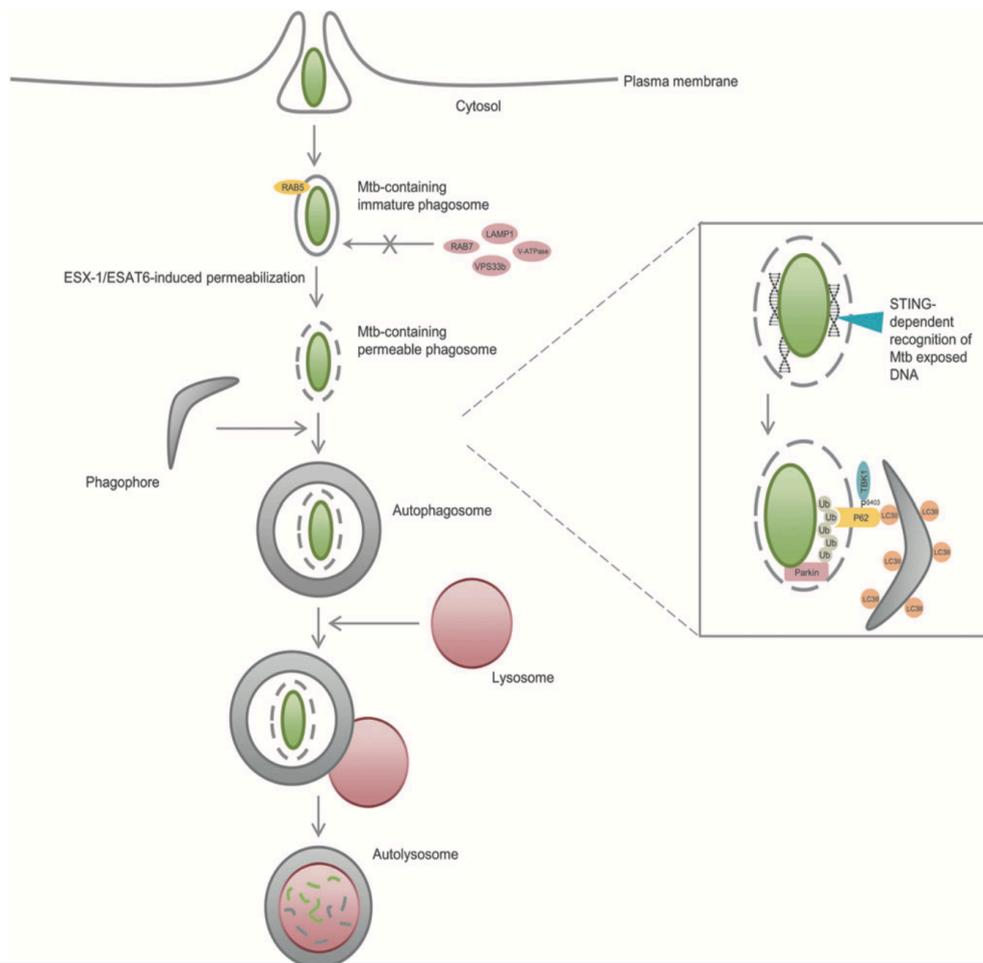


Figura 16. Eliminación de *M. tuberculosis* mediante autofagia.
Modificado Bento et al., 2015

IL-1b, citoquina esencial para el control de la infección, permite la eliminación de *M. tuberculosis* en macrófagos, a través del adaptador TBK-1 (*TANK-binding kinase 1*) en células huésped. La vía de señalización del receptor de IL-1 utiliza a MyD88 como adaptador, que es un paso clave para la regulación de la respuesta inmune y el control temprano de los bacilos intracelulares ¹²⁹.

El sistema de secreción ESX-1 del bacilo, permeabiliza el autofosoma, exponiendo el DNA bacteriano y permitiendo su identificación en el citosol celular ¹³⁰. En los últimos años, diferentes estudios han identificado la proteína STING (*stimulator*

of interferon genes), encargada reconocer el DNA de doble cadena de origen exógeno, e implicada en la producción de citoquinas^{131,132}. Durante la infección, la enzima cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*), genera el dinucleótido cGAMP que es reconocido por STING, permitiendo la amplificación de la respuesta inmune vía IFN- β tipo I¹³⁰.

En consecuencia, el DNA de *Mtb* funciona como una señal para inducir la autofagia en los macrófagos tras ser identificado por STING, desencadenando la activación de TBK1 y el marcaje de la micobacteria con péptidos derivados de ubiquitina¹³⁰. Ponpuak et al. realizaron un análisis del rol de p62 en el proceso de autofagia contra *Mtb*¹¹², TBK1 fosforila el receptor p62, incrementando su afinidad por los sustratos de ubiquitina unidos a *Mtb*¹¹⁶, permitiendo su entrega al autofagosoma (Figura 16). Se ha observado que macrófagos con ausencia de STING son altamente susceptibles a la infección¹³³.

La tuberculosis es la infección oportunista más común en VIH en estadios avanzados de la enfermedad (C3) y la capacidad que tiene *Mtb* de sobrevivir en macrófagos, destaca la importancia de los procesos de tráfico intracelular durante las infecciones¹³⁴.

La inducción de procesos de autofagia anti-*Mtb* también se ha indicado como parte de la interacción directa entre células T específicas y macrófagos infectados¹³⁵. Este mecanismo afecta la generación de respuestas a los HLA II (*Human Leukocyte Antigen Type II*) y las células T CD4+, impactando el desarrollo, diferenciación, polarización y homeostasis de las células T¹³⁶. HLA II facilita el secuestro de bacilos ubiquitinados en los fagosomas y la consecuente fusión con lisosomas. Los péptidos generados después de la captura y destrucción de *Mtb* en autofagolisosomas, son reciclados y ayudan en la producción de moléculas de HLA de clase II¹³⁷.

La autofagia es regulada, entre otros, a través de PRRs (*Pattern recognition receptor*), como las ligandinas TLR y TLRs, TRAF6, y receptores tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization-domain*)^{114,138}. Los TLRs actúan a través de MyD88, relevante en la respuesta inflamatoria a la infección tuberculosa. Además, los receptores TLR2, TLR4 y TLR9 parecen ser los principales TLRs implicados en el reconocimiento de micobacterias y la producción de moduladores antimicrobianos y citoquinas en la infección por *Mtb*¹³⁸.

NOD1 Y NOD2, receptores citosólicos para el peptidoglicano de *Mtb*, se encargan de reclutar ATG16L1 al sitio de entrada de la bacteria en células no

fagocíticas, macrófagos y linfocitos ¹³⁹ y puede activar la autofagia a través de RIPK2 y ULK1 en respuesta a *Mtb* y otras infecciones ⁸³.

Existen importantes agonistas hormonales relacionados con la activación de autofagia por IFN-g, incluyendo el metabolito de la vitamina D derivado del calcitriol, también conocido como 1,25-dihidroxitamina D3 o 1,25-dihidroxicolecalciferol. Diferentes estudios en macrófagos humanos, han corroborado el papel sinérgico entre IFN-g y calcitriol para la eliminación de *Mtb* durante la inducción de la autofagia ^{121,124,140,141}.

El calcitriol se genera en el riñón y circula a muy bajas concentraciones en el suero. Sin embargo, puede generarse adicionalmente en macrófagos humanos a partir de su precursor calcidiol (presente en concentraciones mucho más altas en el suero) por medio de la hidroxilasa 1- α específica generada por macrófagos en respuesta a la activación de los TLRs ¹⁴². Los niveles bajos de calcitriol y calcidiol en el suero se han asociado con la susceptibilidad a la tuberculosis ¹⁴³.

3.2. LA DEFENSA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* FRENTE A LA AUTOFAGIA

Mtb interfiere con el tráfico de la membrana intracelular en macrófagos infectados a través de muchos factores ¹⁴⁴. Algunos de estos factores son producto de mecanismos moleculares que antagonizan la autofagia y que se han analizado en profundidad, así como su relación con la virulencia de esta cepa ¹²⁷.

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno humano altamente adaptado que ingresa a los macrófagos del hospedador, donde se guarda en fagosomas y bloquea la biogénesis de fagolisosomas ^{144,145}, generando una inhibición que es fundamental para la infección tuberculosa, latencia y progresión a enfermedad, además de favorecer su diseminación y suprimir su detección por parte del sistema inmunológico del huésped ^{6,40,146}.

Mtb mejora su supervivencia intracelular produciendo la 1-aminoacetiltransferasa Eis (*Enhances intracellular survival*), que aumenta los niveles de IL-10 y activa la vía PI3K/Akt/mTOR/p70S6K para restringir la actividad autofágica de macrófagos ¹¹. Eis también inhibe la generación de ROS (*Reactive oxygen species*) ¹²⁵ y acetila Lys-55 en una fosfatasa específica de la quinasa JNK

(*c-Jun N-terminal kinase*). La acción de JNK es esencial para la activación del regulador clave de autofagia Beclin 1, por lo que suprime la autofagia ¹²⁵.

En individuos con tuberculosis, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) producen IL-4 e IL-13, dependientes de STAT6 (*Signal Transducer And Activator Of Transcription 6*). Básicamente, estas interleucinas inhiben predominantemente la autofagia, por encima de otros inductores fisiológicos, disminuyendo la sensibilidad de las células a IFN- γ para restringir la formación de autofagosomas ¹²⁸.

Mtb genera una reprogramación metabólica de los macrófagos infectados al aumentar las gotas lipídicas (reservas de lípidos, como los triglicéridos y los ésteres de colesterol), bloquear la maduración del fagosoma, reduciendo la capacidad autofágica de la célula y evitando así su erradicación ^{102,119}.

Ciertos estudios han indicado que ESX-1, un sistema de secreción tipo VII de *Mtb*, libera ESAT-6 (*Early secreted antigenic target of 6 kDa*) para bloquear la fusión autofagosoma-lisosoma evitando la eliminación en células dendríticas ⁷. También, se ha informado que ESAT-6 se une a otro sustrato de secreción de ESX-1, CFP-10 (*10-kDa culture filtrate protein*), para inhibir la formación de autofagosomas y sobrevivir en macrófagos al disminuir los niveles de la proteína ATG8 ²⁰.

Finalmente, las infecciones por micobacterias estimulan la activación de mTOR (mTOR inhibe la autofagia) o inducen la autofagia, dependiendo de la virulencia de la especie o cepa. Un GWAS (*Genome-wide association study*) identificó genes de huésped vinculados a la inhibición de la autofagia durante la infección por *Mtb* H37Rv ¹⁴⁷. Algunos de estos genes aumentan su expresión durante la infección, pero sus funciones en las vías de autofagia no han sido esclarecidas completamente.

3.3. TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO BASADO EN LA AUTOFAGIA

El régimen estándar de tratamiento actual para los casos de TB no resistente implica la combinación de diferentes combinaciones de fármacos durante 4-12 meses: rifampicina, isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) y etambutol ¹⁴⁸. Han sido identificados vínculos inesperados entre la acción de la quimioterapia antituberculosa y la autofagia. La isoniazida y la pirazinamida, medicamentos antituberculosos de primera línea, requieren de procesos de autofagia para su plena eficacia contra la erradicación de la micobacteria a nivel intracelular ¹²⁵.

La liberación de productos bacterianos estimula la autofagia en macrófagos infectados durante el tratamiento con isoniacida o pirazinamida. Esta maquinaria está basada en la producción de ROS de fuentes mitocondriales y NADPH oxidasa ¹²⁵ corroborando el papel de ROS mitocondrial en la inducción de la autofagia ¹⁴⁹ (Figura 17). En este sentido, la inducción farmacológica de la autofagia puede superar la inhibición generada por ESAT-6 ¹²⁵, lo que respalda previas observaciones sobre el efecto que tienen las citoquinas Th1 en la activación de la autofagia y favorecer la erradicación de la bacteria ^{128,150}.

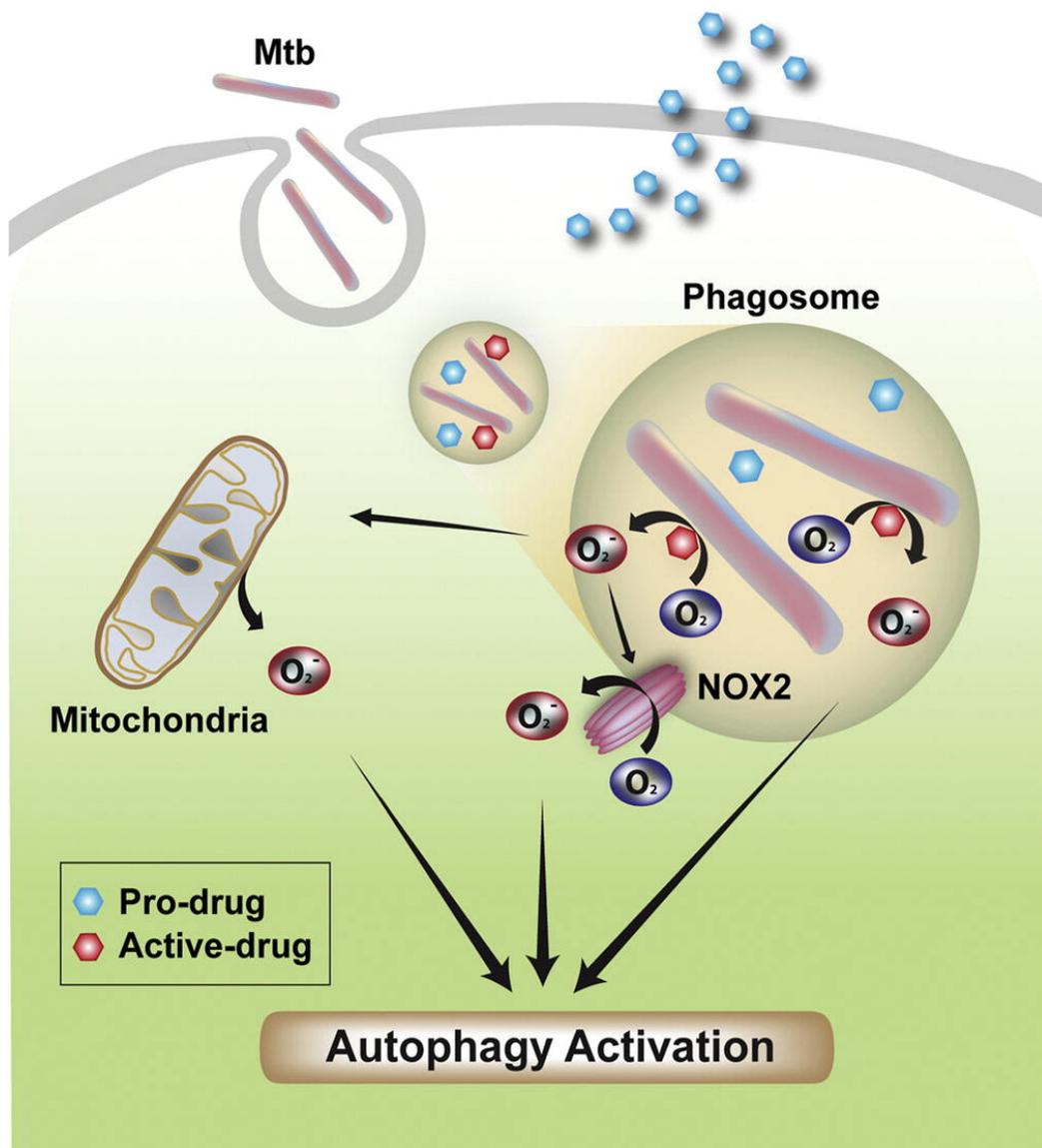


Figura 17. Fármacos antituberculosos en la inducción de la autofagia.

En el presente, diferentes desafíos se han enfrentado en cuanto a el tratamiento antituberculoso, por ejemplo, el aumento de la tasa de cepas resistentes a múltiples fármacos de *Mtb*, la falta de adherencia a tratamiento y las dificultades propias de la

coinfección con VIH ¹. La alta eficacia de estos antibióticos en colaboración con la autofagia puede explicar las propiedades bactericidas de la pirazinamida y su acción antimicobacteriana en macrófagos infectados. Además, se ha indicado que varias partículas inductoras de la autofagia también inhiben *Mtb* sin actuar primero sobre las bacterias ¹²⁵, apoyando la posibilidad de nuevos medicamentos antituberculosos basados en autofagia.

4. GENETICA HUMANA Y SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS

Aproximadamente 1.700 millones de personas, el 23% de la población mundial, tiene infección tuberculosa latente (ILT) ^{1,32}. Independientemente de la alta incidencia de esta infección, no todos los sujetos expuestos a este patógeno se infectan, y muchos de los individuos afectados desarrollarán una infección asintomática que no progresará a enfermedad activa (entre el 90% y 95%) ^{42,151}.

Una de las dificultades en el estudio de la patogénesis de esta patología es la heterogeneidad de su forma clínica. En comparación con otras enfermedades complejas, muchas investigaciones sobre la tuberculosis han tenido un éxito restringido dadas las diferentes etapas en la presentación de la enfermedad y los obstáculos para diagnosticar sus diferentes formas clínicas. En ambas presentaciones, hay una variedad de respuestas inmunitarias, aspectos clínicos y microbiológicos que crean un espectro de manifestaciones en el huésped ⁴².

Los mecanismos implicados en la progresión de la infección a la enfermedad son poco entendidos, y los marcadores biológicos de latencia siguen siendo en su mayor parte desconocidos ^{151,152}. El proceso de evolución de la TB se define por la relación multifacética entre los factores ambientales, las micobacterias y la resistencia del huésped al patógeno, así como todos los factores de riesgo adicionales que modifican las interacciones entre ellos ^{153,154}.

La progresión de la TB ocurre en hasta el 15% de los individuos con infección latente tuberculosa, y el 5% de los individuos infectados desarrollan TB activa dentro de los dos años posteriores a la infección, después de un período muy corto de latencia ³². Aquellas personas diagnosticadas dos años después se denominan casos de "reactivación" de la enfermedad tuberculosa ⁴. Los individuos restantes, que desarrollan tuberculosis clínica más adelante en la vida, tienen un menor riesgo de progresión a medida que pasa más tiempo desde la infección ^{33,155}.

La mayoría de los casos de progresión de la TB no pueden explicarse de forma completa con la edad, la inmunosupresión adquirida o el uso de inmunomoduladores o alcohol. Por lo tanto, una parte del riesgo de reactivación permanece sin explicación en sujetos inmunocompetentes ¹⁴⁶. Un ejemplo claro de este dilema ocurrió en 1926, cuando un grupo de niños fue inmunizado accidentalmente con una cepa virulenta de *Mtb* en Alemania. En este programa de salud pública, 251 bebés recibieron la misma dosis de bacterias dentro de los 10 días del nacimiento y, como consecuencia, 127 niños

presentaron la enfermedad radiológicamente, 77 murieron y 47 no mostraron evidencia de tuberculosis ^{156,157}.

Estudios genéticos anteriores han confirmado que las altas tasas de correlación para la TB activa son mayores entre gemelos monocigóticos que en gemelos dicigóticos, independientemente de la presencia de diferencias étnicas en la susceptibilidad ^{21,153}. En estudios de contactos, entre el 30% y 50% de las personas con una exposición alta a corto plazo no se infectan, lo que revela una heterogeneidad sustancial en la susceptibilidad a la infección ¹⁵⁸.

La evidencia de numerosos estudios epidemiológicos ha confirmado que existen variaciones genéticas relacionadas la susceptibilidad a tuberculosis y los diferentes fenotipos de la enfermedad observados en humanos ^{28,93,116,159-166}. Todos estos estudios implican claramente que los factores genéticos del paciente y el patógeno tienen un papel crítico en la latencia y progresión de la infección. El objetivo de este capítulo es analizar los polimorfismos de los genes humanos que influyen en la variabilidad interindividual de la susceptibilidad a la micobacteria y la tuberculosis activa.

4.1. TUBERCULOSIS COMO ENFERMEDAD POLIGÉNICA EN HUMANOS

En los últimos 15 años, las encuestas clínicas y epidemiológicas han acumulado datos suficientes para respaldar que los factores genéticos humanos desempeñan un papel importante en la susceptibilidad y la historia natural de la tuberculosis ^{19,25,30,153,162,167}.

La susceptibilidad de un individuo está relacionada con su región de procedencia, y el grado de susceptibilidad depende de las tasas de incidencia de tuberculosis en las zonas donde vivían sus ancestros ^{168,169}. Algunos, pero no todos, los genes estudiados se han asociado sistemáticamente con cada población evaluada ²⁴. Estos resultados resaltan la selección ancestral y las dificultades que supone el análisis entre diferentes poblaciones étnicas, pues existe un sesgo étnico en la evaluación del riesgo de la enfermedad. Por ejemplo, se ha documentado que las poblaciones africanas recién expuestas a TB (grupos subsaharianos expuestos a las cepas europeas de *M. tb*) y los nativos americanos presentan tasas elevadas de tuberculosis ¹⁷⁰⁻¹⁷².

Daya et. al., observaron que los linajes de Europa, sur de Asia y este de Asia se han asociado con resistencia a la enfermedad activa, en contraste, los linajes africanos se relacionan con un mayor riesgo de tuberculosis ¹⁶³. Además, un reciente estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en poblaciones de antígenos de leucocitos humanos de clase II con ascendencia europea, las variantes se correlacionaron con la protección contra la progresión a enfermedad activa en individuos infectados ¹⁷³.

4.2. EL PAPEL DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA TUBERCULOSIS.

El estudio de la agregación étnica y familiar de las infecciones fue la primera evidencia que confirmó la hipótesis de que algunas enfermedades infecciosas tienen una naturaleza poligénica ¹⁷⁴, lo que implica que el resultado de las interacciones micobacterias-huésped también está determinado por polimorfismos de ciertos genes ^{23,28,30,93,116,159-166}. Esta sección reúne información sobre las variantes genéticas en humanos que aumentan o disminuyen el riesgo de adquisición de la infección por micobacterias y el desarrollo de su forma clínica.

Solamente una pequeña proporción de los estudios han tenido como objetivo identificar las variantes genéticas que contribuyen a la susceptibilidad a la infección; sin embargo, existen datos fehacientes de estudios clínicos que apoyan el impacto genético en el contagio de la micobacteria. La prueba cutánea de tuberculina (TST, por sus siglas en inglés) es el método más utilizado para el diagnóstico de infección latente. La induración de la piel generada por la TST es producida por depósitos intradérmicos de antígenos de *Mtb* (colección de histiocitos y células T) ¹⁵⁸.

Thye et al., observaron que el haplotipo del promotor del gen IL-10 (22849A/21082A/2819C) se encuentra con mayor frecuencia en sujetos de Ghana con TST positiva que en sujetos con TST negativa ¹⁷⁵. En relación con estos hallazgos, individuos de Brasil que portaban el genotipo GG de IL-10 en el SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) 21082A, presentaron una tasa de negatividad de TST 1,5 veces mayor en comparación con los individuos portadores de los genotipos AA y AG ¹⁷⁶.

En un GWAS realizado en Uganda se encontró que las regiones cromosómicas 2q21 - 2q24 y 5p13 - 5q22 estaban relacionadas con la persistencia de TST negativo en una población de pacientes con VIH ¹⁷⁷. Además, un análisis realizado entre grupos de familias estimó una tasa del 17% en la heredabilidad de las respuestas a IGRAs ¹⁷⁸.

En otro estudio, realizado en poblaciones del noreste de Tailandia, se observó que un polimorfismo (2518A/G) del gen CCL2 (*C-C Motif Chemokine Ligand 2*) es esencial en el tráfico de macrófagos, y fue asociado con la susceptibilidad a infección tuberculosa ¹⁷⁹.

Las variaciones genéticas, que codifican las moléculas HLA de clase II, el receptor P2X7, el SLC11A1 (anteriormente conocido como NRAMP1), el promotor de IFN, la IL-1 β , los receptores TLR 1 y 2, y el TNF, se han relacionado con la susceptibilidad a las micobacterias, aunque el riesgo atribuible absoluto de cada polimorfismo es moderado ¹⁸⁰⁻¹⁸⁵. Las variaciones genéticas de TOX, SLC11A1, IFN- γ , CD14, SP110, CCL2, CD209, MBL, VDR y TLR, entre otras, se tratarán en esta sección.

Baghdadi y colaboradores, han descubierto que la predisposición a la tuberculosis pulmonar y el de inicio temprano de la enfermedad están asociadas a la región cromosómica 8q ¹⁸⁶. Un estudio más extenso de esta región cromosómica, en una población de sujetos de Marruecos y Madagascar, reconoció que las variantes del gen TOX estaban relacionadas con el inicio temprano de PTB en sujetos menores de 25 años ¹⁸⁷. El gen TOX codifica un factor nuclear que está involucrado en el desarrollo de células T CD4p ^{188,189}, esenciales durante la respuesta inmune contra micobacterias ¹⁹⁰. También, se ha descrito que el locus en el cromosoma 11p13 tiene un efecto protector en poblaciones de Gambia y Sudáfrica ¹⁹¹.

Aunque no ha sido replicado en todos los estudios, se demostró la asociación entre el gen SLC11A1 con las respuestas de activación de macrófagos infectados con *Mtb*. Más recientemente, se ha reunido suficiente evidencia para sugerir que muchos de los polimorfismos de este gen pueden relacionarse con la resistencia a tuberculosis en poblaciones de África Occidental ¹⁹², Asia ¹⁹³, Sudáfrica ¹⁹⁴ y Japón ¹⁹⁵, lo que ha motivado la realización de un metanálisis de estas variantes genéticas para confirmar su asociación con la susceptibilidad ¹⁹⁶. Más recientemente, los estudios sobre polimorfismos SLC11A se asociaron significativamente con pacientes con PTB en poblaciones africanas, europeas y asiáticas ¹⁹⁷.

Dentro de los genes HLA, HLA-DR2 (*Human Leukocyte Antigen – DR isotype*) ha sido relacionado regularmente con la tuberculosis en numerosas poblaciones en Rusia ¹⁹⁸, Tailandia ¹⁹⁹, e India ¹⁸². El alelo HLA-DQB1 * 0503, ha presentado una asociación a susceptibilidad para padecer tuberculosis activa en una población camboyana ²⁰⁰. Además, Tong y colaboradores, han realizado un metanálisis que reveló que varios polimorfismos del gen HLA-DRB1 (*Human Leukocyte Antigen – DR Beta*

l) podrían contribuir al riesgo de tuberculosis, especialmente en las poblaciones del este de Asia ²⁰¹.

Uno de los polimorfismos más estudiados de IFN- γ (1874T/A), una citoquina crucial para el control de la infección por *Mtb* ²⁰², se ha relacionado con el riesgo de tuberculosis en algunas poblaciones como de España ²⁰³, China ²⁰⁴, y Sudáfrica ²⁰⁵. Otros SNPs del gen de IFN- γ , A1616G, se asociaron a la susceptibilidad a la tuberculosis en diferentes etnicidades ²⁰⁶, y se ha descrito que los sujetos con genotipos asociados a baja producción de IFN- γ tienen un mayor riesgo de desarrollar tuberculosis activa ²⁰⁷.

Además, se encontró una conexión entre la resistencia a la enfermedad y los alelos del gen que codifica el receptor IFN- γ (IFN- γ R), en sujetos de África occidental y Croacia ^{208,209}. Se determinó que un polimorfismo en el promotor del gen CD14 (posición -159) aumenta la actividad del alelo variante, lo que afecta la respuesta a las micobacterias al disminuir la secreción de IFN- γ ²¹⁰. El mismo SNP se analizó en un metanálisis, que concluyó que este SNP estaba asociado con un mayor riesgo de tuberculosis en asiáticos, pero no una población caucásica ²¹¹.

Las proteínas surfactantes SP-A (*Surfactant protein A*) y SP-D (*Surfactant protein D*) reconocen y se unen a las moléculas de manosa en la superficie de las micobacterias ²¹². Floros et al., Informaron sobre varios polimorfismos en los genes humanos SP-A1 y SP-A2 que afectan la susceptibilidad del huésped a la tuberculosis en una población mexicana ²¹³. Se encontraron asociaciones similares entre los mismos SNPs y TB pulmonar en poblaciones etíopes e indias ^{214,215}.

Diversos polimorfismos de los genes TNF- α y TNFR (tumor necrosis factor receptor) se han analizado ampliamente, dado el papel esencial que desempeñan en el secuestro de *Mtb* en el granuloma durante la infección latente. Diferentes estudios han descrito dos mutaciones en el gen TNF- α (-238 (G/A) y -308 (G/A) que están asociadas con la tuberculosis pulmonar en una población colombiana, aunque esta relación no fue detectada en grupos de Turquía, India o Camboya. La asociación entre la enfermedad tuberculosa y los polimorfismos de los genes que codifican TNFR1 y TNFR2 también fue observada en poblaciones de Uganda, Sudáfrica y Ghana ^{19,216}.

Los polimorfismos en el exón 1 (codones 54, 57 y 52) del gen MBL (*Mannose-binding lectin*) producen niveles séricos bajos de MBL, lo que aumenta la posibilidad de infecciones ²¹⁷. Muchos de los estudios que investigan la influencia de las variantes genéticas de MBL en la susceptibilidad a la tuberculosis son controvertidos, ya que

existen resultados mixtos en subpoblaciones específicas ^{218,219}. Además, no se ha encontrado una conexión significativa entre los genotipos MBL2 y el metanálisis de la tuberculosis pulmonar de 17 estudios en humanos ²⁶.

La influencia del gen DC-SIGN (posición - 336 en la región promotora de CD209) en la respuesta inmune proinflamatoria a *Mtb* fue confirmada en el 2008 por Vannberg et al. ²²⁰. Otras dos variantes promotoras de este gen (-871A / G y -336A / G) se han asociado con la susceptibilidad a tuberculosis en una población sudafricana, aunque estas asociaciones no fueron significativas en otras poblaciones en China y Túnez ²²¹⁻²²³.

Se ha demostrado que los polimorfismos en IL-12R β 1 (*Interleukin 12 receptor β 1*) aumentan la susceptibilidad a la tuberculosis en las poblaciones chinas, marroquíes y japonesas ^{224,225}. Souza y colaboradores, analizaron los SNP en genes de inflamomas en una población de la Amazonía en Brasil con alta incidencia de la infección; describiendo una asociación entre los polimorfismos de NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*) y CTSB (*Cathepsin B*) con la resistencia a la TB pulmonar activa y su relación con el alelo de P2X7 en este grupo poblacional ²²⁶.

4.3. GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA EN LA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS

La autofagia se asocia con la erradicación de micobacterias, y la capacidad de las bacterias para evitar este mecanismo determina sus posibilidades de supervivencia ^{10,114,227-229}. Hay más de 30 proteínas relacionadas con la autofagia (ATG) que regulan el proceso autofágico a través de una gran variedad de vías de señalización. Coordinan múltiples modificaciones postraduccionales en todas las fases, desde la iniciación, formación y fusión del autofagosoma con el lisosoma ^{18,63,230-232}.

El uso de IFN- γ para inducir la autofagia disminuye la supervivencia intracelular de *Mtb* y aumenta la maduración de los fagosomas micobacterianos mediante la colocalización de *Mtb* y Beclin-1 ^{102,233}. La fusión de lisosomas para eliminar micobacterias intracelulares depende, entre otras, de la ruta de autofagia inducida por ATP que es regulada por el Ca²⁺ y el receptor P2X7 ²³⁴. En consecuencia, los genes en la ruta de autofagia que codifican estas moléculas controlan la supervivencia intracelular de *Mtb* ¹⁴⁷. Se ha encontrado un efecto protector para el desarrollo de la enfermedad en el SNP de P2RX7 (posición 762 del exón 1), para sujetos estudiados en Gambia. Estos hallazgos demuestran que la regulación mediada

por ATP/P2X7 tiene un papel relevante en el control de la tuberculosis en humanos ¹⁵⁹. Por lo tanto, la susceptibilidad a la tuberculosis está parcialmente influenciada por la autofagia y diferentes alelos polimórficos en los genes que codifican ATGs están involucrados en la respuesta del huésped a la infección por *Mtb* ^{15,93,126,166,235–241}.

El riesgo de desarrollar la tuberculosis en pacientes de Corea, Túnez y Turquía, se ha relacionado con dos polimorfismos de TLR2: R753Q y R677W ^{242,243}, y también en una población en Vietnam ²⁴⁴. En un estudio reciente han sido evaluados 71 SNPs de la familia de los TLR entre individuos caucásicos, afroamericanos y africanos occidentales, observando correlaciones significativas con dos polimorfismos de TLR2 (una inserción/supresión en –196 a –174) y una variante de TLR9 ²⁴⁵.

En otro análisis del polimorfismo de TLR4 (Asp229Gly), observaron que podría conferir riesgo para desarrollar la enfermedad en pacientes infectados por el VIH de España y Tanzania. Por otra parte, Se encontró que la susceptibilidad a la tuberculosis en las poblaciones de África occidental y Argelia estaba relacionada con la variante S180L en la proteína adaptadora TIRAP (*TIR Domain Containing Adaptor Protein*); aunque esta asociación no se reportó en las poblaciones de Rusia, Ghana e Indonesia ²⁴⁶. Más recientemente, otros estudios han corroborado la relación entre los polimorfismos de TLR y la susceptibilidad a TB activa ^{236,247,248}.

Se requiere catelicidina durante la activación de ATG5 y el complejo beclin1 para la eliminación de *Mtb* por la Vitamina D3 ¹⁴⁰. En consecuencia, los niveles bajos de calcidiol y calcitriol se correlacionaron con la susceptibilidad a la infección ^{121,141}. Ciertos polimorfismos en el gen del receptor de vitamina D (VDR) también se han asociado con una mayor susceptibilidad cuando se combinan con la deficiencia de calcidiol ¹²⁴.

Bornman y colaboradores, observaron que los haplotipos de VDR, en lugar de alelos, podrían ser responsables de una mayor susceptibilidad a la TB en una población de África occidental ²⁴⁹. Por el contrario, se ha observado que numerosos polimorfismos de VDR (BsmI, ApaI, FokI, TaqI) están asociados con la resistencia a la tuberculosis ²⁵⁰. Al mismo tiempo, ha sido publicado que TLR1 y TLR2 amplifican la expresión del gen VDR y vitamina D1-hidroxilasa en monocitos humanos, lo que lleva a la erradicación de *Mtb* intracelular ¹⁴².

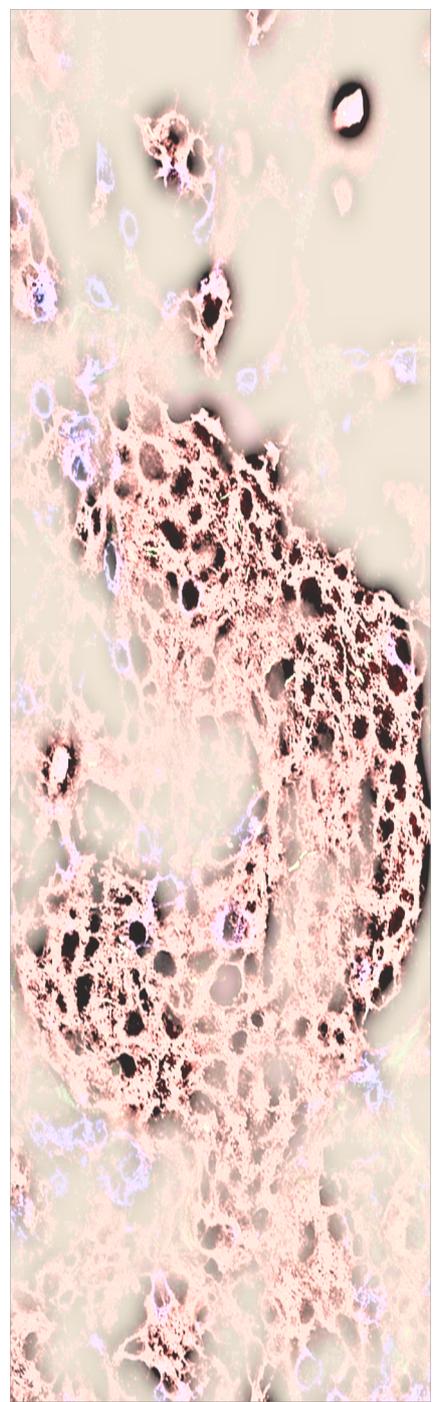
La mayoría de los estudios genéticos han identificado asociaciones de los alelos polimórficos de IRGM (*Immunity-related GTPase family M*) con un efecto protector para tuberculosis en poblaciones chinas y coreanas ^{251–253}, aunque se ha considerado

un factor de riesgo en otras poblaciones ²⁵⁴. Contrario a la mayoría de las variantes de IRGM, cada uno de los SNP estudiados en TLR parece ser un factor de riesgo para el desarrollo de la patología ^{242,243,255}.

En ciertos casos, asociaciones opuestas se encontraron en el mismo alelo en diferentes poblaciones. El análisis de 22 polimorfismos en 14 genes de autofagia en una población indonesia encontró una asociación de la enfermedad tuberculosa con variantes genéticas en LAMP1 y MTOR, aunque se perdió la significación estadística después de la corrección por comparaciones múltiples ²⁸.

La tuberculosis sigue siendo una infección mortal en muchas regiones del mundo y es imperativo descubrir estrategias para la erradicación de esta enfermedad. Aún no se ha demostrado una diferencia genética entre individuos con infección y los que progresan a enfermedad. Por tanto, el análisis de otras conexiones genéticas entre el riesgo de tuberculosis y los genes relacionados con la autofagia tiene implicaciones importantes para descubrir los aspectos genéticos que controlan la respuesta inmune a micobacterias y la historia natural de la enfermedad.

Asimismo, se ha sugerido que polimorfismos específicos pueden servir como marcadores de la susceptibilidad a la TB en algunos grupos étnicos. En este estudio, examinamos los sujetos con tuberculosis latente, pacientes con tuberculosis activa y controles sanos en una población de origen español para evaluar las asociaciones entre 4 SNP de genes relacionados con la autofagia, ATG2B, ATG5, ATG10 y ATG16L1 y determinar el enlace de estos polimorfismos con la predisposición a la tuberculosis latente y activa. Del mismo modo, se han estudiado las características demográficas de esta población y las interacciones genético-ambientales que pudieran predecir la susceptibilidad de la enfermedad.



HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La tuberculosis es la primera causa de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo y las formas resistentes a tratamiento continúan siendo un problema para los sistemas sanitarios a nivel global ^{32,148,256}. Aproximadamente el 5-10% de los seres humanos infectados con *M. tuberculosis* desarrollará la enfermedad clínicamente activa, sin embargo, en la mayoría de las personas no da lugar a la erradicación bacteriana. El tratamiento incompleto o la falta de adherencia de los pacientes a menudo generan resistencias a los medicamentos, asociadas a mutaciones genéticas ^{102,154}.

La autofagia es un proceso celular evolutivamente conservado que permite la supervivencia y homeostasis celular, además de realizar el transporte de componentes celulares endógeno hacia los compartimentos vacuolares líticos para su degradación ⁶⁵. Como consecuencia, la inducción de la autofagia en macrófagos es un mecanismo altamente efectivo en la eliminación de *Mtb* a nivel intracelular, y la capacidad de este patógeno para evadir el proceso es muy importante para su supervivencia ^{6,10,11,63,125}.

Actualmente, la tuberculosis es un problema que afecta a grandes grupos poblacionales, sobre todo, en países con bajos recursos; por tanto, identificar a los sujetos que han sido recientemente expuestos/infectados es imprescindible para su control en programas de salud.

No existen pruebas para pronosticar cuál de los dos mil millones de personas con infección latente son más propensos al desarrollo de la tuberculosis activa; pues los mecanismos moleculares responsables de este progreso no se han dilucidado por completo. Finalmente, se ha sugerido que polimorfismos específicos pueden servir como biomarcadores para evaluar la susceptibilidad a infección y el riesgo de progresión a TB en algunos grupos étnicos.

En este estudio, planteamos que existen diferencias a nivel de SNPs de genes relacionados con la autofagia, ATG2B, ATG5, ATG10 y ATG16L1, entre sujetos con infección latente, pacientes con tuberculosis activa y controles sanos en una población de origen español. Adicionalmente, nuestra hipótesis es que existe una influencia de dichas variantes de genotipos en la evolución clínica y gravedad de esta enfermedad. Los genes relacionados con la autofagia tienen una función esencial en la erradicación de *Mtb*. Asimismo, se han convertido en genes ampliamente analizados para determinar su asociación a la susceptibilidad genética a la enfermedad.

El presente, es el primer estudio de casos y controles para valorar diferencias de los genes de autofagia, ATG2B, ATG5, ATG10 y ATG16L1, en individuos españoles con tuberculosis.

HIPOTESIS

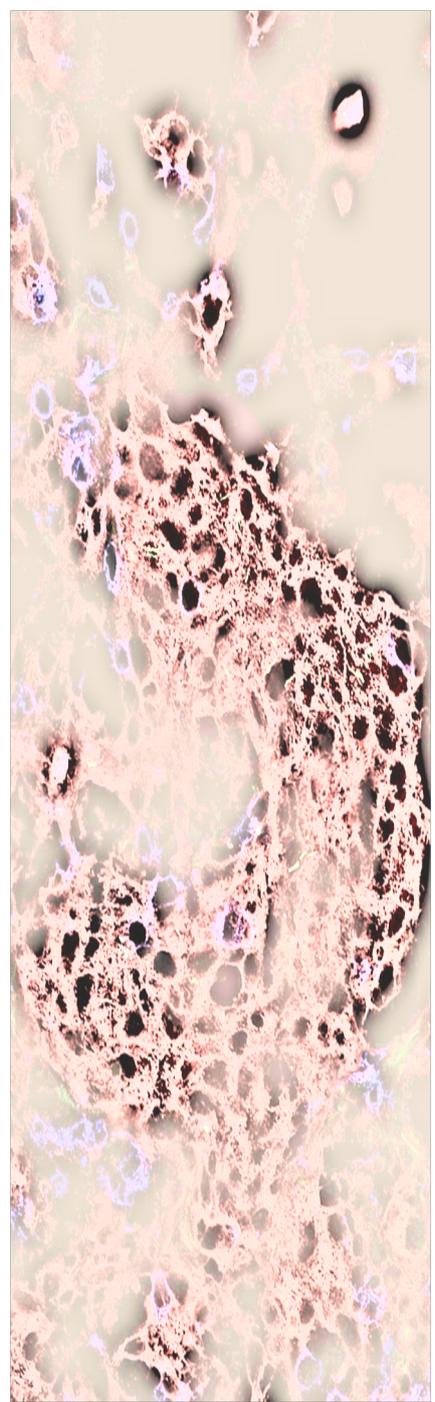
“Proponemos que las variantes de genes relacionados con autofagia podrían contribuir a la respuesta de población caucásica española a *Mtb*, determinando el resultado de la infección y/o el desarrollo de la enfermedad activa”.

OBJETIVOS GENERALES

1. Realizar un estudio descriptivo de una población con diagnóstico de tuberculosis latente y tuberculosis valorados en el Complejo Asistencial de Ávila, el Hospital Virgen de la Concha de Zamora y el Hospital Clínico Universitario de Salamanca en los últimos 6 años; analizando los datos demográficos, microbiológicos, radiológicos, factores asociados, y tratamiento.
2. Determinar si las variantes alélicas de los genes de autofagia, ATG16L1, ATG10, ATG5 y ATG2B, podrían estar implicados en el desarrollo de la infección tuberculosa, al valorar su asociación entre pacientes con infección latente y sujetos sin tuberculosis.
3. Analizar la distribución de genotipos y alelos de genes de autofagia entre individuos sanos y con tuberculosis, para valorar la posibilidad de encontrar un alelo protector o predisponente a el desarrollo de enfermedad Tuberculosa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Examinar las características demográficas de esta población y las interacciones genético-ambientales que pudieran predecir la susceptibilidad de la enfermedad, al relacionar diversos factores (comorbilidades, intolerancia o sensibilidad a fármacos, etc.) con la distribución de los genotipos de los genes de autofagia mencionados en pacientes con tuberculosis.
2. Evaluar, en pacientes con tuberculosis o tuberculosis latente, la afectación hepática y hematológica durante el tratamiento y compararla con la distribución de los polimorfismos mencionados.
3. Analizar la evolución clínica (criterios de gravedad, éxitus, reingreso, resultados de cultivos) según la localización y complicaciones de la tuberculosis de pacientes con tuberculosis y estudiarla según la distribución de los genotipos de los polimorfismos mencionados.



***SUJETOS DE ESTUDIO Y
MÉTODOS***

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Realizaremos un estudio analítico retrospectivo de cohortes con pacientes diagnosticados de tuberculosis, incluyendo infección tuberculosa latente (ILT) o tuberculosis activa de cualquier localización. Hemos documentado variables de información demográfica de cada paciente, estilo de vida, antecedentes personales, hallazgos de examen físico, resultados de pruebas de imagen y de laboratorio, entre otras características clínicas necesarias para confirmar el diagnóstico de tuberculosis. De igual forma, se ha hecho seguimiento del tratamiento y evolución de los pacientes desde la fecha de inclusión en el estudio hasta la actualidad.

Este análisis ha sido realizado en las provincias españolas de Salamanca y Zamora, que tienen una población conjunta aproximada de 500.000 habitantes durante el periodo de este estudio. Los pacientes de estudio han sido seleccionados de la población tratada en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca y Hospital Virgen de la Concha de Zamora, en el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2010 y el 31 de diciembre de 2017.

2. MUESTRA

Este estudio cuenta con una muestra total de 362 individuos, seleccionados entre 2010 y 2017; fraccionados de la siguiente manera: 230 sujetos sanos para el Grupo control y 132 pacientes con tuberculosis para el Grupo TB (Figura 19).

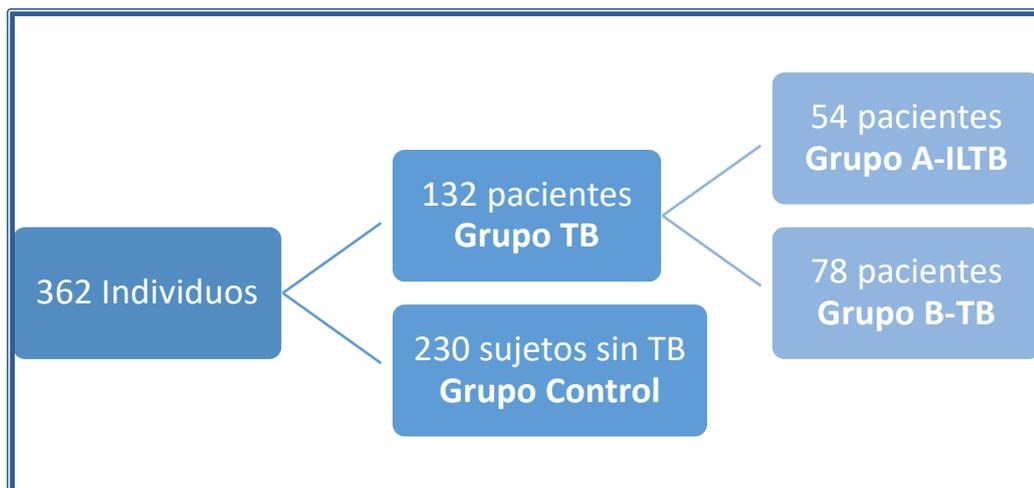


Figura 18. Distribución de participantes por grupo.

Además, los pacientes pertenecientes al Grupo TB han sido subdivididos en Grupo A-ILTB: 54 pacientes diagnosticados de infección tuberculosa latente, y Grupo B-TB: 78 pacientes que presentaron enfermedad tuberculosa activa. Todos los sujetos de estudio - casos y controles - han sido emparejados por edad-sexo y pertenecen al mismo grupo étnico.

2.1. DEFINICIÓN DE CASOS

2.1.1. SUJETOS SANOS (GRUPO CONTROL)

Se analizaron muestras de DNA de sangre periférica de 230 individuos mayores de 18 años que no tenían antecedentes personales de tuberculosis. Se considerarán controles a pacientes mayores de edad que hayan otorgado el consentimiento informado que no hayan padecido tuberculosis o síntomas clínicos relacionados con esta enfermedad y que no cumplan ninguno de los criterios de exclusión que se exponen a continuación.

2.1.2. PACIENTES (GRUPO TB)

Se ha considerado paciente con **ILTB (Grupo A-ILTB)** a quien:

- ‡ Tiene resultados positivos en la prueba de QuantiFERON®-TB test (QFT-Plus)
- ‡ No posee historia de enfermedad tuberculosa activa
- ‡ A fecha de inclusión, no presenta síntomas de tuberculosis (disnea, dolor torácico, sudoración nocturna, fiebre, hemoptisis, y/o pérdida de peso, etc.)
- ‡ Tiene hallazgos de estudios de alguna prueba de imagen (radiografía, TAC, RMN, etc.) negativos para enfermedad activa
- ‡ Exhibe prueba de mantoux positiva, evidenciado tras la administración de PPD intradérmico y lectura de la induración a partir de 48 horas correspondiente s un valor 5 mm a 15 mm – dependiente de las

comorbilidades del paciente – (remitirse a sección de diagnóstico para tuberculosis en introducción)

- ‡ Tiene antecedentes de inmunosupresión o vacunados previa con BCG y presenta positividad de técnicas de inmunoensayo (*QFT-Plus*, *ELISpot*), pues las pruebas de mantoux presenta altas tasas de falsos negativos en este tipo de pacientes.

Se consideró paciente con **enfermedad tuberculosa (Grupo B-TB)** a quien:

- ‡ Presenta TBP activa tras la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en cultivos de esputo, de aspiración traqueal, etc.
- ‡ Se ha evidenciado la presencia de bacilos en muestras biológicas, mediante la realización de pruebas de tinción específicas (Zhiel-Neelsen y la tinción de auramina)
- ‡ Manifiesta sintomatología clínica asociada a tuberculosis (tos, expectoración mucopurulenta o hemoptoica, hemoptisis, disnea o dolor torácico, pérdida de peso, etc.) y pruebas de imagen o laboratorio que soportan el diagnóstico
- ‡ Tiene confirmación de enfermedad tuberculosa diagnosticada por facultativo con pruebas radiológicas o de anatomía patológica
- ‡ Exhibe extensión de la enfermedad a órganos o tejidos fuera del parénquima pulmonar (TBEP), por ejemplo: ganglios linfáticos, abdomen, meninges, tracto genitourinario, piel, articulaciones y huesos
- ‡ Ha sido diagnosticado de TBEP por facultativo, a través de citología de aspiración con aguja fina, análisis bioquímicos, hallazgos histopatológicos o de imagen típicos compatibles con TB en tejido extrapulmonar, o evidencias clínicas sólidas consistentes con TBEP
- ‡ Ha mostrado clínica compatible con la enfermedad y ausencia de pruebas de laboratorio positivas, pero ha manifestado mejoría después del tratamiento empírico con tratamiento antibiótico para tuberculosis

En todos los casos diagnosticados de TBEP, se utilizaron exámenes de esputo y radiografías de tórax para investigar la afectación del parénquima pulmonar.

2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión de pacientes **Grupo TB:**

- ‡ Pacientes que hayan otorgado su consentimiento informado (ver anexo), con diagnóstico de TB o ILTB procedentes de del Hospital Virgen de la Concha y del Hospital Clínico Universitario de Salamanca
- ‡ Paciente de raza caucásica: sólo se incluyeron sujetos españoles en el estudio. Por lo tanto, la muestra total de este análisis esta compuesta totalmente por caucásicos, sin ninguna otra etnia (africana, hispana o asiática)
- ‡ Pacientes mayores de 18 años que no cumplan ninguno de los criterios de exclusión

Criterios de exclusión general:

- ‡ Sujetos no nacidos en territorio español y de raza diferente a la caucásica
- ‡ Cualquier trastorno médico o psicológico que no permita al paciente completar el estudio o firmar el consentimiento informado
- ‡ Reacción alérgica conocida a los fármacos más frecuentes en el tratamiento de tuberculosis (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol)
- ‡ Antecedente de haber recibido cualquier tratamiento experimental en los 30 días previos a la entrada en el estudio
- ‡ Serán excluidos del estudio genético los pacientes con diagnóstico de enfermedades inmunosupresoras, incluyendo diabetes e infección por VIH o VHC

3. RECOLECCIÓN DE DATOS

Todas las variables han sido incluidas en una base de datos diseñada exclusivamente para la recogida de estas. La información demográfica de los pacientes se recopiló mediante un cuestionario de consulta (Anexo 3) y los números de historia clínica de los pacientes se utilizaron para obtener los datos clínicos necesarios. La recolección de datos fue realizada mediante la revisión manual de la historia clínica de los pacientes y el uso de la aplicación institucional Jimena versiones 3.0 y 4.0.

3.1. DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS Y ANTECEDENTES PERSONALES

En la tabla 6, se enumeran las variables tomadas inicialmente para el análisis descriptivo de la población con tuberculosis. Incluyendo datos de antecedentes personales tomados durante la consulta de inclusión en el estudio.

Asimismo, otros antecedentes, en relación con enfermedad tuberculosa, se han considerado de relevancia para su determinación durante la elaboración del formulario de consulta como son antecedentes de abuso de sustancias, diagnóstico o tratamiento previo para TB o ILTB, etc. Estos ítems pueden ser encontrados en detalle en el anexo 3.

Tabla 6. Datos personales y antecedentes médicos.

Variables sociodemográficas	
Sexo	Uso de Corticoides
Masculino	
Femenino	Convivientes TB
	No
Tipo de residencia	Si
Urbano	
Rural	Comorbilidades
	Enfermedades granulomatosas
Grupo de edad	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
Edad menor 55	Patologías oncológicas
Edad 55 ó más	Artritis Reumatoide (AR)

3.2. VARIABLES CLÍNICAS

En este apartado, han sido documentados diferentes datos de laboratorio, microbiológicas, anatomía patológica y de imagen; fecha de diagnóstico, síntomas y signos clínicos en el momento de diagnóstico, reingreso, localización de la enfermedad tuberculosa (TBP y TBEP). Las manifestaciones clínicas se han clasificado en fiebre, tos, disnea, hemoptisis, síndrome constitucional y asintomático. Para efectos de este análisis las variables se han clasificado como se muestra en la tabla 7.

En cuanto a determinaciones analíticas, se valorarán resultados de laboratorio a fecha de diagnóstico de TB o ILTB; incluyendo VSG, hemograma y PCR. Otras pruebas séricas para analizar incluyen la función renal (urea y creatinina sérica), albúmina, proteínas totales, enzimas hepáticas de citólisis y colestasis (AST, ALT, bilirrubina, FA y GGT), para valorar posibles efectos adversos de los fármacos antituberculosos utilizados.

Tabla 7. Variables clínicas y de laboratorio.

Variables clínicas	Hallazgos para pruebas de Imagen y laboratorio	
Clínica al diagnóstico	Neumonía LS	Hemoglobina
Fiebre	Neumonía LM y LI	Leucocitos
Tos	Cavitaciones/Necrosis	Plaquetas
Disnea	Derrame Pleural	Urea
Hemoptisis	TB Miliar	Creatinina
S. Constitucional	Otras	Sodio Sérico
Asintomático	Normal	Proteínas Totales
Otros		Albúmina
	Presencia de anemia	AST
Resultado de cultivos	No anemia	ALT
Sensible a todos	Anemia (M<12 – H<13)	BI TO
Resistentes		FA
Cultivos negativos	Sodio	GGT
	Na <125	TP
Localización de la TB	125-129,9	TTPA
TBP	130-134,9	PCR
TBEP	135-139,9	VSG
TBP+TBEP	Na de 140 ó más	

Por otra parte, se recogerán los resultados de la tinción de muestras biológicas por auramina o Ziehl-Neelssen, el cultivo de micobacterias por Lowenstein Jensen, PCR y antibiograma.

En las pruebas de imagen, los informes radiológicos fueron evaluados de forma independiente y posteriormente informados en relación con los hallazgos de la radiografía de tórax, TAC o RMN, etc. La mayoría de los pacientes en el Grupo B-TB tuvieron seguimiento con radiografías realizadas en el momento del diagnóstico y en los meses posteriores de tratamiento, o cuando se consideró pertinente para valorar el estado de la enfermedad o la eficacia terapéutica.

A efectos de este análisis, las lesiones radiológicas han sido clasificadas principalmente en ocupación del espacio aéreo (condensación) (lóbulo superior-LS, medio-LM e inferior - LI), cavitaciones o necrosis, derrame pleural, TB miliar y otras lesiones.

La denominación de lesión crónica de parénquima pulmonar destruido por *Mtb* se basó en una historia clara de TB actual o pasada, junto con hallazgos radiológicos de parénquima pulmonar destruido, pérdida de volumen pulmonar o cambios bronquiectáticos secundarios, verificados mediante radiografías de tórax o tomografía computarizada por un radiólogo.

3.3. RESPUESTA A TRATAMIENTO DE TUBERCULOSIS

Desde el punto de vista de tratamiento, se ha revisado el régimen empírico pautado, su duración y si existió suspensión de este por alguna causa (alteración hematológica, alteración hepática, intolerancia, etc.), y tratamiento suplementario pautado (vitaminas).

Para evaluar la progresión y la eficacia del tratamiento, se ha realizado un seguimiento clínico del paciente determinando cambios en sintomatología, pruebas de imagen, conversión de las pruebas microbiológicas, criterios de gravedad, complicaciones, lesiones radiológicas residuales tras el tratamiento y éxitus (Tabla 8). Los pacientes han sido clasificados de acuerdo con los criterios de la OMS ³⁴.

Tabla 8. Resultados de tratamiento.

Curación	El paciente ha completado el tratamiento y, además, presenta al menos un cultivo o baciloscopia negativas en muestras tomadas al final del tratamiento, como mínimo, en otra ocasión previa.
Tratamiento completo	El paciente que ha completado el tratamiento, con mejoría clínica y que no cumple criterios para ser clasificado como curación o fracaso terapéutico.
Fracaso terapéutico	Paciente que cinco meses después de iniciado el tratamiento, y habiéndolo realizado correctamente, continúa con baciloscopias o cultivos positivos.
Muerte	Paciente que ha fallecido por cualquier causa durante el curso del tratamiento.
Abandono	Paciente que ha interrumpido el tratamiento durante dos o más meses, sin que se deba a una decisión facultativa.
No evaluado	Paciente que no recibió tratamiento, se ha mudado de residencia y/o sus resultados terapéuticos son desconocidos.

4. ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES

Los SNPs (*Polimorfismos de Nucleótido Único*) son variaciones que se localizan en regiones específicas de la secuencia nucleotídica del genoma, representando las variaciones genéticas más abundantes. Los polimorfismos de genes implicados en autofagia que serán analizados en este estudio se muestran en la tabla 9.

Para la realización de los estudios de polimorfismos de genes relacionados con la autofagia se han analizado muestras de DNA extraído de sangre periférica. En todos los casos las muestras se obtuvieron mediante venopunción ante-cubital, se recogieron en tubos de 10mL con EDTA y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

Tabla 9. Polimorfismos estudiados en este trabajo.

SPN GEN	CAMBIO DNA	CAMBIO PROTEÍNA	SONDA VIC	SONDA FAM	REFERENCIA COMERCIAL
rs3759601 ATG2B	4512C>G	p.Q1383E	C	G	C_9690160_20
rs2245214 ATG5	C>G (Intrón)	-	C	G	C_3001905_20
rs1864183 ATG10	929C>T	p.T212M	C	T	C_11953871_10
rs2241880 ATG16L1	1153A>G	p.T300A	A	G	C_9095577_20

Los polimorfismos se han seleccionado por localizarse en la secuencia codificante o en regiones reguladoras de la expresión. No obstante, uno de ellos es un polimorfismo intrónico debido a la ausencia de información en cuanto a la distribución poblacional de los polimorfismos codificantes descritos hasta el momento en la mayoría de estos genes

4.1. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA de muestras de sangre periférica y epitelio bucal se llevó a cabo utilizando solventes orgánicos. Con este método se aísla el DNA cuando se adhiere fenol:cloroformo a la muestra, favoreciendo la aparición de 2 fases: una fase orgánica que contiene los lípidos y las proteínas disueltas y otra que contiene el DNA correspondiente a la fase acuosa superior.

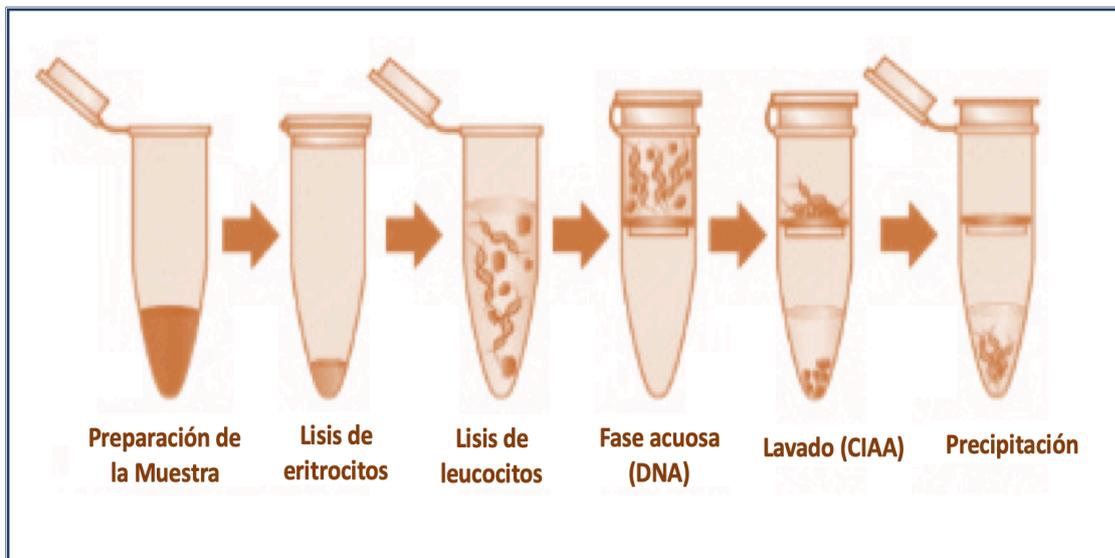


Figura 19. Fases de la extracción de DNA de sangre periférica.

El protocolo para la extracción de DNA a partir de sangre periférica tiene dos etapas. Inicialmente, se procede al lisado celular de la muestra. Se toman 10ml de muestra sanguínea para centrifugación repetida en dH_2O estéril y se crea un botón celular conformado únicamente por las células mononucleadas. Este pellet es resuspendido en tampón Fornace (0.25M Sacarosa, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM KCl, 5mM $MgCl_2$) para no fraccionar la pared celular de los glóbulos blancos y se procede con una centrifugación durante 10 minutos a 1500r.p.m. para su precipitación.

Una vez más, se utiliza el tampón Fornace para resuspender el botón celular, junto con EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) 10mM pH 8, permitiendo la inactivación de nucleasas. Asimismo, se añade SDS (dodecil sulfato sódico) a una concentración final del 1% para romper las membranas celulares y para degradar proteínas se adiciona proteinasa K (*AppliChem*) a una concentración final de 50 μ g/mL.

A continuación, la mezcla se incuba a 55°C durante 8-16 horas, este periodo de incubación es fundamental porque la lisis celular debe ser homogénea antes de añadir fenol. Una vez finalizado este paso, se procede a la extracción y purificación del DNA (Figura 18).

En la segunda etapa, la muestra es tratada con fenol tamponado a pH 8 y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1), se agita por inversión, además de recibir su respectiva centrifugación para separar la muestra en dos fases. La fase acuosa se traslada a un tubo limpio, evitando el contacto con la fase orgánica.

Posteriormente, el DNA que ha sido tomado de la fase acuosa se lava con CIAA para separar, mediante centrifugación, posibles moléculas orgánicas o residuos celulares que estén presentes en la muestra. La fase acuosa, que contiene el material genético, es aislada de nuevo para añadir etanol absoluto frío y precipitar el DNA. Se realiza una última limpieza con etanol al 70% (este lavado puede ser repetido para mejorar la purificación de la muestra), y se deja secar el precipitado de DNA. En último lugar, el DNA se resuspende en 200µl ddH₂O estéril.

4.2. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA

La concentración de DNA de cada muestra y la posible contaminación proteica se calculó en un espectrofotómetro automático Nanodrop® ND2000 (Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sudáfrica). El cociente DO 260/DO 280 sirve para medir longitud de onda a la que se absorbe el DNA y las proteínas respectivamente, se consideraron aceptables los valores comprendidos entre 1.6 y 2, siendo el óptimo 1.8. En los casos en los que se encontró contaminación por proteínas, solventes orgánicos o RNA se procedió a una nueva purificación de la muestra.

La purificación de fragmentos de DNA procedentes de la amplificación fue realizada mediante PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) según las recomendaciones del fabricante. Las muestras de DNA fueron almacenadas en tubos Eppendorf® a -20°C para evitar la degradación progresiva del DNA y una posible contaminación por microorganismos.

4.3. DISCRIMINACIÓN ALELICA MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN™

La discriminación alélica con sondas TaqMan™ puede emplearse para detectar dos variantes de la secuencia de un único nucleótido en una muestra. Los ensayos de genotipado de SNP pueden detectar mutaciones o polimorfismos específicos conocidos dentro de una secuencia de genes, y se basan en la capacidad de detectar una sola mutación de cambio de base. Hemos utilizado la discriminación alélica con sondas TaqMan™ para analizar los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880.

Tabla 10. Sondas son utilizadas en el análisis mediante PCR, identificadas como fluorocromos VIC y FAM.

Fluorocromo	Máx. Abs (nm)	Máx. Em (nm)
VIC	538	554
FAM	495	435

Las sondas utilizadas en este ensayo son complementarias a los polimorfismos estudiados y se unen a las secuencias correspondientes durante la fase de ampliación del DNA diana por PCR. Específicamente, se conectan a el nucleótido no polimórfico o el polimórfico, marcados con un fluorocromo diferente en el extremo 5' y un quencher en el extremo 3'. La DNA polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena hidrolizando el extremo libre 5' de la sonda, generando la liberación del fluorocromo del quencher lo que desencadena la fluorescencia de una de las sondas o de ambas (Figura 19).

Los ensayos de PCR se realizaron utilizando *TaqMan™ Genotyping Master Mix 2x (Applied Biosystems)* a una concentración de sonda de 2x. La reacción se realizó en placas de 96 pocillos en un volumen de reacción total de 10µL. En cada fila de muestras, existe un control que no contiene DNA y los niveles de fluorescencia detectados se deben únicamente a la sonda no liberada. Una vez cargadas la muestras, las placas de reacción se ponen en termocicladores StepOne® Plus Real Time PCR™ (*Applied Biosystems*) que contienen un lector de fluorescencia y son calentadas durante 2 minutos a 50 ° C, durante 10 minutos a 95 ° C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95 ° C y a 60 ° C durante 1,5 minutos.

Al finalizar la reacción, se determinan los niveles de fluorescencia de ambas sondas en cada pocillo utilizando un software automatizado, a través de un diagrama de agrupación 2D en el que la ubicación 2D de cada muestra está determinada por la compatibilidad de las sondas de detección y su grado de fluorescencia.

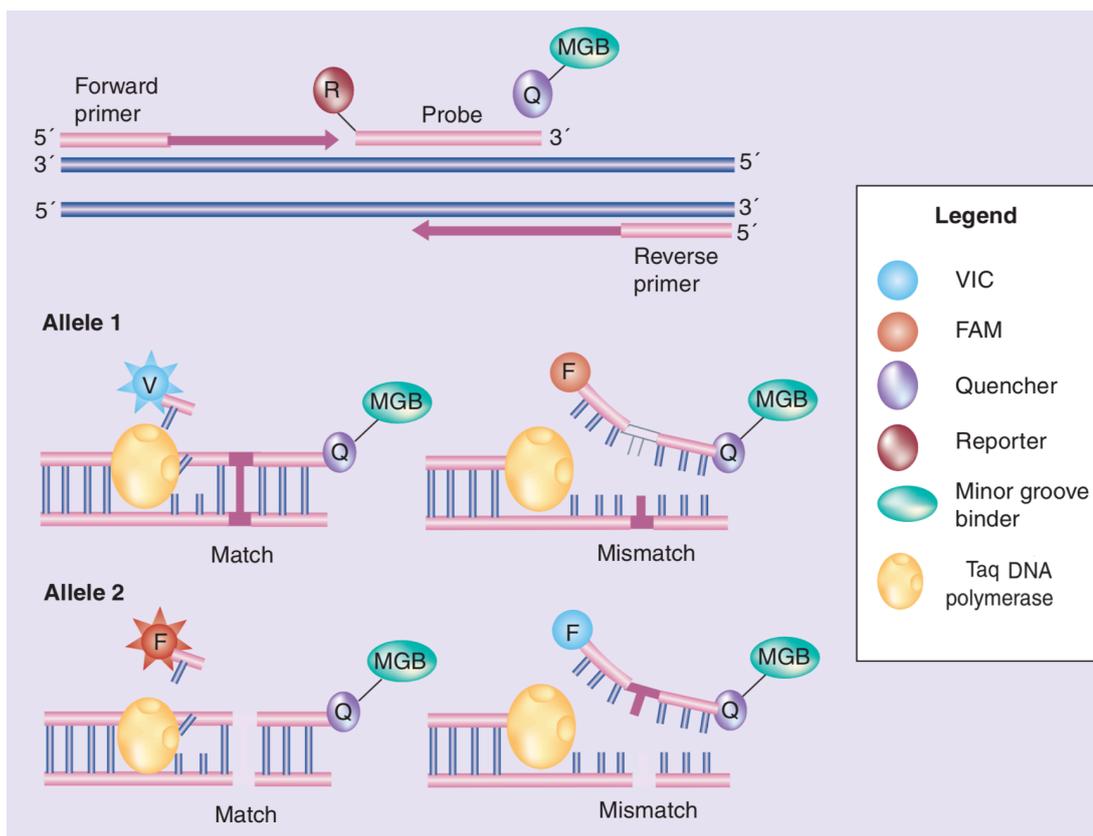


Figura 20. Emisión de fluorescencia dependiente de la hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo mediante un ensayo de discriminación alélica TaqMan™. Modificado de Isler et. al, 2007²⁵⁷.

4.4. INMUNOENSAYOS

Los ensayos QuantiFERON®-TB se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido). Rápidamente, las muestras de sangre se procesaron dentro de las 4 h de la recolección. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad, y se ajustó la concentración celular de manera que cada uno de los cuatro pocillos de la placa de ensayo contenía $2,5 \times 10^5$ células.

Las células se estimularon con medios (control negativo), fitohemaglutinina (control positivo) o péptidos de los antígenos específicos para la tuberculosis ESAT-6 o CFP-10, durante 16 a 20 h con dióxido de carbono al 5% a 37 ° C. El IFN- γ liberado por células individuales se observó como manchas o puntos. El conteo automático de puntos se realizó utilizando un lector de placas ELISpot (Autoimmun Diagnostika (AID), Strassberg, Alemania).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este estudio, considerando unas diferencias entre la prevalencia de un polimorfismo del 3% vs 15% entre casos y controles se estima necesario un tamaño muestral de 89 pacientes y 89 controles para una potencia estadística del 80%, con un nivel de confianza del 95% (significación del 0.05). Calculando un 10% como proporción esperada de pérdidas, el tamaño muestral ajustado a pérdidas es de 100 pacientes (tuberculosis activa y latente) y 100 controles.

Las variables cualitativas serán expresadas como frecuencias y/o porcentajes, se compararán utilizando la prueba de t de Student o la prueba de la U de Mann-Whitney, en caso de no cumplir el supuesto de normalidad. Las variables cuantitativas se indicarán con su media y desviación típica, también se ha comparado el ajuste de las variables a la distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; El test- χ^2 de Pearson o test de Fisher fue utilizado para comparar la distribución de genotipos entre los sujetos de estudio y controles.

La asociación ente los SNPs de ATG y el estatus de la enfermedad fue expresada en odds ratios (OR) y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (CI) usando modelos de regresión logística. Una $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. Para análisis de más de dos grupos se utilizará el test de ANOVA, considerándose estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$. Todo el análisis estadístico fue realizado usando SPSS versión X (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6. ASPECTOS ÉTICOS E INFORMACIÓN DE PACIENTES

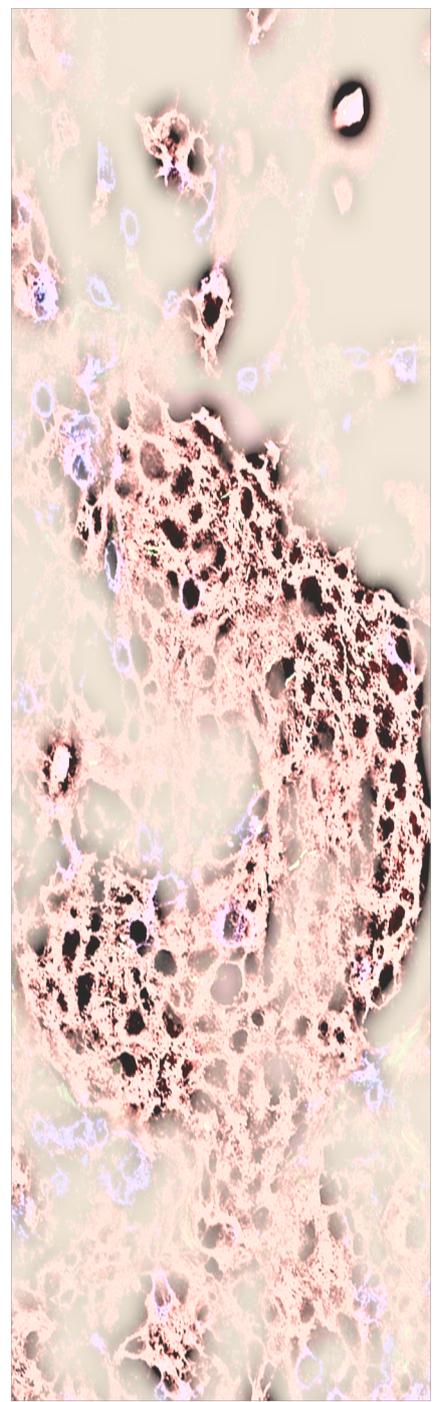
Las muestras tomadas de todos los pacientes incluidos en el estudio se han obtenido tras la firma voluntaria del consentimiento informado (Anexo 1) y han sido almacenadas en el repositorio de la Unidad de Medicina Molecular/Banco de DNA del IBSAL.

Los sujetos de estudio han recibido información verbal y escrita adecuada sobre esta investigación antes de obtener su consentimiento. Se ha proporcionado una hoja de información para el paciente en el idioma local y preparada según las normas vigentes (Anexo 2).

Los pacientes podrán retirarse libremente del estudio en cualquier momento sin tener que dar ninguna explicación. Se deberá retirar a los sujetos del estudio cuando se dé cualquiera de las siguientes situaciones: retirada del consentimiento informado; aparición de algún evento que sea clínicamente relevante y que afecte a la seguridad del paciente.

Toda la información (personal, clínica, y los datos provenientes de la investigación con material biológico) recogida en su nombre se tratará con arreglo a la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales, y a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y su normativa de desarrollo, el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento que la desarrolla. En caso de cesión de datos a terceros países, se garantizará un nivel de protección equivalente al de nuestra legislación.

En la elaboración y diseño de este protocolo se han observado los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, recogidos en la Declaración de Helsinki. El protocolo del estudio ha sido aprobado por el Comité Ético del Complejo Hospitalario Universitario de Salamanca, España.



RESULTADOS

1. PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO Y CLÍNICO

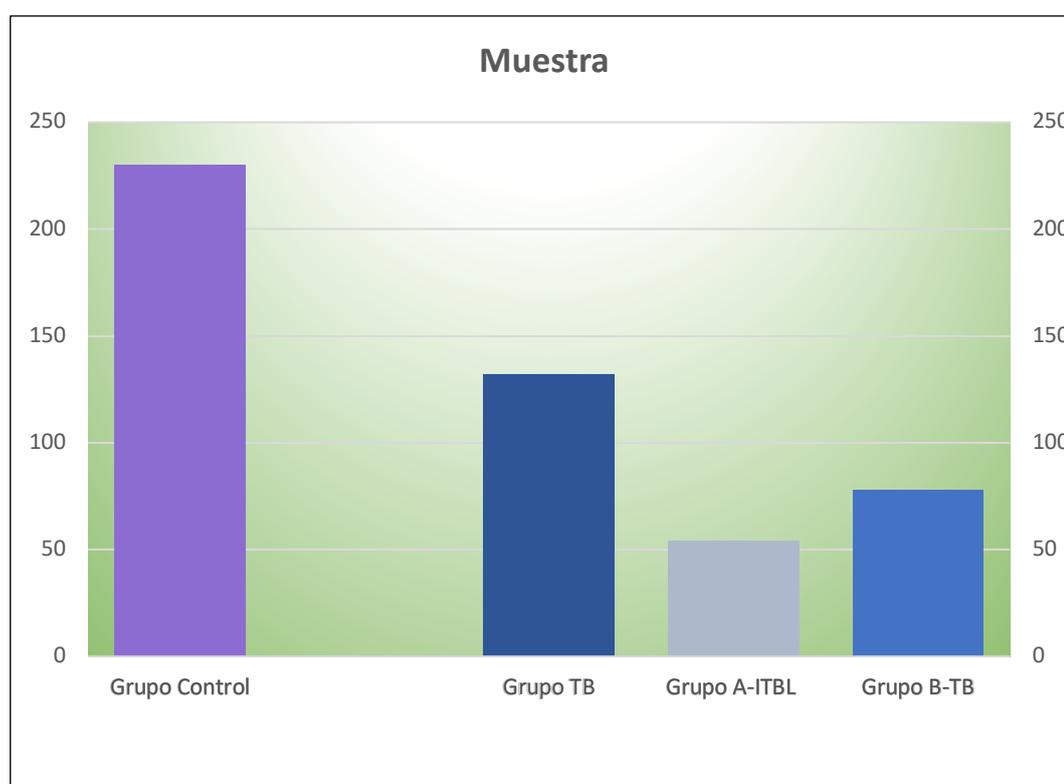


Figura 21. Distribución del total de los individuos incluidos en el estudio según el grupo al que pertenecen.

En el análisis final hemos incluido 362 sujetos, y han sido separados en dos grupos con distribuciones de sexo y edad similares para evitar sesgos; 230 individuos sanos pertenecen al grupo Control (63,5%) y 132 pacientes conforman el Grupo TB (36,5%). Este último grupo se ha subdividido en dos, con cincuenta y cuatro sujetos diagnosticados con infección latente en el Grupo A-ILTBL (14,9%) y setenta y ocho (21,5%) pacientes que han presentado enfermedad tuberculosa conformando el Grupo B-TB (Figura 20).

En el grupo TB (n=132), la edad media de todos los pacientes fue 53,9 años al momento de diagnóstico, con una desviación estándar de $\pm 14,9$. La mayoría de los sujetos tuvo residencia en zonas urbanas al momento de inclusión en el estudio (71,4%). Un 48% de los pacientes son menores de 55 años, y el porcentaje restante (52%), tuvo una edad mayor o igual a 55 años al momento de el diagnóstico de tuberculosis (Figura 21). Conjuntamente, observamos que más de la mitad de los pacientes tuberculosos (54%) ha tenido antecedentes de tratamiento previo con corticoides. En cuanto a las comorbilidades, las enfermedades más frecuentes fueron

las enfermedades granulomatosas y oncológicas con unos porcentajes de 23% y 20,6% de respectivamente (Anexo 5).

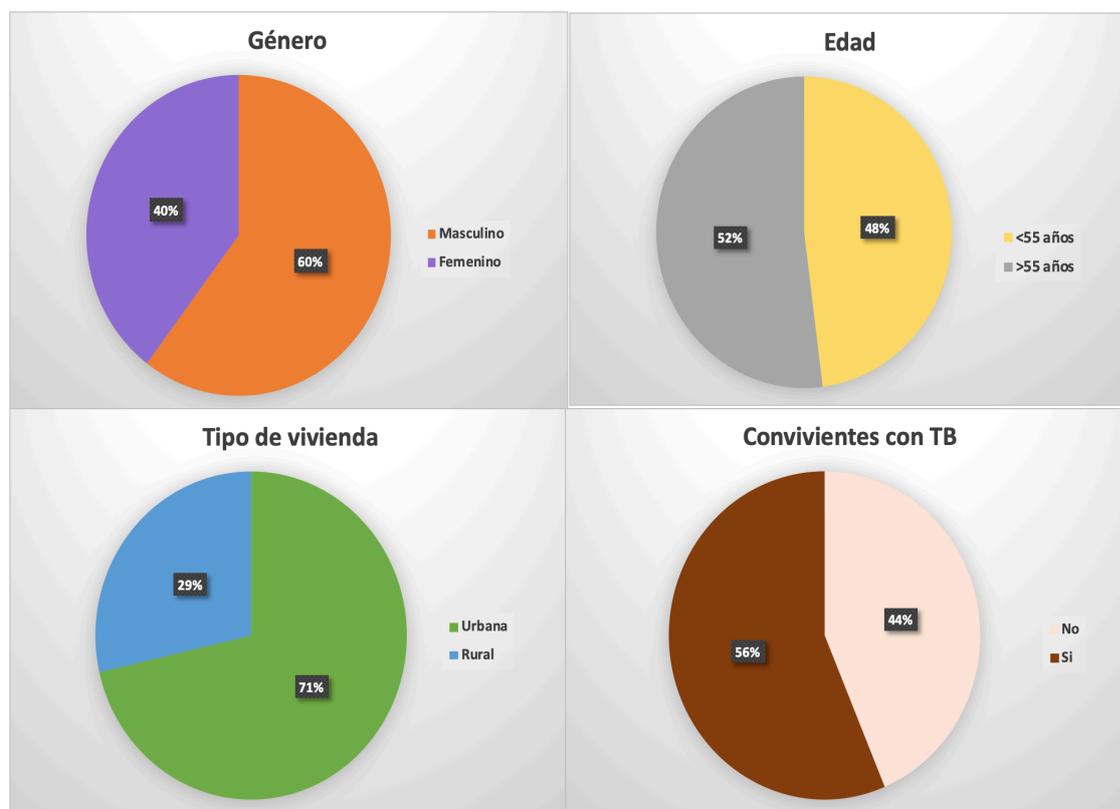


Figura 22. Datos demográficos en pacientes del Grupo TB

1.1. PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO Y CLÍNICO DEL GRUPO B-TB

El subgrupo B-TB (n=78) está constituido por individuos que han manifestado la enfermedad tuberculosa, y presenta un porcentaje de hombres (61,1%) que supera a la población de mujeres (38,9%). La mayoría de los participantes (70,8%) viven en zonas urbanas y un alto porcentaje (38,5%) había recibido tratamiento previo con corticoides (Tabla 11).

Por otra parte, los síntomas más frecuentes en esta población al momento del diagnóstico de la enfermedad son: tos (20,5%), fiebre (15,4%) y síndrome constitucional (13,7%). Valorando las pruebas de imagen diagnósticas realizadas, se ha determinado que la localización de las lesiones pulmonares fue más frecuente (22,7%) en el lóbulo superior, seguido del lóbulo medio e inferior (17,4%).

En términos de lateralidad, la tuberculosis pulmonar (TBP) se presentó un 43,1% en el pulmón derecho, 22,4% en pulmón izquierdo y bilateral para el 34,5% de

los pacientes. Cabe destacar que el 18,0% de los pacientes de este grupo ha presentado lesiones tipo cavitación o necrosis como resultado de la enfermedad.

En cuanto a estudios microbiológicos, se observó que un 9,6% de pacientes había presentado resultados en el antibiograma positivos para *Mtb* resistente a por lo menos un fármaco antituberculoso. Estos pacientes no cumplieron criterios para ser diagnosticados de tuberculosis multirresistente (MDR-TB). Al menos la mitad de estos sujetos presentaron resistencia a isoniacida o estreptomina; dos de ellos exhibieron resistencia secundaria por haber recibido tratamiento para tuberculosis en años anteriores.

Al realizar una evaluación de la duración del tratamiento, apreciamos que la media de tiempo fue de 6,85 ($\pm 1,803DS$) meses (Tabla 11). Cerca de un tercio de los pacientes del grupo B-TB (n=25) necesitó de al menos dos ingresos hospitalarios para el tratamiento de tuberculosis durante el tiempo de realización de este estudio, con una media de 1,76 reingresos atribuible a cada individuo. La mayoría de los pacientes que tuvieron que reingresar en el hospital tenía una edad mayor o igual a 40 años (72,0%). Solo uno de los pacientes del grupo B-TB falleció a causa de la enfermedad.

En el anexo 5, se puede observar una correlación de los resultados de cultivos con la duración y respuesta a tratamiento antituberculoso. Para efectos de este análisis, hemos agrupado a los pacientes que se han curado o han completado el tratamiento en el grupo de respuesta satisfactoria a tratamiento. Un 79,6% de los pacientes tuvo una respuesta satisfactoria a la terapia, y algunos de los pacientes no fueron evaluados por ausencia de resultados de estudios microbiológicos o dificultades en el seguimiento por el desplazamiento a otras provincias.

La curación o fracaso de tratamiento no se puede determinar en pacientes con cultivos negativos pues estos parámetros se evalúan en concordancia a la conversión de los cultivos positivos (remitirse a la tabla 8, en el capítulo de métodos). Por tanto, la respuesta a tratamiento de estos pacientes se ha basado en la mejoría clínica y la buena evolución de los hallazgos en pruebas de imagen, laboratorio y de anatomía patológica.

Tabla 11. Datos demográficos en pacientes del Grupo B-TB.

Grupo B-TB			
Sexo		Localización de la TB	
F	38,9%	TBP	58,3%
M	61,1%	TBEP	27,8%
		TBP+TBEP	13,9%
Residencia			
Urbano	70,8%	Hallazgos para pruebas de Imagen	
Rural	29,2%	Neumonía LS	22,7%
		Neumonía LM y LI	17,4%
Tratamiento previo		Cavitaciones/Necrosis	
Corticoides	38,5%	Derrame Pleural	10,4%
No corticoides	61,4%	TB Miliar	3,3%
		Otras	33,6%
Comorbilidades		Normal	
Enfer. Granulom.	12,5%		
EPOC	16,7%	Anemia	
Patologías oncológicas	25,0%	No anemia	64,6%
Artritis Reumatoide	5,6%	Anemia (M<12 – H<13)	35,4%
Otras	40,2%		
		Hiponatremia	
Convivientes con TB		Na <125	2,8%
No	52,8%	125-129,9	1,4%
		130-134,9	9,7%
Si	47,2%	135-139,9	40,3%
		≥ 140	31,9%
Cuadro Clínico			
Fiebre	15,4%		
Tos	20,5%	Duración de tratamiento	
Disnea	11,1%	< 6 meses	4,2%
Hemoptisis	7,7%	6 meses	70,7%
Sind. Constitucional	13,7%	> 6 meses	22,3%
Asintomático	10,2%	No información	2,8%
Otros	21,4%		
		Pacientes Reingresados n=25	
Resultado de cultivos		Media de reingresos	
Sensible a todos	50,7%	1,76 ± 1,3DE	
Resistentes	9,6%		
Cultivos negativos	39,7%		

1.2. DATOS ANALÍTICOS PARA EL GRUPO A-ILTB Y EL GRUPO B-TB

A continuación, realizamos un análisis comparativo de las características demográficas de los pacientes en los Grupos B-TB y A-ILTB (Anexo 5). Los individuos con tuberculosis presentaron una mayor incidencia de enfermedades oncológicas (25%) y EPOC (16,7%), además de presentar diferencias significativas ($p=0,009$) en cuanto a la distribución de granulomas en imagen y anatomía patológica (Anexo 5. Tabla 22).

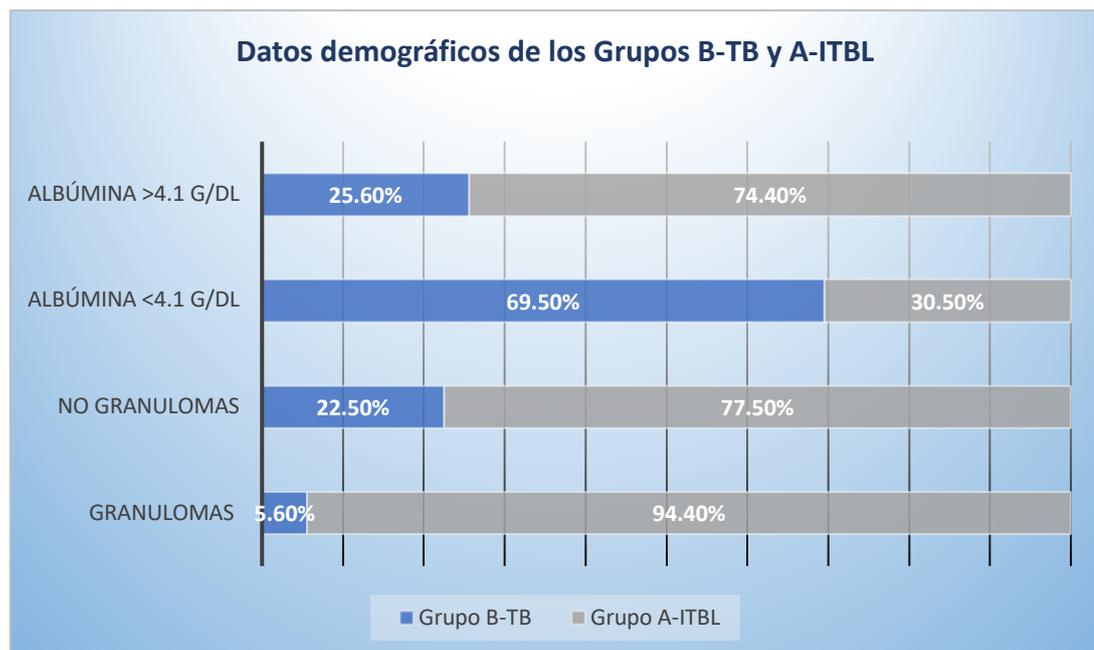


Figura 23. Diferencias significativas al comparar los Grupos B-TB y A-ILTB en pruebas diagnósticas.

En la tabla 12, se exponen los diferentes valores analíticos recopilados durante el estudio para los grupos B-TB y A-ILTB, con un análisis de los valores medios y de desviación estándar de estos datos. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de hemoglobina ($12.98 \pm 2.02 - 13.89 \pm 2.27$; $p=0,032$), sodio sérico ($137.45 \pm 5.84 - 140.75 \pm 2.57$; $p=0,001$) y albúmina sérica ($3.76 \pm 0.63 - 4.08 \pm 0.93$; $p= 0,047$).

Tabla 12. Valores analíticos de los Grupos B-TB y A-ILTB.

Laboratorio	Grupo B-TB	Grupo A-ILTB	p
Hemoglobina	12.98 ± 2.02	13.89 ± 2.27	0,032
Leucocitos	8.32 ± 3.67	8.22 ± 3.25	0,883
Plaquetas	289.91 ± 124.64	267.91 ± 108.56	0,344
Urea	36.76 ± 23.90	39.51 ± 13.35	0,452
Creatinina	1.32 ± 1.73	1.05 ± 1.06	0,367
Sodio Sérico	137.45 ± 5.84	140.75 ± 2.57	0,001
Proteínas Totales	6.88 ± 1.018	6.97 ± 0.63	0,569
Albúmina	3.76 ± 0.63	4.08 ± 0.93	0,047
AST	28.11 ± 36.15	23.28 ± 9.95	0,381
ALT	27.11 ± 31.54	29.04 ± 25.73	0,735
Bilirrubina Total	0.54 ± 0.29	0.48 ± 0.31	0,321
Fosfatasa Alcalina	95.80 ± 90.32	73.86 ± 29.41	0,128
GGT	58.70 ± 127.41	66.90 ± 128.86	0,746
TP	1.29 ± 1.49	1.13 ± 0.39	0,611
TTPA	35.69 ± 5.76	36.18 ± 8.18	0,769
PCR	7.37 ± 9.43	4.50 ± 9.22	0,190
VSG	9.22 ± 33.19	39.00 ± 39.20	0,184

2. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON AUTOFAGIA Y SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS

En este trabajo hemos estudiado los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 mediante la técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan™, con el propósito de determinar si se asocian a cambios en la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de tuberculosis. Estos genes han sido seleccionados porque las proteínas que codifican son esenciales para la formación del autofagosoma.

Por ejemplo, la proteína ATG5 interactúa de forma no covalente con ATG16L1, formando el complejo ATG12-ATG5/ATG16L1 que genera autofagosomas a partir de la elongación y el cierre de pequeñas estructuras de membrana, siendo indispensable en la eliminación de micobacterias a nivel intracelular.

Para realizar este análisis se compararon los resultados de las muestras de DNA extraídas de 132 pacientes con tuberculosis y 230 controles sanos de edades similares.

Realizando modelos Codominantes, dominantes y recesivos. La distribución de los genotipos en cada uno de los polimorfismos analizados en el grupo control cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.1$).

2.1. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS PARA ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 EN EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO TB.

Procedimos a realizar un análisis de estos polimorfismos en diferentes modelos de regresión para comparar el grupo de sujetos sanos con los pacientes con enfermedad TB. se encontró que el alelo del SNP ATG10 rs1864183-T tiene una frecuencia significativamente más elevada en el grupo control ($p=0,025$, $OR=0,702$ (IC 95%= 0,515-0,958)), lo que podría indicar que individuos portadores de este alelo tendrían una menor susceptibilidad a la infección tuberculosa en este grupo poblacional (Tabla 13).

Por el otro lado, al realizar el análisis comparativo de la frecuencia de los genotipos de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Control y TB (Tabla 14). Estos resultados sugieren que las variantes genéticas no se encuentran relacionada con la susceptibilidad subyacente a la tuberculosis en este grupo poblacional.

Tabla 13. Distribución de alelos de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 en los grupos Control y TB con relación al riesgo de adquirir tuberculosis.

SNP	Alelo	Grupo Control	Grupo TB	p	OR (IC 95%)
ATG2B rs3759601	C	161(35,6%)	101(40,1%)	0,241	1
	G	291(64,4%)	151 (59,9%)		0,827 (0,602-1,136)
ATG5 rs2245214	C	298 (65,9%)	95 (38,3%)	0,118	1
	G	154 (34,1%)	153 (61,7%)		0,321 (0,233-0,443)
ATG10 rs1864183	C	183 (40,5%)	124 (49,2%)	0,025	1
	T	269 (59,5%)	128 (50,8%)		0,702 (0,515-0,958)
ATG16L1 rs2241880	G	248 (54,9%)	134 (53,2%)	0,666	1
	A	204 (45,1%)	118 (46,8%)		1,071 (0,786-1,458)

Tabla 14. Frecuencias de genotipos en diferentes modelos para ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 en individuos sanos y grupo TB.

SNP	Herencia	Genotipo	Grupo Control	Grupo TB	p	OR (IC 95%)
ATG2B rs3759601	<i>Codominantes</i>	CC	25 (10,9%)	20 (15,2%)		1
		CG	112 (48,7%)	64 (49%)	0,418	0,714 (0,368-1,387)
		GG	93 (40,4%)	47 (35,8%)		0,632 (0,319-1,253)
	<i>Recesiva</i>	CC+CG	137 (59,6%)	84 (64,2%)	0,393	1
		GG	93 (40,4%)	47 (35,8%)		0,824 (0,529-1,284)
	<i>Dominante</i>	CC	25 (10,9%)	20 (15,2%)	0,224	1
		CG+GG	205 (89,1%)	111 (84,8%)		0,677 (0,360-1,273)
ATG5 rs2245214	<i>Codominantes</i>	CC	95 (41,3%)	46 (35,1%)		1
		CG	113 (49,1%)	71 (54,2%)	0,224	0.782 (0.364-1.681)
		GG	22 (9,6%)	14 (10,7%)		1.063 (0.506-2.234)
	<i>Recesiva</i>	CC+CG	208 (90,4%)	163 (89,3%)	0,259	1
		GG	22 (9,6%)	14 (10,7%)		0.932 (0.456-1.905)
	<i>Dominante</i>	CC	95 (41,3%)	46 (35,1%)	0,139	1
		CG+GG	135 (58,7%)	85 (64,9%)		1.346 (0.857-2.114)
ATG10 rs1864183	<i>Codominantes</i>	CC	39 (17,0%)	33 (25,2%)		1
		CT	107 (46,5%)	62 (47,3%)	0,086	0,685 (0,391-1,198)
		TT	84 (36,5%)	36 (27,5%)		0,506 (0,276-0,929)
	<i>Recesiva</i>	CC+CT	146 (63,5%)	95 (72,5%)	0,080	1
		TT	84 (36,5%)	36 (27,5%)		0,659 (0,412-1,052)
	<i>Dominante</i>	CC	39 (17,0%)	33 (25,2%)	0,060	1
		CT+TT	191 (83,0%)	98 (74,8%)		0,606 (0,359-1,024)
ATG16L1 rs2241880	<i>Codominantes</i>	GG	68 (29,5%)	33 (25,4%)		1
		GA	116 (50,5%)	73 (56,2%)	0,567	1,297 (0,780-2,156)
		AA	46 (20%)	24 (18,4%)		1,075 (0,564-2,050)
	<i>Recesiva</i>	GG+GA	184 (80%)	106 (81,6%)	0,723	1
		AA	46 (20%)	24 (18,4%)		0,906 (0,523-1,567)
	<i>Dominante</i>	GG	68 (29,5%)	33 (56,2%)	0,396	1
		GA+AA	162 (70,5%)	97 (74,8%)		1,234 (0,759-2,006)

2.2. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS PARA ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 EN EL GRUPO CONTROL, Y LOS SUBGRUPOS A-ILTB Y B-TB.

Tabla 15. Distribución de genotipos para los SNPs ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 en los grupos Control, A-ILTB y B-TB.

SNP	Herencia	Genotipo	Grupo Control	Grupo A-ILTB	Grupo B-TB	p
ATG2B rs3759601	Codominantes	CC	25 (10,9%)	4 (7,5%)	16 (20,5%)	0,121
		CG	112 (48,7%)	26 (49,2%)	38 (48,8%)	
		GG	93 (40,4%)	23 (43,3%)	24 (30,7%)	
ATG5 rs2245214	Codominantes	CC	95 (41,3%)	18 (34,0%)	26 (34,2%)	0,314
		CG	113 (49,1%)	30 (56,6%)	41 (54,0%)	
		GG	22 (9,5%)	5 (9,4%)	9 (11,8%)	
ATG10 rs1864183	Codominantes	CC	39 (17,0%)	15 (28,3%)	18 (23,1%)	0,233
		CT	107 (46,5%)	25 (47,2%)	37 (47,4%)	
		TT	84 (36,5%)	13 (24,5%)	23 (29,5%)	
ATG16L1 rs2241880	Codominantes	GG	68 (29,5%)	17 (32,1%)	16 (20,8%)	0,296
		GA	116 (50,5%)	30 (56,6%)	43 (55,8%)	
		AA	46 (20%)	6 (11,3%)	18 (23,4%)	

Al proceder con el análisis de los genotipos de los grupos A-ILTB y B-TB, se distinguieron diferencias significativas en el polimorfismo de ATG2B rs3759601 en el modelo dominante ($p=0,043$ (OR=0,316 (IC 95% (0,099-1,007))), con este hallazgo se puede deducir que este SNP tiene un papel relevante en la progresión de la infección tuberculosa latente a tuberculosis activa. En contraste, no se podría inferir que esta variante genética influye en la susceptibilidad general a la infección tuberculosa por la ausencia de diferencias significativas en el análisis comparativo entre el grupo Control y el grupo TB (Tabla 16).

En general, los resultados evidencian una asociación significativa en el modelo dominante para la variante genética (Tabla 17) ATG2B rs3759601 ($p=0,030$, OR=0,473 (IC 95% 0,237-0,941)). Ser portador de el heterocigoto CC podría conferir un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad tuberculosa (Figura 25). En conjunto con los resultados de la tabla 16 (ILTB vs TB), estos hallazgos soportan la idea de que este genotipo de ATG2B se encuentran implicados en la progresión de la tuberculosis y la susceptibilidad a manifestar la enfermedad.

Tabla 16. Distribución genotípica de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 en pacientes con infección (Grupo A-ILTB) y tuberculosis activa (Grupo B-TB) con relación al riesgo de progresión a enfermedad tuberculosa.

SNP	Herencia/Genotipo	Grupo A-ILTB	Grupo B-TB	p	OR (IC 95%)
ATG2B rs3759601	<i>Codominante</i>				
	CC	4 (7,5%)	16 (20,5%)		1
	CG	26 (49,2%)	38 (48,8%)	0,087	0,365 (0,110-1,218)
	GG	23 (43,3%)	24 (30,7%)		0,261 (0,076-0,898)
	<i>Recesiva</i>				
	CC+CG	30 (56,6%)	54 (69,3%)	0,139	1
	GG	23 (43,3%)	24 (30,7%)		0,580 (0,281-1,197)
	<i>Dominante</i>				
CC	4 (7,6%)	16 (20,5%)	0,043	1	
CG+GG	49 (92,4%)	62 (79,5%)		0,316 (0,099-1,007)	
ATG5 rs2245214	<i>Codominante</i>				
	CC	18 (34,0%)	26 (34,2%)		1
	CG	30 (56,6%)	41 (54,0%)	0,355	0,864 (0,249-2,996)
	GG	5 (9,4%)	9 (11,8%)		0,540 (0,165-1,772)
	<i>Recesiva</i>				
	CC+CG	35 (66,1%)	67 (88,2%)	0,454	1
	GG	18 (33,9%)	9 (11,8%)		0,648 (0,205-2,051)
	<i>Dominante</i>				
CC	5 (9,4%)	26 (34,2%)	0,316	1	
CG+GG	48 (90,6%)	50 (65,8%)		1,449 (0,699-3,005)	
ATG10 rs1864183	<i>Codominante</i>				
	CC	15 (28,3%)	18 (23,1%)		1
	CT	25 (47,2%)	37 (47,4%)	0,732	1,233 (0,526-2,893)
	TT	13 (24,5%)	23 (29,5%)		1,474 (0,561-3,871)
	<i>Recesiva</i>				
	CC+CT	40 (75,5%)	55 (70,5%)	0,533	1
	TT	13 (24,5%)	23 (29,5%)		1,287 (0,582-2,843)
	<i>Dominante</i>				
CC	15 (28,3%)	18 (23,1%)	0,499	1	
CT+TT	38 (71,7%)	60 (76,9%)		1,316 (0,593-2,919)	
ATG16L1 rs2241880	<i>Codominante</i>				
	GG	17 (32,1%)	16 (20,8%)		1
	GA	30 (56,6%)	43 (55,8%)	0,132	1,523 (0,666-3,481)
	AA	6 (11,3%)	18 (23,4%)		3,187 (1,011-10,055)
	<i>Recesiva</i>				
	GG+GA	47 (88,7%)	59 (76,6%)	0,082	1
	AA	6 (11,3%)	18 (23,4%)		2,390 (0,879-6,498)
	<i>Dominante</i>				
GG	17 (32,1%)	18 (20,8%)	0,146	1	
SNP	GA+AA	36 (67,9%)	61 (79,2%)		1,600 (0,733-3,492)

Tabla 17. Distribución de frecuencias genotípicas de las variantes genéticas ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 en pacientes españoles con TB activa comparado con controles sanos.

SNP	Herencia/Genotipo	Grupo Control	Grupo B-TB	p	OR (IC 95%)
ATG2B rs3759601	<i>Codominante</i>				
	CC	25 (10,9%)	16 (20,5%)		1
	CG	112 (48,7%)	38 (48,8%)	0,064	0,530 (0,256-1,097)
	GG	93 (40,4%)	24 (30,7%)		0,403 (0,186-0,872)
	<i>Recesiva</i>				
	CC+CG	137 (59,6%)	54 (69,3%)	0,129	1
	GG	93 (40,4%)	24 (30,7%)		0,655 (0,378-1,133)
	<i>Dominante</i>				
CC	25 (10,9%)	16 (20,5%)	0,030	1	
CG+GG	205 (89,1%)	62 (79,5%)		0,473 (0,237-0,941)	
ATG5 rs2245214	<i>Codominante</i>				
	CC	95 (41,3%)	26 (34,2%)		1
	CG	113 (49,1%)	41 (54,0%)	0,346	1.388 (0.574-3.355)
	GG	22 (9,5%)	9 (11,8%)		1.321 (0.557-3.131)
	<i>Recesiva</i>				
	CC+CG	208 (90,4%)	67 (88,2%)	0,356	1
	GG	22 (9,6%)	9 (11,8%)		1.337 (0.581-3.078)
	<i>Dominante</i>				
CC	95 (41,3%)	26 (34,2%)	0,373	1	
CG+GG	135 (58,7%)	50 (65,8%)		1.171 (0.675-2.030)	
ATG10 rs1864183	<i>Codominante</i>				
	CC	39 (17,0%)	18 (23,1%)		1
	CT	107 (46,5%)	37 (47,4%)	0,364	0,749 (0,383-1,467)
	TT	84 (36,5%)	23 (29,5%)		0,593 (0,288-1,224)
	<i>Recesiva</i>				
	CC+CT	146 (63,5%)	55 (70,5%)	0,080	1
	TT	84 (36,5%)	23 (29,5%)		0,727 (0,417-1,267)
	<i>Dominante</i>				
CC	39 (17,0%)	18 (23,1%)	0,060	1	
CT+TT	191 (83,0%)	60 (76,9%)		0,681 (0,363-1,277)	
ATG16L1 rs2241880	<i>Codominante</i>				
	GG	68 (29,5%)	16 (20,8%)		1
	GA	116 (50,5%)	43 (55,8%)	0,322	1,575 (0,825-3,010)
	AA	46 (20%)	18 (23,4%)		1,663 (0,770-3,593)
	<i>Recesiva</i>				
	GG+GA	184 (80%)	59 (76,6%)	0,528	1
	AA	46 (20%)	18 (23,4%)		1,220 (0,657-2,266)
	<i>Dominante</i>				
GG	68 (29,5%)	18 (20,8%)	0,134	1	
GA+AA	162 (70,5%)	61 (79,2%)		1,600 (0,862-2,972)	

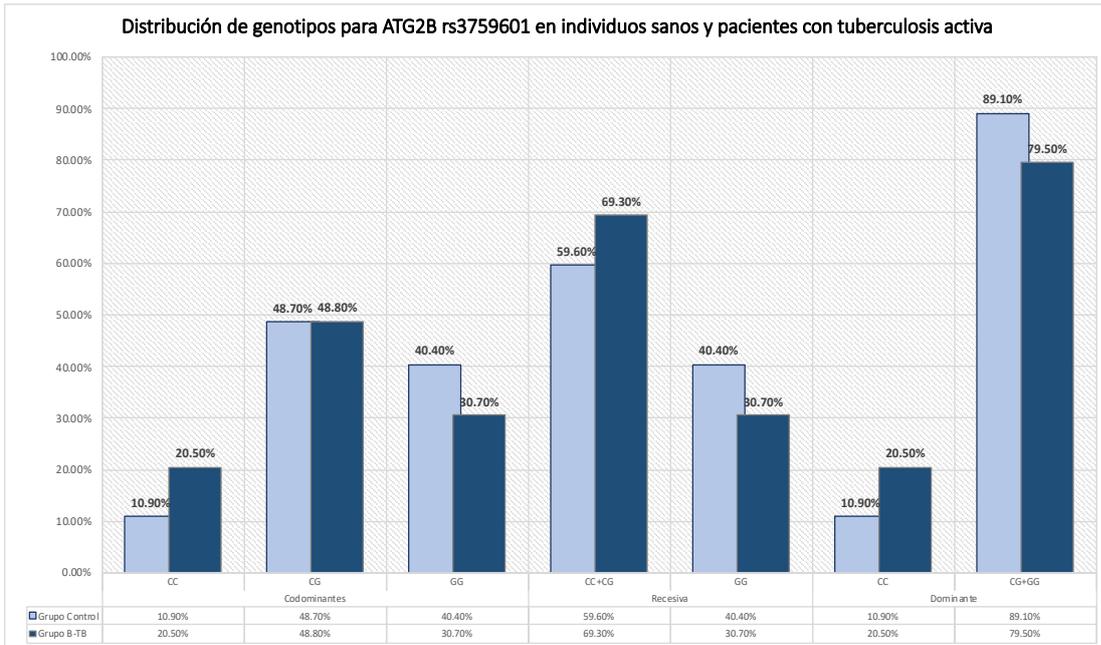


Figura 24. Distribución de genotipos para ATG2B rs3759601 en individuos sanos y pacientes con tuberculosis.

3. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS PARA LOS POLIMORFISMOS ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 Y SU ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS.

3.1 POLIMORFISMOS, TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR Y CAVITACIONES.

Al comprobar la distribución la localización anatómica de la TB, observamos que el 58,3% tuvo tuberculosis pulmonar (TBP), 27,8% tuberculosis extrapulmonar (TBEP) y un 13,9% presentó tuberculosis mixta (TBP+TBEP). Los pacientes con tuberculosis mixta han sido incluidos en el grupo de TBEP, por presentar al menos una localización fuera de la cavidad torácica. No hubo diferencias significativas entre los grupos para edad y sexo (Tabla 18).

El sitio más común de TBEP ha sido en ganglios linfáticos (30%), seguido de osteoarticular (20%), tuberculosis diseminada (13,3%) y abdominal (10%%). Dos pacientes presentaron tuberculosis en el sistema genitourinario y otros dos en pericardio. Comprobamos la posibilidad de susceptibilidad a presentar tuberculosis extrapulmonar comparando los SNPs y la localización de la tuberculosis, pero en este caso, no encontramos diferencias significativas.

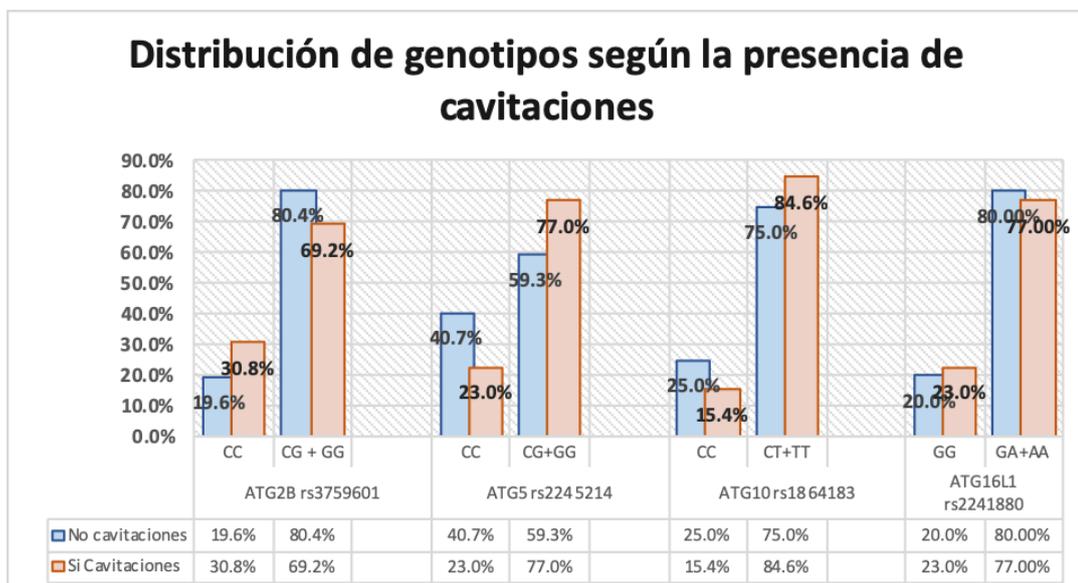


Figura 25. Análisis de la distribución de genotipos en el modelo dominante de los polimorfismos de ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 y la presencia de cavitaciones en pacientes con enfermedad tuberculosa.

Tabla 18. Análisis de la localización de la tuberculosis en pacientes con enfermedad tuberculosa (Grupo B-TB, n=78) y su relación con los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880.

SNP		TBEP	TBP	p	OR (IC 95%)
Sexo	M	53,3%	66,7%	0,253	1
	H	46,7%	33,3%		0,571 (0,218-1,496)
Edad	<55 años	46,7%	50,0%	0,780	1
	≥55 años	53,3%	50,0%		0,875 (0,342 - 2,236)
ATG2B rs3759601					
Dominante	CC	16,7%	26,2%	0,338	1
	CG + GG	83,3%	73,8%		0,564 (0,173 - 1,836)
ATG5 rs2245214					
Dominante	CC	34,5%	39,0%	0,698	1
	CG+GG	65,5%	61,0%		0,822 (0,306 - 2,213)
ATG10 rs1864183					
Dominante	CC	26,7%	19,0%	0,443	1
	CT+TT	73,3%	81,0%		1,545 (0,506 - 4,723)
ATG16L1 rs2241880					
Dominante	GG	26,7%	17,1%	0,328	1
	GA+AA	73,3%	82,9%		1,766 (0,561 - 5,564)

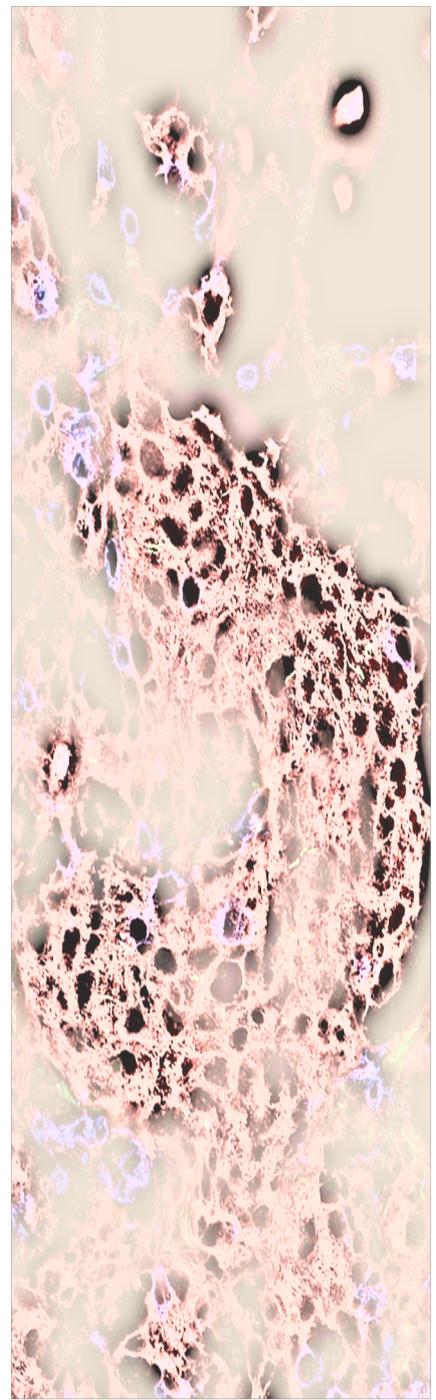
Además, realizamos un análisis de la presencia de cavitaciones en el grupo de pacientes con enfermedad tuberculosa con relación a los polimorfismos sin encontrar diferencias significativas para la distribución de genotipos en el modelo dominante (Figura 24).

3.2. POLIMORFISMOS Y PRESENCIA DE GRANULOMAS EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS.

Por último, en la tabla 19, mostramos el resultado del análisis de la distribución de diferentes genotipos para el modelo dominante de los SNPs estudiados, según la presencia de granulomas en el grupo de pacientes con tuberculosis, sin apreciar asociaciones.

Tabla 19. Distribución de genotipos en el modelo dominante de los polimorfismos de ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 y presencia de granulomas en imagen y anatomía patológica en sujetos del Grupo TB.

Grupo TB (n=132)				
SNP	Genotipo	No Granulomas	Si Granulomas	p
ATG2B rs3759601 <i>Dominante</i>	CC	13,3%	26,3%	0,169
	CG + GG	86,7%	73,7%	
ATG5 rs2245214 <i>Dominante</i>	CC	34,6%	38,9%	0,726
	CG+GG	65,4%	61,1%	
ATG10 rs1864183 <i>Dominante</i>	CC	27,6%	10,5%	0,153
	CT+TT	72,4%	89,5%	
ATG16L1 rs2241880 <i>Dominante</i>	GG	25,7%	27,8%	1,000
	GA+AA	74,3%	72,2%	



DISCUSIÓN

1. POLIMORFISMOS DE AUTOFAGIA Y SU ASOCIACIÓN CON LA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS EN UNA POBLACIÓN CAUCÁSICA

La tuberculosis es una enfermedad que afecta a millones de individuos y su alta prevalencia demuestra que los esfuerzos utilizados en el control de la enfermedad deben ser reevaluados y mejorados. Por ese motivo, se requiere de una mejora en los recursos disponibles en investigación biotecnológica para la investigación y desarrollo de nuevas vacunas, técnicas diagnósticas y tratamientos. En consecuencia, se han establecido metas para disminuir significativamente la incidencia de tuberculosis a nivel global dentro de los Objetivos de desarrollo del Milenio (ODM) ^{1,258}.

Uno de los retos en el área de la investigación en la tuberculosis es la dificultad que supone el diagnóstico certero de la infección latente, pues las bacterias no son observadas directamente en el huésped durante este estadio.

Además, la proporción de personas infectadas por *Mtb* es 10 veces mayor que en los individuos con enfermedad activa ^{1,256,259}, y esto ilustra la heterogeneidad en este grupo clínico, ya que el riesgo de progresión a tuberculosis activa puede depender de una variedad de factores de riesgo conocidos y desconocidos. Podemos deducir que el sistema inmune puede contener la carga bacteriana el tiempo suficiente para evitar el desarrollo de la enfermedad, aunque no siempre se pueda erradicar la infección por completo ^{30,151,256,260}.

El concepto tradicional de la patogénesis de tuberculosis fue declarado formalmente hace 57 años, asumiendo que los casos de infecciones en humanos están determinados puramente por la exposición a un agente microbiano y su origen se relaciona con factores medioambientales. Sin embargo, se ha observado que la incidencia de la infección tuberculosa varía en diferentes poblaciones y este tipo de diferencias no necesariamente se atribuyen a factores meramente sociodemográficos y medioambientales ^{169,219,261}.

Se describe como la exposición a la infección tuberculosa es reciente en África Subsahariana, a diferencia de los europeos que han sido expuestos a la tuberculosis por siglos, dando como resultado poblaciones con una susceptibilidad y factores de protección heterogéneos frente la infección y enfermedad por *Mtb*.

En este sentido, se requiere del abordaje de nuevas líneas de investigación que analicen el problema desde una perspectiva diferente a la trazada convencionalmente, permitiendo la identificación de nuevos biomarcadores para caracterizar la patogénesis y mejorar nuestra forma de entender las diferentes etapas de la infección tuberculosa ^{119,262}.

Diferentes estudios han determinado que los factores genéticos desempeñan un papel clave en la determinación de la susceptibilidad y resistencia del huésped a la tuberculosis ^{174,178,186,263}. La identificación de los múltiples factores que determinan la compleja susceptibilidad y evolución clínica de la infección tuberculosa nos invita a una aproximación a la enfermedad desde un enfoque genético.

Dentro de los genes que han sido estudiados se encuentran los ATGs, implicados en la síntesis de proteínas relacionadas con la autofagia, fundamentales para la eliminación de patógenos intracelulares y cuya importancia en el control de infecciones ha sido demostrada en diferentes estudios sobre autofagia ^{20,102,264,265}. *Mtb* fue uno de los primeros microorganismos descritos en la caracterización preliminar de este mecanismo durante la erradicación de infecciones bacterianas, y más adelante, las proteínas responsables de la degradación de la micobacteria ^{102,106,113,266}.

En términos generales, la identificación de variantes genéticas en diferentes grupos poblacionales permitiría esclarecer su impacto en el estado activo o latente de la infección por tuberculosis. En este análisis, hemos elegido SNPs en los genes ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880, para evaluar el rol que estos polimorfismos tienen en la susceptibilidad y progresión de la tuberculosis en una población de origen español.

2. CORRELACIONES CLÍNICAS Y GENÉTICAS DE LA TUBERCULOSIS EN UNA POBLACIÓN CASTELLANO LEONESA

En años recientes la incidencia de tuberculosis en España ha disminuido considerablemente, aunque los casos de tuberculosis multirresistente (MDR-TB) han continuado en aumento en este país y diferentes zonas de Europa ²⁶⁷. En términos generales, esta enfermedad constituye un problema de salud pública a nivel nacional.

En España existe un predominio de la infección en adultos jóvenes de género masculino, tanto en los enfermos inmigrantes como en los nacidos en este país ²⁶⁸. En nuestro grupo de estudio, las mujeres presentan menos infecciones que los hombres (61,1%), aunque en la actualidad, esa diferencia no se puede atribuir completamente a las tasas de morbilidad en ambos sexos, factores medioambientales o accesibilidad a los servicios de salud. En este sentido, algunos autores han sugerido que el sexo masculino puede desarrollar un nivel mayor de hipersensibilidad a los antígenos micobacterianos en comparación con las mujeres ²⁶⁹.

Dentro de la distribución por edades, la mayoría de los participantes con tuberculosis activa tuvo una edad mayor o igual a 55 años (52,0%), estas diferencias podrían deberse a que la población castellano leonesa tiene una población envejecida en su mayoría (la edad media de Castilla y León se sitúa en 46,4 de edad) ²⁶⁷.

En cuanto a la comparación de los diferentes valores analíticos entre los grupos B-TB y A-ILTB, los valores medios de hemoglobina (12.98 ± 2.02 - 13.89 ± 2.27 ; $p=0,032$), y sodio sérico (137.45 ± 5.84 - 140.75 ± 2.57 ; $p=0,001$) fueron significativamente diferentes. El mecanismo que genera la hiponatremia en pacientes con tuberculosis pulmonar es la secreción inadecuada de la hormona antidiurética. Entre otras causas de hiponatremia se encuentran la infección de la glándulas suprarrenales, hipotálamo y meninges ²⁷⁰.

En esta muestra, hemos encontrado que 12 pacientes habían presentado hiponatremia al momento del diagnóstico de tuberculosis, y un 50% de estos pacientes había manifestado tuberculosis extrapulmonar. Así, dos de estos pacientes debutaron con síntomas de un cuadro confusional y fueron diagnosticados de hiponatremia severa (valores menores de 120 mEq/L). La hiponatremia fue el signo cardinal presente en el momento del diagnóstico de estos dos pacientes, y sería interesante realizar más estudios que permitan determinar factores predisponentes a alteraciones electrolíticas en pacientes con tuberculosis en este tipo de poblaciones.

Asimismo, observamos que los niveles de albumina fueron más bajos en el grupo de pacientes con tuberculosis comparado con los pacientes con tuberculosis latente, (3.76 ± 0.63 - 4.08 ± 0.93 ; $p= 0,047$). Este tipo de resultados también ha sido observado por otros autores al comparar participantes con ILTB y tuberculosis ^{271,272}. En particular, la infección por *Mtb* genera una disminución de los niveles séricos de albumina y la incidencia de malnutrición es elevada en pacientes con tuberculosis activa ²⁷¹.

2.1 ANÁLISIS, EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS, DE LA PRESENTACIÓN CLÍNICA DE TUBERCULOSIS SEGÚN LA DISTRIBUCION DE LOS GENOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS DE ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880.

Estudios recientes han demostrado que la tuberculosis pulmonar se produce dentro de los primeros 3 años de contacto inicial, y que el riesgo disminuye después de este período ¹. La localización de la tuberculosis puede determinar el curso clínico, complicaciones, el tipo régimen y respuesta al tratamiento.

Consideramos relevante realizar una evaluación de la localización de enfermedad y las diferentes etapas de la presentación clínica. Para efectos de este análisis, dividimos la localización de tuberculosis pulmonar (TBP) y extrapulmonar (TBEP) y decidimos buscar asociaciones entre la autofagia impulsada por variantes genéticas, que afectan la localización de la TB.

La TBEP se manifiesta comúnmente como una linfadenopatía generalizada y una reacción proinflamatoria más pronunciada en comparación con otras formas clínicas de la enfermedad ²⁷³. En nuestro estudio se presentaron más casos de TBEP en mujeres (53,3%), en comparación con los hombres y el sitio más común de TBEP ha sido en ganglios linfáticos (30%). Aunque no observamos diferencias significativas en esta distribución, estudios recientes han mostrado datos similares, observándose que la posibilidad de desarrollo de TBEP se incrementó en las mujeres después de 5 años de contacto inicial con la micobacteria ²⁷⁴.

En contraste, las posibilidades de tuberculosis pulmonar fueron mayores en hombres dentro de los primeros años de infección inicial ²⁷⁴. En nuestra población, la mayoría de los casos de tuberculosis han tenido una localización pulmonar (58,3%), y la mayoría ha correspondido también a hombres (66,7%). Además, no encontramos

diferencias significativas al comparar la localización de la tuberculosis y edad de pacientes, al dividirlos en menores y mayores de 55 años. Esto coincide con estudios realizados en EE. UU.⁴⁹ y Turquía²⁷⁵ que informaron que la edad no estaba asociada con la TBEP.

Procedimos a comparar la localización de la tuberculosis y su relación con los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 en el modelo dominante, sin encontrar diferencias significativas (Tabla 18). Otros autores han destacado diferencias significativas en el análisis de otros SNPs, por ejemplo, en una población de Brasil se observó un mayor riesgo de tuberculosis pulmonar en sujetos con el polimorfismo rs10754558 en el gen NLRP3²²⁶. Es de resaltar que los autores no incluyeron a los pacientes con TBEP en el análisis comparativo y no hubo ningún informe sobre la respuesta a tratamiento.

Por otra parte, Berg et al. han observado una frecuencia significativamente mayor en los homocigotos del gen CARD8 (C10X) en pacientes etíopes con TBEP, en relación con individuos sanos de la misma área, lo que indica que el gen CARD8 (C10X) puede ser un factor que contribuya a la alta tasa de TBEP en esta región²⁷⁶.

Un estudio realizado en canadienses con TBEP y VIH positivo, no detectó asociación entre la variante genética HAMP-P -582 A> G y tuberculosis de localización pulmonar. Sin embargo, encontraron que el alelo G de HAMP-P -582 A> G estaba relacionado con un alto riesgo de TBEP²⁷⁷.

En nuestra muestra hemos excluido a pacientes con VIH o diabetes, pues consideramos que la selección de casos es crucial para nuestras comparaciones. En particular, los pacientes con infección por VIH presentan tasas más elevadas de tuberculosis extrapulmonar o diseminada y podría ser que estas comorbilidades afecten los resultados al momento de evaluar otros grupos poblacionales.

En definitiva, sería interesante continuar el análisis en este grupo poblacional para determinar si existen variantes en genes relacionados con la autofagia u otros genes con un papel central en la localización de tuberculosis y pueden explicar en parte, la alta incidencia de TBEP en la población española.

2.2 ANÁLISIS, EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS, DE LA EVOLUCIÓN Y RESPUESTA A TRATAMIENTO PARA TUBERCULOSIS SEGÚN LA DISTRIBUCION DE LOS GENOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS DE ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880.

Con relación a las pruebas de imagen, la tuberculosis pulmonar primaria se manifiesta con afectación parenquimatosa, linfadenopatías, derrame pleural o enfermedad miliar, y la localización de la infección es más común en pulmón derecho que en izquierdo. La reactivación de la tuberculosis tiende a afectar a los segmentos apical y posterior de los lóbulos superiores y el segmento apical de los lóbulos inferiores ²⁷⁸. Hemos observado, en nuestros pacientes, que la localización de las lesiones pulmonares fue más frecuente en el lóbulo superior (22,7%), seguido del lóbulo medio e inferior (17,4%) y en términos de lateralidad, la mayoría (43,1%) tuvo localización en el pulmón derecho (Tabla 11).

El 18,0% de los pacientes de incluidos en nuestro trabajo han presentado lesiones tipo cavitación o necrosis como resultado de la enfermedad. Este tipo de lesiones aparece en el 50% de los casos de tuberculosis por reactivación o reinfección ²⁷⁸. Si bien no pudimos distinguir entre la ocurrencia de lesiones generadas por la progresión de tuberculosis primaria, reinfección o reactivación de la enfermedad durante la inclusión de pacientes, la presencia de la mayoría de las lesiones en el lóbulo superior y un elevado numero de casos con cavitaciones, podríamos suponer que estamos frente a una población con una alta incidencia de casos por reactivación de tuberculosis.

La reactivación de la tuberculosis se caracteriza por una progresión de la inflamación y del tejido necrótico, desarrollándose comunicaciones con la vía aérea y presencia de cavidades. La diseminación brocógena permite la transmisión de la infección a otros segmentos y lóbulos pulmonares ⁵⁴.

La presencia de cavitaciones se correlaciona con la cantidad de bacterias que pueden ser propagadas en el ambiente y, en consecuencia, a mayor numero de cavitaciones aumenta el riesgo de propagación de la infección o reactivación de la enfermedad. En este sentido, destacamos que la presencia de cavitaciones se considera una forma severa de la tuberculosis y es de interés el hallazgo de un porcentaje tan elevado en una población europea.

Por estas razones, procedimos a comparar los porcentajes de individuos con cavitaciones según la distribución de los genotipos de los polimorfismos de ATG2B

rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880, sin encontrar asociaciones significativas en el modelo dominante (Figura 24).

En cuanto a otros estudios de variantes genéticas, se ha descrito que los individuos portadores del genotipo CD209 -336 GG tienen menor riesgo de desarrollar lesiones cavitarias de pulmón. Así pues, es consistente con la evidencia de que la micobacteria puede utilizar la unión con DC-SIGN para disminuir la respuesta inmune proinflamatoria ²⁷⁹. La presencia de cavitaciones se encuentra asociada con la producción de citoquinas como IL-4, que generan tasas elevadas de DC-SIGN en células dendríticas ²⁸⁰.

Es de resaltar que en otro estudio de asociación con SNPs, las mujeres y los pacientes reingresados tenía una edad mayor o igual a 40 años (72,0%), mostrando una asociación significativa entre una buena respuesta a tratamiento y el polimorfismo del gen NLRP3 (Q705K) con mejores respuestas clínicas que los hombres en general ²⁸¹.

En estos participantes, la duración media de tratamiento antituberculosos fue de 6,85 ($\pm 1,803$ DS) meses y un 9,6% de pacientes había presentado resultados de *Mtb* resistente a por lo menos un fármaco antituberculoso en el antibiograma. Los pacientes con tuberculosis activa presentaron una tasa satisfactoria de respuesta a tratamiento del 79,6%, y la mayoría de los pacientes con buena respuesta a tratamiento correspondían a nuevos casos de tuberculosis pulmonar. Sin embargo, las tasas observadas han sido inferiores a la tasa esperada según la OMS (85%) ²⁸².

La presencia de casos de reactivación de tuberculosis en este grupo, indica que varios individuos han presentado hiperactividad inflamatoria en respuesta a la enfermedad, entorpeciendo el efecto terapéutico de los medicamentos, y podrían explicar, en parte, la tasa de respuesta al régimen antituberculoso observada. Asimismo, diferentes factores han sido asociados a asociados con una mala evolución de la infección, la edad avanzada, consumo de tabaco y haber recibido tratamiento antituberculoso en años anteriores ²⁸³.

Por otra parte, durante el seguimiento de los participantes, 13,6% de ellos no pudieron ser reevaluados pues fueron trasladados a otros hospitales, provincias o no asistieron nuevamente a consulta. Al reflexionar sobre la proporción de pacientes que fueron perdidos durante el seguimiento, se requiere de acciones que mejoren los protocolos de rastreo efectivos para los pacientes y minimicen las interrupciones durante el tratamiento antituberculoso.

En consecuencia, recomendamos enfocar los esfuerzos de monitorización en las poblaciones más susceptibles a presentar mala respuesta al tratamiento como son los pacientes de sexo masculino, fumadores y ancianos.

2.3 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 EN LA SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIÓN TUBERCULOSA

La variante genética ATG5 - rs2245214, se relaciona con un cambio intrónico, y su relevancia durante el control de la infección tuberculosa ha sido descrita previamente en otros estudios ^{116,241,284,285}.

Procedimos a realizar el análisis comparativo de la frecuencia de distribución de los genotipos del polimorfismo ATG5 - rs2245214 en pacientes con tuberculosis, comparado con el grupo control, (Tabla 13) sin encontrar diferencias significativas.

En este sentido, el gen ATG5, se encuentra involucrado en la síntesis de la proteína que se une a ATG12 y ATG16L1 para generar un complejo multimérico, fundamental para la elongación de la membrana del autofagosoma ²⁸⁶ y está involucrada directamente con la fusión de lisosomas con autofagosomas que contienen micobacterias ¹¹⁶.

En el estudio realizado por Kimmey et al. se observó que ATG5 tiene un papel único durante la infección por *Mtb*, pues al analizar la respuesta de polimorfonucleares (PMN) en pulmones de ratones carentes de este gen, hubo una acumulación anárquica de estas células incrementando la patología y las condiciones adecuadas para la expansión de la infección ²⁸⁵. ATG5 tiene una implicación directa con la maduración de los autofagosomas regulando la producción de LC3 II ²⁸⁷.

Al evaluar las diferencias entre el grupo control y pacientes con tuberculosis activa (Tabla 17), en función de sus distribuciones genotípicas, observamos que los genotipos del gen ATG5 no presentan diferencias significativas en pacientes con tuberculosis activa comparado con sujetos sanos. Además, no hubo diferencias significativas cuando replicamos este análisis entre los pacientes con tuberculosis latente y activa.

Con estos resultados, podemos deducir que no se observan diferencias para los genotipos de ATG5 - rs2245214, incluso cuando el grupo a comparar incluye tanto a

los pacientes con tuberculosis como a los participantes con infección latente. Sugiriendo que este SNP no estaría implicado con la susceptibilidad subyacente a la infección tuberculosa, o directamente involucrado con el riesgo de progresión de la enfermedad activa en nuestro grupo de pacientes.

En cuanto a el gen ATG10, que codifica una proteína de mismo nombre, es una enzima E2-like implicada en la conjugación de ATG5 con ATG12 que finalmente formaría parte del complejo de membrana ATG12-ATG5-ATG16L⁸¹. El polimorfismo estudiado, ATG10 rs1864183, se trata de un cambio de una citosina por una timina en la posición 929 del gDNA, formando la mutación de cambio de sentido p.T212M.

Al comparar la distribución de alelos en los grupos control y TB (Tabla 14), hemos observado que la distribución de alelos fue significativamente diferente ($p=0,025$, $OR=0,702$ (IC 95%= 0,515-0,958)) pues los individuos sanos son portadores del alelo ATG10 rs1864183 T con mayor frecuencia, lo que podría conferir una menor susceptibilidad a la infección tuberculosa en este grupo poblacional.

En el estudio realizado por Songane y colaboradores, observaron que el polimorfismo de ATG10 rs1864183 estaba asociado con la alta producción de IL-8 durante la infección tuberculosa²⁸. Asimismo, IL-8 se ha vinculado con una mejor respuesta a la infección por *Mtb*, aumentando la habilidad de los leucocitos de fagocitar y eliminar este bacilo²⁸⁸.

En conjunto, los datos observados en estos grupos indican que la variante genética de ATG10 puede tener un impacto positivo en la protección contra la enfermedad tuberculosa gracias a su implicación directa en la formación de autofagosomas y el efecto que tiene sobre la respuesta inmune.

Aunque no observamos otros resultados significativos en cuanto a la distribución de alelos para ATG2B rs3759601 y ATG16L1 rs2241880 es la primera vez que se ha descrito que la variante genética ATG10 rs1864183 estaría asociada con la modulación del huésped para adquirir la infección tuberculosa en una población europea, además de su rol protector durante la infección. Por tanto, la detección de estos polimorfismos entre los pacientes con TB puede proporcionar información importante en la evaluación de los perfiles de riesgo de susceptibilidad a la infección tuberculosa.

2.4 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS ATG2B RS3759601, ATG5 RS2245214, ATG10 RS1864183 Y ATG16L1 RS2241880 EN LA PROGRESIÓN DE INFECCIÓN A ENFERMEDAD TUBERCULOSA

Con la intención de evaluar la posible asociación de las variantes genéticas con la susceptibilidad a padecer la enfermedad activa, analizamos la distribución de genotipos entre los participantes con enfermedad tuberculosa e infección latente (Grupo A-ILTB y B-TB). Dentro de los hallazgos destacan los encontrados para el gen ATG2B, que sintetiza la proteína ATG2B, fundamental en la morfología y configuración final del autofagosoma ²³⁰.

La variante genética ATG2B rs3759601 es un cambio missense p.Q1383E, tras una transversión de citosina por guanina en la posición 4512 del gDNA. Los resultados obtenidos en la distribución de genotipos para el modelo dominante de ATG2B rs3759601 han sido significativos ($p=0,043$ (OR=0,316 (IC 95% (0,099-1,007))). Especulamos que una diferencia de la distribución de genotipos en ATG2B entre pacientes con tuberculosis activa y latente podría conferir una menor posibilidad de progresión enfermedad tuberculosa (Tabla 16).

Además, hemos comparado la distribución de genotipos entre los individuos sanos y sujetos con tuberculosis activa, y notamos diferencias significativas entre frecuencias del genotipo GG ATG2B rs3759601 ($p=0,030$, OR=0,473 (IC 95% 0,237-0,941)). La mayoría de los portadores de este genotipo pertenecen a el grupo control, lo que podría hacernos entender que estos individuos tienen menor riesgo de presentar el estado activo de la enfermedad.

En apoyo a lo señalado, se ha descrito que el aumento de la expresión de ATG2B o la reducción de la biosíntesis de triglicéridos de macrófagos, normaliza la deposición de lípidos en los fagocitos infectados y reduce el número de micobacterias intracelulares viables ^{230,289}.

En un estudio realizado por Buffen et al., observaron que la autofagia es central en la modulación de la inmunidad inducida por BCG. El polimorfismo ATG2B rs3759601 tiene un efecto regulador de la respuesta inmune en modelos in vitro e in vivo, además de relacionarse con el desarrollo y recurrencia de cáncer de vejiga después de el uso de BCG intravesical.

En resumen, estos resultados sugieren que la variante genética de ATG2B rs3759601 podría afectar funcionalmente la expresión de la proteína correspondiente, impactando posteriormente la capacidad del huésped para controlar la infección.

La variante genética de ATG16L1 rs2241880 consiste en una transición de adenina por guanina que genera una sustitución missense de treonina por alanina en la posición 300 (p.T300A). Nuestros resultados indican que el polimorfismo ATG16L1 rs2241880 no presenta diferencias significativas en cuanto a la distribución de genotipos en este grupo poblacional. En este caso, no podemos afirmar que está asociado con una mayor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* en estos individuos.

El gen ATG16L1, sintetiza la proteína del mismo nombre que conforma el complejo ATG12-ATG5-ATG16L para la expansión de la membrana del autofagosoma^{78,286}. Precisamente, diferentes polimorfismos de este gen se han asociado particularmente con enfermedades inflamatorias tipo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, reafirmando el papel que tienen las variantes genéticas de autofagia en el curso clínico de otras enfermedades granulomatosas²⁹⁰⁻²⁹².

Debido a que los procesos utilizados por ATG16L1 para conferir susceptibilidad o protección subyacente pueden ser modestos y es probable que la susceptibilidad del huésped a la tuberculosis esté bajo control poligénico, el análisis de la relevancia clínica de este SNP en tuberculosis sigue siendo un tópico que requiere mayor investigación.

En resumen, con los datos obtenidos sobre la distribución de genotipos y alelos, podemos deducir que la resistencia innata a *M. tuberculosis* podría asociarse con los genes ATG2B y ATG10, afectando la susceptibilidad del huésped hacia la infección y progresión a enfermedad por su efecto directo en la respuesta inflamatoria durante la latencia o después de la primoinfección. Dicha posibilidad encaja perfectamente con la función esencial que tienen en la formación de autofagosomas durante el control de la infección. Este es el primer trabajo en el que se señalan estos polimorfismos como moduladores de la susceptibilidad a padecer tuberculosis en una población española.

3. LA TUBERCULOSIS COMO ENFERMEDAD AUTOFAGO-POLIGÉNICA

Basándonos en los resultados mencionados previamente, ser portador de genotipos y alelos específicos podría modificar la posibilidad de adquirir la infección y afectar el estado activo o latente de la tuberculosis al modular el grado de eliminación de la micobacteria después de la infección. Diferentes autores han apoyado la teoría de que la susceptibilidad genética a tuberculosis tenga una naturaleza poligénica, donde la dinámica entre los efectos de polimorfismos en más de un gen, pueden determinar, junto con factores ambientales, el grado de predisposición a infección y enfermedad activa en humanos ^{19,25,26,29,241}.

En este trabajo, los resultados observados en los genes ATG2B y ATG10 soportan la idea de que las diferentes respuestas de la vía de autofagia en macrófagos están en directa relación con diferentes genotipos de autofagia en individuos de origen español. En contraste a este análisis, el estudio de los polimorfismos ATG2B rs3759601 y ATG10 rs1864183 en otras poblaciones no ha demostrado asociaciones significativas ²⁸. No obstante, esta discordancia puede deberse a varios factores como son la mezcla de varias poblaciones, presencia de otras cepas de *M. tuberculosis*, el uso de diferentes definiciones de casos y controles o tamaños de muestra demasiado pequeños.

Ciertos autores señalan que esas disimilitudes de hallazgos entre grupos étnicos pueden deberse a diferencias intrínsecas en las frecuencias alélicas ²⁵. Adicionalmente, la filogeografía de las micobacterias implica que los linajes de *M. tuberculosis* se han adaptado de forma heterogénea a las variaciones genéticas entre los diferentes grupos raciales ²². Y entendemos que hay subgrupos poblacionales con tuberculosis pulmonar que tienen factores de riesgo genéticos específicos, sugiriendo que los polimorfismos pueden servir como marcadores de la susceptibilidad a la tuberculosis sólo en algunos grupos étnicos.

Es importante destacar que el impacto general de los SNPs en la susceptibilidad a la enfermedad en una población depende de la frecuencia de alelos para ese gen en la población estudiada. La frecuencia acumulada de estos polimorfismos de ATGs debe ser lo suficientemente alta como para afectar la susceptibilidad a la tuberculosis clínica en una población, pues algunas de las asociaciones genéticas identificadas hasta ahora han tenido un efecto modesto ^{208,241,242}.

En particular, un estudio de asociación con polimorfismos del gen NRAMP en una población de Gambia reveló que la presencia de 2 alelos tenía un efecto acumulativo sobre el riesgo de enfermedad en individuos de esta raza ¹⁹². Dentro de nuestro análisis, el efecto de ser portador del los alelo ATG10 rs1864183 T no solo puede ser acumulativo para la reducción de la destrucción intracelular de micobacterias inducida por ATGs, sino que también puede conferir un riesgo acumulado de adquirir o evitar la infección tuberculosa.

Además de los polimorfismos genéticos, existen otras características hereditarias que influyen en la susceptibilidad esta infección ²⁹³, por ejemplo, la acetilación de histonas y la metilación de DNA aberrante que pueden afectar la transcripción y expresión de genes sin afectar la secuencia de nucleótidos ²⁹⁴. Así pues, ha sido descrito que *M. tuberculosis* puede interferir con la regulación de mecanismos epigenéticos ²⁹⁵. Estas características del DNA se transmiten a generaciones posteriores, aunque se vean afectadas por factores medioambientales ²⁹³.

Es fundamental ampliar nuestra comprensión de la susceptibilidad en humanos a la tuberculosis con el uso de técnicas que permitan ilustrar otros mecanismos polimórficos y epigenéticos. Además del genotipado, existen otras técnicas que tienen el potencial de identificar diferentes variantes en genes de autofagia y que permitirían la validación de nuestros resultados y los de otros autores. Una de ellas son los GWAS (*Genome-wide association studies*). Sin embargo, aún no se han realizado muchos estudios de asociación con esta técnica para la infección por *M. tuberculosis*.

El proyecto International HapMap y otros autores ²⁹⁶, han demostrado que la variación más común en el genoma puede representarse por aproximadamente 300 000 SNPs ²⁹⁷ en poblaciones caucásicas. No obstante, estos estudios necesitan un tamaño de muestra grande para asegurar una potencia adecuada y son muy costosos.

Otra técnica utilizada es el estudio de mapeo (*admixture mapping*), que es particularmente indispensable cuando los polimorfismos varían en el mismo grupo étnico, permitiendo la identificación de secciones del genoma heredadas de poblaciones ancestrales y rastrear el loci responsable del fenotipo de interés ²⁹⁸. Enfocar esfuerzos en el uso de este tipo de técnicas permitiría encontrar nuevos genes relacionados con la progresión a la tuberculosis.

En general, en nuestro trabajo reafirmamos que no solo existe una asociación entre los SNPs de ATGs y la infección por *Mtb*, sino también que las diferencias en la distribución de genotipos y alelos de estas variantes genéticas entre individuos sanos,

con tuberculosis latente y activa afianzan la relevancia del efecto genético subyacente en el estado de infección tuberculosa en el huésped pudiendo condicionar la evolución de la tuberculosis.

La era de la medicina personalizada ya ha comenzado, y puede que no pase mucho tiempo para ver adelantos en los procedimientos genéticos individualizados que puedan aplicarse a enfermedades infecciosas como la tuberculosis. Existe la posibilidad de que hallazgos de esta magnitud puedan contribuir con la idea de utilizar genes de autofagia como biomarcadores que optimicen el seguimiento y predicción de la progresión o recurrencia de la infección en individuos con infección latente identificados como portadores de genotipos asociados a una mayor susceptibilidad a la infección.

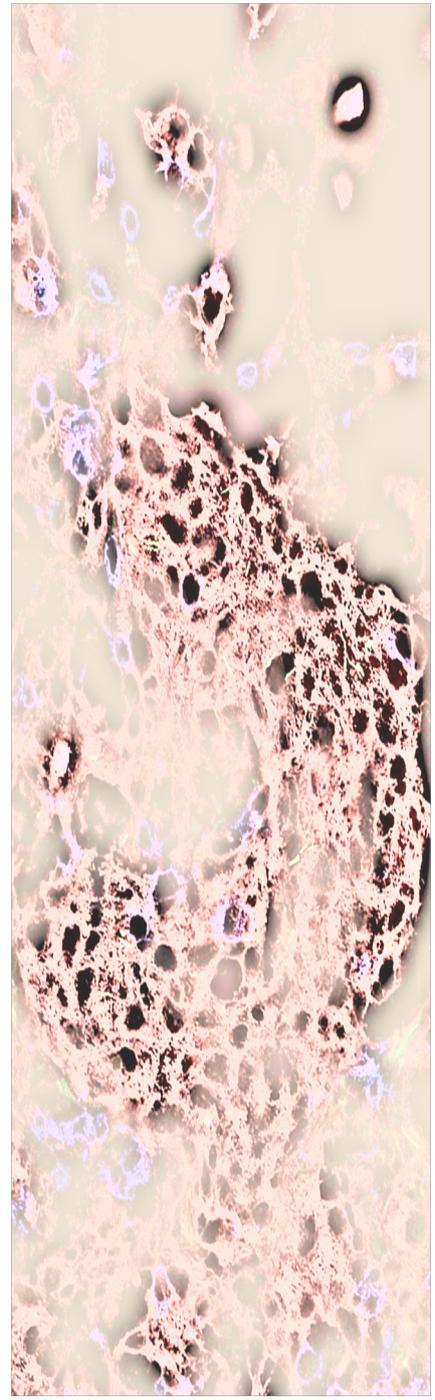
Asimismo, este enfoque incrementaría los beneficios de un régimen profiláctico agresivo dirigido a individuos en donde el estado latente de la tuberculosis puede tener una duración indeterminada gracias a la presencia de otras comorbilidades y factores sociodemográficos de riesgo. Todo lo anterior, ofrecería estrategias innovadoras para el desarrollo de cursos terapéuticos profilácticos y prevenir o retrasar la evolución a enfermedad tuberculosa.

4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En este estudio se han presentado varias limitaciones. En primer lugar, todavía existe la necesidad de otros estudios funcionales con un mayor número de participantes donde se pueda replicar la validez de nuestros hallazgos y se pueda determinar cómo los genotipos de ATGs afectan el estado de la tuberculosis activa frente a la latente que mejoren nuestra comprensión de la participación de la autofagia en la susceptibilidad y evolución de la tuberculosis en humanos. Este tipo de confirmación también podría ser valorado con un futuro meta análisis de múltiples estudios, ofreciendo un análisis que proporcione un mayor poder estadístico a las asociaciones detectadas.

En segundo lugar, la detección de infección latente no se realizó en donantes de sangre. Sin embargo, los métodos actuales, como la prueba cutánea de tuberculina y los ensayos de liberación de interferón gamma, no pueden predecir adecuadamente la tasa real de individuos con infección tuberculosa, pues una prueba positiva no está necesariamente asociada con la presencia de bacterias latentes.

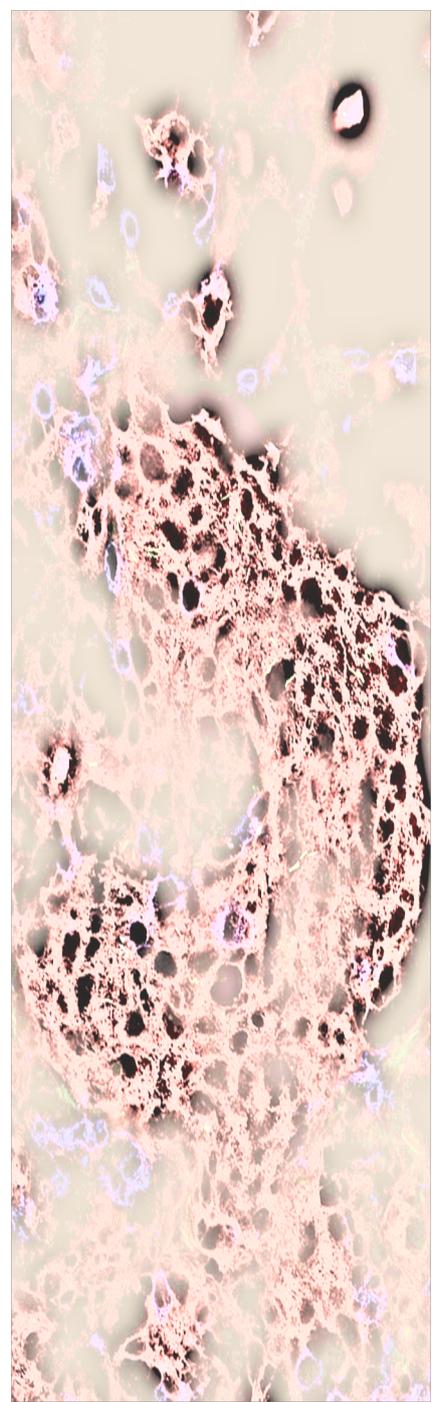
A pesar de lo mencionado, este tipo de estudios brindan una idea más sólida del papel de los ATGs en la respuesta a *Mtb*, el efecto heterogéneo que tienen en varios grupos étnicos, los entornos epidemiológicos y los fenotipos clínicos de la tuberculosis.



CONCLUSIONES

1. La población de pacientes tuberculosos estudiada presenta características demográficas y clínicas similares a las tasas observadas a nivel europeo en cuanto a su distribución por género, edad, localización de la tuberculosis y respuesta a tratamiento. Las diferencias significativas observadas entre los participantes con infección latente y tuberculosis activa son las esperadas para la muestra estudiada.
2. Existe una relación entre variantes genéticas de ATGs con la susceptibilidad y progresión de la tuberculosis en una población de origen español. Los hallazgos estarían asociados con un efecto modulador en el huésped portador de alelos específicos para adquirir la infección tuberculosa. Hay diferencias en la distribución de alelos de ATG10 rs1864183, al comparar individuos sanos con pacientes con tuberculosis. Individuos portadores del alelo ATG10 rs1864183 T podrían tener una menor susceptibilidad a la infección, si bien, podrían representar un rol protector a la infección tuberculosa en este grupo poblacional.
3. Nuestros resultados sugieren que existen diferencias en la distribución de los genotipos entre individuos con tuberculosis latente y activa. Además, la distribución de genotipos entre los individuos sanos y pacientes con tuberculosis ha arrojado diferencias significativas para los portadores del genotipo GG de ATG2B rs3759601, apuntando a podría tener un efecto subyacente al estado de la infección en el huésped, pues estos individuos podrían tener un menor riesgo de desarrollar la enfermedad.
4. Durante el estudio de la evolución clínica de pacientes con tuberculosis, no hemos encontrado asociaciones significativas al analizar la distribución de los genotipos de los polimorfismos de ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880, en individuos con cavitaciones en comparación con pacientes tuberculosos sin complicaciones.
5. En paciente tuberculosos, no hemos encontrado diferencias significativas al relacionar la respuesta a tratamiento y evolución clínica con la distribución de los genotipos de los polimorfismos de ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880.

6. Como una conclusión conceptual final indicamos que la tuberculosis como enfermedad multifactorial tiene un amplio espectro de respuestas inmunes innatas y factores sociodemográficos que influyen en su curso clínico. Aplicar un enfoque multidisciplinario (genómicos, proteómicos e inmunológicos) en la investigación sobre a susceptibilidad y progresión a la tuberculosis, permitiría desarrollar una estructura precisa que capture la heterogeneidad de la historia natural de la infección y la enfermedad. De esta manera mejoraría nuestra comprensión de la participación de la autofagia en la progresión de la tuberculosis y favorecería el desarrollo de estrategias terapéuticas profilácticas para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad.



BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2018*. (2018).
2. Carrol, E. D., Clark, J. E. & Cant, A. J. Non-pulmonary tuberculosis. *Paediatr. Respir. Rev.* **2**, 113–119 (2001).
3. Schlossberg, D. Acute Tuberculosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **24**, 139–146 (2010).
4. Zumla, A., Raviglione, M., Hafner, R. & von Reyn, C. F. Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **368**, 745–755 (2013).
5. Global Tuberculosis Programme. *Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management*. (2018).
6. Deretic, V. Autophagy in tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, a018481 (2014).
7. Gomes, L. C. & Dikic, I. Autophagy in Antimicrobial Immunity. *Mol. Cell* **54**, 224–233 (2014).
8. Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell* **119**, 753–766 (2004).
9. Manzanillo, P. S., Shiloh, M. U., Portnoy, D. A. & Cox, J. S. Mycobacterium Tuberculosis Activates the DNA-Dependent Cytosolic Surveillance Pathway within Macrophages. *Cell Host Microbe* **11**, 469–480 (2012).
10. Hmama, Z., Peña-Díaz, S., Joseph, S. & Av-Gay, Y. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. *Immunol. Rev.* **264**, 220–232 (2015).
11. Weiss, G. & Schaible, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* **264**, 182–203 (2015).
12. Bah, A., Lacarrière, C. & Vergne, I. Autophagy-Related Proteins Target Ubiquitin-Free Mycobacterial Compartment to Promote Killing in Macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, (2016).
13. Khan, A. & Jagannath, C. Analysis of host-pathogen modulators of autophagy during Mycobacterium Tuberculosis infection and therapeutic repercussions. *Int. Rev. Immunol.* **36**, 271–286 (2017).

14. Yu, L., Chen, Y. & Tooze, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* **14**, 207–215 (2018).
15. Jo, E.-K. Autophagy as an innate defense against mycobacteria. *Pathog. Dis.* **67**, 108–118 (2013).
16. Niedergang, F. & Grinstein, S. How to build a phagosome: new concepts for an old process. *Curr. Opin. Cell Biol.* **50**, 57–63 (2018).
17. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 759–774 (2013).
18. Farré, J.-C. & Subramani, S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 537–552 (2016).
19. Möller, M., Wit, E. D. & Hoal, E. G. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 3–26 (2010).
20. Bradfute, S. B. *et al.* Autophagy as an immune effector against tuberculosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 355–365 (2013).
21. Cooke, G. S. & Hill, A. V. S. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 967 (2001).
22. Newport, M. J. & Nejentsev, S. Genetics of susceptibility to tuberculosis in humans. *Monaldi Arch. Chest Dis. Arch. Monaldi Mal. Torace* **61**, 102–111 (2004).
23. Thuong, N. T. T. *et al.* Identification of Tuberculosis Susceptibility Genes with Human Macrophage Gene Expression Profiles. *PLOS Pathog.* **4**, e1000229 (2008).
24. Burgner, D., Jamieson, S. E. & Blackwell, J. M. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect. Dis.* **6**, 653–663 (2006).
25. Fernando, S. L. & Britton, W. J. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol. Cell Biol.* **84**, 125–137 (2006).

26. Denholm, J. T., McBryde, E. S. & Eisen, D. P. Mannose-binding lectin and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis. *Clin. Exp. Immunol.* **162**, 84–90 (2010).
27. Möller, M., Wit, E. D. & Hoal, E. G. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 3–26 (2010).
28. Songane, M. *et al.* Polymorphisms in autophagy genes and susceptibility to tuberculosis. *PloS One* **7**, e41618 (2012).
29. Daya, M., van der Merwe, L., van Helden, P. D., Möller, M. & Hoal, E. G. The role of ancestry in TB susceptibility of an admixed South African population. *Tuberculosis* **94**, 413–420 (2014).
30. Duncan, C. J. & Hambleton, S. Host genetic factors in susceptibility to mycobacterial disease. *Clin. Med.* **14**, s17–s21 (2014).
31. Harishankar, M., Selvaraj, P. & Bethunaickan, R. Influence of Genetic Polymorphism Towards Pulmonary Tuberculosis Susceptibility. *Front. Med.* **5**, (2018).
32. Floyd, K., Glaziou, P., Zumla, A. & Raviglione, M. The global tuberculosis epidemic and progress in care, prevention, and research: an overview in year 3 of the End TB era. *Lancet Respir. Med.* **6**, 299–314 (2018).
33. Vynnycky, E. & Fine, P. E. Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *Am. J. Epidemiol.* **152**, 247–263 (2000).
34. *Treatment of tuberculosis: guidelines.* (World Health Organization, 2010).
35. World Health Organization. *Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing.* (World Health Organization, 2009).
36. Trautmann, M., Ruhnke, M., Held, T. & Weinke, T. Complicated Tuberculosis and Residual Disease. *Immunobiology* **191**, 344–350 (1994).
37. Comstock, G. W. Epidemiology of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **125**, 8–15 (1982).

38. Drain, P. K. *et al.* Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, e00021-18 (2018).
39. Ghazaei, C. Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* **23**, (2018).
40. Vergne, I., Chua, J., Singh, S. B. & Deretic, V. Cell biology of Mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 367–394 (2004).
41. Ernst, J. D. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* **66**, 1277–1281 (1998).
42. Cadena, A. M., Fortune, S. M. & Flynn, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 691–702 (2017).
43. Horsburgh, C. R. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2060–2067 (2004).
44. Zumla, A., Raviglione, M., Hafner, R. & Fordham von Reyn, C. Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **368**, 745–755 (2013).
45. Verver, S., Bwire, R. & Borgdorff, M. W. Screening for pulmonary tuberculosis among immigrants: estimated effect on severity of disease and duration of infectiousness. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **5**, 419–425 (2001).
46. Mayock, R. L. & MacGregor, R. R. Diagnosis, prevention and early therapy of tuberculosis. *Dis. Mon.* **22**, 1–60 (1976).
47. García-Rodríguez, J. F. *et al.* Extrapulmonary tuberculosis: epidemiology and risk factors. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* **29**, 502–509 (2011).
48. (PDF) ECDC SURVEILLANCE REPORT: Annual epidemiological report, Respiratory tract infections, 2014. https://www.researchgate.net/publication/308658653_ECDC_SURVEILLANCE_REPORT_Annual_epidemiological_report_Respiratory_tract_infections_2014.

49. Yang, Z. *et al.* Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **38**, 199–205 (2004).
50. Oxlade, O., Huang, C.-C. & Murray, M. Estimating the Impact of Reducing Under-Nutrition on the Tuberculosis Epidemic in the Central Eastern States of India: A Dynamic Modeling Study. *PLOS ONE* **10**, e0128187 (2015).
51. Hannah, H. A., Miramontes, R. & Gandhi, N. R. Sociodemographic and Clinical Risk Factors Associated With Tuberculosis Mortality in the United States, 2009–2013. *Public Health Rep.* **132**, 366–375 (2017).
52. Saunders, Lancet 2017 pubmed - Google Search. https://www.google.com/search?client=safari&channel=iphone_bm&source=hp&ei=yzWWXbnqCIq_Qavg5CAAw&q=Saunders%2C+Lancet+2017+pubmed&oq=Saunders%2C+Lancet+2017+pubmed&gs_l=psyab.3..33i160.891.3212..3274...0.0..0.211.6j0j1.....0....2j1..gws-wiz.....33i22i29i30.TVKI-611KJ8&ved=0ahUKEwj58uy1IDIAhUPVd8KHa8BBDAQ4dUDCAs&uact=5.
53. Navarro Ballester, A. & Marco Domenech, S. F. Puesta al día en el estudio radiológico de la tuberculosis pulmonar. *Radiología* **57**, 434–444 (2015).
54. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**, 725–735 (1990).
55. Lewinsohn, D. M. *et al.* Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **64**, 111–115 (2017).
56. Ohsumi, Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* **24**, 9–23 (2014).
57. Klionsky, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 931–937 (2007).
58. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**, 169–174 (1993).
59. Thumm, M. *et al.* Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **349**, 275–280 (1994).

60. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 759–774 (2013).
61. Yin, Z., Pascual, C. & Klionsky, D. J. Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell Graz Austria* **3**, 588–596 (2016).
62. Jiang, P. & Mizushima, N. Autophagy and human diseases. *Cell Res.* **24**, 69–79 (2014).
63. Kroemer, G., Mariño, G. & Levine, B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280–293 (2010).
64. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
65. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069–1075 (2008).
66. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 458–467 (2009).
67. Feng, Y., He, D., Yao, Z. & Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* **24**, 24–41 (2014).
68. Zhao, Y. G. & Zhang, H. Formation and maturation of autophagosomes in higher eukaryotes: a social network. *Curr. Opin. Cell Biol.* **53**, 29–36 (2018).
69. Ravikumar, B. *et al.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **90**, 1383–1435 (2010).
70. McEwan, D. G. & Dikic, I. The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol.* **21**, 195–201 (2011).
71. Pietrocola, F. *et al.* Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin. Cancer Biol.* **23**, 310–322 (2013).
72. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 107–132 (2011).

73. Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J. & Guan, K.-L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* **7**, 643–644 (2011).
74. Ruderman, N. B. *et al.* AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E751-760 (2010).
75. Neufeld, T. P. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 157–168 (2010).
76. Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 169–176 (2010).
77. Sengupta, S., Peterson, T. R., Laplante, M., Oh, S. & Sabatini, D. M. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* **468**, 1100–1104 (2010).
78. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 124–131 (2010).
79. Hailey, D. W. *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656–667 (2010).
80. Ravikumar, B. *et al.* Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **90**, 1383–1435 (2010).
81. Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182**, 685–701 (2008).
82. Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. & Eskelinen, E.-L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**, 1180–1185 (2009).
83. Karanasios, E. *et al.* Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat. Commun.* **7**, 12420 (2016).
84. Orsi, A. *et al.* Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1860–1873 (2012).

85. Di Bartolomeo, S. *et al.* The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* **191**, 155–168 (2010).
86. He, C. & Levine, B. The Beclin 1 interactome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 140–149 (2010).
87. Shi, C.-S. & Kehrl, J. H. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J. Biol. Chem.* **283**, 33175–33182 (2008).
88. Maiuri, M. C. *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* **26**, 2527–2539 (2007).
89. Wei, Y., Sinha, S. & Levine, B. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* **4**, 949–951 (2008).
90. Weidberg, H. *et al.* LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* **29**, 1792–1802 (2010).
91. Xia, H.-G. *et al.* Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* **6**, 61–66 (2010).
92. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
93. Bento, C. F., Empadinhas, N. & Mendes, V. Autophagy in the Fight Against Tuberculosis. *DNA Cell Biol.* **34**, 228–242 (2015).
94. Rao, Y., Perna, M. G., Hofmann, B., Beier, V. & Wollert, T. The Atg1-kinase complex tethers Atg9-vesicles to initiate autophagy. *Nat. Commun.* **7**, 10338 (2016).
95. Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y. & Nakatogawa, H. The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 10363–10368 (2018).
96. Gómez-Sánchez, R. *et al.* Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *J. Cell Biol.* **217**, 2743–2763 (2018).
97. Bas, L. *et al.* Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome-vacuole fusion. *J. Cell Biol.* **217**, 3656–3669 (2018).

98. Fujita, N. *et al.* Genetic screen in *Drosophila* muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *eLife* **6**, (2017).
99. Hegedűs, K. *et al.* The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Mol. Biol. Cell* **27**, 3132–3142 (2016).
100. Gao, J., Langemeyer, L., Kümmel, D., Reggiori, F. & Ungermann, C. Molecular mechanism to target the endosomal Mon1-Ccz1 GEF complex to the pre-autophagosomal structure. *eLife* **7**, (2018).
101. Itakura, E., Kishi-Itakura, C. & Mizushima, N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151**, 1256–1269 (2012).
102. Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753–766 (2004).
103. Yu, S. & Melia, T. J. The coordination of membrane fission and fusion at the end of autophagosome maturation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **47**, 92–98 (2017).
104. Matsui, T. *et al.* Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J. Cell Biol.* **217**, 2633–2645 (2018).
105. Ishihara, N. *et al.* Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3690–3702 (2001).
106. Tsuboyama, K. *et al.* The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* **354**, 1036–1041 (2016).
107. Yang, X. & Bassham, D. C. New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **320**, 1–40 (2015).
108. de Duve, C. & Wattiaux, R. Functions of Lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* **28**, 435–492 (1966).
109. Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171**, 603–614 (2005).

110. Münch, C. & Dikic, I. Hitchhiking on selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* **20**, 122–124 (2018).
111. Walter, K. M. *et al.* Hif-2 α promotes degradation of mammalian peroxisomes by selective autophagy. *Cell Metab.* **20**, 882–897 (2014).
112. Ponpuak, M. *et al.* Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity* **32**, 329–341 (2010).
113. Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395–398 (1998).
114. Deretic, V. *et al.* Autophagy in Immunity Against Mycobacterium tuberculosis: a Model System to Dissect Immunological Roles of Autophagy. in *Autophagy in Infection and Immunity* (eds. Levine, B., Yoshimori, T. & Deretic, V.) 169–188 (Springer Berlin Heidelberg, 2009). doi:10.1007/978-3-642-00302-8_8.
115. Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I. & Dikic, I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell* **34**, 259–269 (2009).
116. Seto, S., Tsujimura, K., Horii, T. & Koide, Y. Autophagy adaptor protein p62/SQSTM1 and autophagy-related gene Atg5 mediate autophagosome formation in response to Mycobacterium tuberculosis infection in dendritic cells. *PLoS ONE* **8**, (2013).
117. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
118. Noda, N. N. *et al.* Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **13**, 1211–1218 (2008).
119. Russell, D. G. Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol. Rev.* **240**, 252–268 (2011).
120. Deretic, V. *et al.* Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **335**, 169–188 (2009).

121. Fabri, M. *et al.* Vitamin D Is Required for IFN- γ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages. *Sci. Transl. Med.* **3**, 104ra102-104ra102 (2011).
122. Cemma, M. & Brummell, J. H. Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. *Curr. Biol. CB* **22**, R540-545 (2012).
123. Watson, R. O., Manzanillo, P. S. & Cox, J. S. Extracellular *M. tuberculosis* DNA Targets Bacteria for Autophagy by Activating the Host DNA-Sensing Pathway. *Cell* **150**, 803–815 (2012).
124. Yuk, J.-M. *et al.* Vitamin D₃ Induces Autophagy in Human Monocytes/Macrophages via Cathelicidin. *Cell Host Microbe* **6**, 231–243 (2009).
125. Kim, J.-J. *et al.* Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. *Cell Host Microbe* **11**, 457–468 (2012).
126. Saiga, H., Shimada, Y. & Takeda, K. Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 347594 (2011).
127. Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A. & Deretic, V. Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria. *Science* **313**, 1438–1441 (2006).
128. Harris, J. Autophagy and cytokines. *Cytokine* **56**, 140–144 (2011).
129. Mayer-Barber, K. D. *et al.* Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity* **35**, 1023–1034 (2011).
130. Watson, R. O. *et al.* The Cytosolic Sensor cGAS Detects *Mycobacterium tuberculosis* DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe* **17**, 811–819 (2015).
131. Gao, P. *et al.* Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA. *Cell* **154**, 748–762 (2013).
132. Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **339**, 786–791 (2013).

133. Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788–792 (2009).
134. Espert, L., Beaumelle, B. & Vergne, I. Autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* and HIV infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, (2015).
135. Petruccioli, E. *et al.* Specific T cells restore the autophagic flux inhibited by *Mycobacterium tuberculosis* in human primary macrophages. *J. Infect. Dis.* **205**, 1425–1435 (2012).
136. Jia, W., Pua, H. H., Li, Q.-J. & He, Y.-W. Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 1564–1574 (2011).
137. Bakhru, P. *et al.* BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. *Cell. Immunol.* **287**, 53–61 (2014).
138. Xu, Y., Liu, X.-D., Gong, X. & Eissa, N. T. Signaling pathway of autophagy associated with innate immunity. *Autophagy* **4**, 110–112 (2008).
139. Travassos, L. H. *et al.* Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* **11**, 55–62 (2010).
140. Campbell, G. R. & Spector, S. A. Vitamin D Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 and *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Macrophages through the Induction of Autophagy. *PLOS Pathog.* **8**, e1002689 (2012).
141. Anandaiah, A. *et al.* Vitamin D rescues impaired *Mycobacterium tuberculosis*-mediated tumor necrosis factor release in macrophages of HIV-seropositive individuals through an enhanced Toll-like receptor signaling pathway in vitro. *Infect. Immun.* **81**, 2–10 (2013).
142. Liu, P. T. *et al.* Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* **311**, 1770–1773 (2006).
143. Nnoaham, K. E. & Clarke, A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* **37**, 113–119 (2008).

144. Russell, D. G. Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol. Rev.* **240**, 252–268 (2011).
145. Vergne, I., Chua, J., Singh, S. B. & Deretic, V. Cell Biology of Mycobacterium Tuberculosis Phagosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 367–394 (2004).
146. Flynn, J. L. & Chan, J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immun.* **69**, 4195–4201 (2001).
147. Kumar, D. *et al.* Genome-wide Analysis of the Host Intracellular Network that Regulates Survival of Mycobacterium tuberculosis. *Cell* **140**, 731–743 (2010).
148. Fogel, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis* **95**, 527–531 (2015).
149. Lam, A. *et al.* Role of apoptosis and autophagy in tuberculosis. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **313**, L218–L229 (2017).
150. Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell* **119**, 753–766 (2004).
151. Kondratieva, T., Azhikina, T., Nikonenko, B., Kaprelyants, A. & Apt, A. Latent tuberculosis infection: What we know about its genetic control? *Tuberculosis* **94**, 462–468 (2014).
152. Zhang, C., Yang, L., Zhao, N., Zhao, Y. & Shi, C. Insights into Macrophage Autophagy in Latent Tuberculosis Infection: Role of Heat Shock Protein 16.3. *DNA Cell Biol.* **37**, 442–448 (2018).
153. Alcaïs, A., Fieschi, C., Abel, L. & Casanova, J.-L. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J. Exp. Med.* **202**, 1617–1621 (2005).
154. Liu, C. H., Liu, H. & Ge, B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 963–975 (2017).
155. O’Garra, A. *et al.* The immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 475–527 (2013).
156. Fox, G. J., Orlova, M. & Schurr, E. Tuberculosis in Newborns: The Lessons of the ‘Lübeck Disaster’ (1929-1933). *PLoS Pathog.* **12**, e1005271 (2016).

157. Möller, M. *et al.* Genetic Resistance to Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
158. Abel, L., El-Baghdadi, J., Bousfiha, A. A., Casanova, J.-L. & Schurr, E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, (2014).
159. Li, C. M. *et al.* Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *J. Infect. Dis.* **186**, 1458–1462 (2002).
160. Abel, L. & Casanova, J.-L. Genetic Predisposition to Clinical Tuberculosis: Bridging the Gap between Simple and Complex Inheritance. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 274–277 (2000).
161. Al-Muhsen, S. & Casanova, J.-L. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 1043–1051 (2008).
162. Kumar, D. *et al.* Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of Mycobacterium tuberculosis. *Cell* **140**, 731–743 (2010).
163. Daya, M. *et al.* Using multi-way admixture mapping to elucidate TB susceptibility in the South African Coloured population. *BMC Genomics* **15**, 1021 (2014).
164. Fol, M., Druszczynska, M., Wlodarczyk, M., Ograczyk, E. & Rudnicka, W. Immune response gene polymorphisms in tuberculosis. *Acta Biochim. Pol.* **62**, 633–640 (2015).
165. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of mannose receptor, DC-SIGN and autophagy genes in pulmonary tuberculosis - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979215302213?via%3Dihub>.
166. Dalgic, N. *et al.* Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene from infection to disease in pediatric tuberculosis. *Hum. Immunol.* **72**, 440–445 (2011).
167. Alcaïs, A. *et al.* Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1214**, 18–33 (2010).

168. Stead, W. W. Genetics and Resistance to Tuberculosis: Could Resistance Be Enhanced by Genetic Engineering? *Ann. Intern. Med.* **116**, 937 (1992).
169. Stead, W. W., Senner, J. W., Reddick, W. T. & Lofgren, J. P. Racial Differences in Susceptibility to Infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* **322**, 422–427 (1990).
170. Stead, W. W. THE ORIGIN AND ERRATIC GLOBAL SPREAD OF TUBERCULOSIS: How the Past Explains the Present and Is the Key to the Future. *Clin. Chest Med.* **18**, 65–77 (1997).
171. Keppel, K. G. Ten Largest Racial and Ethnic Health Disparities in the United States based on Healthy People 2010 Objectives. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 97–103 (2007).
172. Uren, C., Möller, M., van Helden, P. D., Henn, B. M. & Hoal, E. G. Population structure and infectious disease risk in southern Africa. *Mol. Genet. Genomics* **292**, 499–509 (2017).
173. Sveinbjornsson, G. *et al.* HLA class II sequence variants influence tuberculosis risk in populations of European ancestry. *Nat. Genet.* **48**, 318–322 (2016).
174. Alcaïs, A., Abel, L. & Casanova, J.-L. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J. Clin. Invest.* **119**, 2506–2514 (2009).
175. Thye, T. *et al.* IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB. *PloS One* **4**, e5420 (2009).
176. Zembrzuski, V. M. *et al.* Cytokine genes are associated with tuberculin skin test response in a native Brazilian population. *Tuberculosis* **90**, 44–49 (2010).
177. Stein, C. M. *et al.* Genome scan of *M. tuberculosis* infection and disease in Ugandans. *PloS One* **3**, e4094 (2008).
178. Stein, C. M. *et al.* Heritability analysis of cytokines as intermediate phenotypes of tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **187**, 1679–1685 (2003).
179. Nonghanphithak, D. *et al.* Genetic polymorphisms of CCL2 associated with susceptibility to latent tuberculous infection in Thailand. <https://www.ingentaconnect.com/contentone/iuatld/ijtd/2016/00000020/00000009/art00022> (2016) doi:info:doi/10.5588/ijtd.16.0017.

180. Azad, A. K., Sadee, W. & Schlesinger, L. S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect. Immun.* **80**, 3343–3359 (2012).
181. Goldfeld, A. E. *et al.* Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA* **279**, 226–228 (1998).
182. Ravikumar, M. *et al.* Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. *Tuber. Lung Dis.* **79**, 309–317 (1999).
183. Bellamy, R. *et al.* Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis. *Tuber. Lung Dis.* **79**, 83–89 (1998).
184. Wilkinson, R. J. *et al.* Influence of Polymorphism in the Genes for the Interleukin (IL)-1 Receptor Antagonist and IL-1 β on Tuberculosis. *J. Exp. Med.* **189**, 1863–1874 (1999).
185. Selvaraj, P., Narayanan, P. R. & Reetha, A. M. Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India. *Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **79**, 221–227 (1999).
186. Baghdadi, J. E. *et al.* An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. *J. Exp. Med.* **203**, 1679–1684 (2006).
187. Grant, A. V. *et al.* Age-dependent association between pulmonary tuberculosis and common TOX variants in the 8q12-13 linkage region. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 407–414 (2013).
188. Aliahmad, P. & Kaye, J. Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX. *J. Exp. Med.* **205**, 245–256 (2008).
189. Aliahmad, P., Kadavallore, A., de la Torre, B., Kappes, D. & Kaye, J. TOX is required for development of the CD4 T cell lineage gene program. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 5931–5940 (2011).
190. Cooper, A. M. T cells in mycobacterial infection and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 378–384 (2009).
191. Thye, T. *et al.* Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to tuberculosis. *Nat. Genet.* **44**, 257–259 (2012).

192. Bellamy, R. *et al.* Variations in the NRAMP1 Gene and Susceptibility to Tuberculosis in West Africans. *N. Engl. J. Med.* **338**, 640–644 (1998).
193. Ryu, S. *et al.* 3'UTR polymorphisms in the NRAMP1 gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **4**, 577–580 (2000).
194. Hoal, E. G. *et al.* SLC11A1 (NRAMP1) but not SLC11A2 (NRAMP2) polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis in a high-incidence community in South Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **8**, 1464–1471 (2004).
195. Gao, P. S. *et al.* Genetic variants of NRAMP1 and active tuberculosis in Japanese populations. International Tuberculosis Genetics Team. *Clin. Genet.* **58**, 74–76 (2000).
196. Li, X. *et al.* SLC11A1 (NRAMP1) Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* **6**, e15831 (2011).
197. Park, Y. S. *et al.* Rapid increase of non-tuberculous mycobacterial lung diseases at a tertiary referral hospital in South Korea [Short communication]. <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2010/00000014/00000008/art00024> (2010).
198. Khomenko, A. G., Litvinov, V. I., Chukanova, V. P. & Pospelov, L. E. Tuberculosis in patients with various HLA phenotypes. *Tubercle* **71**, 187–192 (1990).
199. Vejbaesya, S., Chierakul, N., Luangtrakool, K., Srinak, D. & Stephens, H. a. F. Associations of HLA class II alleles with pulmonary tuberculosis in Thais. *Eur. J. Immunogenet.* **29**, 431–434 (2002).
200. Goldfeld, A. E. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. *Tuberculosis* **84**, 76–81 (2004).
201. Tong, X. *et al.* Polymorphisms in HLA-DRB1 Gene and the Risk of Tuberculosis: A Meta-analysis of 31 Studies. *Lung* **193**, 309–318 (2015).

202. Vidyarani, M. *et al.* Interferon gamma (IFN γ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* **124**, 403–410 (2006).
203. López-Maderuelo, D. *et al.* Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 970–975 (2003).
204. Tso, H. W. *et al.* Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes Immun.* **6**, 358 (2005).
205. Rossouw, M., Nel, H. J., Cooke, G. S., van Helden, P. D. & Hoal, E. G. Association between tuberculosis and a polymorphic NF κ B binding site in the interferon γ gene. *The Lancet* **361**, 1871–1872 (2003).
206. Cooke, G. S. *et al.* Polymorphism within the Interferon- γ /Receptor Complex Is Associated with Pulmonary Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 339–343 (2006).
207. Lio, D. *et al.* Genotype frequencies of the +874T \rightarrow A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- γ gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur. J. Immunogenet.* **29**, 371–374 (2002).
208. Cooke, G. S. *et al.* Polymorphism within the Interferon- γ /Receptor Complex Is Associated with Pulmonary Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 339–343 (2006).
209. Fraser, D. A. *et al.* Interferon- γ Receptor-1 Gene Polymorphism in Tuberculosis Patients from Croatia. *Scand. J. Immunol.* **57**, 480–484 (2003).
210. Kang, Y. A., Kwon, S.-Y., Yoon, H. I., Lee, J. H. & Lee, C.-T. Role of C-Reactive Protein and Procalcitonin in Differentiation of Tuberculosis from Bacterial Community Acquired Pneumonia. *Korean J. Intern. Med.* **24**, 337–342 (2009).
211. Yuan, Q. *et al.* The association between C-159T polymorphism in CD14 gene and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 7623–7629 (2014).
212. Sorensen, G. L., Husby, S. & Holmskov, U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology* **212**, 381–416 (2007).

213. Floros, J. *et al.* Surfactant Protein Genetic Marker Alleles Identify a Subgroup of Tuberculosis in a Mexican Population. *J. Infect. Dis.* **182**, 1473–1478 (2000).
214. Madan, T., Saxena, S., Murthy, K. J. R., Muralidhar, K. & Sarma, P. U. Association of polymorphisms in the collagen region of human SP-A1 and SP-A2 genes with pulmonary tuberculosis in Indian population. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, 1002–1008 (2002).
215. Malik, S. *et al.* Variants of the SFTPA1 and SFTPA2 genes and susceptibility to tuberculosis in Ethiopia. *Hum. Genet.* **118**, 752–759 (2006).
216. Stein, C. M. *et al.* Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNF α cytokine expression: evidence for association with IFNGR1, IL-10, and TNF receptor 1 genes. *Hum. Genet.* **121**, 663–673 (2007).
217. Singla, N. *et al.* Association of mannose-binding lectin gene polymorphism with tuberculosis susceptibility and sputum conversion time. *Int. J. Immunogenet.* **39**, 10–14 (2012).
218. Druszczyńska, M. *et al.* Tuberculosis bacilli still posing a threat. Polymorphism of genes regulating anti-mycobacterial properties of macrophages. *Pol. J. Microbiol.* **55**, 7–12 (2006).
219. Sahly, H. M. E., Reich, R. A., Dou, S. J., Musser, J. M. & Graviss, E. A. The effect of mannose binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups. *Scand. J. Infect. Dis.* **36**, 106–108 (2004).
220. Vannberg, F. O. *et al.* CD209 Genetic Polymorphism and Tuberculosis Disease. *PLOS ONE* **3**, e1388 (2008).
221. Barreiro, L. B. *et al.* Promoter Variation in the DC-SIGN–Encoding Gene CD209 Is Associated with Tuberculosis. *PLOS Med.* **3**, e20 (2006).
222. Ben-Ali, M. *et al.* Promoter and neck region length variation of DC-SIGN is not associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Hum. Immunol.* **68**, 908–912 (2007).
223. Zheng, R. *et al.* Relationship between polymorphism of DC-SIGN (CD209) gene and the susceptibility to pulmonary tuberculosis in an eastern Chinese population. *Hum. Immunol.* **72**, 183–186 (2011).

224. Tso, H. W., Lau, Y. L., Tam, C. M., Wong, H. S. & Chiang, A. K. S. Associations between IL12B Polymorphisms and Tuberculosis in the Hong Kong Chinese Population. *J. Infect. Dis.* **190**, 913–919 (2004).
225. Dalton, J. P., Desmond, A., Shanahan, F. & Hill, C. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in patients with Crohn’s disease is unrelated to the presence of single nucleotide polymorphisms rs2241880 (ATG16L1) and rs10045431 (IL12B). *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **203**, 195–205 (2014).
226. Souza de Lima, D., Ogusku, M. M., Sadahiro, A. & Pontillo, A. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **41**, 240–244 (2016).
227. Biswas, D. *et al.* ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunol.* **9**, 35 (2008).
228. Castillo, E. F. *et al.* Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E3168–3176 (2012).
229. Khan, A. & Jagannath, C. Analysis of host-pathogen modulators of autophagy during *Mycobacterium Tuberculosis* infection and therapeutic repercussions. *Int. Rev. Immunol.* **36**, 271–286 (2017).
230. Osawa, T. *et al.* Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 281–288 (2019).
231. Soto-Burgos, J., Zhuang, X., Jiang, L. & Bassham, D. C. Dynamics of Autophagosome Formation. *Plant Physiol.* **176**, 219–229 (2018).
232. Zhao, Y. G. & Zhang, H. Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J. Cell Biol.* **218**, 757–770 (2019).
233. Fernando, S. L. *et al.* Gene Dosage Determines the Negative Effects of Polymorphic Alleles of the P2X7 Receptor on Adenosine Triphosphate–Mediated Killing of Mycobacteria by Human Macrophages. *J. Infect. Dis.* **192**, 149–155 (2005).

234. Biswas, D. *et al.* ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunol.* **9**, 35 (2008).
235. Hussain, R., Ansari, A., Talat, N., Hasan, Z. & Dawood, G. CCL2/MCP-I Genotype-Phenotype Relationship in Latent Tuberculosis Infection. *PLoS ONE* **6**, (2011).
236. Wu, L., Hu, Y., Li, D., Jiang, W. & Xu, B. Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population. *BMC Med. Genet.* **16**, (2015).
237. Lu, Y. *et al.* Association of autophagy-related IRGM polymorphisms with latent versus active tuberculosis infection in a Chinese population. *Tuberculosis* **97**, 47–51 (2016).
238. Schurz, H., Daya, M., Möller, M., Hoal, E. G. & Salie, M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **10**, (2015).
239. Buffen, K. *et al.* Autophagy controls BCG-induced trained immunity and the response to intravesical BCG therapy for bladder cancer. *PLoS Pathog.* **10**, e1004485 (2014).
240. Fernando, S. L. *et al.* A Polymorphism in the P2X7 Gene Increases Susceptibility to Extrapulmonary Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 360–366 (2007).
241. Songane, M. *et al.* Polymorphisms in autophagy genes and susceptibility to tuberculosis. *PloS One* **7**, e41618 (2012).
242. Ogun, A. C. *et al.* The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur. Respir. J.* **23**, 219–223 (2004).
243. Ben-Ali, M., Barbouche, M.-R., Bousnina, S., Chabbou, A. & Dellagi, K. Toll-Like Receptor 2 Arg677Trp Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis in Tunisian Patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 625–626 (2004).

244. Thuong, N. T. T. *et al.* A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes Immun.* **8**, 422–428 (2007).
245. Velez, D. R. *et al.* Variants in toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans. *Hum. Genet.* **127**, 65–73 (2010).
246. Miao, R., Li, J., Sun, Z., Xu, F. & Shen, H. Meta-analysis on the association of TIRAP S180L variant and tuberculosis susceptibility. *Tuberculosis* **91**, 268–272 (2011).
247. Salie, M. *et al.* Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. *Infect. Genet. Evol.* **34**, 221–229 (2015).
248. Xiong, Y., Song, C., Snyder, G. A., Sundberg, E. J. & Medvedev, A. E. Arg753Gln Polymorphism Inhibits Toll-like Receptor (TLR) 2 Tyrosine Phosphorylation, Dimerization with TLR6 and Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 Recruitment. *J. Biol. Chem.* jbc.M112.375493 (2012) doi:10.1074/jbc.M112.375493.
249. Bornman, L. *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. *J. Infect. Dis.* **190**, 1631–1641 (2004).
250. Uitterlinden, A. G., Fang, Y., van Meurs, J. B. J., Pols, H. A. P. & van Leeuwen, J. P. T. M. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* **338**, 143–156 (2004).
251. Intemann, C. D. *et al.* Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by Mycobacterium tuberculosis but not by M. africanum strains. *PLoS Pathog.* **5**, e1000577 (2009).
252. Che, N. *et al.* Identification of a novel IRGM promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis. *Clin. Chim. Acta* **411**, 1645–1649 (2010).
253. Bahari, G. *et al.* Association of IRGM Polymorphisms and Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *The Scientific World Journal* (2012) doi:10.1100/2012/950801.

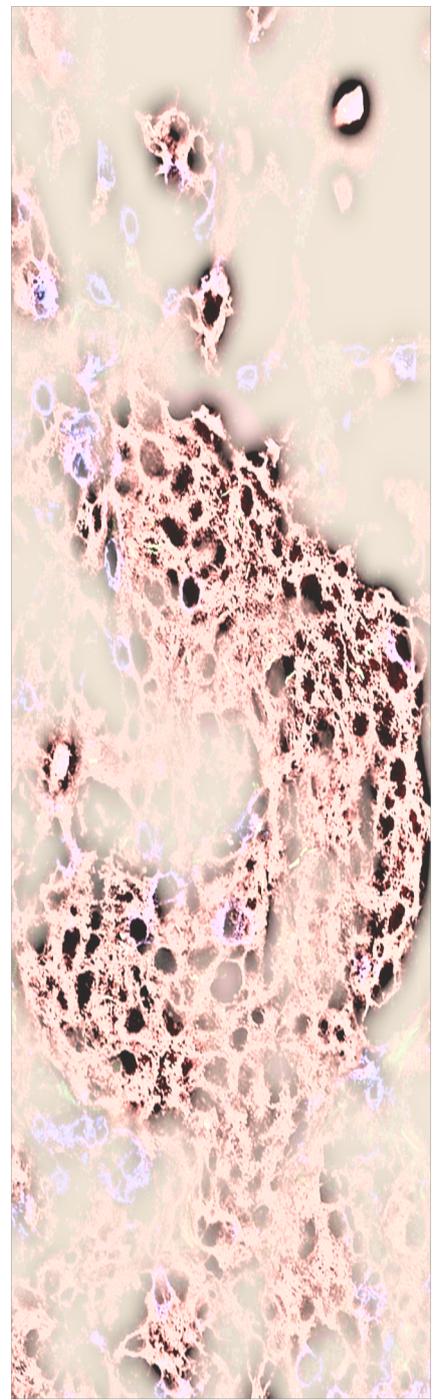
254. King, K. Y. *et al.* Polymorphic Allele of Human IRGM1 Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis in African Americans. *PLOS ONE* **6**, e16317 (2011).
255. Etokebe, G. E. *et al.* Toll-like receptor 2 (P631H) mutant impairs membrane internalization and is a dominant negative allele. *Scand. J. Immunol.* **71**, 369–381 (2010).
256. Ravimohan, S., Kornfeld, H., Weissman, D. & Bisson, G. P. Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* **27**, (2018).
257. Isler, J. A., Vesterqvist, O. E. & Burczynski, M. E. Analytical validation of genotyping assays in the biomarker laboratory. *Pharmacogenomics* **8**, 353–368 (2007).
258. van der Werf, M. J., Bonfigli, S. & Huba, F. Will the European Union reach the United Nations Millennium declaration target of a 50% reduction of tuberculosis mortality between 1990 and 2015? *BMC Public Health* **17**, (2017).
259. Glaziou, P., Sismanidis, C., Floyd, K. & Raviglione, M. Global Epidemiology of Tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, (2015).
260. Sia, J. K., Georgieva, M. & Rengarajan, J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between Mycobacterium tuberculosis and Innate Immune Cells. *J. Immunol. Res.* **2015**, (2015).
261. Delgado, J. C., Baena, A., Thim, S. & Goldfeld, A. E. Ethnic-Specific Genetic Associations with Pulmonary Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **186**, 1463–1468 (2002).
262. Parrish, N. M., Dick, J. D. & Bishai, W. R. Mechanisms of latency in Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol.* **6**, 107–112 (1998).
263. Möller, M., De Wit, E. & Hoal, E. G. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 3–26 (2010).
264. Wang, K. *et al.* Protective Features of Autophagy in Pulmonary Infection and Inflammatory Diseases. *Cells* **8**, 123 (2019).

265. Castillo, E. F. *et al.* Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E3168–E3176 (2012).
266. Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A. & Deretic, V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**, 1438–1441 (2006).
267. CESCYL Monográfico situación población 2015.pdf.
268. Rodriguez, E., Villarubia, S., Díaz, O., Hernández, G. & Tello, O. Situación de la tuberculosis en España, 2011. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Bol. Epidemiológico Sem.* **20**, 140–147 (2012).
269. Fine, P. E. *et al.* Tuberculin sensitivity: conversions and reversions in a rural African population. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **3**, 962–975 (1999).
270. Jonaidi Jafari, N. *et al.* Hyponatremia Due to Pulmonary Tuberculosis: Review of 200 Cases. *Nephro-Urol. Mon.* **5**, 687–691 (2013).
271. Heidarneshad, F. *et al.* Evaluation and Comparison of Body Mass Index and Albumin Level in Patients with Active Tuberculosis and Latent Tuberculosis Infection. in (2016). doi:10.22038/jctm.2016.6953.
272. Onwubalili, J. K. Malnutrition among tuberculosis patients in Harrow, England. *Eur. J. Clin. Nutr.* **42**, 363–366 (1988).
273. García-Rodríguez et al. - 2011 - Extrapulmonary tuberculosis epidemiology and risk.pdf.
274. Atif, M. *et al.* Analysis of tuberculosis treatment outcomes among pulmonary tuberculosis patients in Bahawalpur, Pakistan. *BMC Res. Notes* **11**, (2018).
275. Musellim, B., Erturan, S., Sonmez Duman, E. & Ongen, G. Comparison of extrapulmonary and pulmonary tuberculosis cases: factors influencing the site of reactivation. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **9**, 1220–1223 (2005).

276. Berg, S. *et al.* Investigation of the high rates of extrapulmonary tuberculosis in Ethiopia reveals no single driving factor and minimal evidence for zoonotic transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *BMC Infect. Dis.* **15**, 112 (2015).
277. Cowie, R. L. & Sharpe, J. W. Extra-pulmonary tuberculosis: a high frequency in the absence of HIV infection. <https://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtld/1997/00000001/00000002/art00011> (1997).
278. Burrill, J. *et al.* Tuberculosis: a radiologic review. *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* **27**, 1255–1273 (2007).
279. Vannberg, F. O. *et al.* CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PloS One* **3**, e1388 (2008).
280. MAZZARELLA, G. *et al.* T lymphocyte phenotypic profile in lung segments affected by cavitory and non-cavitory tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* **132**, 283–288 (2003).
281. Abate, E. *et al.* Polymorphisms in CARD8 and NLRP3 are associated with extrapulmonary TB and poor clinical outcome in active TB in Ethiopia. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
282. Halleux, C. M. *et al.* The World Health Organization global aDSM database: generating evidence on the safety of new treatment regimens for drug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* **51**, 1701643 (2018).
283. Gebrezgabiher, G. *et al.* Treatment Outcome of Tuberculosis Patients under Directly Observed Treatment Short Course and Factors Affecting Outcome in Southern Ethiopia: A Five-Year Retrospective Study. *PloS One* **11**, e0150560 (2016).
284. Kimmey, J. M. *et al.* Unique role for ATG5 in neutrophil-mediated immunopathology during *M. tuberculosis* infection. *Nature* **528**, 565–569 (2015).
285. Kimmey, J. M. *et al.* Unique role for ATG5 in PMN-mediated immunopathology during *M. tuberculosis* infection. *Nature* **528**, 565–569 (2015).
286. Matsushita, M., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ohsumi, Y. & Inagaki, F. Expression, purification and crystallization of the Atg5–Atg16 complex essential for

- autophagy. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 1021–1023 (2006).
287. Guo, X.-G., Ji, T.-X., Xia, Y. & Ma, Y.-Y. Autophagy protects type II alveolar epithelial cells from *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 308–313 (2013).
288. Krupa, A. *et al.* Binding of CXCL8/IL-8 to *Mycobacterium tuberculosis* Modulates the Innate Immune Response. *Mediators Inflamm.* **2015**, 1–11 (2015).
289. Péan, C. B. *et al.* Regulation of phagocyte triglyceride by a STAT-ATG2 pathway controls mycobacterial infection. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
290. Cheng, J.-F., Ning, Y.-J., Zhang, W., Lu, Z.-H. & Lin, L. T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: A meta-analysis. *World J. Gastroenterol. WJG* **16**, 1258–1266 (2010).
291. Glubb, D. M. *et al.* NOD2 and ATG16L1 polymorphisms affect monocyte responses in Crohn’s disease. *World J. Gastroenterol.* **17**, 2829–2837 (2011).
292. Salem, M., Nielsen, O. H., Nys, K., Yazdanyar, S. & Seidelin, J. B. Impact of T300A Variant of ATG16L1 on Antibacterial Response, Risk of Culture Positive Infections, and Clinical Course of Crohn’s Disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **6**, e122 (2015).
293. Richards, E. J. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 395–401 (2006).
294. Reik, W. & Walter, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 21–32 (2001).
295. Pennini, M. E., Pai, R. K., Schultz, D. C., Boom, W. H. & Harding, C. V. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 4323–4330 (2006).
296. Sweeney, T. E., Braviak, L., Tato, C. M. & Khatri, P. Genome-wide expression for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a multicohort analysis. *Lancet Respir. Med.* **4**, 213–224 (2016).

297. Manolio, T. A. & Collins, F. S. The HapMap and Genome-Wide Association Studies in Diagnosis and Therapy. *Annu. Rev. Med.* **60**, 443–456 (2009).
298. Kassahun, Y. *et al.* Admixture mapping of tuberculosis and pigmentation-related traits in an African-European hybrid cattle population. *Front. Genet.* **6**, 210 (2015).



ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO POLIMORFISMOS EN TUBERCULOSIS

Yo,

_____ (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio. He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el Dr. _____ (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1.º Cuando quiera.
- 2.º Sin tener que dar explicaciones.
- 3.º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio, y autorizo a que los datos clínicos obtenidos en el transcurso de este estudio sean:

- 1.- Registrados y utilizados de conformidad con los criterios explicados en la hoja de información.
- 2.- Puedan ser presentados al promotor del estudio para su análisis científico, y a las autoridades competentes para su verificación, siempre y cuando se asegure que no se podrá relacionar mi identidad con mis datos (datos disociados).
- 3.- Sean inspeccionados (sin salir del hospital) como datos personales por representantes autorizados por el Promotor, así como por autoridades sanitarias nacionales e internacionales; todo ello con el fin de verificar los datos y la correcta realización del estudio.

Fecha (*)

Firma del participante

He comentado este estudio de investigación clínica con el paciente en un lenguaje comprensible e idóneo. Considero que he informado completamente al participante de la naturaleza del estudio y de los posibles beneficios y riesgos derivados del mismo, y creo que el participante ha comprendido esta explicación. He entregado una copia de la hoja de información sobre el estudio y de este documento fechado y firmado al paciente.

Firma del investigador: _____ Fecha (*): _____
Día / Mes / Año

(*) Cada firmante del consentimiento debe escribir personalmente la fecha de su firma
Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente.

ANEXO 2. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

Información para los participantes en el estudio genético de tuberculosis

Versión 1.0

Estimado Señor/a,

Mediante el presente documento se le invita a participar en un estudio de investigación, cuyo promotor es LA UNIDAD DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE MEDICINA MOLECULAR DEL IBSAL. Este formulario le informará de las características del estudio y los procedimientos a seguir en el mismo. Por favor, lea atentamente la información contenida en este formulario y no dude en contactar con su doctor para cualquier pregunta que le pueda surgir. Asimismo, usted puede consultar con otras personas antes de tomar una decisión.

Objetivo del estudio y antecedentes: El objetivo principal del estudio es investigar la relación de diversos polimorfismos genéticos y la tuberculosis. En la mayoría de los casos, existen varios factores predisponentes a esta enfermedad. Actualmente se considera que podría estar causada por una interacción entre factores medioambientales y factores genéticos.

El objeto de este estudio es el de analizar la relación entre diversos polimorfismos genéticos y la presencia de tuberculosis. Los estudios sobre polimorfismos genéticos comparan la presencia de un marcador genético en individuos que padecen una determinada enfermedad con respecto a la prevalencia de ese marcador en una población control. El avance en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos del desarrollo de esta enfermedad infecciosa permitirá su tratamiento más efectivo.

Como al resto de pacientes a incluir en este proyecto, a usted se le ofrece la oportunidad de participar en este estudio. Por supuesto usted es libre de no entrar en el mismo, y si lo hace, podrá abandonar el estudio en cualquier momento que desee.

Procedimientos: Este es un estudio que se realizará en su hospital habitual. Está previsto que, si usted decide participar en el estudio, lo haga durante la completa duración de este, aunque usted es libre de abandonar el estudio en cualquier momento, sin dar ninguna explicación.

Si acepta participar, deberá firmar una hoja denominada consentimiento informado, o en caso de que exista algún impedimento que haga que no pueda firmarlo, podrá otorgar su consentimiento ante algún testigo, que firmará por usted.

Las exploraciones, pruebas, procedimientos y visitas previstas son las habituales en el proceso asistencial para la patología en estudio y no se contempla ningún procedimiento específico del estudio que no forme parte de su asistencia rutinaria.

Si usted consiente su participación en el estudio se extraerá en el momento de la consulta y en una sola ocasión sangre periférica (10 ml) o muestra de mucosa bucal obtenida mediante hisopo para la determinación de diversos polimorfismos genéticos.

Una vez finalizado el tratamiento usted realizará contactos de seguimiento con su médico (telefónicamente o en consulta), que no exceden los que se harían de forma convencional.

Beneficios de su participación en el estudio: Esperamos que el resultado sea beneficioso para usted, o que ayude a otros. Los beneficios potenciales de su participación en este estudio es el mayor conocimiento de la tuberculosis con el fin de mejorar en su tratamiento. Incluso, si usted no se beneficia personalmente de este estudio, la información obtenida puede ser útil en el tratamiento de esta enfermedad en el futuro.

Riesgos: Mínimos (hematoma o rubor local rubor), los únicos derivados si se procede a la extracción de 10 ml de sangre periférica mediante venopunción antecubital en tubos con anticoagulante EDTA.

Participación voluntaria: Su participación en el estudio es completamente voluntaria. Usted puede negarse a participar o retirarse del estudio en cualquier momento sin que de ello se derive ningún perjuicio ni pérdida de los beneficios a los que usted tiene derecho. Usted puede interrumpir su participación en el estudio sin que por ello se vean afectados sus cuidados médicos en curso.

Nuevos descubrimientos: Todos los nuevos descubrimientos que se realicen durante el curso de esta investigación, que puedan influenciar razonablemente en su deseo de continuar en el estudio, le serán comunicados en cuanto sean disponibles. En este caso, usted deberá firmar un nuevo documento de consentimiento informado.

Confidencialidad: Con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos en este estudio, será preciso que representantes del promotor, miembros del equipo investigador y, eventualmente, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios o miembros del Comité Ético de Investigación Clínica tengan acceso a su historia clínica, comprometiéndose a la más estricta confidencialidad.

Toda la información (personal, clínica, y los datos provenientes de la investigación con material biológico) recogida en su nombre se tratará con arreglo a la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales, y a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y su normativa de desarrollo, el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento que la desarrolla. En caso de cesión de datos a terceros países, se garantizará un nivel de protección equivalente al de nuestra legislación.

De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales y a su rectificación, cancelación y oposición, que podrá ejercer dirigiéndose al médico que le atiende en este estudio. En caso de que se ejerciten estos derechos, el médico lo pondrá inmediatamente en conocimiento del promotor como responsable del fichero.

Comités Éticos: El presente protocolo de estudio ha sido revisado por el Comité Ético de Investigación Clínica de los hospitales participantes, que han otorgado una opinión favorable del mismo. En la elaboración y diseño de este protocolo se han aplicado los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, recogidos en la Declaración de Helsinki.

Esperamos que después de leer este formulario, Usted estará suficientemente informado sobre los procedimientos del estudio. Su médico le contestará a cualquier pregunta o duda relacionada con este proyecto de investigación

ANEXO 3. FORMULARIO DE CONSULTA

**HOSPITAL
UNIVERSITARIO
DE SALAMANCA**

Nombre del Doctor responsable del paciente:

Nombre del Hospital:

Teléfono de contacto:

DATOS PERSONALES Y EPIDEMIOLÓGICOS

- FECHA INCLUSION ESTUDIO (debe coincidir con la del consentimiento inf.) _____
- NOMBRE _____
- NHC _____
- FECHA NACIMIENTO _____
- SEXO _____
- VIVO/VIVI EN: medio rural/medio urbano/institucionalizado/otro tipo de hacinamiento

ANTECEDENTES MÉDICOS

- Tuberculosis previa: SI/NO ¿recibió tratamiento completo?
- ¿Mantoux o quantiferon® previo a este diagnóstico positivo? ¿recibió tratamiento de tb latente con INH el tiempo adecuado?
- Antecedentes de convivientes con tuberculosis
- ¿Recibió al diagnóstico de la tb tratamiento inmunosupresor/inmunomodulador o padecía alguna enfermedad que produjera inmunodepresión (DM, etc... no contará VIH)?
- Comorbilidad: (enfs que aumentan riesgo: enf. Pulmonar (especificar: _____) incluyendo silicosis, IRC, DM, leucemia, linfoma, ca. cerebral, ca. de cuello, ca. pulmón, bajo peso, by pass ilioyeyunal, ADVP). Otros especificar: _____
- Tratamientos previos: esteroides, tto urológico, etc. Especificar: _____

FECHA DEL DIAGNÓSTICO

CLÍNICA AL DIAGNÓSTICO

- ASINTOMÁTICO.
- SINTOMÁTICO: Disnea/ Dolor pleurítico/Fiebre/síndrome constitucional (anorexia) /hemoptisis/otros.

 ○ Especificar otros: pat. Nefrourológica, neurológica, articular, digestiva, especificar otras:

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS (MANTOUX, RX, MICROBIOLÓGICAS, AP)

- Mantoux al diagnóstico? SI NO Quantiferon® al diagnóstico? SI NO
- Cultivos: esputos auramina POS NEG cultivo POS NEG sensibilidad _____
- Otros: de: _____ auramina POS NEG cultivo POS NEG
sensibilidad _____

- Pruebas de imagen:
Rx_ (apuntar localización:apical,etc) _____
Diagnóstico (otras pruebas) de imagen _____ (especificar) _____
- Anatomía patológica? SI NO Diagnostica de tb? SI NO
- VIH/VHC/VHB: pedidos SI NO SI NO SI NO vacunado

LOCALIZACIÓN

- PULMONAR
- DERRAME PLEURAL
- GANGLIONAR
- VERTEBRAL
- OTRAS: _____

DATOS DE LABORATORIO PREVIOS AL TRATAMIENTO:

- Hemoglobina/leucocitos/plaquetas:
- Urea/creatinina:
- Hiponatremia:
- Proteínas totales/Albúmina:
- AST/ALT/BI TO/BI I/FA/GGT:
- Coagulación (en número): TP/TTPA:
- PCR:
- VSG:
- Sistemático de orina:

CUMPLE CRITERIOS DE GRAVEDAD?: SI NO

EXITUS? SI NO

REINGRESO POR LA MISMA PATOLOGÍA? SI (Número:) NO

COMPLICACIONES?: SI NO

hemoptisis/neumotórax/ shock séptico/bronquiectasias/destrucción pulmonar extensa/malignidad/tromboembolismo/aspergilosis pulmonar crónica.

SE PRESCRIBIÓ TRATAMIENTO EMPÍRICO CON:

+ _____ meses
+ _____ meses

DURACIÓN TRATAMIENTO:

¿Se aumentó la duración del tratamiento? SI NO

- Por persistencia de cultivo positivo al 2º mes tras tto y tuberculosis pulmonar cavitada.
- Por meningitis tuberculosa
- Por respuesta lenta al tratamiento, espondilitis con afectación neurológica
- Por silicosis

SUSPENSIÓN DE ALGÚN MEDICAMENTO POR:

- Resistencias ¿Qué fármaco?
- Intolerancia ¿Cuál?
- Toxicidad: hepática hematológica otras ¿Cuál?
- Comorbilidad: _____
- Otras causas de la suspensión: colestasis/citolisis/intolerancia gástrica/otras (especificar): _____.

RECIBIÓ VITAMINA B PARA EVITAR LA NEUROPATÍA SI ESTABA CON ISONIAZIDA? SI NO

AL ALTA:

Lesión residual radiológica: SI NO

ANEXO 4. TABLA DE DATOS CLÍNICOS Y MOLECULARES DE LOS PARTICIPANTES

Tabla 20. Datos clínicos y resultados de genotipado de pacientes en Grupo TB.

ID del Paciente	Diagnóstico	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
1	TB	GG	CC	TT	AA
2	TB	CG	CG	CT	AG
3	TB	GG	CC	TT	GG
4	TB	CC	CG	TT	AG
5	TB	CG	0	TT	AG
6	TB	CG	CG	CC	AA
7	TB	GG	CC	TT	AA
8	TB	CG	CG	CT	AA
9	TB	CG	CG	TT	AA
10	TB	CG	CG	CT	AG
11	TB	CG	CC	TT	AG
12	TB	CC	CG	CT	AG
13	TB	CG	CC	TT	AA
14	TB	CC	CC	TT	AG
15	TB	CG	CC	TT	AG
16	TB	GG	CC	CT	AG
17	TB	CG	CG	CC	AG
18	TB	CC	CC	TT	AG
19	TB	GG	0	TT	AG
20	TB	CC	CC	CT	AA
21	TB	CC	CG	TT	AG
22	TB	CG	CG	CT	AA
23	TB	CC	CC	CC	AA
24	TB	CG	GG	CT	GG
25	TB	CC	CG	TT	AG
26	TB	CC	CG	CT	GG
27	TB	CG	CG	CT	AG
28	TB	CC	CG	CT	GG
29	TB	CG	CC	TT	AA
30	TB	GG	CG	CT	AG
31	TB	CG	GG	CT	AG
32	TB	GG	CG	CC	GG
33	TB	CG	GG	TT	AG

34	TB	CG	CG	CT	AG
35	TB	CG	CG	CC	AG
36	TB	CC	GG	CT	AA
37	TB	CG	CG	CC	GG
38	TB	GG	GG	TT	AG
39	TB	CG	CG	CT	GG
40	TB	CG	CG	CT	AG
41	TB	CG	CC	CC	AG
42	TB	CG	CG	TT	AG
43	TB	CC	CC	TT	GG
44	TB	GG	GG	CC	AG
45	TB	GG	CC	CC	AG
46	TB	CG	CG	CT	AG
47	TB	CG	CG	CT	AA
48	TB	GG	CG	CC	GG
49	TB	GG	CC	CT	AG
50	TB	CG	CC	CT	AA
51	TB	GG	CG	CC	AA
52	TB	CC	GG	CT	GG
53	TB	CC	CG	CT	GG
54	TB	GG	CG	CT	AG
55	TB	GG	CC	CT	AA
56	TB	CG	CC	CT	AG
57	TB	CG	GG	CC	GG
58	TB	CG	CC	CT	AG
59	TB	CG	CG	TT	AA
60	TB	CG	CG	CT	GG
61	TB	GG	CC	CT	AG
62	TB	GG	CC	CC	GG
63	TB	CC	CG	CT	AG
64	TB	CG	CG	CC	AA
65	TB	GG	CC	CC	AG
66	TB	CG	GG	TT	0
67	TB	CG	CG	CT	AG
68	TB	CG	CC	TT	AG
69	TB	GG	CC	TT	GG
70	TB	CC	CG	CT	AG
71	TB	CG	CG	CC	AA
72	TB	CG	CC	CT	AG
73	TB	CC	CG	CT	GG
74	TB	CG	CG	CT	AG

75	TB	CC	CG	TT	AG
76	TB	CC	CG	TT	AG
77	TB	CC	CG	CT	AG
78	TB	CC	CG	CT	AG
79	ILTB	CG	GG	CT	AG
80	ILTB	CG	CG	TT	AG
81	ILTB	GG	CG	TT	AG
82	ILTB	CG	CG	CT	AG
83	ILTB	GG	CG	CT	AG
84	ILTB	GG	CG	CC	GG
85	ILTB	GG	CG	CC	AA
86	ILTB	GG	CG	TT	GG
87	ILTB	GG	CG	CT	GG
88	ILTB	CG	CC	CC	AG
89	ILTB	CG	CG	CT	AA
90	ILTB	GG	CG	CT	AG
91	ILTB	CG	CG	CT	GG
92	ILTB	CC	CC	CT	AA
93	ILTB	CC	CC	CT	GG
94	ILTB	CG	CC	CC	AG
95	ILTB	CG	CC	CC	AG
96	ILTB	GG	CC	TT	AG
97	ILTB	CG	CC	TT	GG
98	ILTB	CG	CC	CC	AG
99	ILTB	GG	CG	CT	GG
100	ILTB	CG	CC	TT	AG
101	ILTB	CG	CC	CC	AG
102	ILTB	CG	CC	CT	AG
103	ILTB	CG	CC	CC	GG
104	ILTB	GG	GG	CT	GG
105	ILTB	GG	CG	CC	AG
106	ILTB	CG	CC	CC	AG
107	ILTB	CG	CG	CT	AA
108	ILTB	CC	GG	TT	GG
109	ILTB	CG	CG	TT	AG
110	ILTB	GG	CG	TT	AG
111	ILTB	CG	CC	TT	AG
112	ILTB	CG	CG	CC	AG
113	ILTB	CG	CG	CC	AG
114	ILTB	GG	CC	TT	GG
115	ILTB	GG	CG	CT	AG

116	ILTB	GG	CG	CT	AG
117	ILTB	CG	CG	CT	AG
118	ILTB	CG	CC	TT	AA
119	ILTB	GG	CG	TT	AG
120	ILTB	GG	CC	CT	AG
121	ILTB	GG	CG	TT	AG
122	ILTB	GG	GG	CT	GG
123	ILTB	GG	GG	CT	AG
124	ILTB	CG	CG	CT	AG
125	ILTB	CG	GG	CT	GG
126	ILTB	CC	CC	CC	AG
127	ILTB	GG	CG	CC	GG
128	ILTB	CG	CG	CT	AA
129	ILTB	CG	CG	CT	GG
130	ILTB	GG	CG	CT	AG
131	ILTB	CG	CG	CC	GG
132	ILTB	GG	CG	CT	GG

ANEXO 5. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Tabla 21. Distribución del total de los individuos incluidos en el estudio según el grupo al que pertenecen.

	Frecuencia	Edad (DE)	p
Grupo Control	230 (63,5%)	51,71 ± 12,39	0,000
Grupo TB	132 (36,5%)	53,9 ± 14,09	
Grupo A-ILTB	54 (14,9%)		
Grupo B-TB	78 (21,5%)		
Total	362		

Tabla 22. Datos demográficos de los Grupos B-TB y A-ILTB.

Características	Grupo B-TB	Grupo A-ILTB	p	OR (IC 95%)
Sexo				
F	38,9%	40,7%	0,833	1
M	61,1%	59,3%		1,080 (0,526-2,221)
Edad				
< 55 años	48,6%	47,1%	0,865	1
≥ 55 años	51,4%	52,9%		1,064 (0,518-2,182)
Residencia				
Urbano	70,8%	72,2%	0,864	1
Rural	29,2%	27,8%		0,934 (0,427-2,043)
Comorbilidades				
Enfer. Granulomatosas	12,5%	37,0%		
EPOC	16,7%	3,7%		
Patologías oncológicas	25,0%	14,8%		
Artritis Reumatoide	5,6%	3,7%		
Otras	40,2%	40,8%		
Enf. Granulomatosas	12,5%	37,0%	0,001	1
No enf. granulomatosas	87,5%	63,0%		0.242 (0,099-0,591)
Granulomas en imagen y anatomía patológica				
No	77,5%	94,4%	0,009	1
Si	22,5%	5,6%		0,202 (0,055-0,735)
Albumina				
<4.1 g/dL	69,5%	25,6%	0,000	
≥4.1 g/dL	30,5%	74,4%		
Sodio sérico				
<139 mEq/l	50,0%	15,9%	0,000	
≥139 mEq/l	50,0%	84,1%		

Tabla 23. Descripción de la duración y respuesta a tratamiento en pacientes con resultados de cultivos en el Grupo de B-TB.

Características	Cultivo +	Cultivo -
Duración de tratamiento		
< 6 meses	2,3%	4,3%
6 meses	75%	69,6%
> 6 meses	22,7%	26,1%
Respuesta a tratamiento		
Satisfactorio (Curado/Completo)	79,6%	78,6%
Insatisfactorio (Fracaso/muerte)	6,8%	-
No Evaluado	13,6%	21,4%

Tabla 24. Datos demográficos en pacientes del Grupo TB.

Grupo TB			
Sexo		Comorbilidades	
Masculino	60,3%	Enf. granulomatosas	23,0%
Femenino	39,7%	EPOC	11,1%
Residencia		Patologías oncológicas	20,6%
		Artritis Reumatoide	4,8%
Urbano	71,4%	Otras	40,5%
Rural	28,6%	Granulomas	
<55 años	48,0%	No	84,9%
≥55 años	52,0%	Si	15,1%
Tratamiento previo		Uso concomitante de Vitamina B	
Corticoides	54,0%	No	28,9%
No corticoides	40,5%	Si	71,0%
Convivientes con TB			
No	43,7%		
Si	56,3%		

Tabla 25. Análisis de la distribución de genotipos en el modelo dominante de los polimorfismos de ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880 y la presencia de cavitaciones en pacientes con enfermedad tuberculosa.

Grupo B-TB (n=78)				
		No cavitaciones	Si Cavitaciones	p
ATG2B rs3759601	CC	19,6%	30,8%	0,458
Dominante	CG + GG	80,4%	69,2%	
ATG5 rs2245214	CC	40,7%	23,0%	0,342
Dominante	CG+GG	59,3%	77,0%	
ATG10 rs1864183	CC	25,0%	15,4%	0,717
Dominante	CT+TT	75,0%	84,6%	
ATG16L1 rs2241880	GG	20,0%	23,0%	1,00
Dominante	GA+AA	80,0%	77,0%	