



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA INDUCIDA POR**  
***Mycobacterium bovis* BCG EN MACRÓFAGOS HUMANOS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

**QFB. GABRIELA MOLINA OLVERA**

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Yolanda López Vidal**

Facultad de Medicina, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Gloria Soldevila Melgarejo**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

MÉXICO, D. F. Octubre, 2013.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme desde hace tanto tiempo y darme la oportunidad de crecer bajo sus valores espirituales, tecnológicos, científicos e intelectuales.

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por abrirme las puertas de su grupo de investigación, por darme el apoyo, confianza y dirección que me ha permitido crecer en esta invaluable oportunidad de aprendizaje. Gracias por seguir creyendo en mí.

A la Dra. Antonia Castillo Rodal por su compromiso y apoyo incondicional, ya que con su valiosa colaboración fue posible concretar este proyecto y etapa. Por sus enseñanzas no sólo académicas.

Al Comité Tutorial conformado por la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo y a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por el tiempo dedicado para conocer y ayudar a construir este proyecto, por sus valiosas contribuciones.

A los miembros del Jurado: Dr. Raúl Mancilla, Dra. Laura Bonifaz, Dr. Edgar Zenteno, Dra. Claudia González y Dra. Clara Espitia, por cada una de sus recomendaciones y correcciones que enriquecieron tanto el proyecto como el manuscrito.

Al CONACyT (No. de becario 374717) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría y desarrollar mi tesis.

Este proyecto fue financiado por CONACyT SALUD-2007-C01-68729 y DGAPA-IN214713-3.

A mis compañeros del PIMM: Stephanie, Eduardo, Karen, Viri, Paty, Arturo, Guillermo, Fabiana, Sebastian, María, Luis e Iván y claro, al Dr. Raúl y a la Dra. Marisa por su camaradería, compromiso y compañerismo durante este tiempo, dentro y fuera del laboratorio.

## DEDICATORIAS

A mi familia, por su apoyo, cuidado y amor. Gracias a mi madre por el apoyo moral, su cariño y comprensión que desde siempre me ha brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles. Te amo Pet, eres mi mayor motivo para seguir, mi inigualable amiga.

A Step y Lalito, por su incondicional amistad, consejos, jugarretas, por hacer todo agradable y ameno, por alentarme a continuar. Porque siempre tienen una palabra oportuna en todo momento, que comparten mi soledad y tristeza con su alegría y sonrisa: Mil gracias, los quiero mucho hermanitos.

Xiúhnel, te amo, así sin más, hasta que la arena se convierta en sal.

## INDICE

	Página
Abreviaturas	I
Índice de tablas	IV
Índice de figuras	V
Resumen	1
<b>Introducción</b>	
1. Epidemiología	2
2. Vacuna BCG	4
2.1 Diferencias entre subcepas de la vacuna BCG	
Eficacia protectora	5
Diferencias bioquímicas	8
Diferencias genómicas	11
Diferencias proteómicas	13
3. Respuesta inmune contra BCG	
Respuesta inmune innata	15
Respuesta inmune adaptativa	20
Citocinas implicadas en la infección por micobacterias	21
Factor de Necrosis Tumoral	22
Interleucina 12	24
Interleucina 10	24
<b>Justificación</b>	26
<b>Hipótesis</b>	27
<b>Objetivo</b>	28
Objetivos particulares	28
<b>Metodología</b>	
Diseño experimental	29
Materiales y métodos	31
<b>Resultados</b>	
Curvas de crecimiento de subcepas BCG	36

Reconocimiento a través de TLR 2 y 4	38
Determinación de sobrevivencia y multiplicidad de Subcepas BCG en macrófagos THP-I	40
Activación de Estallido Respiratorio en macrófagos THP-I infectados con subcepas BCG	43
Producción de citocinas por macrófagos THP-I infectados con subcepas BCG	46
<b>Discusión</b>	52
<b>Resumen de resultados</b>	58
<b>Conclusión</b>	59
<b>Perspectivas</b>	60
Anexo I	62
Anexo II	64
Anexo III	66
Referencias	69

## ABREVIATURAS

·ON	Óxido nítrico
°C	Grados Celsius
α-TLR	Anticuerpo anti-TLR
Acil-CoA	Acil coenzima A
ADC	Albúmina -dextrosa -catalasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BMMs	Macrófagos de médula ósea
CD	Conjunto de diferenciación
Céls	Células
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CRH	Hormona liberada de corticotropina
dH <sub>2</sub> O	Agua desionizada
DO	Densidad óptica
DTH	Respuesta de hipersensibilidad retardada
DU	Unidad de duplicación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FasL	Ligando de Fas
GM-SCF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
G-SCF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
h	Horas

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HEK293	Células de riñón de embrión humano
HEPES	Acido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-Piperacínil-Etanosulfónico
hTLR	Receptor tipo Toll de humano
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IgG-Fc	Fracción cristalizable de la inmunoglobulina G
IKK	Complejo inhibidor de cinasas de NF- $\kappa$ B
IL	Interleucina
IRAK	<i>Cinasa</i> asociada al receptor de la interleucina 1
JNK	Cinasa C-Jun N-terminal
LPS	Lipopolisacárido
MAPk	Cinasa mitógeno activada
MD2	Antígeno linfocítico 96
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ L	Microlitros
mL	Mililitros
mM	Micromolar
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MPLA	Fosfolipasa A micobacteriana
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida adenín dinucleótido
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sodio
NF $\kappa$ B	Factor de transcripción nuclear $\kappa$ B
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
OADC	Ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud

PBS	Solución salina de fosfatos
pg	Picogramos
PMA	Miristato de ester de forbol
RD	Región de diferenciación
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SSI	Solución salina isotónica
STAT	Transductor de señales y activador de transcripción
sTNFR	Receptor soluble del factor de necrosis tumoral
t	Tiempo
TA	Temperatura ambiente
TACE	Metaloproteasa convertidora del factor de necrosis tumoral
TB	Tuberculosis
TE	Tris- Ácido etilendiaminotetraacético
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
THP-I	Células monocíticas humanas
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del Factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor asociado al receptor del Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
Vol	Volumen

***Índice de tablas***

*Página*

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de subcepas BCG.	10
Tabla 2. Comparación entre los proteomas de BCG México y BCG Tokio, Danesa y Phipps.	13
Tabla 3. Moléculas micobacterianas y receptores del macrófago implicados en el reconocimiento y fagocitosis	17
Tabla 4. Fase media logarítmica de crecimiento para cada subcepa BCG.	41
Tabla 5. Producción de nitritos por macrófagos infectados con subcepas BCG a diferentes tiempos post-infección.	48

<b>Índice de figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Incidencia global de tuberculosis durante el 2010.	2
Figura 2. Incidencia de tuberculosis en México durante el 2009	3
Figura 3. Porcentaje de protección contra tuberculosis meníngea y miliar en población infantil.	6
Figura 4. Porcentaje de protección contra tuberculosis pulmonar.	7
Figura 5. Genealogía refinada de las subcepas BCG.	12
Figura 6. Proteoma de extracto celular de BCG México 1931 y comparación con los proteomas de BCG Danesa, Phipps y Tokio.	14
Figura 7. Señalización mediada por TLR2 y TLR4.	19
Figura 8. Diagrama general de trabajo.	31
Figura 9. Curva de crecimiento de distintas subcepas de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.	38
Figura 10. Comparación del reconocimiento de subcepas BCG a través de receptores TLR2 y TLR4.	39
Figura 11. Bacterias intracelulares en macrófagos THP-I infectados con subcepas BCG.	42
Figura 12. Supervivencia y multiplicidad de subcepas BCG en macrófagos THP-I.	43
Figura 13. Producción de óxido nítrico por macrófagos infectados con subcepas BCG.	46
Figura 14. Producción de IL-12 en sobrenadantes de macrófagos infectados con subcepas BCG, 24 y 72 h post-infección.	48
Figura 15. Producción de IL-10 en sobrenadantes de macrófagos infectados con subcepas BCG, 72 h post-infección.	50
Figura 16. Producción de TNF en sobrenadantes de macrófagos infectados con subcepas BCG. 72h post-infección.	52

## RESUMEN

La respuesta inmune adaptativa producida por las diferentes subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG presenta diferencias en la protección conferida, sin embargo, pocos estudios han evaluado la respuesta inmune innata inducida por estas vacunas. Por lo anterior es de suma importancia caracterizar la respuesta inmune innata de macrófagos humanos infectados con distintas subcepas BCG.

Con las subcepas BCG Moreau, Danesa, México, Tice y Phipps se infectaron macrófagos provenientes de la línea celular THP-I. Las bacterias viables intracelulares se determinaron por la cuantificación del contenido de ATP bacteriano a las 24 y 72h post-infección. Se evaluó el perfil producido de citocinas y la activación del estallido respiratorio en los sobrenadantes.

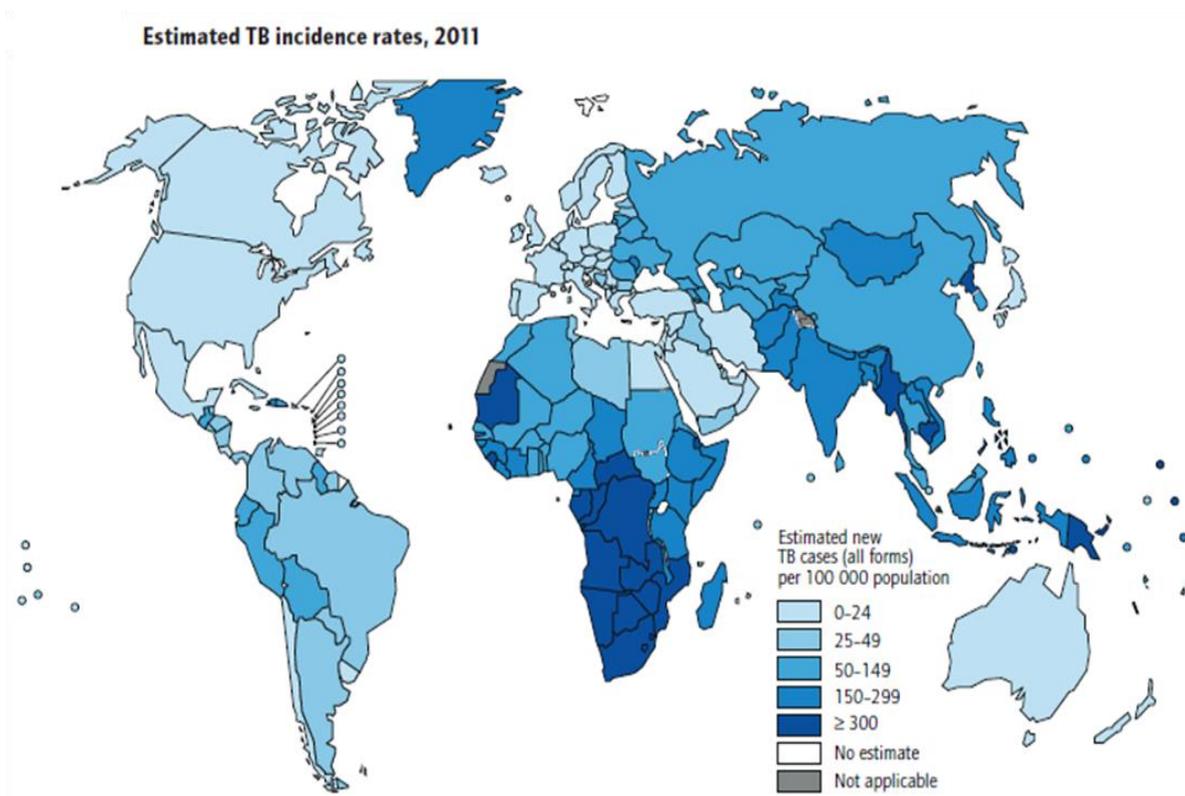
La fagocitosis de la subcepa BCG México fue 2 veces mayor en comparación con las otras subcepas BCG estudiadas. Posterior a las 24 h, se observó una disminución de la cuenta bacteriana intracelular (a la mitad) de BCG Moreau, México y Tice. La producción de óxido nítrico por macrófagos infectados con BCG Moreau y BCG Tice incrementó desde un 100 hasta 500% a las 72 h. La subcepa BCG Phipps indujo la producción más elevada tanto de TNF (540 pg/mL) como de IL-10 (100 pg/mL) a las 72 h.

La mayor producción de óxido nítrico se relaciona con la disminución del número de bacterias intracelulares de las subcepas BCG Moreau y Tice. La baja concentración de óxido nítrico y la alta producción de TNF e IL-10 sugieren la persistencia intracelular de la BCG Phipps. Estos datos señalan diferencias en la respuesta innata de los macrófagos infectados con distintas subcepas BCG.

## INTRODUCCIÓN

### 1 Epidemiología

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica que afecta principalmente pulmón y cuyo agente causal es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Se estima que la tercera parte de la población mundial humana está infectada con *Mtb* [Dye et al, 1999]. La OMS calculó para el año 2010, cerca de 8.7 millones de nuevos casos (125 por cada 100 000 habitantes) (Figura 1) y una prevalencia a nivel mundial de 12.0 millones de personas (170 por cada 100 000 habitantes). La mortalidad asociada a esta enfermedad fue de casi 1.4 millones de personas al año [WHO, 2012].



**Figura 1. Incidencia global de tuberculosis durante el 2010. WHO 2012.**

En el último reporte de la OMS, México se consideró entre los países con incidencia de tuberculosis menor a 24 por cada 100 mil habitantes (Figura 2). Así mismo se registran cada año cerca de 15 mil nuevos casos de TB pulmonar y cerca de dos mil

defunciones, lo que representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico del país, ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años [SSA, 2011].

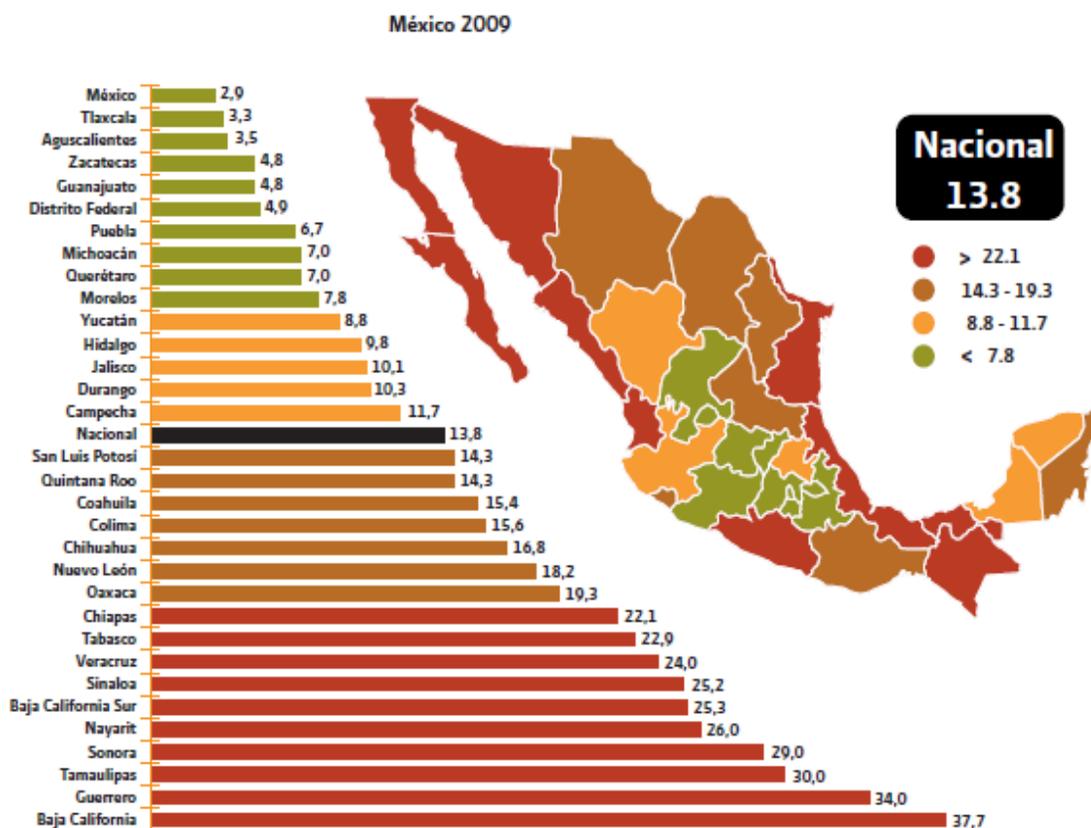


Figura 2. Incidencia de tuberculosis en México durante el 2009. SSA 2011.

El control y/o erradicación de la TB se ha dificultado por diferentes factores, dentro de ellos están: los factores sociales, genéticos, nutricionales, estados de inmunosupresión y el desarrollo de farmacorresistencia de *Mtb* ya sea primaria o secundaria.

El único tratamiento preventivo contra la tuberculosis es la aplicación de la vacuna del Bacilo de Calmette y Güerin (BCG). Actualmente la vacuna BCG es obligatoria en 64 países y recomendada oficialmente en otros 118 países y territorios. La OMS estima que más de 3 mil millones de personas han sido vacunadas hasta el

momento, con una cobertura del 90% en infantes menores de un año durante el 2010 [UNICEF, 2011].

## 2 Vacuna BCG

En 1908 Albert Calmette y Camille Guérin, del Instituto Pasteur en Lille Francia, obtuvieron un aislado de *Mycobacterium bovis* a partir de leche de vaca con mastitis tuberculosa; después de 13 años lograron la atenuación de la cepa a través de subcultivos cada 3 semanas en medio de papa, glicerol y sales biliares de buey [Liu, 2009]. Durante este tiempo se observaron cambios morfológicos en las colonias y estudios en diversos modelos animales como conejos, perros, vacas, caballos, gallinas y primates no humanos, demostraron una evidente disminución de la virulencia de la cepa al observar una disminución en la tasa de mortalidad por la tuberculosis generada y sin producir lesiones tuberculosas [Liu, 2009; Behr, 1999]. En 1921 se aplicó por primera vez como vacuna en forma oral en un infante cuya madre falleció por tuberculosis al momento del parto, el infante no desarrolló la enfermedad y tuvo tolerancia a la inmunización. Durante los siguientes tres años se vacunaron en Europa a más de 300 niños, con lo que la eficacia y seguridad de la vacuna quedaron establecidos [Liu, 2009; Brewer, 1995].

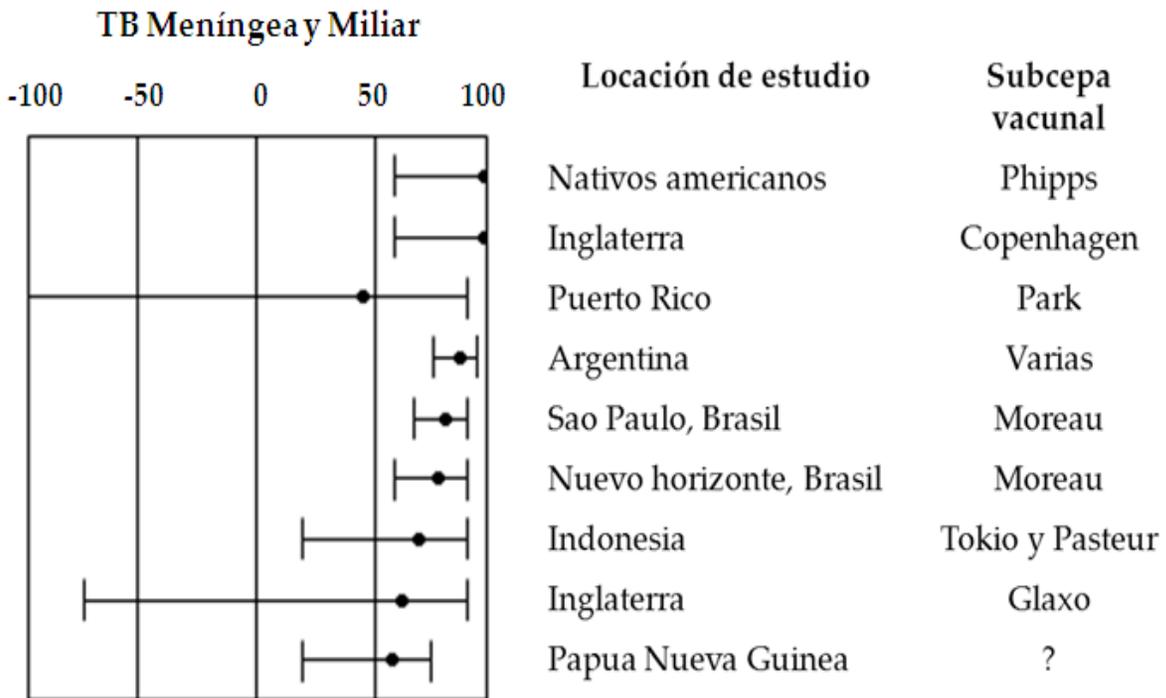
Para 1924 comenzó la distribución de los subcultivos de la cepa atenuada a diferentes países para su uso y producción local, estos subcultivos recibieron el nombre del investigador, instituto o país que los recibió surgiendo así las denominadas "subcepas BCG". Para mantener la cepa algunos países decidieron cambiar la composición original del medio y el tiempo para subcultivar, lo que dio origen a las diferencias en las propiedades genéticas y fenotípicas demostradas entre las subcepas BCG [Oettinger, 1999; Liu, 2009].

### 3 Diferencias entre Subcepas de la vacuna BCG

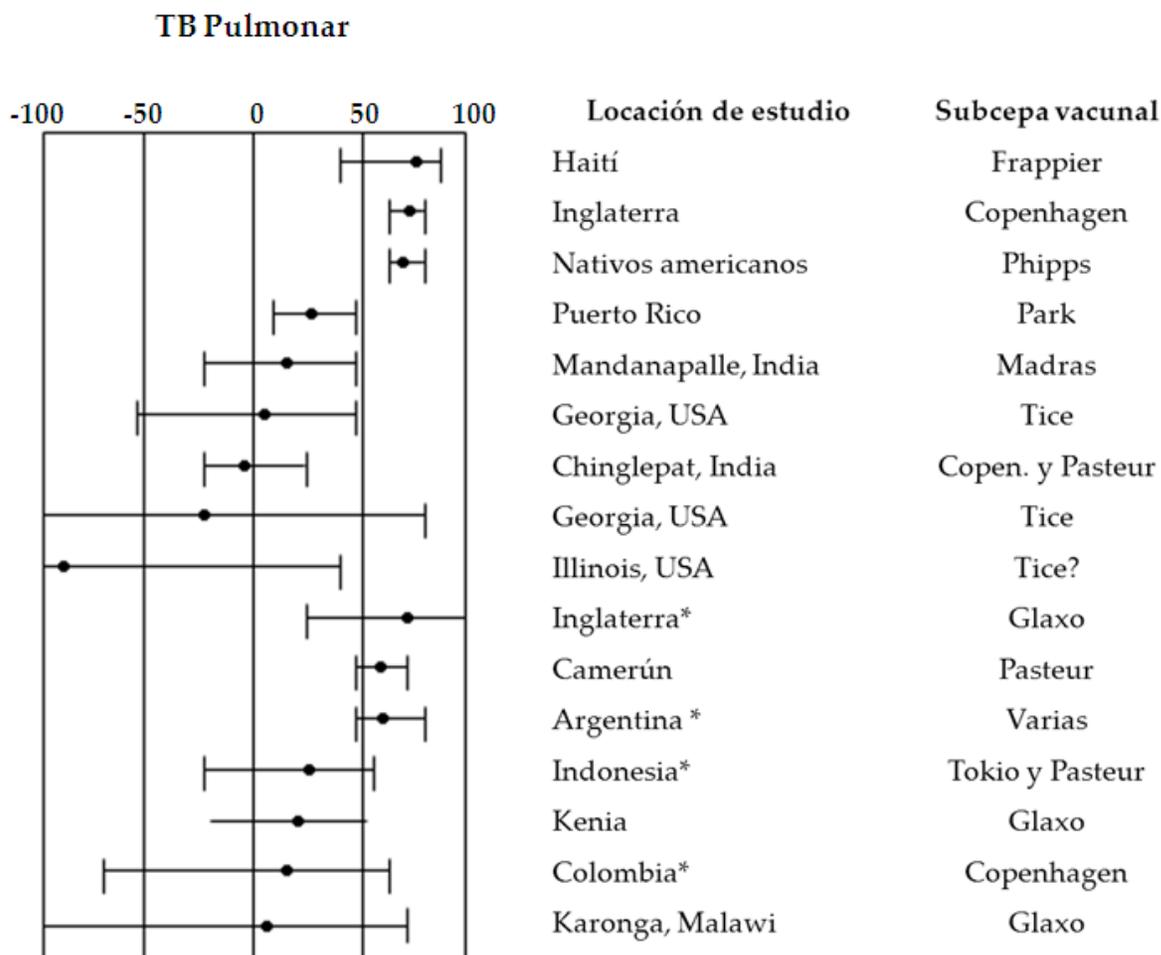
#### Eficacia protectora de la vacuna BCG

La vacuna BCG ha demostrado en el humano un nivel de protección variable, que va desde un 0 a 80%, determinada por el número de adolescentes y adultos enfermos de tuberculosis pulmonar detectados post-vacunación (Figura 3) [Fine, 1990], o bien, mayor a un 80% de protección contra formas graves de tuberculosis como la miliar y meníngea en infantes (Figura 4) [Colditz, 1994; Fine, 1999]. Entre los diferentes factores que inciden en la variabilidad de la vacuna BCG en los adultos se encuentran:

- A. Factores poblacionales: La susceptibilidad genética a la infección, el tipo de población, la edad de vacunación y el grado de endemidad de la tuberculosis [Fine, 1995; Colditz, 1994].
- B. Factores bacterianos: Genotipos diferentes de *Mtb*, factores de virulencia propios de cada cepa de *Mtb*, resistencia o multidrogoresistencia a antifímicos [Parwati, 2010].
- C. Micobacterias ambientales: La exposición a micobacterias no tuberculosas (MNT) antes o después de la inmunización con la vacuna BCG, modula la respuesta inflamatoria hacia una tolerancia inmunológica [Fine, 1999; Mendoza-Coronel, 2010; Andersen, 2005].
- D. Diferencias entre subcepas BCG: Las diferencias en la composición genotípica y fenotípica de la subcepa BCG empleada, la vía de administración y preparación para realizar la vacunación [Fine, 1999; Nava-Aguilera, 2009].



**Figura 3. Porcentaje de protección contra tuberculosis meníngea y miliar en población infantil.** Modificado de Fine 1999.



**Figura 4. Porcentaje de protección contra tuberculosis pulmonar.** Modificado de Fine 1999. \*Población infantil.

Investigaciones realizadas por nuestro grupo demostraron diferencias en la protección entre 10 subcepas de la vacuna BCG en modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva. Las subcepas se clasificaron de acuerdo al nivel de protección en menor, mediana y mayor protección evaluando en tres órganos tras el reto con *Mtb* H37Rv los siguientes parámetros: respuesta inmune (Th1/Th2), porcentaje de neumonía, respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), unidades formadoras de colonias (UFC) [Castillo-Rodal, 2006]. Las subcepas Birkhaug, Tice, Moreau y Danesa se clasificaron en el grupo que confiere menor protección ya que los valores para la

respuesta DTH y neumonía fueron los más elevados, mientras que las subcepas Sueca, México y Frappier se clasificaron como de mediana protección al encontrar que la neumonía y la respuesta DTH eran moderadas. Por último, la subcepa Phipps se relacionó con la mayor protección al presentar la mayor eliminación de Mtb, menor grado de neumonía y un perfil preferente de citocinas de tipo Th1.

### **Diferencias bioquímicas entre subcepas BCG asociadas a la sobrevivencia.**

La identificación de las especies micobacterianas se realiza por diferentes métodos, que tradicionalmente es mediante pruebas bioquímicas. Recientemente, Hayashi y colaboradores estudiaron las diferencias bioquímicas entre 14 subcepas BCG y observaron heterogeneidad bioquímica entre las BCG sugiriendo que puede relacionarse con su resistencia a ambientes adversos (Tabla 2) [Hayashi, 2010].

Un mecanismo de eliminación de microorganismos intracelulares es la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La resistencia al  $H_2O_2$  contribuye a la sobrevivencia de las micobacterias en células hospederas. Las subcepas BCG Rusia y Tokio presentaron la mayor resistencia a  $H_2O_2$  y esto se puede relacionar directamente con su sobrevivencia tanto en células THP-I como en monocitos obtenidos de médula ósea de ratón (BMMs) [Hayashi, 2010].

Las subcepas BCG Moreau, Sueca, Danesa, Conaught, Montreal, Phipps, Australia y Pasteur resultaron positivas a la prueba de hidrólisis de Tween 80. La fosfolipasa A micobacteriana (MPLA) es una serin-esterasa que cataliza la hidrólisis de lípidos como el Tween 80 y se sabe que las micobacterias utilizan ácidos grasos como fuente de carbono en un estado latente, por lo que la actividad enzimática de la MPLA puede contribuir a la sobrevivencia bacteriana bajo condiciones de inanición durante la latencia.

Otro factor que puede ayudar a la sobrevivencia bacilar en células del hospedero es la actividad de la enzima nitrato reductasa; en el caso de BCG, la narGHJJ contribuye

a la virulencia en ratones inmunodeficientes [Weber, 2000]. Mientras que el denominado sistema de “respiración de nitritos” puede ser responsable de la sobrevivencia de *M. tuberculosis* bajo condiciones anaerobias [Sohaskey, 2008]. La mayoría de las subcepas resultaron ligeramente positivas para la prueba de reducción de nitratos, BCG México, Australia y Pasteur son negativas, la única subcepa positiva para dicha prueba es Birkhaug, lo que puede relacionarse con la viabilidad intracelular observada, ya que no es tolerante al óxido nítrico, pero puede reducirlo.

El reciclaje de NAD favorece la infección latente de *Mtb* [Boshoff, 2008] y la NAD-quinolona reductasa es responsable de la resistencia a estrés oxidativo [Akhtar, 2006]. Lo anterior sugiere que la actividad del metabolismo de NAD se puede asociar a la sobrevivencia del bacilo BCG en macrófagos ó en células del hospedero. Las subcepas denominadas tempranas, BCG Rusia, Moreau, Tokio y Birkhaug son positivas para la prueba de acumulación de niacina y se encuentra una relación directa con su sobrevivencia en células THP-1.

El componente lipídico característico de las micobacterias son los ácidos micólicos, presentes en la compleja pared celular (Anexo II), y varían de acuerdo a la especie y subespecie de micobacteria. Las subcepas BCG denominadas tardías carecen de ácidos metoxi-micólicos [Hayashi, 2010], y la proporción de ácidos  $\alpha$ -micólicos varía de un 25 a 30% en estas subcepas (Anexo II), además la estructura es constante (ácido dienólico 78:2). El contenido de ácidos ceto-micólicos varía de 68 a 75%, la longitud de estas cadenas es específica para cada subcepa BCG [Ueneshi 2009].

**Tabla 1. Pruebas bioquímicas de subcepas BCG.**

**+ positivo, +/- ligeramente positivo, - negativo, ND no determinado**

Subcepa BCG	Reducción de nitratos	Acumulación de niacina	Hidrólisis Tween 80	Catalasa burbuja (mm)	Tolerancia H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tolerancia NO	Viabilidad THP-I		Viabilidad en BMMs	
							-IFN $\gamma$	+IFN $\gamma$	-IFN $\gamma$	+IFN $\gamma$
Rusia	+/-	+	-	9.3	+	-	+	+	+	+
Moreau	+/-	+	+/-	7.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tokio	+/-	+	-	14.8	+	+	+	+	+	+
Sueca	+/-	+	+/-	6.7	-	-	-	-	+	+
Birkhaug	+	+	-	11.8	+	-	+	+	-	-
Danesa	+/-	-	+/-	9.4	-	+	+	+	-	+
Glaxo	+/-	-	-	7.4	-	+	-	-	-	-
México	-	-	-	6.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tice	+/-	-	-	6.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Connaught	+/-	-	+/-	7.9	+	-	-	-	-	-
Montreal	+/-	+	+/-	6.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Phipps	+/-	+	+/-	6.0	-	-	-	-	-	-
Australia	-	-	+/-	6.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pasteur	-	-	+/-	7.3	-	+	+	+	-	+

## Diferencias genómicas entre subcepas BCG

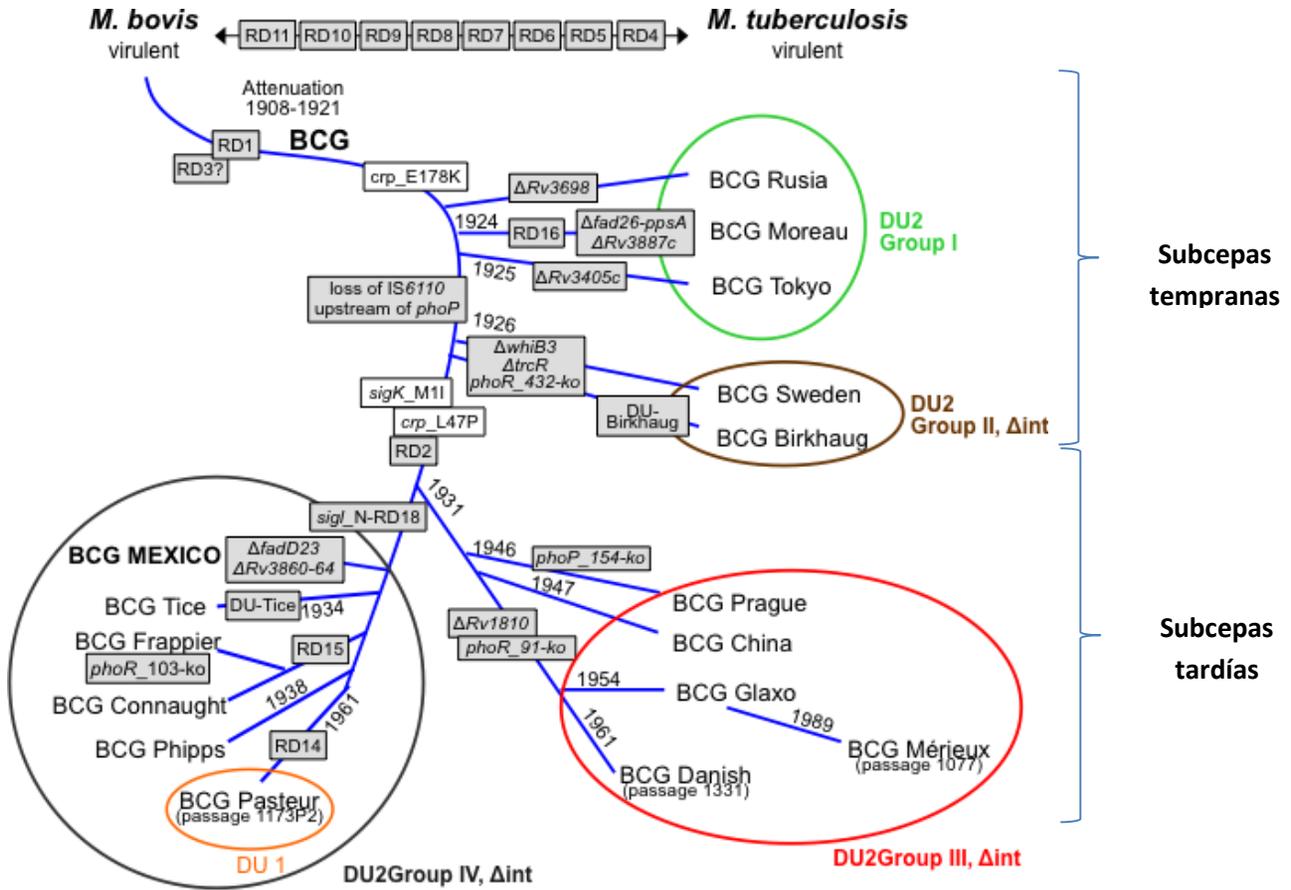
Análisis comparativos a nivel genético entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG han identificado regiones de diferenciación (RD) y unidades de duplicación (DU) que sirven como marcadores para estas cepas [Mahairas, 1996; Behr, 1999; Brosh, 2000]. Las regiones de diferenciación son regiones de ADN que han sido deletadas de los genomas de *M. bovis* y *M. bovis* BCG con respecto a *M. tuberculosis*. La región RD1 se relaciona con la atenuación de la cepa BCG; se ha demostrado que la delección de esta región en la cepa *M. tuberculosis* H37Rv conlleva a su atenuación [Lewis, 2003]; sin embargo, la complementación de *M. bovis* BCG Pasteur con RD1 no restablece su virulencia totalmente [Pym, 2002].

De acuerdo a la presencia o ausencia de la región RD2, deletada en el periodo de 1927 a 1931, se puede clasificar a las subcepas en tempranas (aquellas que se distribuyeron antes de 1931) o tardías. Esta región les confiere diferencias estructurales debido al polimorfismo de un nucleótido en el gen *mma3*, relacionado con la producción de los ácidos metoxi-micólicos [Behr, 2000] característicos de la pared celular micobacteriana, los cuales están ausentes en subcepas BCG tardías [Hayashi, 2009].

A partir de la secuencia del genoma de BCG Pasteur 1173P2 se construyó la genealogía refinada de subcepas BCG (Figura 5), que pueden también clasificarse en cuatro grupos (I-IV) de acuerdo a los marcadores RD y DU2 presentes [Brosh, 2007]. Así, los dos primeros grupos pertenecen a las denominadas subcepas tempranas y los grupos III y IV pertenecen a las subcepas tardías.

A la fecha se cuenta con la secuencia de cuatro genomas: BCG Tokio 172, Moreau, México 1931 y Pasteur 1173P2 [Seki, 2009; Gomes, 2011; Orduña, 2011; Brosh, 2007] los cuales difieren en aproximadamente 20Kb entre ellos. Con la anotación del genoma de la BCG México 1931 se describieron tres nuevas RD, una de ellas denominada RDMex02 [Orduña, 2011], está asociada con la afectación del producto del gen *fadD23*, el cual codifica para una probable acil-CoA ligasa de ácidos grasos

involucrada en la producción de sulfolípidos. Se ha descrito que al interrumpir la funcionalidad de dicho gen, se incrementa la asociación de *M. tuberculosis* con macrófagos [Lynett, 2007], por lo que esta característica podría reproducirse en la subcepa BCG México.



**Figura 5. Genealogía refinada de las subcepas BCG.**

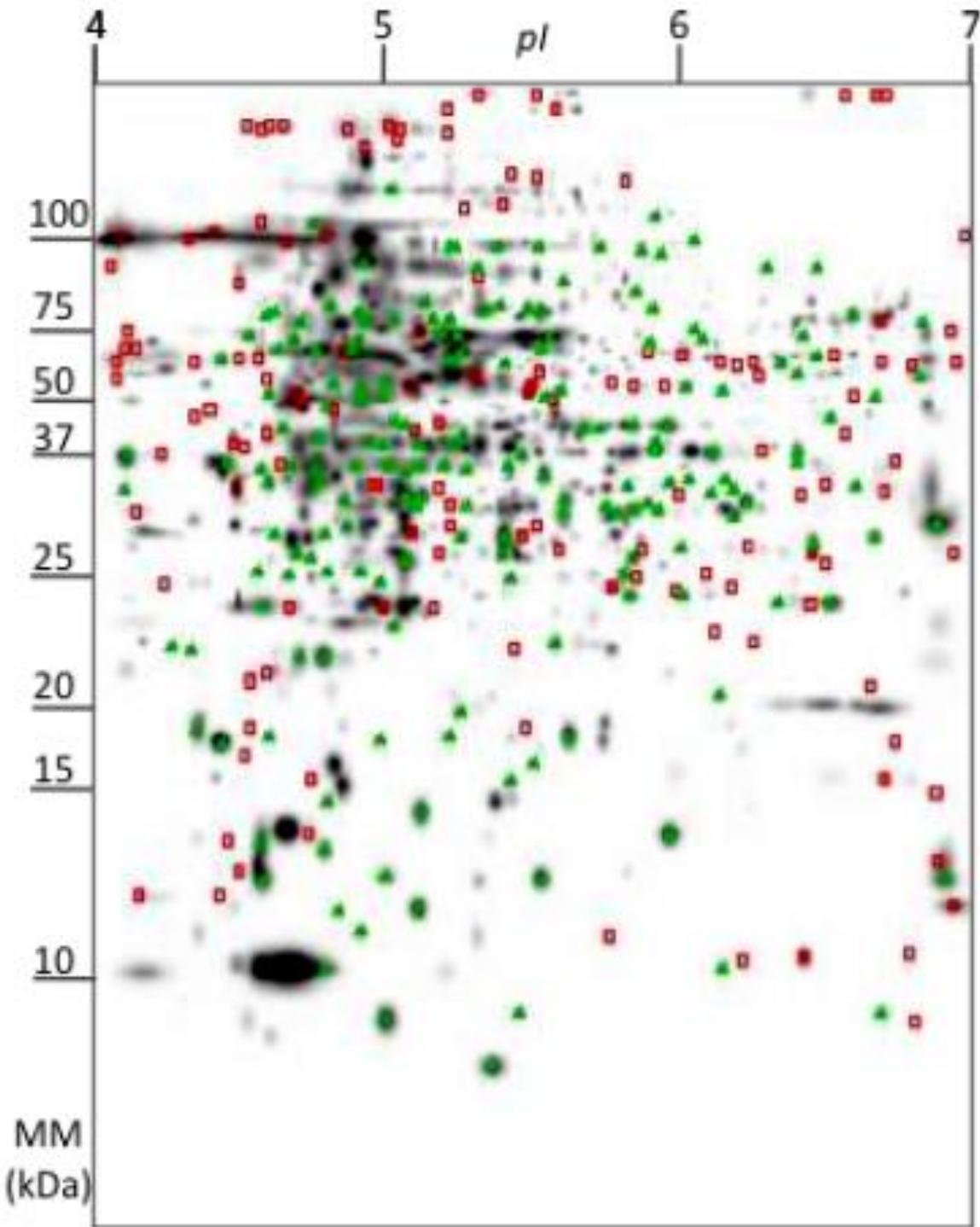
Los DU2 grupo I y II son subcepas tempranas mientras las DU2 grupo III y IV pertenecen a subcepas tardías. Recuadros grises simbolizan regiones perdidas o mutadas, recuadros blancos simbolizan inserciones. Para cada subcepa se muestra el año de salida del Instituto Pasteur, Francia. Tomado de Orduña 2011.

## Diferencias proteómicas entre subcepas BCG

Al comparar los proteomas de los extractos proteicos a partir de la lisis de las subcepas BCG Tokio, Danesa, México y Phipps (Figura 6), se observa que las subcepas tardías comparten un alto número de proteínas, mayor al 60%, mientras que en la subcepa Tokio, sólo hay un 48% de proteínas comunes (Tabla 2) [Orduña, 2011]. En un reporte anterior se demostró que existen diferencias en la expresión de proteínas entre las subcepas BCG Phipps y Danesa [Rodríguez-Álvarez, 2009]. La subcepa BCG Danesa expresó cuatro veces más el antígeno 65kDa (GRO-EL2), implicado en el plegamiento de proteínas en condiciones de estrés; mientras que la BCG Phipps expresó el antígeno Mpt32, un potente inductor de la respuesta inmune celular y la proteína hipotética Rv1836, la cual es sobreexpresada en cepas virulentas durante la infección [Rodríguez-Álvarez, 2009].

**Tabla 2. Comparación entre los proteomas de BCG México y BCG Tokio, Danesa y Phipps.** \*Porcentaje calculado a partir del número de spots en el proteoma de BCG México. Tomado de Orduña, 2011.

BCG	Proteínas	Compartidas (%)*	Únicas
México	812	---	---
Tokio	701	340 (48%)	361
Danesa	194	494 (62%)	300
Phipps	791	486 (61%)	305



**Figura 6. Proteoma de extracto celular de BCG México 1931 y comparación con los proteomas de BCG Danesa, Phipps y Tokio. Triángulos verdes: proteínas comunes para todas las subcepas, cuadros rojos: proteínas únicas para BCG México. Orduña P, 2011.**

### 3 Respuesta inmune contra BCG

#### Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato comprende tres importantes mecanismos efectores que permiten la eliminación rápida y eficiente de bacterias:

1) Péptidos antimicrobianos. Reconocen directamente moléculas microbianas y lisan membranas, eliminando así la bacteria en cuestión de segundos a minutos. Sin embargo, las concentraciones de estos péptidos deben alcanzar concentraciones relativamente altas para ser eficaces [Gasque, 2004].

2) El sistema del complemento. Constituido por alrededor de 30 proteínas plasmáticas con actividad proteolítica, su activación ocurre a través de tres vías distintas de acuerdo al motivo estructural microbiano y todas convergen en la inserción y activación de la proteína C3 en la membrana celular, lo que provoca la lisis bacteriana [Bardoel, 2011].

3) Células fagocíticas profesionales. Tales como neutrófilos, monocitos y macrófagos pueden ingerir y eliminar a las bacterias mediante una amplia variedad de moléculas como: proteasas, lipasas, amidasas, péptidos antimicrobianos o al producir diferentes radicales libres [Abbas, 2011].

En el sitio de la infección, las células fagocíticas reconocen estructuras moleculares conservadas en la superficie de la bacteria directamente a través de receptores presentes en la superficie celular y por receptores de opsoninas que reconocen proteínas del complemento también presentes en la superficie bacteriana. Después del reconocimiento y unión a los receptores, las células fagocíticas se activan, las bacterias son envueltas por la misma membrana celular y se forma el fagosoma. Para la degradación de la membrana bacteriana, el fagosoma debe acidificarse y fusionarse con el lisosoma para exponer las bacterias fagocitadas a las enzimas proteolíticas, además de especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno, lo que ocasiona daño y la muerte bacteriana [Bardoel, 2011].

Los fagocitos mononucleares representan las primeras células de defensa contra distintos patógenos, entre ellos las micobacterias que requieren generalmente de un ambiente intracelular en el que puedan sobrevivir y duplicarse. Aunque las células hospederas puedan producir un ambiente hostil al patógeno, también ofrecen ventajas únicas [Oliveira 2001]. Al ser células con un largo tiempo de vida (2 semanas) proporcionan un hábitat potencial a largo plazo para la micobacteria. Los macrófagos tienen un papel importante en la defensa contra la infección, principalmente debido a la gran cantidad de mediadores que secretan estas células, mientras que la micobacteria despliega una amplia variedad de estrategias de supervivencia para escapar de la respuesta inmune del hospedero [Martino 2008].

*M. bovis* BCG asegura la entrada a los macrófagos vía moléculas de superficie, que son importantes para la adhesión y posterior invasión a células eucariotas debido a que se unen a diversos receptores presentes en las células del hospedero (Tabla 3). Cuando la micobacteria es reconocida se induce el incremento en el consumo de oxígeno y glucosa, en la actividad del ciclo de las pentosas o hexosas monofosfatadas y la producción de cantidades elevadas de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Este conjunto de eventos se define como “Estallido respiratorio” [Rojas-Espinoza 2003].

**Tabla 3. Moléculas micobacterianas y receptores del macrófago implicados en el reconocimiento y fagocitosis** (Dietrich 2009, Bhatt 2007, Wallis 1994 y Díaz-Silvestre 2005).

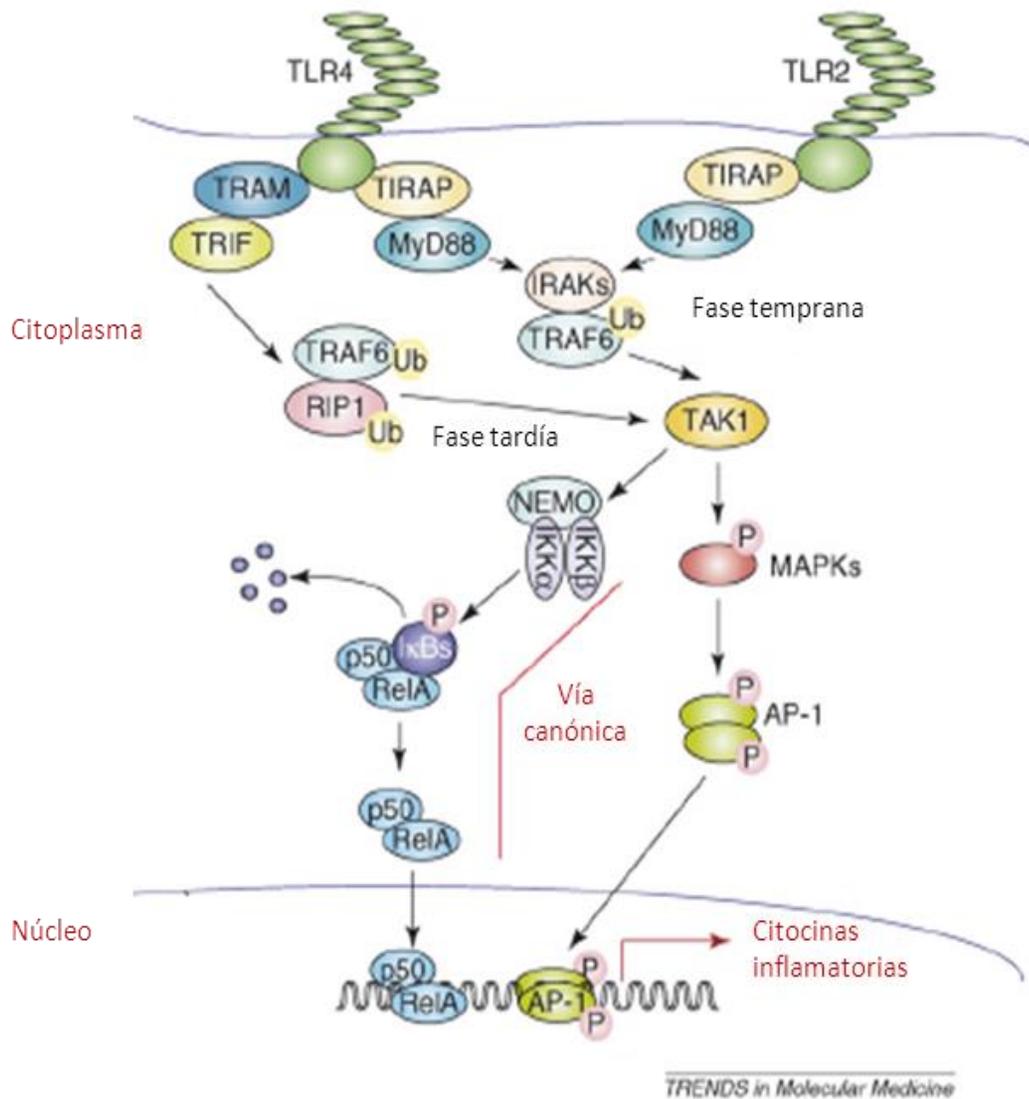
<i>Receptores en el macrófago</i>	<i>Moléculas micobacterianas</i>
TLR 1/2	LpqH (19kDa)
TLR 2	LAM, PIM, MPT32, ESAT-6
TLR 2/6	Diacil lipopéptidos
TLR 4	LPS
CD14	LPS, LBP
Receptores PAMP	Ácidos micólicos, lipoproteínas, ESAT-6
Receptor de Manosa	LAM, LpqH, PstS-1, MPB83
Receptor de Proteína surfactante A	MPT32
Receptores de Fibronectina	Complejo antígeno 85
Receptores del Complemento	
CR1	C3b unido a carbohidratos y proteínas
CR3	Complejo antígeno 85

Como se mencionó anteriormente, la respuesta inmune innata contra las micobacterias comprende el reconocimiento de diversas estructuras moleculares proteicas y lipídicas del bacilo por diferentes receptores, entre los que se encuentran los Toll-like (TLRs). Los TLRs activan la transducción de señales intracelulares, con un papel fundamental en los mecanismos de defensa del hospedero al inducir moléculas como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el óxido nítrico (NO) que contribuyen a la destrucción del patógeno [Wang, 1999]. El ON inhibe la síntesis del ADN y la actividad respiratoria del bacilo que ocasiona su lisis. El TNF, conocido por su efecto citotóxico en células tumorales [Shah, 2002], funciona como una molécula activadora de

monocitos; los cuales producen citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Diversos componentes del bacilo BCG como lipoproteínas, glicoproteínas y el lipoarabinomanana (LAM) se unen a TLR2 e inducen la producción de moléculas implicadas en la inflamación. Investigaciones recientes señalan que la fagocitosis del bacilo BCG Pasteur 1173P2 es dependiente de TLR2 [Quesniaux, 2004] y en menor proporción de TLR4, ambos modulan la inducción de COX-2, iNOS y TNF por medio de diferentes vías de señalización [O'Neill, 2007].

Posterior al reconocimiento y unión de la micobacteria por los receptores se inducen diferentes vías de señalización, de las mayoritariamente estudiadas son dos vías activadas a través de TLR2, con la activación de factores de transcripción responsables de la expresión de un gran número de genes responsables de la producción de moléculas participantes en la inmunidad como: quimiocinas, citocinas, aminas vasoactivas y otros compuestos que atraen a un exudado inflamatorio constituido por proteínas plasmáticas y leucocitos [Mendez-Sampeiro, 2007]. Una de las vías es dependiente de la proteína adaptadora MyD88 para que se lleve a cabo la activación de la familia de cinasas IRAK, que da como resultado el estímulo del complejo inhibidor de cinasas de NF- $\kappa$ B (IKK) y por consiguiente, la activación y traslocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B [Kawai 2007], involucrado en la transcripción de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-10, IL-12, IL-18, TNF y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), responsable de la producción de NO (Figura 7). Mientras que, la otra vía activa las cinasas MAP y la cinasa JNK [Méndez-Sampeiro, 2007], lo cual resulta en la activación y translocación al núcleo del factor de transcripción AP-1, que activa la síntesis de IL-2, IL-4, IL-8, c-Jun, factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y del ligando de Fas (FasL) [O'Neill, 2006; Trinchieri, 2007].



**Figura 7. Señalización mediada por TLR2 y TLR4.** Tomado de Kawai 2007.

Un mecanismo bactericida de los macrófagos es la producción de óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), el cual se genera a partir del metabolismo de L-arginina y su producción se regula por el interferón gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ). El  $\cdot\text{NO}$  es un subproducto en la vía de transformación del aminoácido L-arginina a citrulina y un intermediario de los radicales nitrato ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) [Marletta, 1988]. El  $\cdot\text{NO}$  inhibe la síntesis de ADN y la actividad respiratoria bacteriana; por lo que ocasiona la lisis de los microorganismos intracelulares, incluido *M. tuberculosis* [Chan, 2001]. La generación de especies reactivas es asociada con la liberación de mediadores inflamatorios como factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos y factores fibrogénicos [Maureen, 2006]. Sin embargo, los macrófagos son utilizados por la micobacteria para sobrevivir

intracelularmente evadiendo el contacto con neutrófilos, células T y monocitos atraídos al sitio de infección [Sawant, 2007]. La sobrevivencia y multiplicación de la BCG en el macrófago del hospedero son esenciales para la inducción de una respuesta inmune protectora [Orme, 1998; Kauffmann, 1995].

### **Respuesta inmune adaptativa**

Diferentes estudios en animales apoyan el papel de la inmunidad mediada por células contra la TB y recientemente se ha enfatizado en el establecimiento de una inmunidad que involucra múltiples poblaciones de linfocitos T [Flynn, 2001]. La importancia de las células T CD4<sup>+</sup> productoras de INF- $\gamma$  se ha demostrado en diversos modelos animales, así como por un incremento de la susceptibilidad a la TB en pacientes VIH positivos con un número disminuido de linfocitos T CD4<sup>+</sup> [Agger, 2002]. Aunque la correlación de la alta producción de INF- $\gamma$  con una inmunidad protectora es debatida, esta citocina se ha utilizado ampliamente en la detección de nuevos antígenos para el desarrollo de vacunas contra la TB [Agger, 2001].

La importancia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la defensa del hospedero contra la TB se basa en tres mecanismos efectoros: 1) la lisis de las células infectadas, 2) la eliminación extracelular directa a través de la actividad antimicrobiana y 3) la producción de INF- $\gamma$ . Diversos estudios en humanos demuestran que linfocitos T CD8<sup>+</sup> lisan macrófagos infectados con micobacterias por medio de la liberación de gránulos que contienen granulinsina y perforina [Agger, 2002].

Información sobre el papel de linfocitos no convencionales, como células T restringidos a CD1 se desarrolla rápidamente. Los linfocitos T $\gamma\delta$  son activados por pequeños metabolitos fosforilados, mientras que los linfocitos T $\alpha\beta$  restringidos a CD1 son activados por lípidos micobacterianos, en ambos casos para producir INF- $\gamma$  y ejercer su actividad citolítica [Moody, 1996; Raja, 2004].

El equilibrio entre la respuesta tipo Th1 y Th2 refleja la resistencia del hospedero contra la TB. La respuesta T reguladora induce la secreción de IL-17 y la diferenciación de células precursoras hacia Th1 o Th2 puede estar bajo el control de citocinas como IL-12 [Raja, 2004]. Mientras que la inmunidad contra patógenos intracelulares depende principalmente de la activación mediada por INF- $\gamma$ , que es producido mayoritariamente por células T CD4<sup>+</sup> durante la respuesta Th1, lo que aumenta la capacidad microbicida de macrófagos [Kaufmann 1995,

Dietrich 2009]. En este contexto, los microorganismos que suprimen o evitan la producción de citocinas pro-inflamatorias tempranas como TNF- $\alpha$  e IL-12 por parte de los macrófagos infectados favorecerán el desarrollo de un fenotipo susceptible a infecciones posteriores ya que estas citocinas son cruciales para el desarrollo de una respuesta Th1 [Trinchieri 1993, Flesch 1995].

### **Citocinas implicadas en la infección por micobacterias.**

Las micobacterias inducen en las células del sistema inmune la producción de citocinas y quimiocinas a través de interacciones fagocíticas y no fagocíticas una vez que son reconocidos motivos proteicos, lipídicos y glicosídicos. Funcionalmente, las citocinas y quimiocinas pueden actuar sinérgicamente o antagonizarse entre ellas. Sin embargo, durante todas las etapas de la infección, el equilibrio moléculas activadoras y desactivadoras de macrófagos pueden impactar en el balance entre contener la infección o propiciar su extensión y diseminación [Toossi, 2003].

El reclutamiento de células mononucleares y polimorfonucleares (PMN) que intervienen en la inflamación y que son importantes para el desarrollo de la inmunidad protectora es dirigida a través de quimiocinas. Específicamente, interleucina 8 (IL-8), la proteína quimioatrayente de monocitos, son inmediatamente inducidas por MTB en macrófagos alveolares y en consecuencia el reclutamiento de PMN, monocitos asesinas naturales y linfocitos T. El reclutamiento de PMN y células mononucleares genera una segunda producción de quimiocinas cuando son expuestas a MTB y sus productos. Por ejemplo, MTB induce la producción de IL-8 y MCP-1 en PMN, sin embargo, los monocitos y macrófagos producen más quimiocinas que los PMN. Así, la evolución del perfil de quimiocinas puede mantenerse por el perfil de moléculas inducidas por MTB en monocitos reclutados y macrófagos residentes. La secreción de MCP1 e IL-8 es inducida por TNF y se sabe que la expresión de esta última citocina ocurre durante todas las etapas de la infección, esto provee de un mecanismo para el reclutamiento continuo de monocitos y PMN hacia el sitio de infección [Riedel y Kaufmann, 1997].

Una importante característica de la infección con micobacterias, y que es importante en la patogénesis, es la inducción de citocinas proinflamatorias en monocitos y macrófagos. Diferentes estudios han demostrado que el PPD, MTB y otros productos micobacterianos inducen la producción de citocinas proinflamatorias como interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ), IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y TNF, además, MTB induce

mayoritariamente la expresión de IL-12 en fagocitos mononucleares, lo cual es crucial para el desarrollo de una respuesta Th1, que se sabe, es protectora [Kaufmann, 2010].

Además, otros mecanismos pueden operar para controlar la inflamación desde una fase temprana de la infección. Citocinas antiinflamatorias como interleucina 10 (IL-10) son inducidas en respuesta a TNF y por MTB, además MTB y componentes de la pared micobacteriana como lipoarabinomanana (LAM) son potentes inductores del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), el cual puede regular negativamente la producción de citocinas proinflamatorias como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e incluso IL-10. Por último, la desactivación de macrófagos y supresión de la respuesta de células T puede observarse en presencia de IL-10 y TGF- $\beta$  [Toossi 2003].

- **Factor de Necrosis Tumoral**

El Factor de necrosis tumoral (TNF) es un potente modulador de la respuesta inflamatoria primaria contra una gran variedad de estímulos físicos, ambientales, infecciosos e inmunológicos. Es una citocina pleiotrópica producida por diferentes células del cuerpo, principalmente por monocitos. El TNF es producido primariamente como una proteína transmembranal organizada en homotrimeros estables que al ser escindidos por la metaloproteasa convertidora de TNF alfa (TACE) produce la forma soluble [Harris, 2010]. El TNF se une a dos receptores, TNFR1 y TNFR2 localizados en células como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Ambos receptores pueden transducir señales anti-apoptóticas y pro-inflamatorias por activación de la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B o por las cinasas MAP; sólo TNFR1 transduce señales apoptóticas y anti-inflamatorias gracias al reclutamiento del dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y la activación de caspasa 8 [Wajant, 2003]. Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares como la interleucina 1 (IL-1) y endotoxinas bacterianas. Sistémicamente, el TNF ejerce distintas funciones como suprimir el apetito, estimular la hormona liberadora de corticotropina (CRH); estimula la respuesta aguda de la inflamación en el hígado, con activación de la síntesis de proteína C reactiva; y el aumento en la activación y adhesión plaquetaria [Abbas, 2010].

Los animales deficientes de TNF son más susceptibles a presentar TB primaria después de la infección por *Mtb* [Bean 1999]. El TNF forma parte de la inmunidad contra la tuberculosis induciendo la secreción de quimiocinas, la expresión elevada de moléculas de adhesión y la inducción de apoptosis en el macrófago. El TNF tiene una función dual en la sobrevivencia celular; por una parte promueve la sobrevivencia a través de la activación del NF- $\kappa$ B o induce apoptosis al activar la cascada de caspasas. En macrófagos infectados con *Mtb*, la apoptosis de células infectadas protege al hospedero al privar al bacilo de su nicho [Keane, 2000], además; promueve la eliminación del bacilo y permite que la presentación de antígenos a linfocitos T CD8<sup>+</sup> se realice vía el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I, a través de las células dendríticas que han fagocitado vesículas apoptóticas que contienen a los bacilos [Schaible, 2003].

Las micobacterias virulentas son capaces de inhibir la apoptosis mediante la secreción de TNFR2 soluble (sTNFR2) dependiente de IL-10 en macrófagos alveolares humanos [Balcewicz-Sablinska, 1998], por lo que la protección del hospedero mediante la apoptosis de macrófagos dependiente de TNF se ve interrumpida. Por otra parte, bloqueadores de TNF han demostrado disminuir los efectos del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y estimular la apoptosis en células como monocitos, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup> reactivos a *Mtb* [Bruns, 2009]. También se ha demostrado que el incremento en la maduración del fagosoma inducido por IFN- $\gamma$  es inhibido en macrófagos humanos tratados con bloqueadores de TNF, por lo que el efecto de IFN- $\gamma$  en la maduración del fagosoma es dependiente de la secreción autocrina de TNF [Harris, 2008]. Otro mecanismo es la autofagia, que interviene en la inmunidad contra la micobacteria por tener efecto en la muerte bacteriana intracelular, la activación del inflamosoma y la presentación de antígenos [Harris, 2009], por lo que la inhibición de esta y la apoptosis mediada por TNF [Miller, 2010] le confiere a la micobacteria la capacidad de persistir en células hospederas como los macrófagos.

- **Interleucina 12**

La fuente predominante de esta citocina son células dendríticas, macrófagos y linfocitos B linfoblásticos [Trinchieri, 2003]. El heterodímero se une a través de puentes disulfuro y comprende dos subunidades, la cadena ligera de p35 (IL-12A) y la cadena pesada p40 (IL-12B) [Yuzhaling, 2012]. La actividad biológica de la IL-12 está mediada por su receptor (IL-12R), formado por las subunidades IL-12R-b1 e IL-12R-b2. Tras unirse al ligando, la IL-12R-b2 proporciona los sitios de unión para las cinasas Tyk1 y Jak2, que activan factores de transcripción como las proteínas transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT)3 y STAT4 [Yuzhalin, 2012], relacionados en la producción de citocinas, factores de crecimiento, interferones y receptores.

La interleucina 12 (IL-12) es una citocina pro-inflamatoria que promueve la producción de IFN- $\gamma$ , favorece la diferenciación de linfocitos T hacia una respuesta Th1, además de formar parte del enlace entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Se ha sugerido que el balance entre la respuesta Th1 y Th17 está relacionado con las concentraciones relativas de IL-12 e IL-23 producidas [Khader, 2008]. Distintas micobacterias no tuberculosas (*M abscessus*, *M avium* y *M goodnae*) inducen una baja producción de esta citocina en monocitos humanos [Jönsson, 2012]; sin embargo no existen estudios sobre el balance de la respuesta inmune contra las subcepas BCG.

- **Interleucina 10**

La interleucina 10 (IL-10) es la citocina anti-inflamatoria más importante junto con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Esta proteína es secretada después escindir su péptido señal, la proteína ya plegada es un homodímero formado por dos uniones no covalentes [Windsor, 1993].

La fuente principal de esta citocina son los monocitos y macrófagos pero también es sintetizada por células dendríticas, células B y T, células Natural Killer, células cebadas, eosinófilos y neutrófilos [Siewe, 2006; Speiran, 2009]. Monocitos y macrófagos secretan IL-10 después de la activación por LPS, a través de la vía TLR4, TRAF3, NF- $\kappa$ B p65/p50 y la cinasa ERK [Zhang, 2009].

IL-10 utiliza principalmente a la familia de cinasas Janus y factores de transcripción STAT para mediar sus efectos. Cuando esta citocina se une a su receptor, activa a dos miembros de la familia Janus: Jak1 (asociado al receptor 1 (IR1) de IL10) y Tyk2 (asociado al IL-10R2), con lo que se autofosforilan STAT3, STAT1 y/o STAT5 formando homo- y heterodímeros que se traslocan al núcleo, induciendo la transcripción de genes blanco [Finbloom, 1995]. El supresor de señalización de citocinas 3 (SOCS3) es uno de los genes cuya expresión es inducida por IL-10 [Piessevaux, 2008], su función es inhibir la actividad de cinasas Janus al unirse a estas.

La IL-10 tiene influencia en tres importantes funciones de los monocitos/macrófagos: la producción de mediadores inmunes, la presentación de antígeno y la fagocitosis. Inhibe la liberación de mediadores pro-inflamatorios como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-SCF y GM-CSF inducidos por LPS e IFN- $\gamma$  [Waal Malefyt, 1991]. Inhibe la presentación de antígeno al disminuir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II inducida por IFN- $\gamma$ , además de moléculas coestimuladoras (CD86) y de adhesión (CD54) [Waal Malefyt, 1991]. Aumenta la fagocitosis de monocitos/macrófagos al incrementar la expresión de varios receptores como los IgG-Fc (CD64, CD32 y CD16) y moléculas como CD14 responsables de la entrada de partículas opsonizadas o no opsonizadas [Velde, 1992].

## JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es todavía un problema de salud a nivel mundial y la única vacuna aprobada para prevenir dicha enfermedad ha mostrado diferencias en la eficacia protectora contra la infección de *M. tuberculosis*. El estudio de la activación de la respuesta inmune innata de macrófagos humanos infectados con distintas subcepas BCG, permitirá entender el tipo de activación de respuesta inmune adquirida y ayudará a seleccionar la mejor subcepa BCG para desarrollar vacunas de segunda generación.

## **HIPÓTESIS**

Existen diferencias en la respuesta inmune innata de macrófagos humanos infectados con distintas subcepas BCG.

## **OBJETIVO**

- Evaluar la respuesta inmune innata de macrófagos humanos infectados con distintas subcepas BCG.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Comparar el reconocimiento de las subcepas BCG a través de TLR 2 y TLR4.
- Determinar la sobrevivencia de las subcepas BCG fagocitadas por el macrófago.
- Evaluar la producción de óxido nítrico en el macrófago infectado por cada una de las subcepas BCG.
- Comparar el perfil de citocinas producidas por el macrófago activado posterior a la infección.

## **METODOLOGÍA**

### **Diseño experimental**

Células de la línea HEK293 transfectadas con TLR2-CD14 ó TLR4-MD2-CD14 se infectaron durante 3 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con las subcepas BCG Moreau, Tokio, Danesa, México, Tice y Phipps con un índice de infección 1:10, bloqueando o no el TLR correspondiente con anticuerpos. Como control positivo, se utilizó LPS (100 ng/mL). Posteriormente, se determinó la producción de IL-8, 24h post-infección en los sobrenadantes cuantificado por el método de ELISA.

La línea celular THP-I se incubó con 100nM de PMA por 48h para la obtención de macrófagos derivados de monocitos, y se favoreció la activación con 100 ng/mL de LPS durante 3 h, ambas incubaciones se realizaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 8). Después de comprobar el porcentaje de adherencia, se realizó la infección de los macrófagos THP-I con las subcepas BCG Moreau, Tokio, Danesa, México, Tice y Phipps con un índice de infección de 1:10 durante 3 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior al tiempo de incubación, se hicieron lavados con PBS y se incubó con 200µg/mL de Amikacina por 2 h para eliminar las bacterias no fagocitadas. Se obtuvo el sobrenadante y se lisaron los macrófagos a 0, 24 y 72h post-infección para recuperar las bacterias intracelulares, que se determinaron por cuantificación del contenido de ATP. A partir de los sobrenadantes, se evaluó la producción de NO por cuantificación de nitritos y la producción de IL-12, IL-10 y TNF por el método de ELISA.

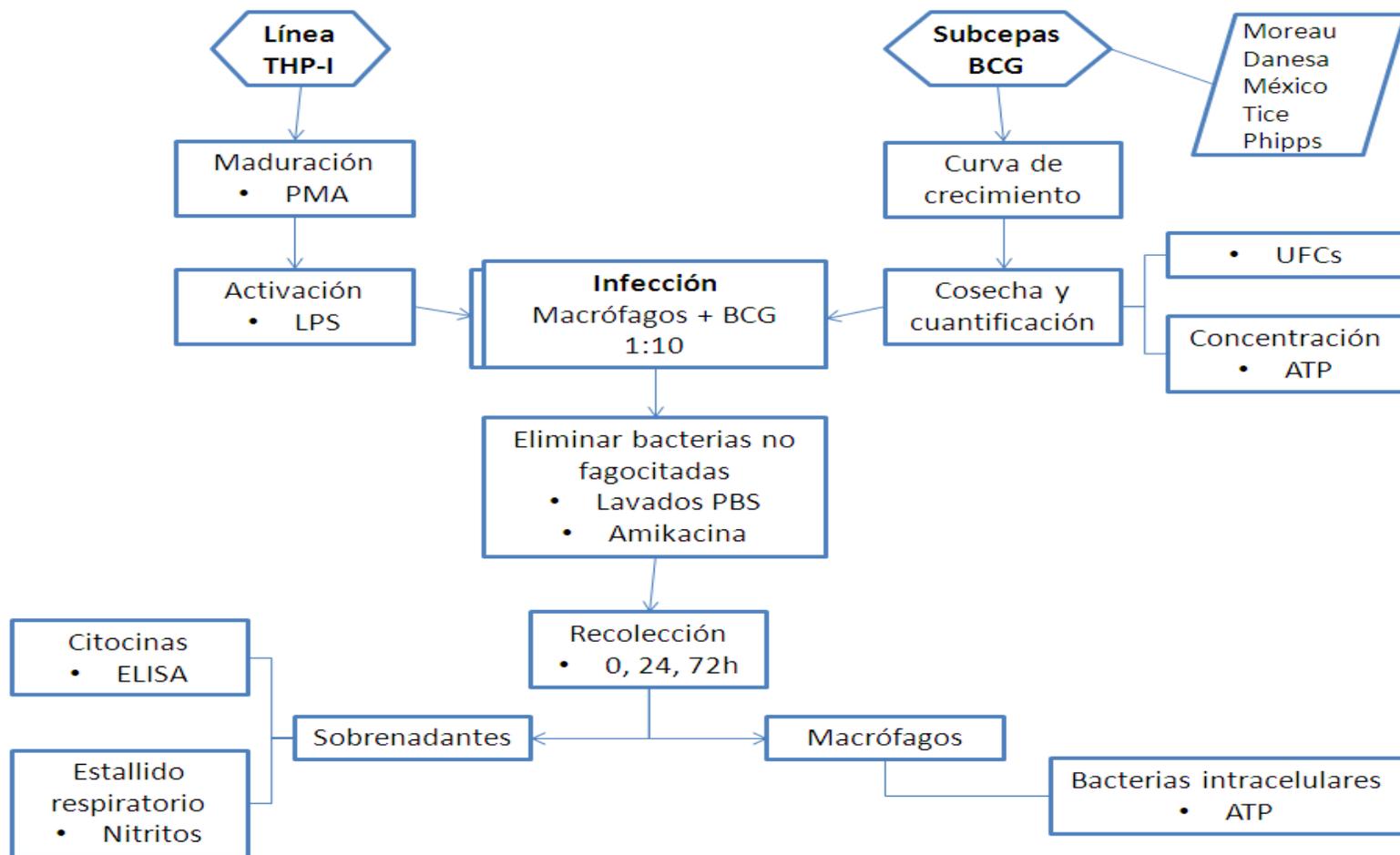


Figura 8. Diagrama general de trabajo.

## **Materiales y métodos**

### **1 Cultivo de la línea celular THP-I (TIB-202, ATCC)**

El vial obtenido de ATCC con 1 mL ( $1 \times 10^6$  células/mL aprox) se descongeló y resuspendió en medio RPMI-1640 a 37°C, por último se centrifugó a 1 000 rpm/ 5min/ TA, por duplicado. El precipitado celular se resuspendió en medio RPMI-1640 + 10% SFB + 0.05 mM 2-mercaptoetanol y se transfirió a botellas de cultivo. La incubación se realizó a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 6 días. Se determinó la morfología y viabilidad del cultivo por exclusión de azul tripano.

Se adicionó medio fresco cada 2-3 días para proliferar la línea celular y mantenerla a una concentración de  $5 \times 10^5$  céls/mL.

### **2 Obtención de macrófagos a partir de la línea celular THP-I (Theus 2004; Shiratsuchi 2004)**

Para la diferenciación, se utilizó miristato de éster de forbol (PMA) a una concentración final de 50ng/mL en el medio RPMI. En placas de 24 pozos se agregó a cada pozo 500 µL de suspensión de macrófagos con viabilidad  $\geq 95\%$  de  $1 \times 10^6$  céls/mL, se incubó a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 24h. Los macrófagos maduros ó bien diferenciados se mantuvieron adheridos a la superficie del pozo.

Posterior a la incubación, se adicionó medio RPMI con 100 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) a cada pozo y se incubó a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 3h. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregó 1mL de medio RPMI-1640 + 10% SFB + 0.05 mM 2-mercapto-etanol [Branislava 2008]. Después de este proceso, los macrófagos incrementan su actividad fagocítica, así como la producción de EROs, ON y citocinas.

### **3 Precultivos de subcepas BCG**

Se inoculó en medio sólido 7H10 + OADC a partir del vial de cada subcepa BCG: Moreau, Danesa, México; Tice y Phipps. La incubación se hizo a 37°C / 5% CO<sub>2</sub>/ 3 semanas. Se sembró una colonia en medio líquido 7H9 + ADC y se incubó a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> / hasta D.O. = 0,6 a  $\lambda=600$  nm con espectrofotómetro (Biomates, Thermo Spectronic, England) [Worku 2003; Rodríguez-Álvarez 2009]. De esta forma se obtuvieron bacilos con metabolismo activo.

#### **a. Curvas de crecimiento subcepas BCG**

A partir del precultivo, se hizo la siembra en medio 7H9 + ADC, se incubó a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> y se midió la D.O. a  $\lambda=600$  nm cada 24 h. Se graficó para obtener las curvas de crecimiento, determinar el tiempo óptimo para la fase de crecimiento exponencial [Rodríguez-Álvarez 2009] y realizar la cosecha de las subcepas BCG. Se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por método de dilución en placa en medio sólido 7H10 + OADC (37°C / 5% CO<sub>2</sub> / 3 semanas) y el número de bacterias por método de cuantificación del contenido de ATP bacteriano. Se ajustó la suspensión bacteriana a  $2 \times 10^6$  UFC/mL con medio RPMI-1640 + 10% SFB + 15% de glicerol a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 1h previo a realizar los ensayos de infección (Oliveira 2001; Passmore 2001; Theus 2004; Rajavelu 2007. Esquivel-Solís 2009).

### **4 Infección de macrófagos THP-I con las subcepas BCG**

Al cultivo de macrófagos activados se le retiró el medio de cada pozo y se adicionó a cada pozo 1mL de la suspensión bacteriana (1:10 en relación a los macrófagos) de la subcepa BCG correspondiente. Se incubó a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 3, 24 y 72 h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 5 Fagocitosis por los macrófagos THP-I

### a. Sobrenadantes post-infección

Al término de cada tiempo de incubación (3, 24 y 72h) se retiró el sobrenadante de cada pozo y se centrifugó por separado a 3,200 rpm/10 min/TA, para recolectar y almacenar el sobrenadante a -71°C, que se usó para determinar la concentración de nitritos y citocinas iniciales. Para completar la incubación a 24 y 72 h, se eliminaron las bacterias no fagocitadas con lavados con PBS 1X estéril, y se trató con amikacina (100µg/mL) por 2 h [Hayashi 2010].

### b. Lisis de los macrófagos

Posterior a los tiempos de incubación, se realizó la lisis con una solución de Tritón X-100 al 0.1% en PBS [Esquivel–Solís 2009], se incubó a 4°C/10min. Después de homogenizar cada pozo, se centrifugó a 3 200 rpm /10 min/TA y se almacenó el precipitado celular obtenido a -71°C para determinar las bacterias fagocitadas después de la incubación.

## 6 Determinación de la viabilidad bacteriana por cuantificación de ATP (ATP Kit SL de Bio Thema Luminescent Assays) [Askgaard 1995; Jensen 2008; Ho 2008]

Una alternativa para determinar el número de bacterias viables es la cuantificación del contenido de ATP en la muestra, así que por la relación directa que existe entre el número de bacterias cuantificadas ó las Unidades Formadoras de Colonias con la concentración de ATP reportada en trabajos anteriores, se utilizó este último método para los ensayos de infección y sobrevivencia intracelular.

Se descongelaron y homogenizaron las alícuotas de subcepas BCG. Una vez centrifugadas a 3,200 rpm/5 min/TA, se resuspendió el precipitado bacteriano

obtenido en medio Dubos suplementado. Se incubó a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 22-26 h con agitación constante.

Antes del termino del tiempo de incubación (30'), se hicieron alícuotas con 500 µL de solución amortiguadora Tris-EDTA (TE) [tres diluciones por subcepa BCG (1, 1:2 y 1:5) y cada dilución por triplicado]. Estas alícuotas fueron incubadas a 96-98°C por 10 min en termoblock (Multi-Blok Heater, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois,USA).

De las alícuotas de subcepas BCG incubadas previamente, se realizaron diluciones 1:2 y 1:5 con medio Dubos suplementado. De estas diluciones y el original, se tomaron 100 µL y adicionaron a las alícuotas de buffer TE. Se incubaron 6 min a 96-98°C.

En placa blanca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 160 µL de los extractos de ATP obtenidos y de los controles positivo: medio Dubos suplementado en buffer TE y 2.5 µL del estándar de ATP; negativo: medio Dubos suplementado en buffer TE. Se añadieron 40 µL del reactivo de ATP a todos los pozos y se incubó por 5 min/TA en oscuridad. La luminiscencia se midió a 560 nm en espectrofotómetro Magellan (GENios Plus, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). La cuantificación de la concentración de ATP se realizó de acuerdo a la curva estándar y posteriormente se determinó el número de bacterias contenidas en cada muestra, de acuerdo a la metodología ya descrita por el fabricante.

El índice de multiplicidad se definió como el número de bacterias al t=24h y t=72h post-infección, dividido entre el número de bacterias al t=3h. Índice de multiplicidad >1 significa que la bacteria fue capaz de duplicarse dentro del macrófago, mientras que, un índice de multiplicidad ≤1 significa que las bacterias fueron incapaces de ello.

**7 Cuantificación de nitritos producidos por el macrófagos post-infección por las diferentes subcepas BCG** (Measure-iT Nitrite Assay Kit de Molecular Probes) [Hayashi 2009].

Después de descongelar los sobrenadantes, para la determinación de la concentración de nitritos se tomaron 5 µL de la muestra ó 10 µL de la dilución de la curva estándar incluida en el kit. Como control positivo, se adicionaron 5 µL de una solución de NaNO<sub>2</sub> (200 µM/100 µL), y como negativo, sólo el medio RPMI. Se determinó la fluorescencia, a una excitación de 360 nm y Emisión a 430 nm, en el lector Magellan (GENios Plus, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

**8 Determinación de citocinas producidas por el macrófago post-infección por las diferentes subcepas BCG por el método de ELISA** [Esquivel-Solís 2009].

Se descongelaron los sobrenadantes, se estabilizaron a TA y se determinó la concentración de IL-12, IL-10 y TNF por triplicado a partir de curvas patrón elaboradas con las citocinas recombinantes de humano por el método de ELISA directo siguiendo las instrucciones del fabricante (DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay development system; R&D Systems, Inc.)

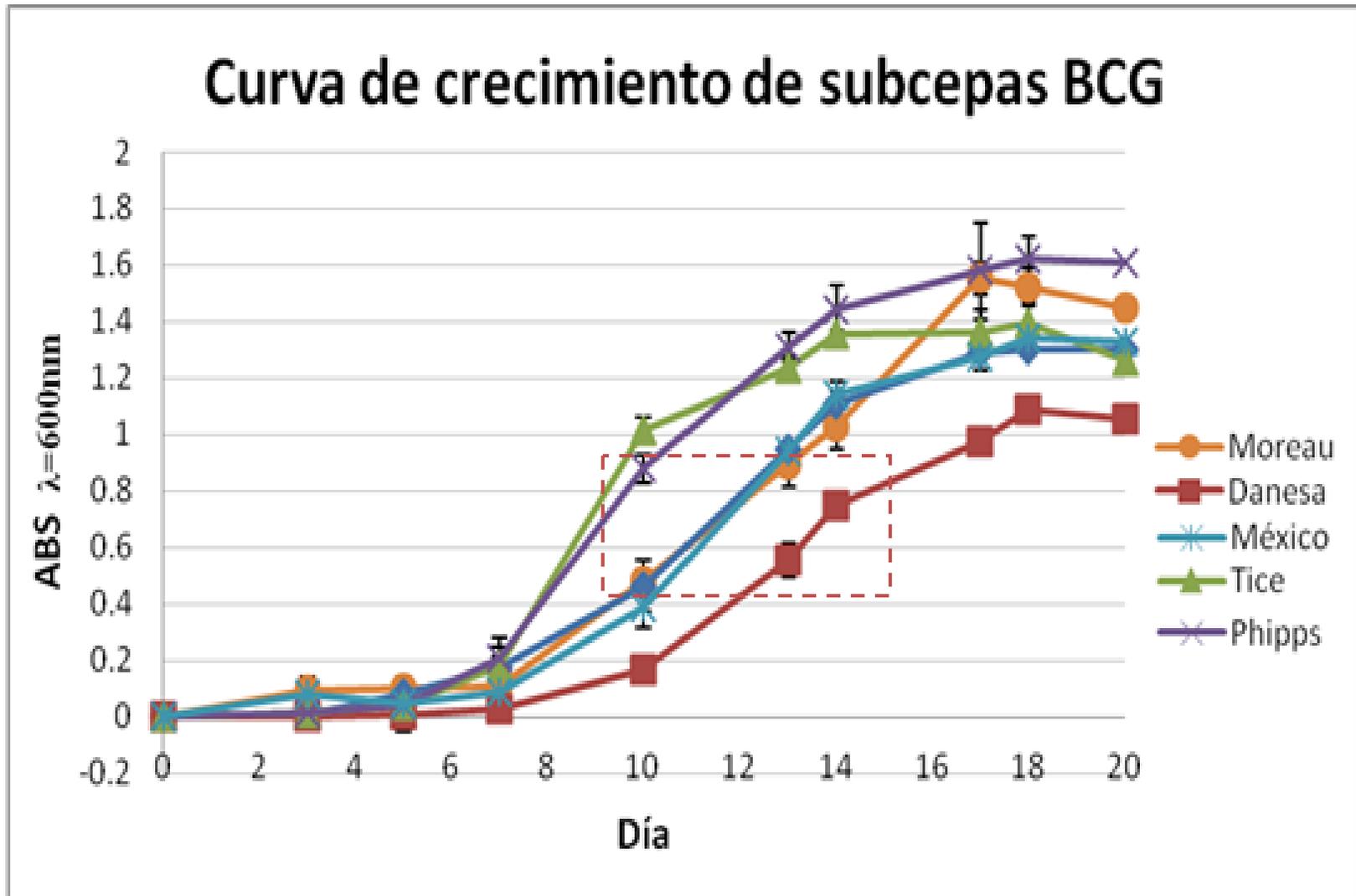
## RESULTADOS

### 1.- Curvas de crecimiento de subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG

- En la Figura 9 se muestra la curva de crecimiento de cinco subcepas de *M. bovis* BCG realizada a partir de 3 cultivos independientes; en esta gráfica se determinó que la fase media logarítmica se encuentra a una densidad óptica (DO) entre 0.5 y 0.8 a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm la cual se alcanza entre el 9<sup>o</sup> y 13<sup>o</sup> día (Tabla 4).

**Tabla 4. Fase media logarítmica de crecimiento para cada subcepa BCG.**

Subcepas <i>M. bovis</i> BCG	Fase media logarítmica (días)
Moreau	11
Danesa	13
México	11
Tice	9
Phipps	10

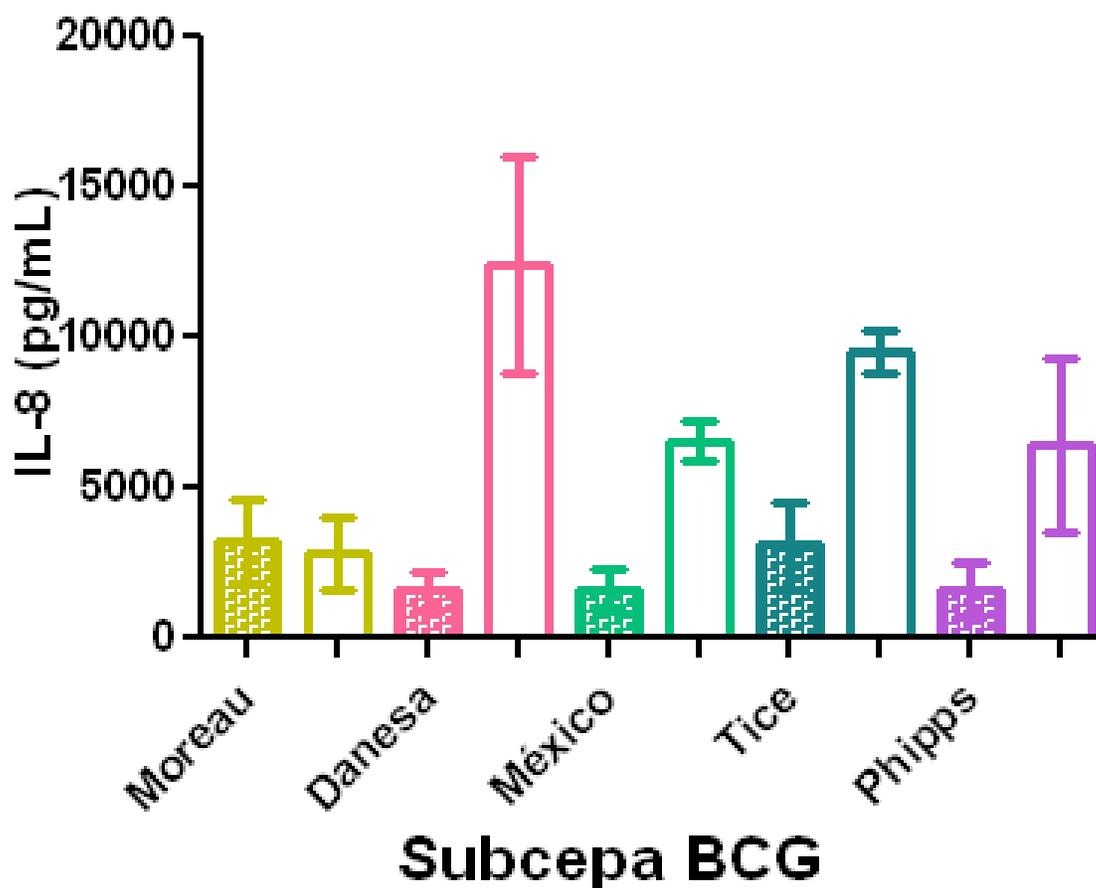


**Figura 9. Curva de crecimiento de distintas subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG.** Los cultivos se realizaron en medio 7H9 suplementado con ADC, la curva representa el promedio de la medición de D.O. a 600nm, en tres ensayos independientes. El recuadro punteado muestra la fase media logarítmica.

## 2.- Reconocimiento a través de TLR 2 y 4

Para discernir si las subcepas BCG son reconocidas discriminadamente por TLR2 o TLR4, se evaluó la producción de IL-8 por la línea celular HEK 293 transfectadas con hTLR2-CD14 y hTLR4-MD2-CD14 e infectadas con las subcepas BCG Moreau, Danesa, México, Tice y Phipps. Como controles se utilizaron LPS y anticuerpos contra el TLR en cuestión.

### Reconocimiento a través de TLR



**Figura 10. Comparación del reconocimiento de subcepas BCG a través de receptores TLR2 y TLR4.** La concentración de IL-8 en los sobrenadantes de células HEK293 que sobre-expresan TLR2 ó TLR4 infectadas con distintas subcepas BCG, se determinó por ELISA 24h post-infección. Columnas sólidas reconocimiento a través de TLR2; columnas vacías reconocimiento a través de TLR4.

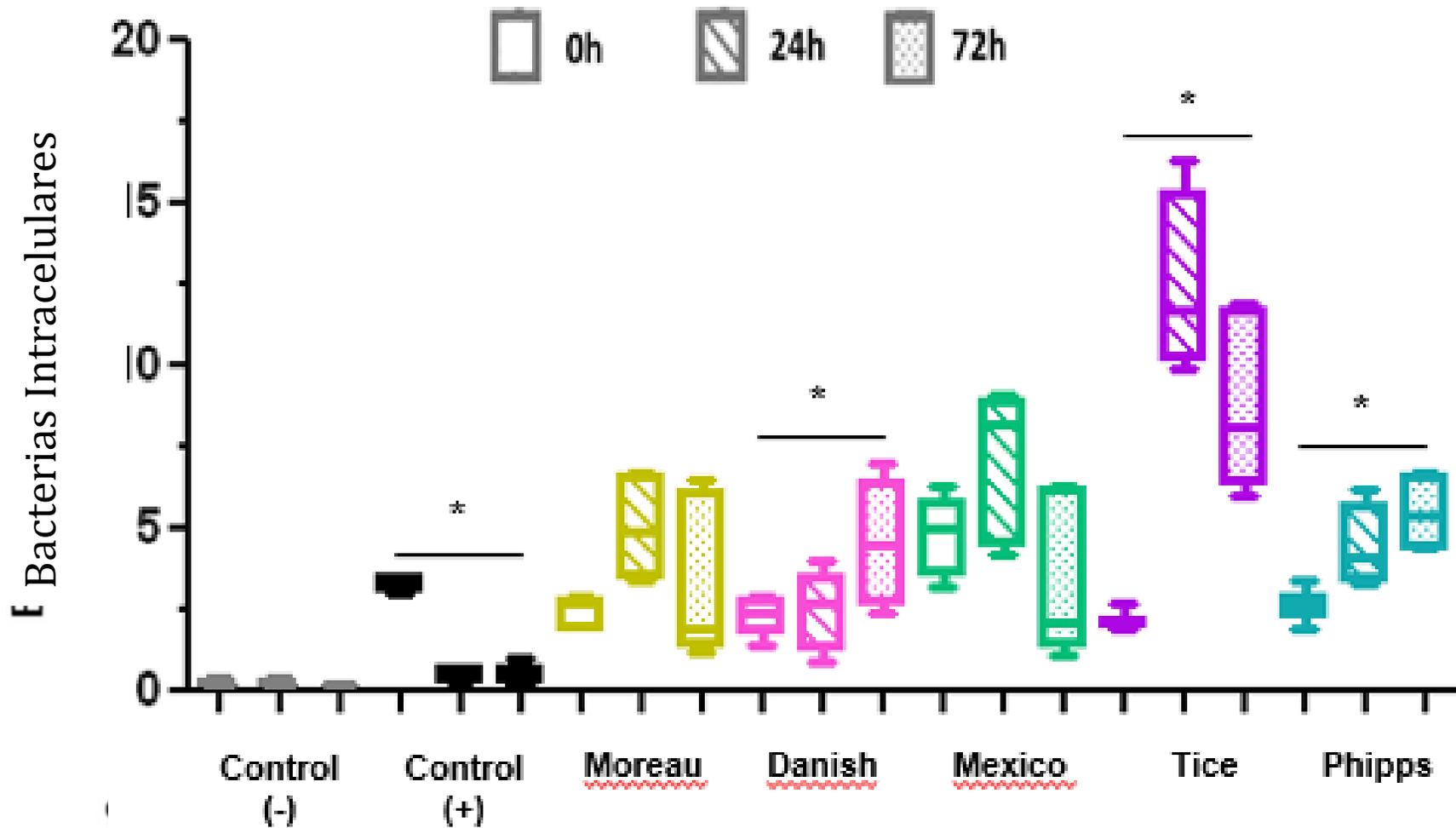
La estimulación con LPS de *E.coli* activó preferencialmente el reconocimiento por TLR4 en las células HEK293, como se ha descrito ampliamente en la literatura. Tal como hipotetizamos, las subcepas BCG fueron reconocidas diferencialmente por los receptores TLR 2 y 4. Al utilizar el anticuerpo correspondiente para cada TLR ( $\alpha$ -TLR), se observa una disminución en la producción de IL-8 (Anexo III). En los ensayos se observaron dos grupos: a) la producción de IL-8 dependiente del reconocimiento a través de TLR2 y b) la producción de IL-8 parcialmente dependiente del reconocimiento a través de TLR2. Sólo para BCG Moreau y México, al usar el  $\alpha$ -TLR2, no se observan diferencias en el estímulo producido; mientras que la producción de IL-8 tras la infección con BCG Danesa, Tice y Phipps depende del reconocimiento de TLR2. Por otra parte, cuando se emplea el  $\alpha$ -TLR4 con las subcepas BCG Moreau, México, Tice y Phipps, hay diferencia en el estímulo producido.

Sorprendentemente, la concentración de IL-8 detectada en los sobrenadantes de las células HEK293/TLR4/CD14/MD2 estimuladas con las subcepas BCG Moreau, Danesa y Mexico resultó aproximadamente dos veces mayor en comparación con la de las células HEK293/TLR2/CD14 (Figura 10), lo que sugiere que estas cepas son reconocidas preferencialmente a través de TLR4. A diferencia de las anteriores, las subcepas Tice y Phipps, no mostraron preferencia alguna en su reconocimiento por TLR2 o TLR4, sugiriendo que los componentes de la pared celular de estas subcepas son parecidos y que pueden estimular a ambos TLRs indistintamente.

### 3.- Determinación de sobrevivencia y multiplicidad de Subcepas BCG en macrófagos THP-I

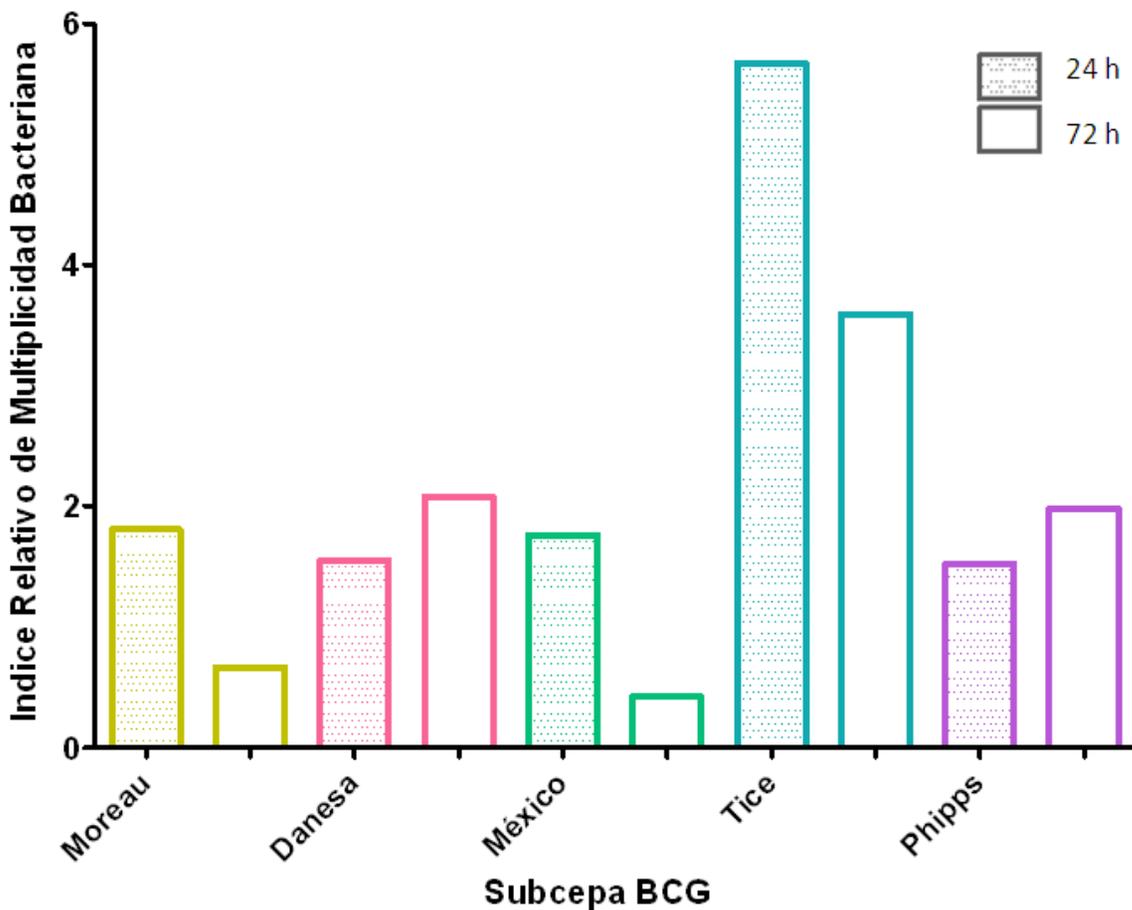
Debido a que se ha reportado ampliamente que las subcepas BCG presentan diferencias en la composición de su pared celular y que esto impacta en su reconocimiento por distintos TLRs, tal como se mostró anteriormente, consideramos que la habilidad de las subcepas BCG para inducir su fagocitosis por los macrófagos, así como su capacidad para sobrevivir y multiplicarse dentro de ellos, podría también ser distinta.

La fagocitosis de las bacterias por los macrófagos se evaluó 3 h posterior a la infección, el número de bacterias intracelulares de las subcepas BCG presentaron valores similares (2-3 bacterias) y con excepción de la BCG México que presentó 2 veces el valor de las demás subcepas evaluadas (5 bacterias) (Figura 11). Todas las BCG sobreviven intracelularmente a los tiempos de evaluación (24 y 72h), mientras que *Escherichia coli*, empleada como control (*E. coli*) es eliminada desde las 24 h. Las subcepas Moreau, México y Tice presentaron una mayor multiplicación inicial a las 24 h, de estas, BCG Tice tuvo el mayor índice de multiplicidad, calculado a partir del número de bacterias fagocitadas a las 3h, superior a 5.6, comparado con el 1.8 en promedio de las BCG Moreau y México (Figura 12). Sin embargo, a las 72 h, la cantidad de bacterias intracelulares disminuyó casi a la mitad.



**Figura 11. Bacterias intracelulares en macrófagos THP-1 infectados con subcepas BCG.** Macrófagos obtenidos a partir de la línea celular THP-1 se infectaron con distintas subcepas BCG a una relación 1:10. El número de bacterias intracelulares se determinó a través de la cuantificación del contenido de ATP bacteriano a 0, 24 y 72h post-infección. Control (-): macrófagos THP-1 sin infectar; Control (+): macrófagos THP-1 infectados con *E. coli*. \* $p < 0.05$  Kruskal-Wallis.

Las subcepas BCG Danesa y Phipps presentan un patrón diferente, ya que la fagocitosis es similar que las otras subcepas (a excepción de México) y el número de bacterias intracelulares evaluadas a las 24 h muestra un índice de multiplicidad mayor a 1.5, el cual aumenta a 2.0 en ambos casos a las 72 h (Figura 12), lo que sugiere que son capaces de sobrevivir en el interior del macrófago.



**Figura 12. Supervivencia y multiplicidad de subcepas BCG en macrófagos THP-I.** A partir del número de bacterias intracelulares, se determinó el índice de multiplicidad a las 24 y 72h con respecto a las bacterias fagocitadas inicialmente. Índice de multiplicidad > 1, la subcepa se multiplica intracelularmente.

#### 4.- Activación de Estallido Respiratorio en macrófagos THP-I infectados con subcepas BCG

Un mecanismo bactericida eficaz para la eliminación de micobacterias es la producción de especies reactivas del nitrógeno, a través del estallido respiratorio. Para determinar si la eliminación de algunas BCG observada a las 72 h podría relacionarse con este mecanismo, se determinó la producción de  $\cdot\text{ON}$  a través de la producción de nitritos en los sobrenadantes. La cantidad inicial de nitritos inducido por las subcepas evaluadas al tiempo 0 muestra diferencias para las subcepas BCG Moreau, México y Phipps (Tabla 5 y Figura 13), mientras que los macrófagos del grupo control, presentaron los mismos valores que con las subcepas BCG Danesa y Tice, ya que se infectaron con *E. coli*, además de ser activados con LPS, que se sabe, es un inductor de la activación del estallido respiratorio al ser ligando del receptor TLR 4.

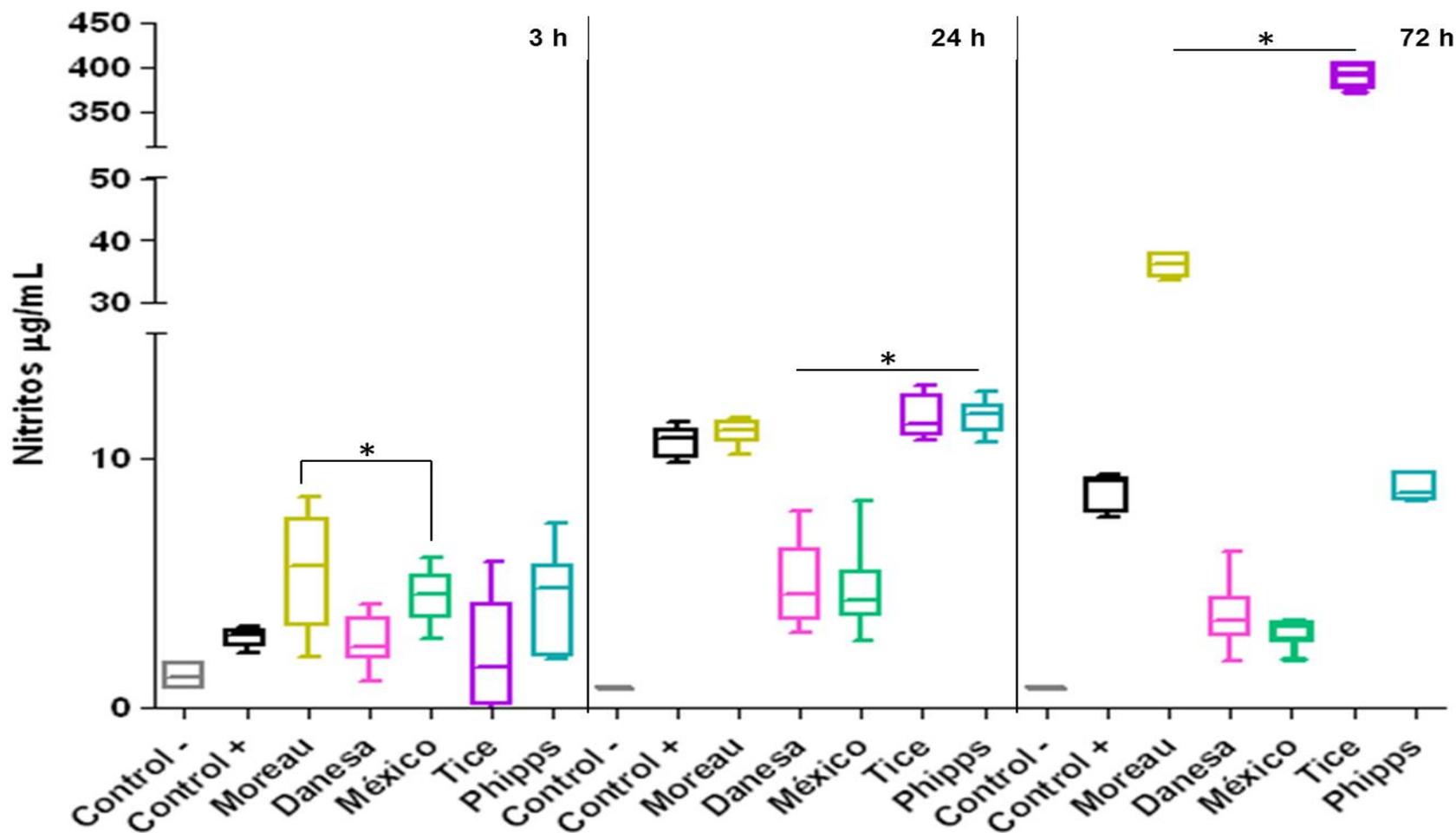
**Tabla 5. Producción de nitritos por macrófagos infectados con subcepas BCG a diferentes tiempos post-infección. \* $p < 0.05$  prueba t de Student.**

Subcepa BCG	Nitritos ( $\mu\text{M}$ )		
	0 h	24 h	72 h
<b>Control (-)</b>	1.25 +/- 0.45	0.77 +/- 0.04	0.76 +/- 0.05
<b>Control (+)</b>	2.82 +/- 0.41	10.65 +/- 0.61*	8.41 +/- 0.79*
<b>Moreau</b>	5.48 +/- 2.48	11.05 +/- 0.53	36.13 +/- 1.93*
<b>Danesa</b>	2.48 +/- 1.16	5.69 +/- 1.56*	2.94 +/- 0.82
<b>México</b>	4.89 +/- 0.96	5.05 +/- 2.83	2.93 +/- 0.70
<b>Tice</b>	2.12 +/- 2.25	11.64 +/- 0.86*	39.14 +/- 1.43*
<b>Phipps</b>	4.34 +/- 2.07	11.67 +/- 0.71	8.86 +/- 0.66

A las 24 h post-infección los valores de  $\cdot\text{ON}$  incrementaron su valor a más del doble en las subcepas BCG Moreau, Danesa y Phipps con respecto al tiempo 0 h, con la subcepa BCG Tice se observa un incremento mayor de 5 veces que el valor inicial, mientras que, para la subcepas BCG México la producción de nitritos se conservó, por lo que el estallido respiratorio se mantiene activo. Al comparar con el control, sólo con la subcepa BCG Moreau se obtuvieron valores similares (Tabla 5).

Para las 72 h, la subcepa BCG Moreau presentó un incremento mayor 100% y la subcepa Tice un incremento superior al 500%, evidenciado una importante producción de NO. BCG Danesa y México mantienen baja producción de NO con valores similares al tiempo 0 h (Tabla 5) y la subcepa BCG Phipps tiene una producción parecida al control (Figura 13).

Se puede correlacionar la cantidad de nitritos producidos por los macrófagos con la sobrevivencia intracelular de las BCG evaluadas. Así, la infección con BCG Moreau y Tice induce la mayor producción de nitritos que pudieran eliminar a las bacterias intracelulares y esto explicaría la disminución de la cuenta bacteriana observada a las 72h.



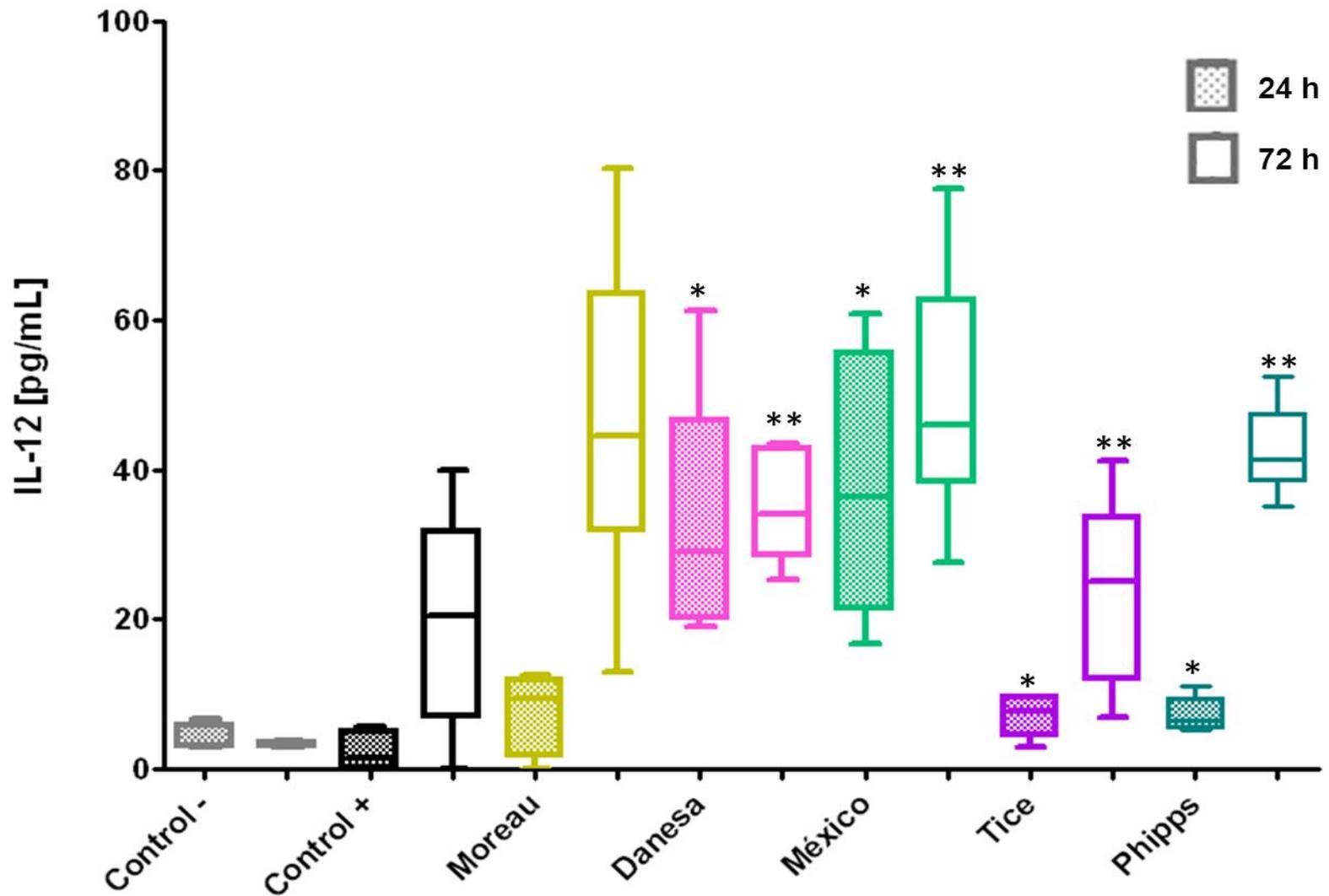
**Figura 13. Producción de óxido nítrico por macrófagos infectados con subcepas BCG.** Macrófagos obtenidos a partir de la línea celular THP-I se infectaron con distintas subcepas BCG a una relación 1:10. La producción de NO se determinó a partir de la cuantificación de nitritos en los sobrenadantes a 0, 24 y 72h post-infección. Control (-): macrófagos THP-I sin infectar; Control (+): macrófagos THP-I infectados con *E. coli*. \* $p < 0.05$  Kruskal-Wallis.

## **5.- Producción de citocinas por macrófagos THP-I infectados con subcepas BCG**

Otra de las funciones del macrófago es la producción de citocinas, lo que crea el microambiente que influye en la respuesta inflamatoria y, consecuentemente, en la respuesta adaptativa. Por lo anterior, se evaluaron tanto citocinas inflamatorias (IL-12 y TNF) como anti-inflamatorias (IL-10) producidas por los macrófagos.

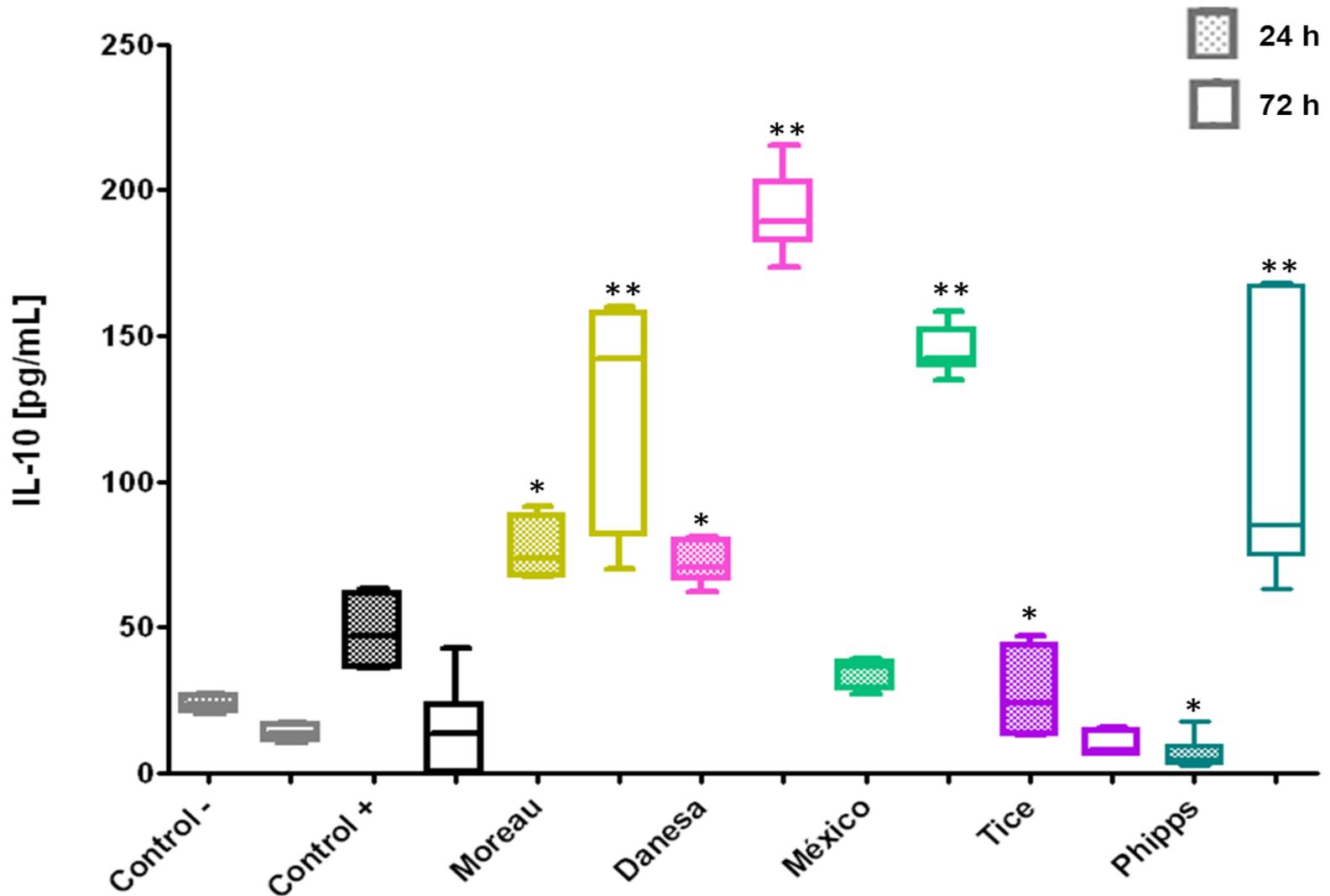
Las subcepas BCG Danesa y México evaluado a las 72 h inducen mayor cantidad de IL-12, aproximadamente 2 y 3 veces más, respectivamente que otras BCG evaluadas. La concentración de IL-12 producida por la infección con BCG Tice y Phipps es menor a los 10 pg/mL (7.84 +/-1.86 y 6.5 +/- 4.5, respectivamente), sin embargo la diferencia con respecto al control es significativa. No existieron diferencias estadísticas para la producción de IL-12 inducida por la subcepa BCG Moreau con respecto al control (Figura 14).

Dentro de las funciones de IL-12 está la maduración de células presentadoras de antígeno, además de ser necesaria para la producción de INF- $\gamma$  por parte de linfocitos T para la consecuente activación de macrófagos, los cuales adquieren mayor capacidad microbicida. Nuestros resultados sugieren que las subcepas BCG pueden tener estrategias para regular la producción de IL-12, una citocina central para la inmunidad adaptativa y la eliminación de bacterias intracelulares.



**Figura 14. Producción de IL-12 en sobrenadantes de macrófagos infectados con subcepas BCG, 24 y 72 h post-infección.** Macrófagos obtenidos a partir de la línea celular THP-1 se infectaron con distintas subcepas BCG a una relación 1:10. La concentración de IL-12 se determinó por ELISA en los sobrenadantes 24 y 72h post-infección. Control (+): macrófagos infectados con *E. coli*. Control (-): macrófagos sin infectar. \*  $p < 0.05$  Mann Whitney.

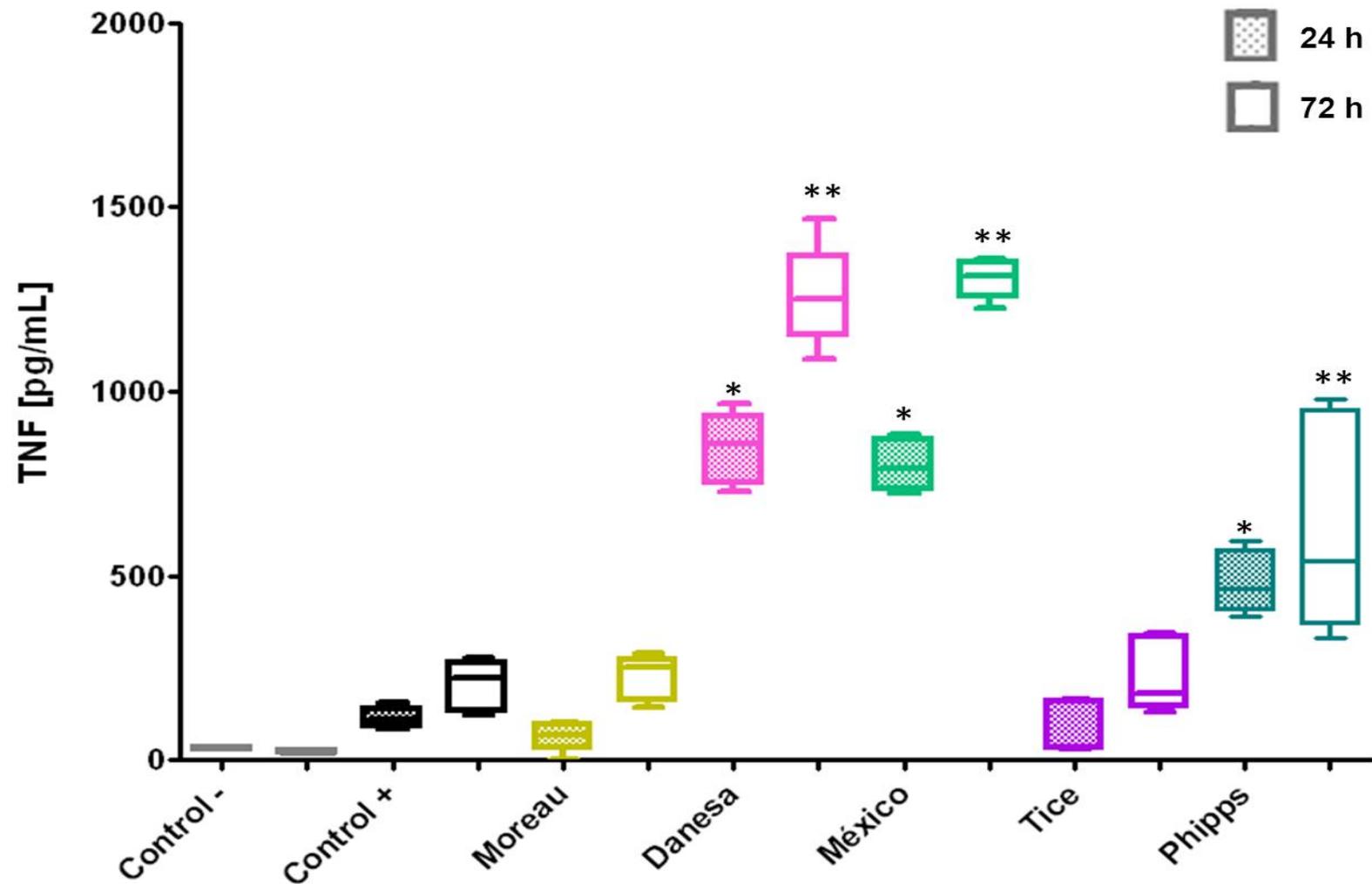
Las subcepas BCG Moreau, México y Phipps inducen una producción similar de IL-10 (de 100 a 150 pg/mL), mientras que la producción por la infección con BCG Danesa es ligeramente mayor (188.9 +/- 12.7 pg/mL) en comparación a estas, pero incrementa 10 veces la concentración de IL-10 comparada con el control (15.8 +/-12.5 pg/mL) (Figura 15). Se observó que incluso el control tiene una mayor producción de esta citocina en comparación con la infección por BCG Tice (10.45 +/- 4.5 pg/mL). Una de las funciones de IL-10 es disminuir la expresión de MHC-II con lo cual la maduración de células presentadoras de antígeno se ve reducida, al igual que la producción de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  por parte de linfocitos. Lo anterior puede afectar directamente en la activación de células como macrófagos y neutrófilos, así como en la formación de mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF, necesarios para mantener el proceso inflamatorio e inmunidad. Así, las subcepas BCG inducen la producción de IL-10 en diferente medida, proporcionando ventajas a aquellas subcepas que promuevan dicha citocina ya que se controlaría la respuesta inflamatoria, incluyendo la eliminación de las bacterias intracelulares.



**Figura 15. Producción de IL-10 en sobrenadantes de macrófagos infectados con subcepas BCG, 72 h post-infección.**

Macrófagos obtenidos a partir de la línea celular THP-I se infectaron con distintas subcepas BCG a una relación 1:10. La concentración de IL-10 se determinó por ELISA en los sobrenadantes 72h post-infección. \*  $p < 0.05$  Mann Whitney.

Mientras la BCG Phipps promueve una intermedia producción de TNF (540.5 +/- 254.3 pg/mL), la infección con BCG Moreau y Tice produjo la misma cantidad que el control (223.9 +/- 63.4 pg/mL) (Figura 16). La infección con BCG Danesa y México induce la mayor producción de TNF por los macrófagos (1311.8 +/- 48.5 pg/mL), casi 6 veces más que el control y más del doble que la subcepa BCG Phipps. Debido a la función dual de TNF en la sobrevivencia/apoptosis celular, la producción de esta citocina inducida por las BCG es fundamental para la eliminación de bacterias intracelulares y el desarrollo de la inmunidad adaptativa. La alta producción de TNF por los macrófagos infectados con BCG Danesa y México podría inducir mayor inflamación, sin embargo solo las BCG Danesa y Phipps son capaces de sobrevivir intracelularmente en los tiempos evaluados además de secretar citocinas inflamatorias, lo que sugiere que la activación de factores transcripcionales como NF- $\kappa$ B se realiza después del reconocimiento de estas subcepas.



**Figura 16. Producción de TNF en sobrenadantes de macrófagos infectados con subcepas BCG. 72h post-infección.** Macrófagos obtenidos a partir de la línea celular THP-I se infectaron con distintas subcepas BCG a una relación 1:10. La concentración de TNF se determinó por ELISA en los sobrenadantes 72h post-infección. \*  $p < 0.05$  Mann Whitney.

## DISCUSIÓN

A pesar de las diferentes investigaciones reportadas en los últimos años acerca de la protección conferida por la vacuna BCG, aún se desconocen muchos factores de los mecanismos que realiza el macrófago para la protección contra la tuberculosis. De acuerdo a los ensayos con las células HEK293, se observan dos grupos en el reconocimiento a través de TLR2, así, las Subcepas BCG Danesa, Tice y Phipps al ser reconocidas a través de TLR2 inducen la producción de IL-8, mientras que las subcepas Moreau y México inducen la producción de IL-8 a través de otros receptores en el macrófago como los de manosa, scavenger, NLR y RLR. Todas la subcepas BCG evaluadas son reconocidas a través de TLR4, sin embargo, este reconocimiento no es esencial para la producción de IL-8.

De las subcepas utilizadas en nuestra investigación, la subcepa México fue fagocitada en mayor proporción al compararla con las subcepas Danesa, Tice y Phipps que presentan un comportamiento similar.

La literatura señala diversos factores de virulencia de *M. tuberculosis* y su fagocitosis por el macrófago; aunque recientemente es cuando se trata de entender los mecanismos de las vías intracelulares que se desencadenan desde el reconocimiento de las mismas hasta su instalación o eliminación. En nuestros resultados observamos que la fagocitosis de la subcepa BCG México es mayor en comparación con el resto de las subcepas estudiadas, prácticamente al doble. Con excepción de la subcepa Moreau, el resto de las subcepas pertenecen a los grupos III y IV de la Genealogía refinada de las BCG (subcepas tardías) propuesta por Brosh y col. en el 2007. La superficie de la pared celular de las micobacterias (glicolípidos manosilados) desempeñan un papel importante en la regulación de la fagocitosis y la respuesta inmune, además se ha reportado que la pared celular de estos dos grupos es similar en presencia y composición de ácidos micólicos ( $\alpha$ -micólicos de 25-30% y ceto-micólicos de 70-75%) [Ueneshi 2009], por lo que se esperaría que el reconocimiento por parte del macrófago sea similar. Sin embargo, BCG Phipps presenta una cadena más larga de ácido ceto-micólico metoxilado, de 86 carbonos, en comparación con la cadena de 84 carbonos presente mayoritariamente en las BCG Danesa, México y Tice. La

presencia de este ácido monoenoico podría estar relacionada con el reconocimiento diferencial de BCG Phipps y por tanto, la inducción de una respuesta diferente por parte del macrófago, sin embargo, estudios más detallados sobre estructuras implicadas en el reconocimiento son necesarios. La subcepa Moreau, miembro del Grupo I de la Genealogía refinada, posee una pared celular compuesta por los tres tipos de ácidos micólicos ( $\alpha$ -, ceto- y metoxi-) al no presentar el polimorfismo de un nucleótido en el gen *mma3*, implicado en la síntesis de ácidos metoxi-micólicos [Hayashi 2009]. Por otro lado, la reciente secuenciación del genoma de la BCG México reveló que existen polimorfismos específicos para dicha subcepa. La región RDMex02 incluye la pérdida de 218 aminoácidos del gen *fadD23* (BCG3889), afectando una región conservada de la proteína que incluye dos dominios transmembranales. Este gen codifica para una probable acil-CoA ligasa de ácidos grasos involucrada en la degradación de lípidos y la producción de sulfolípidos por lo que la disrupción de este gen resulta en un incremento en la asociación de *Mtb* y macrófagos [Lynett 2007]. Estos datos podrían explicar en parte la variación en la fagocitosis de las subcepas BCG analizadas.

A las 24 h post-infección, la subcepa Tice presenta el mayor número de bacterias en el interior de macrófagos THP-I. Lo anterior puede relacionarse con la velocidad del crecimiento ya que la subcepa Tice alcanza en un tiempo menor su fase de crecimiento exponencial (Tabla 2), por lo que su duplicación es en menor tiempo que las otras subcepas analizadas, mientras que la BCG Danesa tiene el mayor tiempo de duplicación, por lo que la cuenta bacteriana intracelular es la menor a las 24 h. Estos valores en la tasa de crecimiento cambian a las 72 h, ya que se observa una disminución casi a la mitad de la población bacteriana en el interior de macrófagos. Estos datos sugieren que el elevado número de bacterias BCG Tice a las 24 h pudiera dar un mayor estímulo al macrófago para que lleve a cabo el estallido respiratorio, así; la alta producción de  $\cdot\text{ON}$  a las 72 h post-infección (Gráfico 4) se correlaciona con la considerable disminución en el número de bacterias BCG Tice intracelulares a las 72 h. La ventaja inicial de una rápida y mayor multiplicación en el interior del macrófago no se ve reflejada con la persistencia, ya que un mayor número de bacterias estimularía en

mayor medida la activación del estallido respiratorio, que elimina rápidamente a los patógenos intracelulares.

En el caso de la infección con BCG Moreau se observa un patrón similar al de BCG Tice, a las 24 h post-infección aumenta la carga bacteriana en el interior de los macrófagos y disminuye aproximadamente un 60% a las 72 h. Esto puede explicarse por la producción elevada de  $\cdot\text{ON}$ , que es más de 2.5 veces que la cantidad producida por los macrófagos infectados con BCG Phipps. Aunque su fagocitosis fue menor, logró multiplicarse en el interior del macrófago con una tasa intermedia entre BCG tice y BCG Phipps, y similar a la BCG México.

Diferentes mecanismos de sobrevivencia y persistencia se han descrito para micobacterias patógenas, desde manipular las señalizaciones de receptores implicados en el reconocimiento, evitar la maduración del fagosoma, neutralizar especies reactivas producidas en el estallido respiratorio o evitar que se produzcan, hasta manipular la secreción de citocinas anti-inflamatorias [Piddington 2001, Vergne 2005, Steinberg 2008, Hajishengallis 2011]. La infección con BCG Danesa y Phipps muestra que su duplicación desde las 24 h, es la más lenta de las subcepas estudiadas, se duplica apenas 1.5 veces. A las 72 h post-infección, su duplicación aumenta un 33%, su carga bacteriana no disminuye, continúa aumentando ligeramente. Esta multiplicación intracelular lenta y controlada parece pasar desapercibida por el macrófago, que no lleva a cabo la activación del estallido respiratorio, ya que la producción de  $\cdot\text{ON}$  es igual a la de macrófagos sin infectar (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para la BCG Phipps y en disminución para BCG Danesa. Su lenta duplicación en el interior del macrófago pudiera darles la ventaja de persistir por largo tiempo.

En estudios realizados en nuestro grupo de investigación, se demostró que las Subcepas BCG Danesa y BCG Phipps tienen patrones distintos de expresión de

proteínas implicadas en adaptación, virulencia, desintoxicación, metabolismo de lípidos y pared celular [Rodríguez-Álvarez 2009]. BCG Phipps produce en mayor proporción proteínas en respuesta a estrés oxidativo, como la AhpC involucrada en la respuesta contra especies reactivas de nitrógeno y la resistencia a izoniacida [Rodríguez-Álvarez 2009] que pudieran ayudarle a sobrevivir en el interior del macrófago, ya que la subcepa BCG Phipps es sensible al estrés nitrosativo [Hayashi 2010]. Lo anterior puede representar ventajas para la adaptación a medios adversos y cambios metabólicos, sin embargo hace falta realizar estudios que eluciden esto. Por otra parte, se ha relacionado que la inmunización con BCG Phipps confiere una mayor protección contra la tuberculosis pulmonar (>70%) [Fine 1999], demostrado también en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva [Castillo-Rodal 2006]. Para que exista una respuesta inmune protectora, la BCG debe persistir en los macrófagos [Orme, 1988; Kaufmann, 1995]; nuestros resultados muestran que la BCG Phipps es capaz de persistir en el macrófago y que existe una correlación con la baja producción de especies reactivas del nitrógeno, un mecanismo para eliminación de bacterias intracelulares, además de generar un ambiente inflamatorio favorable para la presentación de antígenos por la producción de IL-12 y TNF, pero controlado por la producción de IL-10.

Después del reconocimiento de patógenos por la familia de los TLRs, se activa la transducción de señales a través de moléculas adaptadoras, la más usada es MyD88, lo que lleva a la activación del factor NF- $\kappa$ B y de MAP cinasas como p38, ERK y JNK [Basak 2008], cuyos productos finales son citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias. Con las acciones de IL-10 descritas anteriormente, puede explicarse el fenotipo inducido por la infección con BCG Moreau. Considerando sólo los valores de las medianas, BCG Moreau induce alta producción de IL-10 a las 72h, lo que inhibe la producción de TNF. Se han descrito varios mecanismos para explicar este fenómeno: la ubiquitinación y degradación de moléculas de la señalización dependiente de MyD88 (IRAK-1, IRAK-4 y TRAF6) es regulada por IL-10 [Chang 2009]. Además se ha sugerido que IL-10 induce la traslocación del homodímero de NF- $\kappa$ B p50/p50, disminuyendo la transcripción de genes dependientes de NF- $\kappa$ B como citocinas pro-inflamatorias (TNF) y aumentando la

producción de IL-10 [Driessler 2004]. Así, la alta producción de IL-10 por la infección con BCG Moreau disminuye sustancialmente la producción de TNF a un nivel parecido al control. Sin embargo, la infección con las subcepas BCG Danesa y México inducen la mayor producción tanto de IL-10 como de TNF. Las diferencias observadas en la composición de la pared micobacteriana [Ueneshi 2009] podrían explicar lo anterior, ya que se ha demostrado que estructuras específicas en los ácidos micólicos como arabinosa, son responsables de la producción de TNF vía TLR2-MyD88 dependiente [Miyachi 2011]. Además, esta explicación es coherente también para la alta producción de IL-12 mostrada en la infección por estas dos subcepas BCG. Otras modificaciones estructurales de los componentes de la pared micobacteriana se han relacionado con la regulación en la síntesis de citocinas. Las formas tri -acetiladas de la lipomanana de BCG promueven la producción de IL-12 y NO usando proteínas adaptadoras como MyD88, a través de TLR2/TLR1 [Doz, 2007], mientras que la lipomanana en su forma di-acetilada induce la inhibición de producción de citocinas y NO en macrófagos activados con LPS. Así, las diferencias estructurales en la pared celular de BCG pueden alterar el reconocimiento a través de receptores, y a su vez, la respuesta del macrófago a la infección.

Nuestros resultados mostraron que el perfil mostrado por la subcepa BCG Phipps sugiere explicar su persistencia en el interior de macrófagos, el inducir una menor producción de óxido nítrico podría dar ventaja de no ser eliminada por estas especies reactivas, que se sabe, atraviesan la compleja pared micobacteriana y se unen al ADN, inhibiendo la duplicación [Rojas-Espinoza 2003]. También, la BCG Phipps produce en mayor proporción, al compararse con BCG Danesa, proteínas en respuesta a estrés oxidativo, que podrían contribuir en la sobrevivencia en el interior del macrófago [Rodríguez-Álvarez 2009]. Además, el óxido nítrico puede generar un ambiente inflamatorio en los alrededores pero al generarse poca cantidad de este oxidante y de IL-12, aunado a la producción de IL-10 (quizás por una vía independiente de MyD88) se generaría una respuesta tolerogénica. La mayor producción de TNF inducida por esta subcepa sugiere la posible inducción de apoptosis/autofagocitosis por los macrófagos

infectados [Miller 2010] con la BCG Phipps, lo que le ayudaría a esta subcepa a diseminarse a otras células hospederas y persistir en el tejido sin crear inflamación, además de favorecer la presentación de antígenos micobacterianos presentes en las vesículas apoptóticas.

## RESUMEN DE RESULTADOS

- Las BCG son reconocidas a través de TLR4 y BCG Danesa, Tice y Phipps son reconocidas a través de TLR2.
- Existen diferencias en la sobrevivencia de las subcepas BCG en el interior de macrófagos THP-I a las 24 y 72h.
- Las BCG Tice y Moreau activan la producción de óxido nítrico, que se correlaciona con la disminución de bacterias intracelulares a las 72 h; mientras que la multiplicación intracelular controlada de BCG Danesa y Phipps se relaciona con la baja producción de óxido nítrico inducida por estas subcepas.
- La subcepa BCG Tice induce la menor producción de IL-10.
- La alta producción de TNF por la BCG Phipps y Danesa podría darles ventajas en la persistencia.

## CONCLUSIÓN

Existen diferencias en la respuesta inmune innata de macrófagos humanos infectados con distintas subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG.

## PERSPECTIVAS

- Determinar las vías de señalización activadas a través de TLR2 y TLR4 en el macrófago infectado con *M. bovis* BCG.
- Ampliar el perfil de citocinas producidas por el macrófago y buscar correlación con las vías de señalización activadas por la infección de *M. bovis* BCG.
- Evaluar la activación y tipo de muerte celular producida por la infección de *M. bovis* BCG en el macrófago.

## ANEXO I

### REACTIVOS

HEPES 1M

-12 g de HEPES en 40 mL de dH<sub>2</sub>O. Ajustar pH 7.4 y llevar al aforo 50 mL

Solución stock de 2-Mercaptoetanol

Dilución 1:1000 en medio RPMI-1640

Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) 1L

-2 g de NaHCO<sub>3</sub>

-10.4g del polvo RPMI-1640

Disolver en aproximadamente 750 mL de dH<sub>2</sub>O

-9 mL de glucosa al 50%

-10 mL de piruvato de sodio 100mM

-10 mL de HEPES 1M

-4 mL de 2-Mercaptoetanol 1:1000

Llevar al aforo y filtrar por membrana 0.22µm. Conservar a 4°C

Medio RPMI-5

-Medio RPMI con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado a 60°C por 30 minutos

Medio RPMI-10

- Medio RPMI con 10% de SFB inactivado a 60°C por 30 minutos

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

-8.0 g de NaCl

-0.2 g de KCl

-1.15 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

-0.2 g de KHPO<sub>4</sub>

Ajustar pH 7.4 y llevar a 100mL con dH<sub>2</sub>O

Solución salina isotónica (SSI)

-0.9g de NaCl en 1 L de dH<sub>2</sub>O

Solución de lisis

-0.8766g de NaCl

-0.0372g de EDTA

-0.6057g de Tris

-500µL de Tritón X-100

-500µL de SDS

Llevar al aforo en matraz de 100mL.

#### Medio Middlebrook 7H10 Agar + Middlebrook OADC Enrichment

-Pesar 1.9 g del polvo 7H10 y disolver en 900 mL de H<sub>2</sub>O que contengan 5 mL de glicerol. Calentar con agitación constante y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 lb / 15 min).

-Agregar asépticamente 100 mL del medio de enriquecimiento OADC cuando la disolución se encuentre en 50-55°C. Vaciar en cajas Petri y esperar a solidificación. Evitar condensación. Almacenar a 4°C.

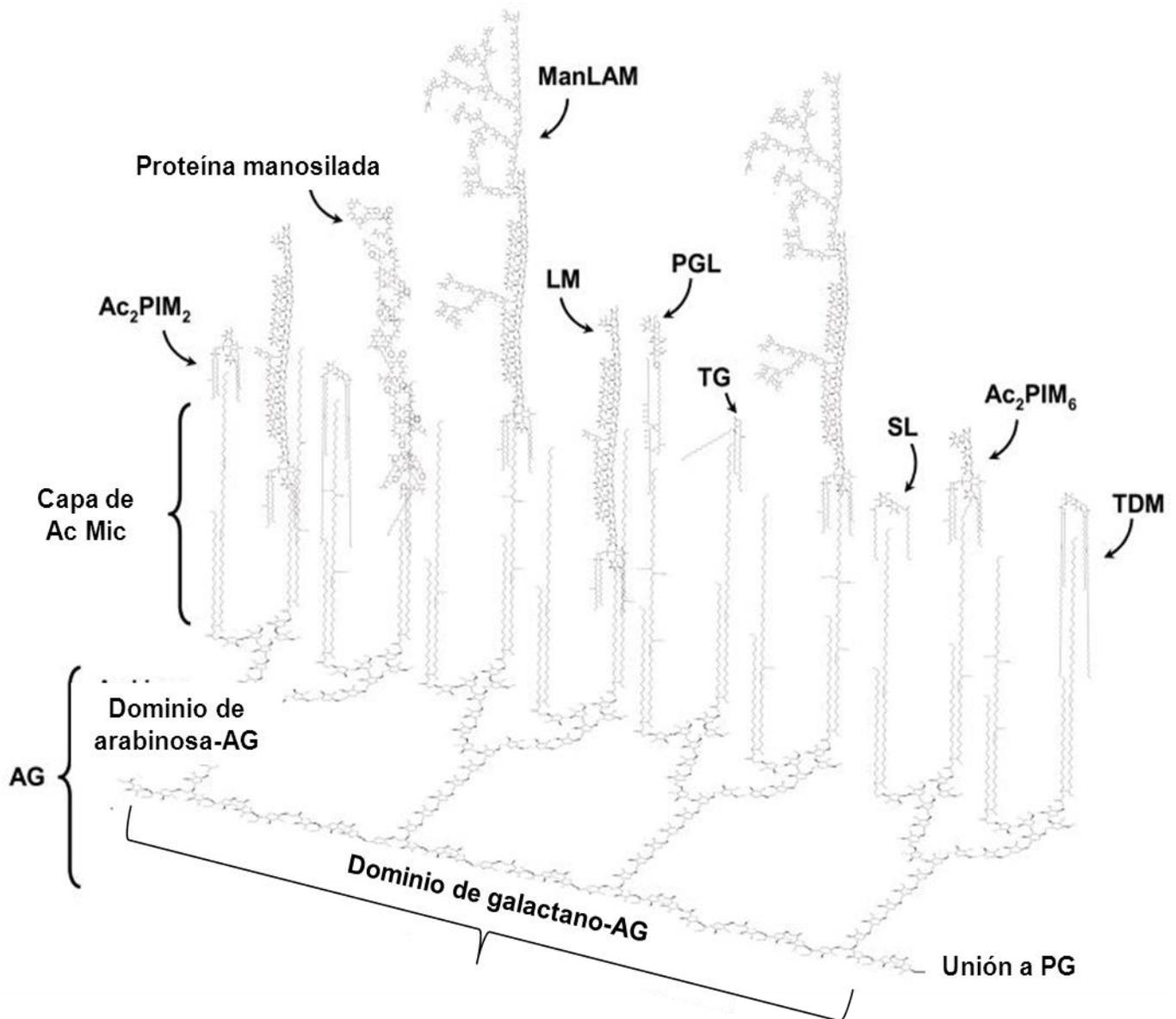
#### Medio Middlebrook 7H9 + Middlebrook ADC Enrichment

-Pesar 4.7 g del polvo 7H9 y disolver en 900 mL de H<sub>2</sub>O que contengan 5 mL de glicerol. Calentar con agitación constante y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 lb / 8 min).

-Adicionar asépticamente 100 mL del medio de enriquecimiento ADC cuando la disolución se encuentre a 45°C. Almacenar a 4°C.

ANEXO II

a) Pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* con énfasis en los componentes manosilados expuestos. Tomado de Torrelles, 2010.



Este esquema representa la envoltura celular (complejos de micolil-arabinogalactano-peptidoglicano) y hace hincapié en la distribución de los principales

componentes manosilados intercalados en la pared celular, que están expuestos en la superficie de *M. tuberculosis*. Arabinogalactano (AG) se une covalentemente a peptidoglicano (PG) a través de la cadena de galactano y la cadena de arabinosa está a su vez vinculada a los ácidos micólicos (Ac Mic) que se muestran perpendicular a la membrana plasmática.

Los grupos polares (es decir, dominios de hidratos de carbono) de varios componentes manosilados de la pared celular, están expuestos en la superficie de la célula y sus dominios de lípidicos están intercalados con la capa de Ac Mic. Estos componentes incluyen lipoarabinomannano unido a manosa (ManLAM), lipomannano (LM), fosfatidil-inositol manosido (PIM), y lipomanoproteínas.

También se representan otros factores de virulencia descritos para *M. tuberculosis* y que interactúan con la capa de Ac Mic (es decir trealosina dimicolato (TDM), sulfolípidos (SL), triglicéridos (TG) y glicolípidos fenólicos (PGL), este último sólo en algunas cepas de *M. tuberculosis*). No todos los Ac Mic que se representan interactúan con componentes de la superficie celular [Torrelles, 2010].

**b) Abundancia de ácidos micólicos y subclases de ceto-micolatos presentes en la pared celular de subcepas BCG, por Cromatografía Líquida de alto Rendimiento. Tomado de Ueneshi, 2009.**

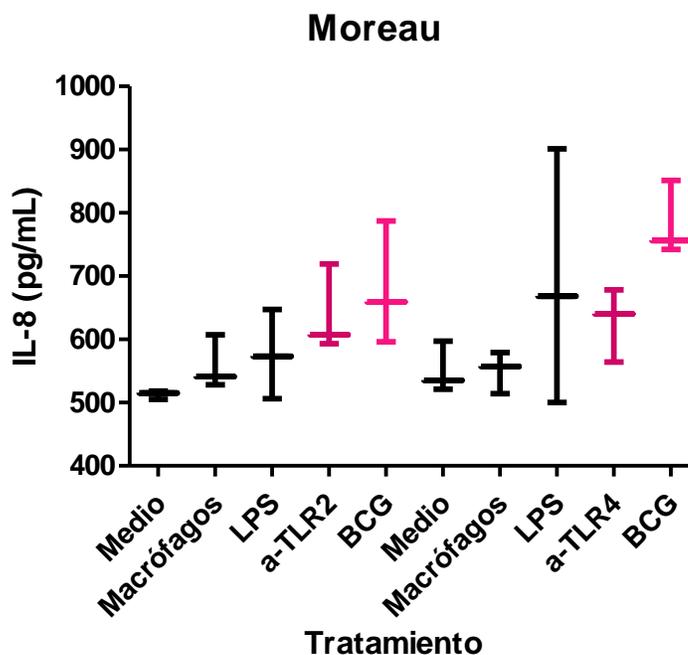
Subcepa BCG	Ácidos $\alpha$ -micólicos (%)	Ácidos ceto-micólicos (%)	Subclase ceto-micolato
Danese	31.2	68.7	84:1
México	28.1	71.8	84:1
Tice	29.0	71.0	84:1
Phipps	25.4	74.5	86:1

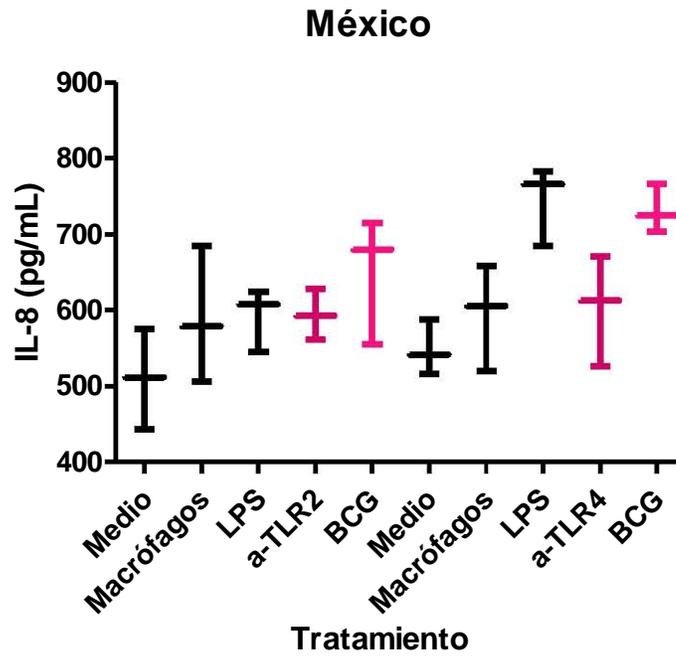
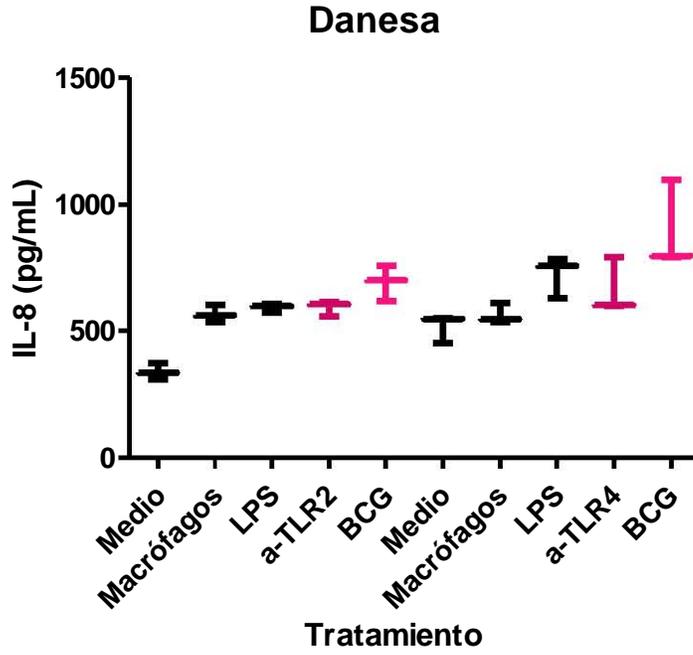
### ANEXO III

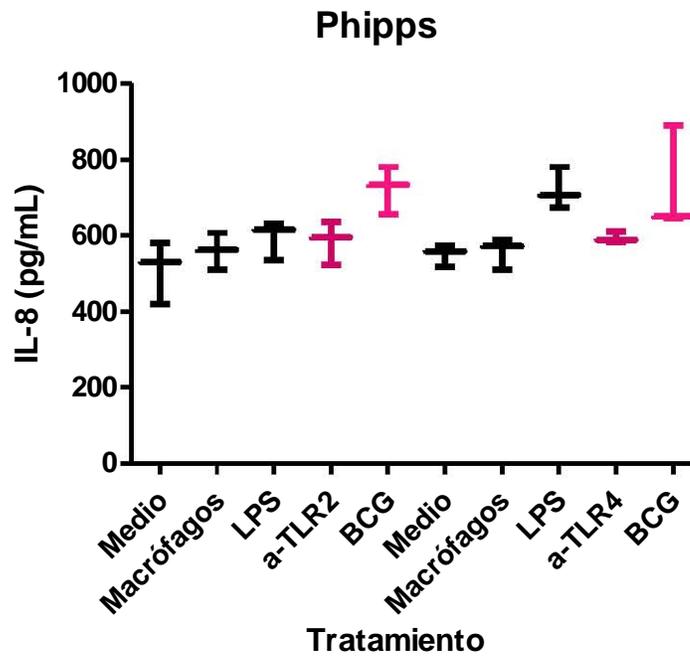
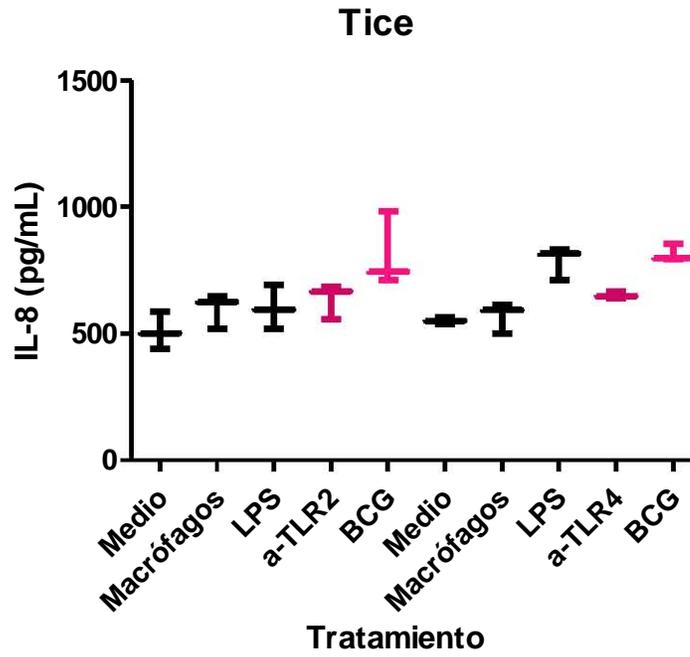
#### Uso de TLR medido a través de la producción de IL-8 por células HEK293 transfectadas con TLR2/4 e infectadas con diferentes subcepas BCG.

Para discernir si las subcepas BCG son reconocidas discriminadamente por TLR2 y 4, se evaluó la producción de IL-8 por células HEK 293 transfectadas con hTLR2-CD14 y hTLR4-MD2-CD14 e infectadas con las subcepas BCG Moreau, Tokio, Danesa, México, Tice y Phipps. Como controles o se utilizaron LPS y anticuerpos contra el TLR en cuestión.

Al utilizar el anticuerpo correspondiente contra cada TLR, se observa una disminución en la producción de IL-8. Sólo para BCG Danesa y Tice, al usar el  $\alpha$ -TLR2, no se observaron diferencias significativas en el estímulo producido. Por otra parte, cuando se emplea el  $\alpha$ -TLR4 con la subcepa Phipps, no hay diferencia en el estímulo producido.







## REFERENCIAS

- **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** (2011). "Cellular and molecular immunology". Philadelphia, PA: Elsevier.
- **Agger, E.M., Andersen, P.** (2001). "Tuberculosis subunit vaccine development: on role of interferon". Vaccine **19**: 2298-2302.
- **Agger, E.M., Andersen, P.** (2002). "A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure". Vaccine **21**: 7-14.
- **Andersen, P., Doherty, T.M.** (2005). "The success and failure of BCG implications for a novel tuberculosis vaccine". Nat Rev Microbiol **3**(8): 656-662.
- **Askgaard, D.S., Gottschau, A., Knudsen, K., Bennedsen, J.** (1995). "Firefly luciferase assay of Adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines". Biologicals **23**:55-60.
- **Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H., Remold, H.G.** (1998). "Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha2. J Immunol **161**:2636–41.
- **Bardoel, B.W., Strijp, J.A.G.** (2011). "Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity". J Mol Recognit **24**(6):1077-86.
- **Basak, S., Hoffmann, A.** (2008). "Crosstalk via the NF-kappaB signaling system". Cytokine Growth Factor Rev **19**:187–197.
- **Bean, A.G., Roach, D.R., Briscoe, H., et al. (1999).** "Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underline the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin". J Immunol **162**: 3504-3511.
- **Behr, M.A.** (2002). "BCG-different strains, different vaccines?". Lancet Infect Dis **2**: 86-92.
- **Behr, M.A., Small, P.M.** (1999). "A historical and molecular phylogeny of BCG strains". Vaccine **17**(7-8): 915-922.
- **Bhatt, K.** (2007). "Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*". J Clin Immunol **27**(4):347-462.
- **Brewer, T.F.** (2000). "Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature". Clin Infect Dis **31** Suppl 3: S64-S67.
- **Brewer, T.F., Colditz, G.A.** (1995). "Relationship between bacille Calmette-Guerin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis". Clin Infect Dis **20**(1): 126-135.
- **Brosch, R., Gordon, S.V., et al.** (2007). "Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy". Proc Natl Acad Sci USA **104**(13): 5596-5601.
- **Brosh, R., Gordon, S. V., et al.** (2007). "Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy". PNAS **104** (12):5596-5601.

- **Bruns, H., Meinken, C., Schauenberg, P., et al** (2009). "Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans". J Clin Invest 119:1167–77.
- **Castillo-Rodal, A. I., Castañon-Arreola M., et al.** (2006). "*Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis". Infect Immun 74(3):1718-24.
- **Chan, E. D., Chan, J., Schluger, N. W.** (2001). "What is the role of Nitric Oxide in murine and human defense against tuberculosis?". Am J Respir Cell Mol Biol 25:606-612.
- **Chang, J., Kunkel, S.L., Chang, C.H.** (2009). "Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells". Proc Natl Acad Sci USA 106:18327–18332.

Chapter 11 Human Interleukin-12-Interferon- $\gamma$  axis in protective immunity to mycobacteria. Claire Fieschi, Stéphanie Dupuis, Capucine Picard and Jean-Laurent Casanova.

Chapter 9 Regulation of cytokines and chemokines in human mycobacterium infection. Zahna Toossi and Jerrold J. Ellner.

- **Chow, S.S, Craig, M.E., Jones, C.A., Hall, B., Catteau, J., Lloyd, A.R., Rawlinson, W.D.** (2008). "Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection". Cytokine 44:78-84.
- **Colditz, G.A., Brewer, T.F., et al.** (1994). "Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature". JAMA 271(9): 696-702.
- **Cytokines and chemokines in infectious diseases handbook**, (2003). Humana Press.
- **Díaz-Silvestre, H., Espinosa-Cueto, P., Sánchez-González, A., et al.** (2005). "The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria". Microb Pathog 39(3):97-107.
- **Dietrich, J., Doherty, T. M.** (2009). "Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: consequences for vaccine development". APMIS 117:440-457.
- **Doz, E., Rose, S., Nigou, J., et al.** (2007). "Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan". J Biol Chem. 282(36):26014-25
- **Driessler, F., Venstrom, K., Sabat, R., et al.** (2004). "Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50". Clin Exp Immunol 135: 64–73.
- **Ehrt, S., Shnappinger, D.** (2009). "Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses". Cell Microbiol 11(8): 1170-1178.
- **Esquivel-Solís, H., Quiñones-Falconi, F., Zarain-Herzberg, A., Amieva-Fernández, R.I., López-Vidal, Y.** (2009). "Impaired activation of Stat1 and c-Jun as a possible defect in macrophages of patients with active tuberculosis". Clin Exp Immunol 158(1):45-54.

- **Fine, P.E., Rodriguez R.C.** (1990). "Modern vaccines. Mycobacterial diseases". Lancet **335**(8696):1016-1020.
- **Fine, P.E.M., Carneiro, Ilona A.M., Clements, C. Jhon.** (1999). "Issues relating to the use of BCG in immunization programmes". WHO, Genova.
- **Flesch, I. E. A, Hess, J. H., et al** (1995). "Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ ". J Exp Med **181**: 1615-1621.
- **Floyd, M.M., Silcox, V.A., Jones, W.D. Jr., Butler, W.R., Kilburn, J.O.** (1992). "Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by Using High-Performance Liquid Chromatography of Mycolic Acids". J Clin Microbiol **30**(5): 1327-1330.
- **Flynn, J.L., Chan, J.** (2001). "Immunology of tuberculosis". Annu Rev Immunol **19**: 93-129.
- **Gasque, P.** (2004). "Complement: a unique innate immune sensor for danger signals". Mol Immunol **41**(11):1561-1565.
- **Hajishengallis, G., Lambris, J. D.** (2011) " Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity". Nat Rev Immunol **11**(3):187-200.
- **Harris J., Hope, J.C., Lavelle, E.C.** (2009). "Autophagy and the immune response to TB". Transbound Emerg Dis **56**:248–54.
- **Harris, J., Hope, J.C., Keane, J.** (2008). "Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*". J Infect Dis **198**:1842–50.
- **Harris, J., Keane, J.** (2010). "How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity". Clin Exp Immunol **1**;161(1):1-9.
- **Hayashi, D., Takii, T., Fujiwara, N., Fujita, Y., Yano, I., Yamamoto, S., Kondo, M., Yasuda, E., Inagaki, E., Kanai, K., Fujiwara, K., Karawazaki, A., Chiba, T., Onozaki, K.** (2009). "Comparable studies of immunoestimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains". FEMS Immunol Med Microbiol **56**:116-128.
- **Hayashi, D., Takii, T., Mukai, T., Makino, M., Yasuda, E., Horita, Y., Yamamoto, R., Fujiwara, A., Kanai, K., Kondo, M., Kawarazaki, A., Yano, I., Yamamoto, S., Onozaki, K.** (2010). "Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains". FEMS Microbiol Lett **306**:103-109.
- **Ho, M. M., Markey, K., Rigsby, P., Jensen, S.E., Gairola, S., Seki, M., Castello-Branco, L.R. López-Vidal, Y. Knezevic, I., Corbel, M.J.** (2008). "Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine". Vaccine **26**:4754-4757.
- **Jensen, S. E., Hubrechts, P., Klein, B.M., Haslov, K.R.** (2008). "Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine". Biologicals **36**(5):308-314.
- **Jönsson, B., Ridell, M., Wold, A. E.** (2012). "Phagocytosis and cytokine response to rough and smooth colony variants of *Mycobacterium abscessus* by human peripheral blood mononuclear cells". APMIS **121**(1):45-55

- **Kaufmann, S. H. E.** (1995). "Immunity to intracellular microbial pathogens". Immunol Today **16**: 338-342.
- **Kawai, T., Shizuo, A.** (2007). "Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors". Trends Mol Med **13**(11):460-469.
- **Keane, J., Remold, H.G., Kornfeld, H.** (2000). "Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages". J Immunol **164**:2016–20.
- **Khader, S.A., Cooper, A.M.** (2008). "IL-23 and IL-17 in tuberculosis". Cytokine **41**:79–83.
- **Klingler, K., Tchou-Wong K.M., Brändli, O., Aston, C., Kim, R., Chi, C., Rom, W.N.** (1997). "Effects of Mycobacteria on Regulation of Apoptosis in Mononuclear Phagocytes". Infect Immun **65**(12):5272-5278.
- **Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR.** (2003). "Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation". J Infect Dis **187**(1):117–123.
- **Liu, J., Tran, V., et al.** (2009). "BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy". Hum Vaccin **5**(2): 70-78.
- **Marletta, M. A., Yoon, P. S., et al.** (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate; nitric oxide is an intermediate". Biochemistry **21**:8706-8711.
- **Martino, A.** (2008). "Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity". J Biosci **33**(1): 137-144.
- **Maureen, R. G., Vallyathan, V.** (2006). "Respiratory Burst: Role in Signal Transduction in Alveolar Macrophages". J Toxicol Environ Health B Crit Rev **9**(1):27-39.
- **Méndez-Sampeiro, P., Trejo, A., Pérez, A.** "*Mycobacterium bovis* BCG induces CCL5 secretion via the Toll-like receptor 2-NF- $\kappa$ B and –Jun N-terminal kinase signaling". Clin Vaccine Immunol **15**(2):277-283.
- **Mendoza-Coronel, E., et al.** (2010). "PD-L2 induction o dendritics cells exposed to *Mycobacterium avium* downregulateds BCG-specific T cell response". Tuberculosis **91**(1):36-46.
- **Miller, J.L., Velmurugan, K., Cowan,M.J., Briken, V.** (2010). "The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF- $\alpha$  mediated host cell apoptosis". PLOS Pathog **22**;6(4):e1000864
- **Minnikin, D.E., Parlett, J.H., Magnusson, M., Ridell, M., Lind, A.** (1984). "Mycolic Acid Patterns of Representatives of *Mycobacterium bovis* BCC". J Gen Microbiol **30**(10):2733-2736.
- **Moody, D.B., Sugita, M., Peters, P.J., Brenner, M.B., Porcelli, S.A.** (1996). " The CD-1 restricted T-cell response to mycobacteria". Res Immunol **147**:550–9.
- **Nava-Aguilera, E., et al.** (2009). "Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis". Int J Tuberc Lung Dis **13**(1): 17-26.
- **O'Neill, L.A.** (2006). "How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know". Curr Opin Immunol **18**(1):3-9.

- **O'Neill, L.A., Bowie, A.G.** (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling". *Nat Rev Immunol* **7**(5):353-364.
- **Oliviera, M. M., Charlab, R., Pessolani, M.C.** (2001). "*Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF- $\alpha$  secretion in human monocytic THP-1 cells". *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**(7):973-978.
- **Orduña, P., Cevallos, M.A., de León, S.P., et al.** (2011). "Genomic and proteomic analyses of *Mycobacterium bovis* BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection". *BMC Genomics* **12**:493-505.
- **Passmore, J.S., Lukey, P.T.** (2001). "The human macrophage cell line U937 as an in vitro model for selective evaluation of mycobacterial antigen-specific cytotoxic T-cell function". *Immunology* **102**:146-156.
- **Piddington, D. L., Fang, F. C., et al.** (2001). "Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst". *Infect Immun* **69**(8):4980–4987.
- **Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F., Tavernier, J.** (2008). "The many faces of the SOCS box". *Cytokine Growth Factor Rev* **19**:71–381.
- **Quesniaux, V.J., Nicolle, D.M., Torres, D., Kremer, L., Guérardel, Y., Nigou, J., Puzo, G., Erard, F., Ryffel, B.** (2004). "Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans". *J Immunol* **172**(7):4425-4434.
- **Raja, A.** (2004). "Immunology of tuberculosis". *Indian J Med Res* **120**:213-232.
- **Rajavelu, P., Ras, S.D.** (2007). "A correlation between phagocytosis and apoptosis in THP-1 cells infected with prevalent strains of *Mycobacterium tuberculosis*". *Microbiol Immunol* **51**(2):201-210.
- **Rodriguez-Alvarez, M., Mendoza-Hernández, G., Encarnación S., et al.** (2009). "Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level". *Tuberculosis* **89**(2):126-135.
- **Rojas-Espinoza, O.** (2003). "Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Tercera parte". *Bioquímica* **29**(2):55-67.
- **Sawant, K.B., Mc Murray, D.N.** (2007). "Guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis* produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures". *Infect Immun* **27**(4):1870-1877.
- **Schaible, U.E., Winau, F., Sieling, P.A. et al** (2003). "Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis". *Nat Med* **9**:1039–46.
- **Shah, A., Unger, E., Bain, M.D., Bruce, R., Bodkin, J., Ginnetti, J., Wang W.C., Seon, B., Stewart, C.C., Evans, S.S.** (2002). "Cytokine and adhesion molecule expression in primary human endothelial cells stimulated with fever-range hyperthermia". *Int J Hyperthermia* **18**(6):534-551.
- **Shin, D.M., Jeon, B.Y., Lee, H.M., et.al** (2010). "*Mycobacterium tuberculosis* Eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling". *PLOS Pathog* **16** ;6 (12) :e 1001230 .

- **Shiratsushi, H., Basson, M.D.** (2004). "Activation of p38 MAPK $\alpha$  by extracellular pressure mediates the stimulation of macrophage phagocytosis by pressure". *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C1083–C1093.
- **Steinberg, B. E., Grinstein, S.** (2008). "Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants". *J Clin Invest* **118**:2002–2011.
- **Theus, S. A., Cave, M. D., Eisenach, K.D.** (2004). "Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates". *Infect Immun* **72**(2):1169-73.
- **Trinchieri, G.** (1993). "Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells". *Immunol Today* **14**: 335-337.
- **Trinchieri, G.** (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity". *Nature* **3**: 133-146.
- **Trinchieri, G., Sher, A.** (2007). "Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence". *Nat Rev Immunol* **7**(3): 179-190.
- **Ueneshi, Y., Taki, T. Yano, I., Sunagawa, M.** (2009). "Separation and molecular characterization of mycolic acid from the cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 (SMP-105) and BCG substrains by normal-phase high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry". *J Microbiol Methods* **77**(3):320-322.
- **UNICEF.** (2011). "The State of the World's Children 2012: Children in an Urban World".
- **Velde, A.A. te, Waal Malefijt, R. de, Huijbens, R.J., et al.** (1992). "IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10". *J Immunol* **149**:4048–4052.
- **Vergne, I., et al.** (2005). "Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*". *Proc Natl Acad Sci* **102**: 4033-4038.
- **Waal Malefijt, R. de, Abrams, J., Bennett, B., et al.** (1991). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes". *J Exp Med* **174**:1209–1220.
- **Waal Malefijt, R. de, Haanen, J., Spits, H., et al.** (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression". *J Exp Med* **174**:915–924.
- **Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P.** (2003). "Tumor necrosis factor signaling". *Cell Death Differ* **10**:45–65.
- **Wallis, R. S., Ellner, J. J.** (1994). "Cytokines and tuberculosis". *J Leukoc Biol* **55**(5):676-681.
- **Wehinger, J., Gouilleux, F., Groner, B., Finke J., et al.** (1996). "IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes". *FEBS Lett* **394**:365–370.

- **Worku, S., Hoft, D.F.** (2003). "Differential Effects of Control and Antigen-Specific T Cells on Intracellular Mycobacterial Growth". *Infect Immun* **71**(4):1763-1773.
- **World Health Organization.** (2010). Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report, WHO/HTM/TB/2010.411
- **Yuzhalin, A.E, Kuthikin, A.G.** (2012). "Interleukin-12: Clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility". *Growth Factors* **30**(3):176-191.