



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS DE LICENCIATURA

Evaluación de Marcadores de Maduración en Macrófagos
Derivados de Monocitos en Respuesta a PIM₆ Proveniente de
Mycobacterium tuberculosis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

Cuautle Zavala Ana Beatriz

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. María Isabel Sada Ovalle

ASESOR INTERNO:

Dr. Hugo López Muñoz



México D.F., 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **CUAUTLE ZAVALA ANA BEATRIZ**, con número de cuenta **308018071**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **22 de septiembre de 2015** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

VOCAL Dra MARÍA ISABEL SADA OVALLE*

SECRETARIO Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

[Handwritten signatures and marks on the right side of the page, including a large signature at the top and several smaller ones below.]

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación de Marcadores de Maduración en Macrófagos Derivados de Monocitos en Respuesta a PIM₆ Proveniente de *Mycobacterium tuberculosis*.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 05 de agosto de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

[Handwritten signature]
VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS

Cuando se llega al final de una meta que te has propuesto te preguntas ¿cómo pudiste llegar tan lejos? y te das cuenta de que definitivamente no podrías haberlo hecho tu solo, así que cuando pienso en las personas que han sido fundamentales en mi vida, la primera en llegar mi mente es mi madre a quien le debo todo lo que soy y tengo, por ser el pilar fundamental de mi vida, esa hermosa persona tan insistente y maravillosa a la que le agradezco el recordarme en cada momento de flaqueo que todo esfuerzo en esta vida vale la pena. Mi padre que con tan pocas palabras ha sido un recordatorio permanente de que debemos ver la vida del lado más amable que nos muestre y por ser capaz de generar en cualquier persona tantas emociones encontradas. Gracias infinitas a ambos por todo (en especial por aguantar mi peculiar carácter) y por jamás quejarse su buena a mala hija quien este día les dedica su tesis.

Junto a ellos está mi familia que me ha brindado todo su apoyo y cariño, como mi querida Tía Evelia y mis hermanas a quienes amo con todo mi corazón: Claudia por ser mi mejor amiga y el mejor complemento espiritual de mi vida, Beli San por brindarle alegría a toda la familia con tu auténtica forma de ser y Rosalin porque sabes que la distancia no borra el cariño y que el cariño para ti es perenne. No saben lo importantes que son para mí y aunque la mayoría de las veces no soy lo suficientemente expresiva... es bueno que sepan que hoy y siempre quiero verlos felices.

A la Dra. Isabel Sada por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartirme sus experiencias y conocimientos, en especial, por mostrarme la parte más humana de la ciencia y ser el mejor ejemplo de que un investigador es capaz de cumplir íntegramente en todos los aspectos de la vida: personal, familiar y profesionalmente.

A todas aquellas personas que conocí en el pasado y que influyeron consciente o inconscientemente en mi desarrollo personal y profesional....Gracias.... A ti Jess Juan por ser una gran amiga durante estos años (perdón por siempre vivir al pendiente del reloj) y también gracias a todos y cada uno de mis nuevos compañeros... ahora amigos del "Lab. Inmunología integrativa": Luis Bolaños, Ranferi, Mirelle, Dra. Lucero, Sra. Josefina y José Luis de quienes aprendí muchas cosas y me brindaron su apoyo en este último año, en especial y con gran cariño Paola Salinas y Eugenio Contreras

Por último, pero no menos importante, un agradecimiento especial a una persona que el destino se encargó de poner en mi camino hace algunos años y que me ha brindado todo su apoyo incondicionalmente. Gracias Ricardo Gen, porque sé que empezar de cero no es fácil, por enseñarme a ser tolerante, paciente y por cada momento que me has dejado compartir a tu lado.

Un Canto de Alegría

*TE MIRO ACARICIAR EL AIRE
CON TU NATURALEZA DE LUZ
PUES NO APRECIARTE SERÍA UN DESAIRE
MARAVILLOSA CHISPA DE LUZ*

*QUE FELIZ SERIA YO
SI TU CANTO PUDIERA ILUMINAR AL MUNDO
Y LAS LÁGRIMAS DE DOLOR, SE HICIERAN RISAS
Y LAS TRISTEZAS, DE ALEGRÍA SE HICIERAN LLANTO*

*CHISPA DE LUZ QUE ATRAVIESA EL AIRE
PAPALOTE HECHO DE TUL
QUE VUELAS POR EL AIRE
TRINO QUE BAJA DEL CIELO AZUL*

*QUE SENTIRÍAN LO CORAZONES DEL MUNDO
SI AL UNÍSONO, PUDIERAN ESCUCHAR TU CANTO
CUANTA GENTE EXPERIMENTARÍA ALEGRÍA
Y CUANTA GENTE OLVIDARÍA SU LLANTO*

*DESLÍZATE FELIZ
QUE TE BESE EL AIRE EN SU EMBELESO
QUE MAÑANA LLEGARA LA AURORA
PARA DARTE NUEVAMENTE UN BESO*

*AVE LINDA CON ALAS DE ABANICO
QUE ACARICIAS EL CIELO QUE TE BAÑA
Y QUE ILUSIONAS AL POBRE, IGUAL QUE AL RICO
PARA LA FÉ, SIEMPRE EXISTIRÁ UN MAÑANA*

*HA INICIADO UN NUEVO DÍA
Y ME LLENO DE TU LINDO CANTO
HOY NADA SERÁ TRISTEZA, TODO SERÁ ALEGRÍA
TODO SERÁ ALEGRÍA Y NADA SERÁ LLANTO*

*YA EL SOL QUIERE DESPERTAR AL DÍA
PARA DARLE NUEVAMENTE UN BESO
Y DE LO QUE AYER ME HACÍA PRESO
HOY RECOBRARE MI FE Y MI ALEGRÍA*

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Integrativa perteneciente a la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) bajo la dirección de la Dra. María Isabel Sada Ovalle.

México D.F., 2015

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
1 MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Epidemiología.....	3
1.2 Transmisión de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.3 Componentes Estructurales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1.4 Componentes Ricos en Arabinosa y Galactosa.....	9
1.5 Componentes Ricos en Manosa.....	9
1.6 Respuesta Inmune Innata.....	12
1.7 Receptores de Dominio de Oligomerización por unión de nucleótidos (NOD)	14
1.8 Receptores Scaveger (SR).....	15
1.9 Receptores de Lectina Tipo C (CLRs).....	15
1.1.1 Receptores Tipo Toll (TLRs).....	15
1.1.2 Fusión Fagolisosomal.....	16
1.1.3 Secreción de Citocinas.....	17
1.1.4 Respuesta Inmune Adaptativa.....	19
1.1.5 Células T CD4.....	19
1.1.6 Células T CD8.....	20
1.1.7 Granuloma.....	21
1.1.8 Estrategias de Evasión	24
2 JUSTIFICACIÓN	26
3 HIPÓTESIS	26
4 OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos	27
5 MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Diseño experimental.....	28
5.2 Obtención de Células Mononucleares (CMN).....	28
5.3 Purificación de Monocitos y Diferenciación a Macrófagos.....	28
5.4 Estimulación <i>in vitro</i> de Monocitos y Macrófagos con antígenos de <i>M. tuberculosis</i>	29
5.5 Análisis de Pureza.....	29
5.6 Citometría de Flujo Multiparamétrica.....	29
5.7 Cuantificación de TNF- α e IL-1 β por inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)	30
5.8 Análisis Estadístico.....	31
6 RESULTADOS	32
7 DISCUSIÓN.....	50
8 CONCLUSIÓN	54
9 PERSPECTIVAS	54
10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

ABREVIATURAS

APC	Célula Presentadora de Antígeno	MR	Receptor de Manosa
AraLAM	Lipoarabinomanana Cubierta de Arabinosa	NK	Célula Natural Killer
BCG	Bacillus de Calmette y Güerin	iNKT	Célula T Natural Killer invariante
CD	Célula Dendrítica	NOD	Dominio de Oligomerización por Unión de Nucleótidos
CMN	Células Mononucleares	PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
ESAT-6	Diana Antigénica secretora Temprana de 6 kDa	PG	Peptidoglucano
HLA	Antígeno Leucocitario Humano	PI	Fosfatidilinositol
IL-12p40	Interleucina 12p40	PIM	Manósido de Fosfatidilinositol
IL-1α	Interleucina 1 alpha	PIM₆	Manósido de Fosfatidilinositol 6
IL-1β	Interleucina 1 beta	PIMLAM	Manósido de Fosfatidilinositol Cubierto de Lipoarabinomanana
IL-2	Interleucina 2	PPD	Derivado Protéico Purificado
IL-6	Interleucina 6	RNI	Intermediarios Reactivos de Nitrógeno
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia	ROI	Intermediarios Reactivos de Oxígeno
INF-γ	Interferón gama	SFB	Suero Fetal Bovino
LAM	Lipoarabinomanana	SR	Receptor Scavenger
LM	Lipomanana	TACO	Proteína Triptofano de la Cubierta que Contiene Aspartato
LPS	Lipopolisacárido	TBP	Tuberculosis Pulmonar
T CD4	Linfocito T CD4	TCR	Receptor de Célula T
T CD8	Linfocito T CD8	Th1/2	Linfocito T Cooperador Tipo 1/2
MΦ	Macrófagos alveolares	TLR	Receptor Tipo Toll
ManLAM	Lipoarabinomanana Cubierta de Manana	TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alpha
MHC I/II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I/ II	VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

La tuberculosis pulmonar es una de las enfermedades más antiguas que se conocen y una de las que más muertes han ocasionado a lo largo de la historia. Es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, quien es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos del hospedero y posee la capacidad de modular la respuesta inmunológica. En la infección activa, los monocitos son reclutados al pulmón y se diferencian en macrófagos, siendo las principales células en ser infectadas y responsables de la producción de sustancias microbicidas que contribuyen al control del crecimiento micobacteriano activando la respuesta adaptativa del hospedero. Las grandes cantidades de lípidos presentes en la pared celular de la micobacteria juegan un papel importante en términos de su virulencia; es por ello que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del Manósido de Fosfatidilinositol 6 (PIM₆) sobre la diferenciación de monocitos CD14⁺ a macrófagos maduros, evaluándose mediante citometría de flujo el porcentaje e intensidad media de fluorescencia de la expresión de moléculas críticas en la presentación antigénica, tal es el caso de HLA-DR, CD68, CD80, CD86, TLR2, TLR4, TNFR1 y TNFR2. Adicionalmente se evaluó la capacidad funcional de éstas células mediante la cuantificación de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β . Los resultados obtenidos muestran que PIM₆ indujo cambios en la expresión de dichas moléculas durante el proceso de diferenciación de los monocitos, modulando negativamente su expresión y presentando una respuesta diferencial en función de la secreción de citocinas de una manera concentración dependiente. Con lo cual se concluye de manera preliminar que PIM₆ es un importante modulador de la maduración monocítica, teniendo impacto en la calidad de la respuesta inmunológica que por consiguiente intervendría en la diseminación de la infección.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Epidemiología

La tuberculosis es una enfermedad antigua que afecta principalmente las vías respiratorias, causada por una bacteria aerobia llamada *Mycobacterium tuberculosis*. La tuberculosis pulmonar (TBP) es la forma más frecuente de ésta enfermedad y es considerada la segunda causa de mortandad a nivel mundial, después de la infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) debido a un agente infeccioso. En el año 2013, la Organización Mundial de la Salud reportó que 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis y que 1.5 millones fallecieron como consecuencia de este padecimiento; ocurriendo más del 95% de estas defunciones en países en vías de desarrollo, teniendo mayor prevalencia en mujeres de entre 15 y 44 años. En ese mismo año, el mayor número de casos ocurrieron en Asia Sudoriental y en regiones del Pacífico Occidental, a las que correspondió el 56% de los casos nuevos en el mundo (Figura 1). No obstante, África reportó la mayor tasa de incidencia con más de 280 casos por cada 100 000 habitantes (OMS, 2015).

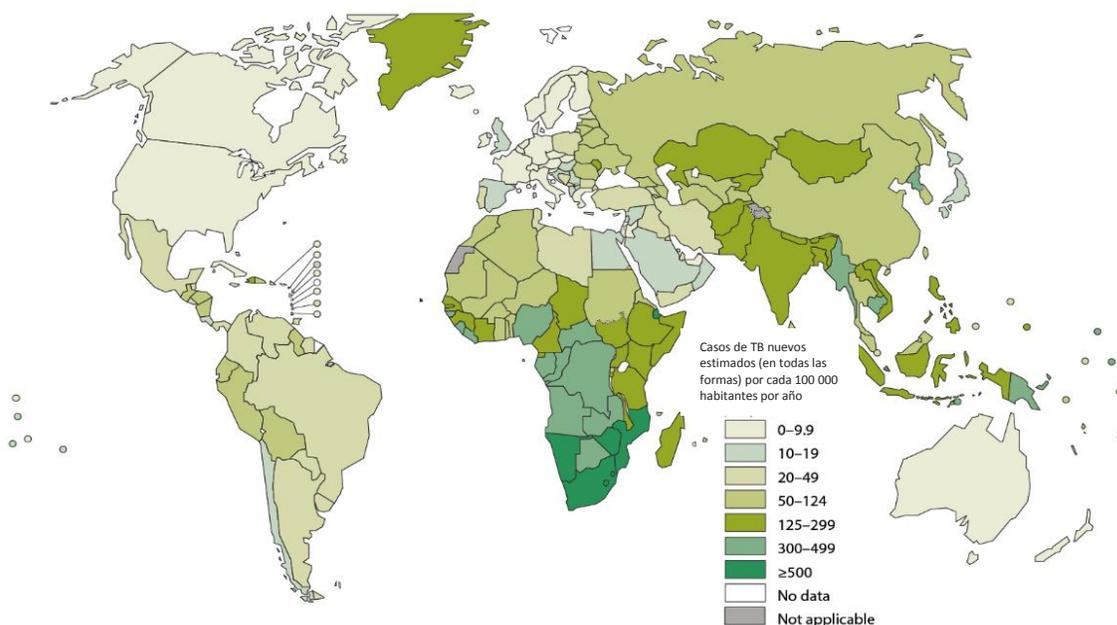


Figura 1. Incidencia de Tuberculosis a nivel mundial en el año 2013 (OMS, 2015).

En el caso de México para el año 2012 se reportó un total de 21 426 casos de tuberculosis en todas sus formas (81% pulmonares, 17.8% extrapulmonares y 1.5% meníngeas), siendo Baja California Norte, Sonora, Veracruz y Chiapas los estados que mostraron tasas superiores a 3 muertes por 100 000 habitantes (Figura 2) (Cenaprece, 2013).

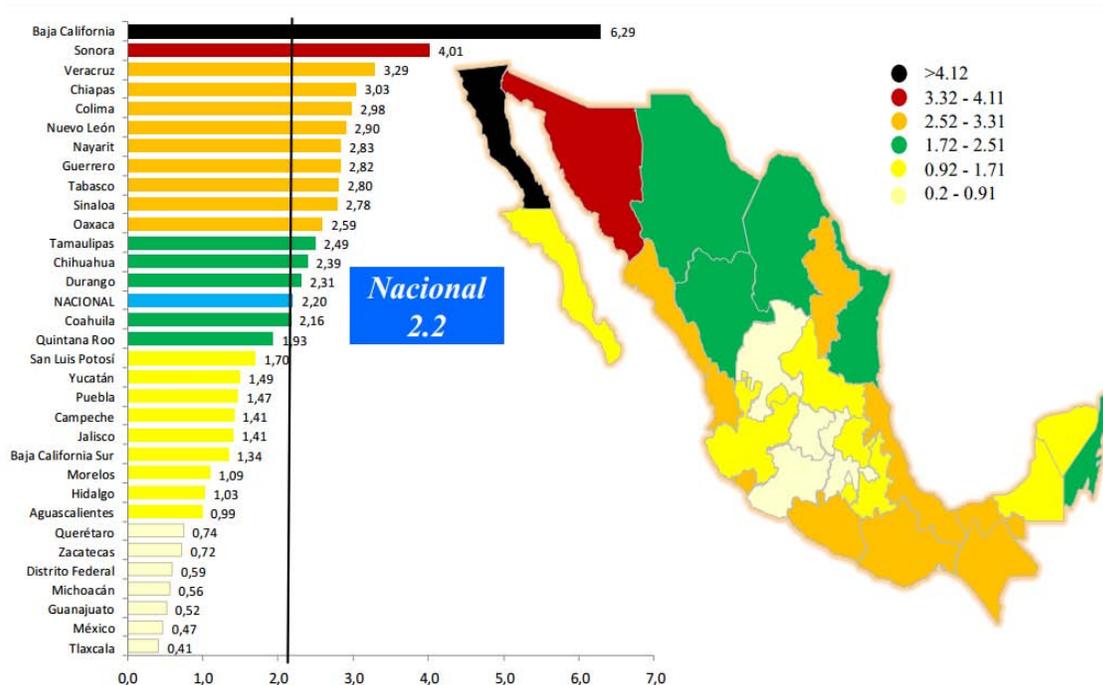


Figura 2. Mortalidad Reportada en México por Tuberculosis en todas sus formas (Cenaprece, 2013).

Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo del 10% de desarrollar la enfermedad en algún momento de la vida (Allepuz *et al.*, 2015); sin embargo, este riesgo incrementa en personas que cursan con algún estado de inmunodeficiencia, como ocurre en los pacientes con infección por VIH (en quienes la tuberculosis es la principal causa de muerte), desnutrición, alcoholismo, cáncer, diabetes mellitus y en aquellas personas que consumen tabaco, ya que más del 20% de los casos de tuberculosis son atribuibles a este hábito. Aunado a esto, se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, están infectadas por el bacilo, pero aún no han enfermado ni son capaces de transmitir la infección dado que su sistema inmunológico actúa formando una barrera de contención a la bacteria.

En 1921, la vacuna *Mycobacterium bovis* BCG, desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin, se utilizó por primera vez en seres humanos y actualmente sigue siendo la única vacuna contra la tuberculosis en todo el mundo; consiste en la administración intradérmica de BCG a los bebés poco después del nacimiento, la cual protege parcialmente contra la forma infantil de la enfermedad y contra algunas formas graves tales como la tuberculosis meníngea y tuberculosis miliar. Sin embargo, se ha demostrado que la eficacia de ésta vacuna disminuye con el tiempo y ofrece poca o ninguna protección contra la TBP en adolescentes y adultos (Cheng & Schorey, 2013).

1.2 Transmisión de *Mycobacterium tuberculosis*

La transmisión del bacilo se produce casi exclusivamente por medio de núcleos suspendidos en pequeñas gotas que son expulsadas con el estornudo y la expectoración de las personas afectadas con TBP. Estas pequeñas gotas pueden permanecer infectantes en el aire y ser inhaladas por otras personas; mientras que la infección por contacto es más probable cuando se convive o se permanece durante tiempo prolongado cerca del enfermo que expectora y en un ambiente poco ventilado; además se calcula que a lo largo de un año, un enfermo de tuberculosis puede infectar de 10 a 15 personas por contacto estrecho. Entre los síntomas más comunes se encuentran la tos productiva (a veces con sangre en el esputo), dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre, escalofríos y sudores nocturnos que varían en intensidad a lo largo de meses (CDC, 2015).

En 1890 Robert Koch observó que individuos infectados por *M. tuberculosis* experimentaban una reacción inflamatoria localizada cuando se les inyectaba por vía intradérmica un filtrado derivado del cultivo de micobacterias, PPD (Purified Protein Derivative), denominó a esta reacción cutánea localizada “reacción a la tuberculina”, la cual es una reacción de tipo tardía o tipo IV refiriéndose a su inicio postergado y a la lesión tisular inducida, la cual, actualmente es una de las pruebas estándar para la detección de la tuberculosis latente (Kind *et al.*, 2007).

La manera habitual de diagnosticar la TBP ha sido por medio de la baciloscopia del esputo, este método de rápido diagnóstico se lleva a cabo mediante la técnica de coloración Ziehl-Neelsen que posee la ventaja de ser económica y eficiente para identificar los casos infecciosos, sin embargo, el estándar de oro sigue siendo el cultivo de la micobacteria. Para que la baciloscopia resulte positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo entre 5 000 y 10 000 bacilos por mililitro ya que este alto contenido de micobacteria se encuentra presente en los pacientes con enfermedad activa, especialmente en aquellos con estadios avanzados y con lesiones cavitadas (OPS, 2008).

La enfermedad es tratable mediante diferentes combinaciones de antibióticos a los cuales es sensible la bacteria; sin embargo, recientemente se han identificado cepas que presentan resistencia a por lo menos un medicamento, lo que ha desencadenado la llamada tuberculosis multifármaco resistente para la cual en el año 2013 se notificaron 480 000 casos, 50% de ellos identificados en India, China y la Federación de Rusia. En esta variante de la enfermedad, la cepa no responde al tratamiento con isoniazida y rifampicina (medicamentos antituberculosos de primera con mayor eficacia), no obstante puede tratarse y ser curable con medicamentos inyectados de segunda línea como amikacina, capreomicina y kanamicina (OMS, 2015). Con base en lo anterior y a pesar de que el número aproximado de personas que enferman de tuberculosis cada año ha disminuido, la tasa de incidencia ha ido en decremento muy lentamente.

1.3 Componentes Estructurales de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis, es una bacteria en forma de bacilo, inmóvil, sin generación de esporas, del orden *Actinomycetae*, perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*, en la que se ha observado una modificación en su pared celular por su alto contenido lipídico con respecto a las bacterias Gram positivas, por lo cual son denominadas bacterias ácido-alcohol resistentes (Koneman, 2008), con una longitud aproximada de 3 - 5 μm y 0.2 - 0.6 micras de ancho (Figura 3), el cual es un tamaño comparable con el diámetro del núcleo de un linfocito.

Hoy en día existen reportadas aproximadamente 39 295 cepas de *M. tuberculosis* en 122 países, entre las que se incluyen a *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*; las cuales se encuentran filogenéticamente relacionadas ya que su estructura y pared celular son muy similares (Brudey, 2006). El género *Mycobacterium* presenta aproximadamente 30 diferentes compuestos antigénicos que desencadenan reacciones de hipersensibilidad y pueden dividirse en dos grandes grupos: los solubles o citoplasmáticos e insolubles ligados a la pared celular (Ramírez *et al.*, 2002). Estas moléculas pueden activar diferentes vías de señalización en la célula hospedera y son capaces de inducir un amplio espectro de funciones que incluyen activar o inhibir mecanismos efectores de la respuesta inmune para controlar o perpetuar la infección.



Figura 3. Microscopía electrónica de *M. tuberculosis* (Palomino *et al.*, 2007).

La envoltura de *M. tuberculosis* se encuentra constituida por una cápsula, pared celular y una membrana plasmática (Figura 4). La cápsula representa la capa externa de la envoltura y cumple la función de proteger contra múltiples factores externos, además, es de gran importancia ya que tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune innata (Sköld & Behar, 2008). Entre sus principales componentes se encuentran el ácido micólico (que contribuye al carácter hidrofóbico de la envoltura) y glicolípidos, éstos junto con algunas proteínas conforman del 10 al 15% del peso seco del bacilo y son responsables en parte de las características antigénicas que la bacteria posee (Gorocica *et al.*, 2005).

La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula, separada por un espacio periplasmático y posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) que constituyen más de la mitad del peso seco de las micobacterias confiriéndole un

carácter hidrofóbico (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011), haciéndola resistente al ataque por hidrólisis enzimática y se encuentra constituida por un complejo macromolecular formado por ácidos micólicos/arabinogalactano/peptidoglicano. Además, se encuentran presentes algunas proteínas en la superficie celular o incrustadas a través de la misma pared como en el caso de las porinas, que permiten el paso de solutos como ácidos grasos, carbohidratos, alcoholes, aminoácidos esenciales, fosfatos y sulfatos (Cook *et al.*, 2009), mientras que otras son secretadas y encontradas en el medio de cultivo o en suero de pacientes con TBP tal es el caso de ESAT-6 y CFP-10 (Smith, 2003).

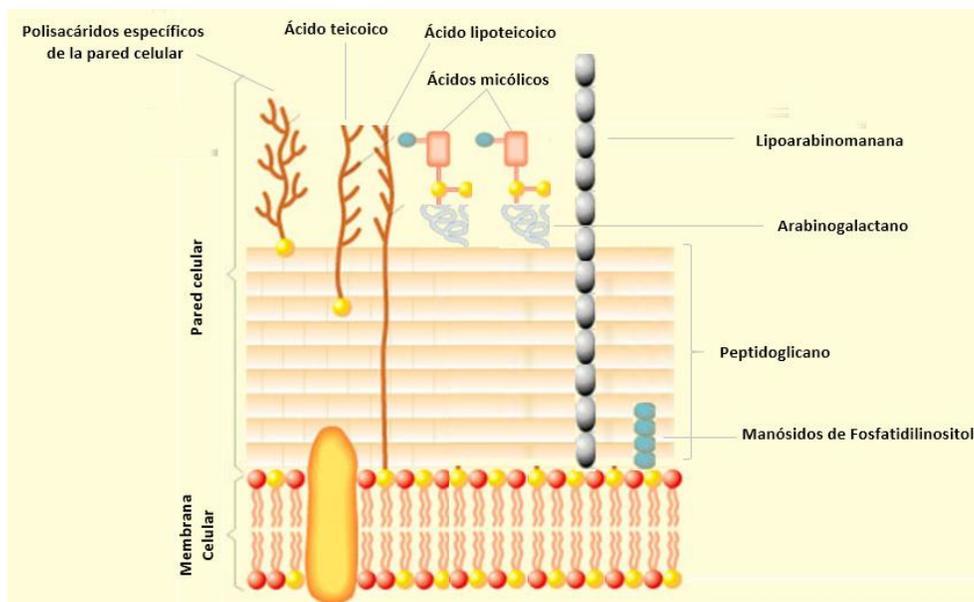


Figura 4. Estructura de *Mycobacterium tuberculosis* (En línea, 2015 [modificado])
<http://iesicaria.xtec.cat/~DCN/BiologiaCurtis/Seccion%205/5%20-%20Capitulo%2027.htm>

Por otra parte, la membrana celular posee las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, representando un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis pues proporciona las características específicas del género: resistencia a los ácidos, hidrofobicidad extrema, resistencia a las lesiones, incluyendo las inducidas por muchos antibióticos y propiedades inmunológicas definidas. Los componentes mayoritarios son lípidos asociados a carbohidratos (glicolípidos) o carbohidratos complejos sustituidos con ácidos micólicos o péptidos que a su vez pueden actuar como reservas de carbono y energía; sin

embargo, la composición lipídica del bacilo puede variar durante su ciclo de vida en cultivo y la lenta tasa de crecimiento que algunas especies presentan está dada mediante la restricción de la absorción de nutrientes (Palomino *et al.*, 2007).

1.4 Componentes Ricos en Arabinosa y Galactosa

En las micobacterias el arabionogalactano, representa cerca del 35% de la composición de su pared celular. Este disacárido se encuentra compuesto D-galactofuranosa y D-arabinofuranosa y se considera necesario para la formación de uno de los componentes de mayor importancia estructural, el péptidoglicano (PG), que se encuentra en la pared de todas las bacterias y las protege de la lisis osmótica. Las características estructurales que constituyen al PG lo hacen altamente inmunogénico y por tanto forma parte de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Gorocica *et al.*, 2005).

1.5 Componentes Ricos en Manosa

Las micobacterias presentan gran cantidad de fosfolípidos, los cuales se encuentran de manera abundante en la estructura de todas las membranas y pueden formar parte de moléculas con funciones biológicas definidas, tal es el caso de los Manósidos de Fosfatidilinositol (PIM) y la Lipoarabinomanana (LAM); para las cuales, su base estructural es el fosfatidil-inositol (PI). Éstas moléculas se unen a la cara externa de la membrana celular micobacteriana y producen un enlace no covalente entre la membrana y la pared celular, además pueden tener abundantes residuos de manosas y otros carbohidratos como la arabinosa (Koneman, 2008).

La estructura general de LAM, el cual es el factor de virulencia lipídico mejor caracterizado de *M. tuberculosis*, presenta una región común para todas las especies de *Mycobacterium*, con ligeras variaciones en la parte glicosilada, específica en cada cepa y especie. Ésta molécula consta de unidades repetitivas de D-manana y D-arabinana que se extienden a lo largo de su superficie y cuenta con algunos residuos de carbohidratos ramificados, formando dominios terminales conocidos como “camping motif”, asociados a las características de crecimiento y virulencia. Existen dos estructuras terminales en la LAM de las micobacterias, una

con residuos de manosa denominada ManLAM asociada a especies y cepas patógenas, y una segunda estructura carente de residuos de manosa terminal, teniendo en su lugar una molécula de PI y una arabinosa, denominándose PIMLAM o AraLAM respectivamente, asociadas principalmente a especies y cepas no patógenas, con crecimiento rápido en cultivo (Gorocica *et al.*, 2005).

Por otra parte, los PIM poseen muchos residuos de manosas y son la base estructural de LAM y de la Lipomanana (LM); se encuentran en cantidades abundantes en las membranas internas y externas de la envoltura celular de todas las especies de *Mycobacterium* y por tanto constituyen hasta un 56% de todos los fosfolípidos. La familia de los PIM comprenden glicoformas de PI mono, di, tri, tetra, penta, y hexamanosilados con diferentes grados de acilación (Figura 5), siendo PIM₂ y PIM₆ las dos clases más abundantes encontrados en *M. bovis*, *M. tuberculosis H37Rv*, *M. smegmatis* y en BCG, siendo PIM₂ el precursor metabólico de PIM₆ (De la Salle *et al.*, 2005).

Éstos Manósidos de Fosfatidilinositol se caracterizan por un número variable de unidades α -D-Manp y una cadena de acilo graso en la cara citosólica de la membrana plasmática anclada al PI; dentro de ésta familia, PIM₆ es la fracción polar más grande, compuesta de un grupo pentamansil, t- α Manp (1→2) - α Manp (1→2) - α -Manp (1→6) - α -Manp (1→6) - α -Manp (1→), unido a la posición 6 del anillo de mioinositol además de un residuo Manp presente en la posición 2 y puede presentar diferentes grados de acilación (Guerin *et al.*, 2010).

La cantidad de PIM de orden superior a la que corresponden PIM₅ y PIM₆ aumenta con la edad del cultivo a expensas de las formas apolares (PIM₁ y PIM₄), la síntesis de los cuales tiende a disminuir en *M. smegmatis* cuando el cultivo entra en fase estacionaria. Sin embargo éstas moléculas de orden superior se consideran prescindibles en *M. smegmatis*, *M. bovis BCG* y *M. tuberculosis*, caso contrario a lo que ocurre con PIM₁ y PIM₂, en donde la interrupción de su síntesis provoca la detención inmediata del crecimiento tanto en micobacterias de crecimiento rápido como lento (Driessen *et al.*, 2009).

Aunado a esto, en 2011 Cao y colaboradores demostraron a través de estudios basados en deleciones genéticas, que varios pasos en la biosíntesis de los PIM, LM y LAM son esenciales para la supervivencia de diversas cepas micobacterianas y ahora es bien documentado que son moléculas cruciales que median las interacciones huésped-patógeno en las infecciones. Estas moléculas son presentadas a los linfocitos T por una molécula análoga al MHC denominada CD1, sin embargo se ha demostrado que diversos receptores de superficie son capaces de reconocer estos determinantes antigénicos.

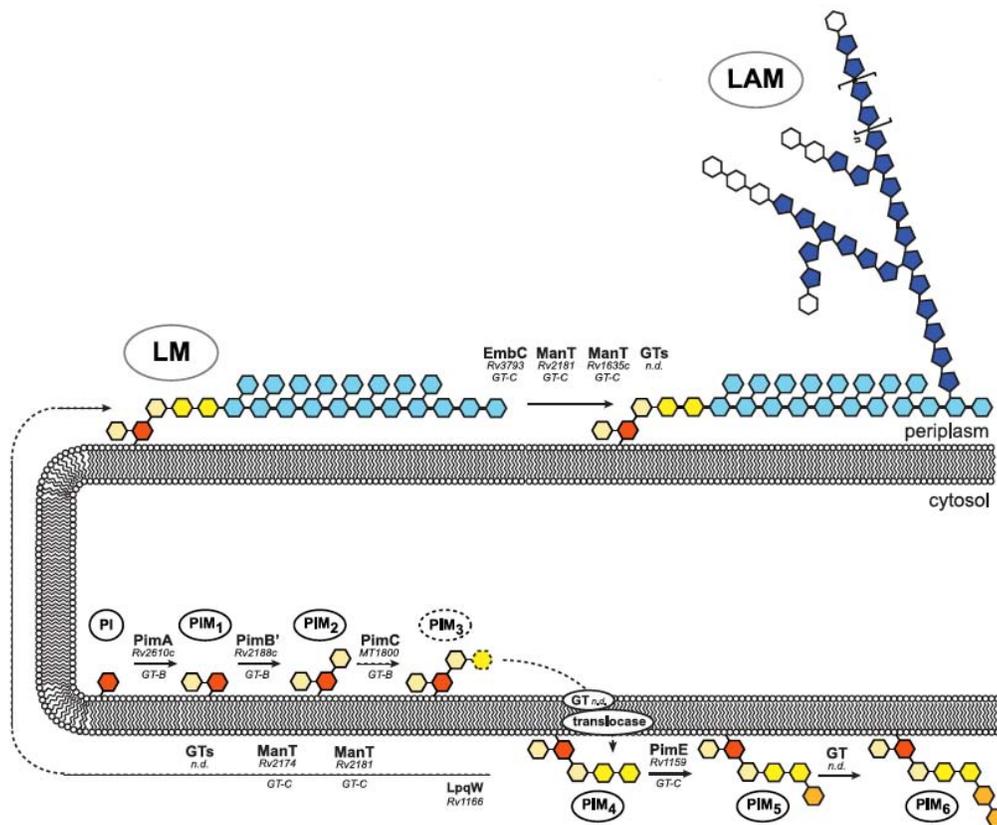


Figura 5. Modelo propuesto para la biosíntesis y regulación de PIM (Guerin *et al.*, 2010).

A pesar de la información disponible sobre las alteraciones en la respuesta inmune ocasionada por moléculas provenientes de *M. tuberculosis*, aún queda por esclarecer completamente la maquinaria biosintética de los PIM, su papel en la fisiología de las micobacterias y principalmente su contribución en las interacciones huésped-patógeno.

1.6 Respuesta Inmune Innata

El cuerpo humano cuenta con un sistema de defensa que le permite prevenir, contener o eliminar diversos agentes infecciosos y sustancias de naturaleza orgánica e inorgánica que son potencialmente perjudiciales para la salud. El desarrollo de una enfermedad infecciosa supone interacciones complejas entre los microorganismos y los componentes del sistema inmune del hospedero. De manera general los acontecimientos que se presentan durante un proceso infeccioso son la entrada del microorganismo, la invasión y colonización de los tejidos del huésped, así como la superación de las defensas del individuo y la lesión o alteración de los tejidos. El sistema inmune de los seres humanos y la mayor parte de los animales vertebrados se puede dividir en dos apartados principales, la inmunidad innata con la cual nacemos y la inmunidad adquirida que desarrollamos a lo largo de la vida; los múltiples mecanismos efectores de ambas llevan a cabo la defensa del individuo. De manera particular, el sistema inmunitario innato proporciona una defensa inicial y esencial contra los patógenos, mientras que el adaptativo se encarga de proporcionar una respuesta más potente y mantenida, ya que son estimuladas células efectoras que permiten eliminar a los microorganismos y al mismo tiempo generar memoria inmunológica (Murphy *et al.*, 2008).

Entre las células efectoras de la respuesta inmune innata se encuentran los neutrófilos, basófilos, células natural killer (NK), monocitos, células B, células dendríticas (CD) y macrófagos, éstas dos últimas se denominan células presentadoras de antígeno (APC) y son consideradas fagocitos profesionales, en las que su característica distintiva es la capacidad de expresar moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA) de clase II y mediar una señal coestimuladora dada por CD80 y CD86 (B7.1 Y B7.2 respectivamente). Éstas moléculas proporcionan una señal a los linfocitos T durante la activación celular, sin ella, los linfocitos no son capaces de activarse o de proliferar de manera adecuada ante una infección, manteniéndose en un estado anérgico. El HLA de clase II humano contiene genes que codifican las cadenas clásicas de éste complejo designadas HLA-DR, DP y DQ, de los cuales, HLA-DR es donde se

encuentran de tres a cuatro genes de cadena funcionales. Las CD expresan de manera constitutiva un alto nivel de moléculas HLA-II y coestimuladoras, mediante las cuales pueden activar a los linfocitos T CD4+; de igual forma, las células B expresan de manera constitutiva HLA-II, pero no pueden ser activadas antes de expresar moléculas coestimuladoras; mientras que los macrófagos deben ser activados por mecanismos que inducen posterior a la fagocitosis de antígenos particulados, antes de poder expresar moléculas HLA-II ó coestimuladoras como en el caso de la molécula CD80 (Kindt *et al.*, 2007). La APC que posee el papel más relevante en la inmunopatogénesis de la tuberculosis es el macrófago alveolar (MΦ), el cual proviene de monocitos de sangre periférica que han sido reclutados al pulmón y se caracterizan por llevar el marcador de superficie celular CD14 (Zhou *et al.*, 2014). Sin embargo, ambos tipos celulares, monocitos y macrófagos son células efectoras y reguladores críticos de muchos sistemas de órganos, incluyendo el metabolismo sistémico, hematopoyesis, angiogénesis y la reproducción (Geissmann *et al.*, 2010), representando papeles bien establecidos tanto en la homeostasis celular, así como al promover el inicio y la progresión de lesiones y la remodelación de tejidos en varias enfermedades patógenas (Murray & Wynn, 2012).

El control de la infección comienza con el reconocimiento de los componentes estructurales de la pared celular de la micobacteria, por medio de receptores de superficie expresados en macrófagos, CD y células epiteliales pulmonares principalmente, éstos se denominan receptores de reconocimiento de patrones, entre los que se incluyen los receptores de lectina tipo C, receptor de manosa, scavenger, tipo NOD y tipo Toll (Figura 6). El perfil de su expresión en las APCs y en las células epiteliales pulmonares facilita la internalización y alojamiento de la micobacteria para su degradación, sin embargo, *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir e incluso replicarse en el interior de estos fagocitos, en donde encuentra un nicho en el que es inaccesible a los anticuerpos circulantes. Durante la primoinfección los bacilos se multiplican y producen una respuesta inflamatoria leve de baja trascendencia clínica que a menudo pasa desapercibida (Schäfer *et al.*, 2009).

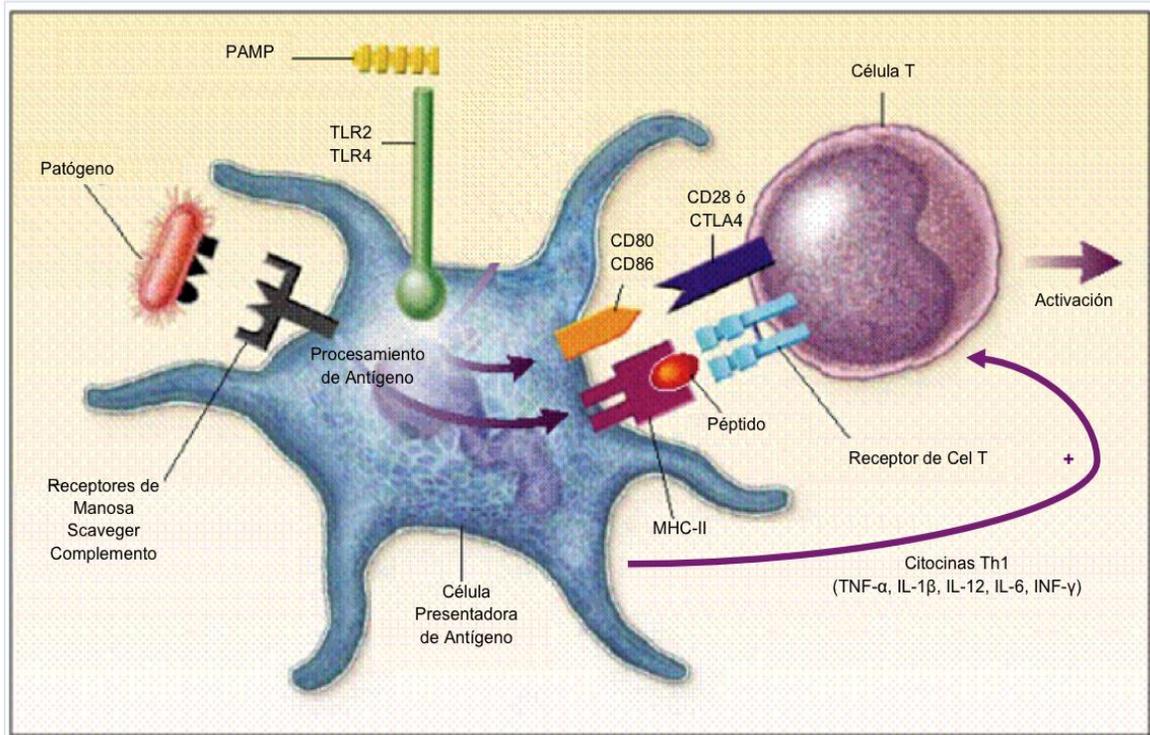


Figura 6. Reconocimiento y presentación de antígenos (En línea, 2015 [modificado])

http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=c%C3%A9lulas+presentadoras+de+ant%C3%ADgenos&lang=2

1.7 Receptores de Dominio de Oligomerización por unión de Nucleótidos (NOD)

Son receptores citoplasmáticos de reconocimiento que median respuestas a PG presente en la pared celular bacteriana. Se requiere de éste grupo de receptores para una óptima secreción de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-12p40) por parte de monocitos y macrófagos. En un modelo murino realizado por Divangahi y colaboradores en el 2008, se demostró que cuando ratones deficientes de NOD2 eran infectados con *M. tuberculosis*, presentaban una menor reacción inflamatoria en etapas tempranas de la enfermedad y en la etapa crónica mostraban mayor carga bacteriana y una muerte más temprana.

1.8 Receptores Scavenger (SR)

Son receptores que pertenecen a una amplia familia de glicoproteínas transmembranales con estructuras multidominio clasificadas en 6 subgrupos basados en su estructura terciaria; juegan un papel importante en la inmunidad innata y en la activación de los macrófagos ya que son capaces de unirse a una gran variedad de moléculas tanto endógenas como exógenas (Peiser & Gordon, 2001), principalmente a moléculas polianiónicas entre las que se incluyen: lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas, ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram positivas y moléculas con ácido siálico. La clase A de los SR, contribuye en la interacción entre *M. tuberculosis* y los macrófagos uniéndose a los sulfolípidos; mientras que el SR de clase B se ha implicado en la fagocitosis de células apoptóticas (Trejo *et al.*, 2003).

1.9 Receptores de Lectina Tipo C (CLRs)

Conforman una familia de receptores capaces de reconocer hidratos de carbono presentes en los patógenos; tienen como característica distintiva la necesidad de calcio para poder realizar su función, reconociendo no solo manosa, fucosa y galactosa, sino también los arreglos post-traduccionales que éstos pudieran llegar a sufrir. Varios CLRs se encuentran implicados en la captación de micobacterias, entre los que se incluyen el receptor de manosa en macrófagos, el primero de esta familia en estar asociado junto con otro receptor llamado DC-SIGN en el reconocimiento y fagocitosis, uniéndose a ManLAM y PIM₆ micobacteriano (Philips & Ernst, 2012), mientras que el ligando de *M. tuberculosis* para otro de los receptores de esta familia, Dectina-1, es aún desconocido.

1.1.1 Receptores Tipo Toll (TLRs)

Son una familia de proteínas homólogas a las de tipo Toll que se expresan en *Drosophila melanogaster* que se extienden a lo largo de la superficie de células del sistema inmune innato en mamíferos. Los TLRs son importantes en las respuestas de macrófagos a antígenos de diversa naturaleza, mediando la

activación celular en presencia de sus ligandos (Kurt-Jones *et al.*, 2002). Éstas proteínas atraviesan la membrana una sola vez y se caracterizan por tener múltiples copias de un motivo con alto contenido de leucina en su dominio extracelular y uno compartido llamado TIR en su dominio citoplasmático que inicia la vía de transducción de señales. Entre los receptores de esta familia que han sido implicados en el reconocimiento de antígenos micobacterianos se encuentran TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9 (Constantoulakis *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la señalización de TLR4 es crítica en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas y algunos virus (Kurt-Jones *et al.*, 2000), por lo que macrófagos y CD incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86; en tanto que TLR2 es importante en respuesta a componentes de bacterias Gram positivas, reconociendo péptidos bacterianos como PG, LM, LAM, AraLAM y PIM de *M. tuberculosis* (Banaiee *et al.*, 2006).

1.1.2 Fusión Fagolisosomal

Una vez que las células presentadoras de antígeno reconocen los diferentes componentes estructurales de la micobacteria, ésta es internalizada por medio de fagocitosis para su posterior degradación dentro de los compartimentos de la vía endocítica de procesamiento antigénico que comprende tres secciones con acidez creciente: endosomas tempranos (pH 6.0 a 6.5), endosomas tardíos o endolisosomas (pH 5.0 a 6.0) y lisosomas (pH 4.5 a 5.0). Así, el antígeno pasa de endosomas tempranos a tardíos, y por último, este producto también llamado fagosoma se fusiona con los lisosomas en los que se encuentran una gran cantidad de enzimas hidrolíticas, proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas y fosfatasas capaces de degradar una amplia gama de macromoléculas. Una vez que el microorganismo ha sido degradado, los antígenos peptídicos generados se unen a moléculas MHC de clase II en el interior del retículo endoplásmico rugoso y éste complejo MHC/péptido es transportado a la membrana plasmática para su posterior reconocimiento por parte de los linfocitos T CD4 (Kind *et al.*, 2007). En respuesta a la fagocitosis, los

macrófagos son capaces de generar intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), intermedios reactivos de nitrógeno (RNI) y algunos otros mecanismos mediados por citocinas que inducen un ambiente altamente oxidante y tóxico que conlleva a la degradación de la micobacteria. Por lo cual, estos eventos altamente regulados constituyen un importante mecanismo antimicrobiano de la inmunidad innata (Flynn & Chan, 2001).

1.1.3 Secreción de Citocinas

Posterior al reconocimiento y procesamiento antigénico, se inicia la producción de citocinas que median el desarrollo de respuestas inflamatorias cruciales en el control de la infección, promoviendo la migración de diferentes subpoblaciones celulares a los tejidos infectados que conllevan a la formación de granulomas, tal es el caso de IFN- γ , TNF- α y algunas interleucinas como IL-12p40, IL-6 e IL-1 α / β ; proteínas de vital importancia ya que se ha demostrado una temprana mortalidad en macrófagos cultivados con *M. tuberculosis* asociada con defectos en la secreción de éstas citocinas (Zuñiga *et al.*, 2012).

En las primeras fases de la infección, IL-6 es secretada por células T, M Φ , fibroblastos y células endoteliales participando en la proliferación y desarrollo de la respuesta adaptativa y en la hematopoyesis, teniendo además un papel importante en infecciones virales, enfermedades autoinmunes y cáncer (Kishimoto *et al.*, 1992).

IL-12p40, es una subunidad de componentes bioactivos como IL-12 e IL23, funge como un quimioatrayente para macrófagos y promueve la migración de células dendríticas, además, se asocia con el desarrollo de la respuesta inflamatoria relacionada con rechazo de injertos y asma (Cooper & Khader, 2007). Algunos estudios han sugerido que la producción de IL-12 es dependiente de la señalización vía TLR9 en CD4 y dependiente de TLR2 en macrófagos, alguna deficiencia en la secreción de ésta citocina aumenta la susceptibilidad a infecciones micobacterianas.

IL-1 β es otro componente crítico en la respuesta innata, secretada por monocitos y macrófagos, la cual requiere de una molécula adaptadora (MyD88) para desencadenar la señalización corriente abajo de todos los miembros de la familia de TLRs en respuesta a *M. tuberculosis*. Varios reportes sugieren que ratones deficientes de éste adaptador carecen de IL-1 β o del receptor de IL-1 (Mayer-Barber *et al.*, 2010).

El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) es producido por una variedad de células, entre las que se encuentran macrófagos, linfocitos, neutrófilos, mastocitos y células endoteliales. Dentro de sus funciones más relevantes está la regulación de la respuesta inflamatoria temprana contra patógenos, estimulando la producción de IL-1 e IL-6; contribuyendo así a la activación de los macrófagos para la eliminación de las micobacterias además de modular el proceso apoptótico de las células infectadas (Zuñiga *et al.*, 2012).

Adicionalmente, las células T activadas, NK y macrófagos, secretan Interferón gamma (INF- γ), el cual es esencial en la activación de fagocitos y la presentación de antígenos, además de promover la proliferación y adhesión celular, así como la apoptosis. En ratones, la activación de las células T Natural Killer invariantes (iNKT) con α -galactosylceramida, el cual es un lípido sintético, antes o durante la infección con *M. tuberculosis* resulta en un aumento de la secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD4 y CD8, lo que resulta en la reducción de la carga bacteriana y en una supervivencia prolongada, además, esta citocina induce explosión respiratoria en macrófagos contribuyendo en la producción de ROI y RNI (Philips & Ernst, 2012). Con base en lo anterior se puede considerar que la principal función de la inmunidad innata parece estar enfocada en optimizar la respuesta inflamatoria y regular el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, en donde el microambiente, el estado de maduración, diferenciación o activación de las células efectoras de la inmunidad innata juegan un papel importante durante la infección producida por *M. tuberculosis*.

1.1.4 Respuesta Inmune Adaptativa

El sistema inmunitario adaptativo tiene la capacidad de reconocer y reaccionar ante una gran cantidad de antígenos microbianos y no microbianos, además de poder distinguir entre moléculas propias de ajenas y entre las que son muy afines entre sí, por lo cual también es conocido como inmunidad específica.

Aunque la respuesta inmune innata es esencial para la defensa contra la infección producida por *M. tuberculosis*, es insuficiente para el control a largo plazo y la prevención de la enfermedad activa, ya que las bacterias que logran sobrevivir en los pulmones pueden reactivarse. Entre 6 a 8 semanas después de la infección ésta alcanza los ganglios linfáticos regionales con la consiguiente activación de los linfocitos T CD4 y T CD8. Sin embargo, dicha activación depende totalmente de moléculas inducidas como una consecuencia del reconocimiento innato de éstos patógenos. Entre las estrategias con las que cuenta el sistema adaptativo para combatir a la mayoría de los patógenos se encuentra la secreción de anticuerpos para su unión a microorganismos extracelulares, bloqueando de este modo su capacidad de infectar a las células del huésped y favoreciendo su digestión por los fagocitos; sin embargo la respuesta adaptativa ante *M. tuberculosis* se ha centrado más en la activación de células T en lugar de las células B, debido a que los linfocitos T helper o cooperadores (Th) fomentan la actividad fagocítica de las células de la inmunidad innata y los linfocitos T citotóxicos destruyen células infectadas que permanecen inaccesibles a los anticuerpos (Abbas *et al.*, 2008).

1.1.5 Células T CD4

Como se mencionó *M. tuberculosis* reside en el interior de los macrófagos dentro de fagosomas y sus antígenos son procesados y presentados en el contexto de moléculas MHC de clase II a los linfocitos T CD4 +, los cuales, por medio de su receptor ($\alpha\beta$ TCR) median su función protectora (Rivas-Santiago *et al.*, 2005). En las enfermedades infecciosas crónicas se induce la polarización de estas células a sus formas Th1 y Th2, Th17 y T reguladoras. Los linfocitos T CD4+ de tipo Th1 contribuyen activamente a contener la infección mediante una adecuada secreción de TNF, IFN γ e IL-2; mientras que los Th2, antagonizan esta función al secretar IL-

4 que inhibe el desarrollo y la producción de células Th1, por lo tanto cualquier desequilibrio en la respuesta Th1/Th2 tiene un efecto directo en el control de la tuberculosis; adicionalmente fueron descritas las células Th17, asociadas con enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, por la alta secreción de IL-17 e IL-22 (Lin & Ottenhoff, 2008), estas citocinas son de gran importancia ya que contribuyen a la formación de lesiones granulomatosas. Aunado a esto, se sabe que en los seres humanos, la infección por el VIH induce la pérdida de células T CD4+, lo que aumenta la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis, más frecuentemente mediante la reactivación de tuberculosis latente.

1.1.6 Células T CD8

Las células T CD8+ constituyen otra fuente adicional de IFN- γ , sin embargo su principal aportación en la inmunopatogénesis de la TBP es su capacidad de ejercer funciones citotóxicas al reconocer antígenos micobacterianos presentados por las APCs en el contexto de moléculas MHC I (Raja, 2004). En los gránulos que contienen las células CD8 se encuentran proteínas importantes como perforinas y granzimas, las cuales forman trímeros que se insertan en la membrana de las APCs facilitando la entrada de granzimas y granulisinas, ejerciendo un efecto directo en la eliminación de éstas células. Además los linfocitos T CD8 cuentan con otros mecanismos igualmente importantes para mediar citotoxicidad que son dependientes de la interacción entre receptores de muerte celular con sus ligandos, como en el caso de Fas/FasL, a través del cual se induce muerte celular de tipo apoptótica limitando la diseminación del microorganismo, sin embargo *M. tuberculosis* emplea múltiples estrategias para invadir y explotar las células fagocíticas del huésped, evitando su eliminación.

1.1.7 Granuloma

En la tuberculosis y en otras enfermedades como la lepra, las bacterias han desarrollado la capacidad de vivir en equilibrio con la respuesta inmune del hospedero a través de la formación de agregados de células inmunes denominados granulomas (Ernst, 2012), los cuales son lesiones histopatológicas consideradas una de las características principales de la tuberculosis. Éstas estructuras tridimensionales y heterogéneas se forman en respuesta a estímulos persistentes de carácter infeccioso o no infeccioso y presentan una función crucial en la protección contra las micobacterias ya que son capaces de contener y limitar a los patógenos que son fagocitados por los macrófagos. Sin embargo el microambiente inmunológico que caracteriza a los granulomas no solo es capaz de contener la infección, también constituye un nicho en el que los bacilos pueden prosperar y modular la respuesta inmune para asegurar su supervivencia por períodos prolongados sin causar daños, estableciendo así un medio de proliferación y difusión dentro del huésped debido a que en el interior del granuloma las bacterias son capaces de cambiar sus características fisiológicas, metabólicas y la composición de su envoltura externa; por lo tanto, su susceptibilidad a un fármaco dado puede ser completamente diferente de la que se produce en condiciones extracelulares o incluso dentro de las células individuales (Silva-Miranda et al., 2015). En el interior del granuloma, el microorganismo puede estar en un estado inactivo sin replicarse o metabólicamente alterado con ciclos replicativos infrecuentes o limitados; cuando se produce algún fenómeno de alteración inmunológica, ésta resulta en la reactivación y propagación del bacilo con necrosis y daño al tejido pulmonar. En el caso de *M. tuberculosis*, éstas formaciones se han observado por reconocimiento de glicolípidos específicos como LM y PIM (Zuñiga et al., 2012)

El granuloma comienza su formación mediante la agregación de diferentes poblaciones de células de linaje mieloide, en su mayoría macrófagos, células epitelioides, CDs, neutrófilos y células gigantes multinucleadas que posteriormente son rodeadas por linfocitos T (Figura 7). Dentro de los factores más importantes

para la formación, mantenimiento y funcionalidad del granuloma se encuentra la producción de TNF- α e IFN- γ quienes reclutan otras poblaciones celulares, incluyendo más macrófagos al sitio de la infección. Con el tiempo, éstas células pueden sufrir cambios adicionales, transformándose en células gigantes multinucleadas de Langerhans que se forman por la fusión de sus membranas plasmáticas ó pueden diferenciarse en macrófagos espumosos, caracterizados por la acumulación de lípidos intracelulares que les proporciona una apariencia espumosa, perdiendo su actividad fagocítica y bactericida, lo cual le permite a la micobacteria su persistencia en un estado latente y se asume que ésta acumulación de lípidos les es útil como fuente nutrimental (Silva-Miranda *et al.*, 2012).

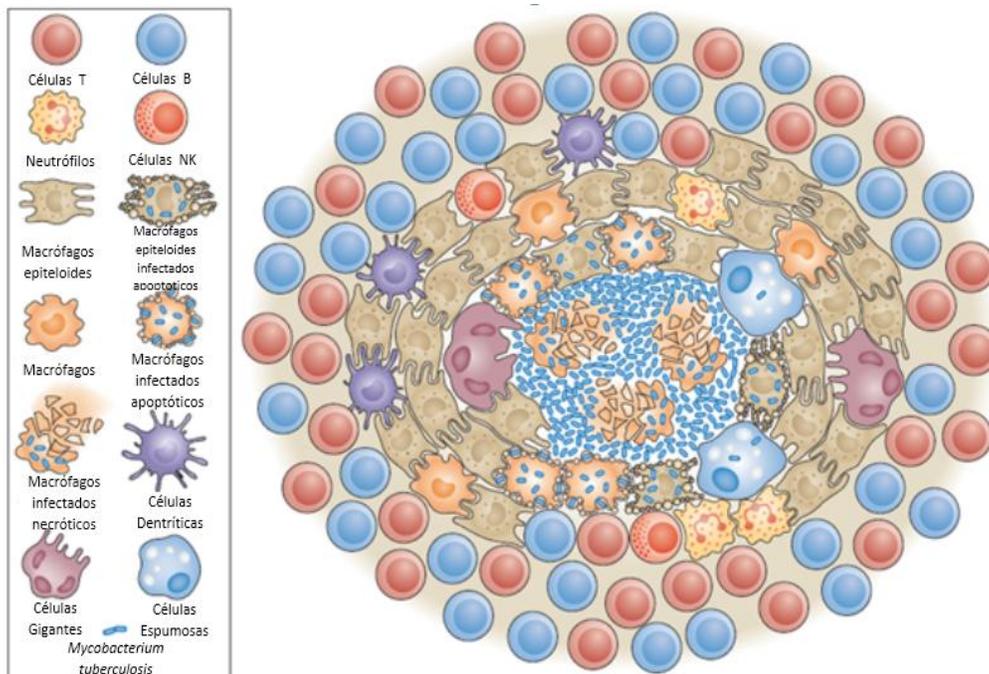


Figura 7. Estructura del Granuloma (Ramakrishnan, 2012).

Otras células que participan en el desarrollo del granuloma son las CD, las cuales se ubican hacia la periferia de la lesión y retienen menos bacterias que los macrófagos, se identifican en el granuloma en las primeras etapas de la infección y posteriormente migran a los ganglios linfáticos, donde activan la respuesta de los

linfocitos T mediante la presentación de antígenos; a pesar de que éstas células no son las más eficaces para eliminar al patógeno, mantienen a las bacterias en un estado de no división. De igual modo, los neutrófilos se encuentran dentro de la primera línea de defensa contra la tuberculosis, ayudando a eliminar las bacterias e iniciar el proceso inflamatorio, sin embargo, una vez establecido el granuloma, no parecen desempeñar un papel relevante en los seres humanos, volviendo al sitio de infección sólo cuando el granuloma comienza a ser necrótico (Silva-Miranda *et al.*, 2012).

A pesar de no ser esenciales para el inicio de la formación, los linfocitos T están presentes en los granulomas maduros de humanos y ratones infectados con *M. tuberculosis*, su contribución es importante en el mantenimiento de la organización y en el control de la progresión de las micobacterias después de la fase aguda de la infección. Cerca de 60 a 70% de las células T presentes son CD4+, 15 a 30% son CD8+ α/β y tan solo un 2% de células son T γ/δ , las cuales tienen un contacto directo con la mayoría de los macrófagos y se presentan como una banda discreta de que rodea al granuloma. De éstos, los linfocitos CD4+, constituyen la única población linfoide crítica para su formación, mientras que las células T CD8+ se encuentran inicialmente en la periferia, migrando más profundamente en la estructura conforme la enfermedad progresa en el modelo murino, alguna deficiencia en éstas células conlleva a un mal funcionamiento del granuloma. Por otra parte, las células B representan del 1 al 10% de los leucocitos presentes en el granuloma de ratón y su reclutamiento depende de la quimiocina CXCL13, están asociadas con un buen control inmunológico de la enfermedad, sin embargo, su ausencia no ha demostrado tener ningún efecto en la progresión de la tuberculosis durante la fase crónica (Silva-Miranda *et al.*, 2012). Con base en esto, algunas poblaciones celulares pueden presentar un papel predominantemente antimicobacteriano, mientras que otras tienen una mayor actividad inmunomoduladora en la eliminación de las APCs infectadas durante la infección.

Cuando se produce muerte celular por necrosis, los detritos celulares dan lugar a la formación de granulomas denominados caseosos, que son la firma de la tuberculosis activa en huéspedes inmunocompetentes, este tipo de muerte en

células infectadas provoca la formación de una zona necrótica en el centro del granuloma que finalmente se desintegra, promoviendo así la inflamación y facilitando la propagación bacteriana; mientras que la apoptosis se asume como mecanismo de eliminación que promueve la presentación de antígenos con la correspondiente estimulación de las células T. En modelos *in vitro* se ha propuesto que los macrófagos que migran al granuloma y fagocitan macrófagos en proceso de apoptosis, se infectan y constituyen un nuevo reservorio de proliferación bacteriana (Ramakrishnan, 2012).

Se han desarrollado diversos modelos animales para comprender la verdadera función del granuloma en la tuberculosis activa, entre los que se incluye el pez cebra que ha demostrado la capacidad de formar granulomas en ausencia de señalización por TNF y que sin este estímulo, la agregación celular se acelera, contrariamente, los modelos murinos estimulados con BCG indican que TNF es esencial para el reclutamiento de linfocitos T a los granulomas y para la retención de macrófagos infectados y no infectados, sin embargo, los ratones desarrollan una enfermedad aguda, en lugar de crónica y el granuloma en el pulmón carece de la apariencia estructurada y organizada de los granulomas humanos (Silva-Miranda *et al.*, 2015), por lo cual actualmente no se cuenta con un modelo apropiado para su investigación.

1.1.8 Estrategias de Evasión

M. tuberculosis y otras micobacterias patógenas como *M. marinum* tienen la capacidad de manipular los nichos celulares en su propio beneficio con la finalidad de persistir de manera indefinida dentro de los macrófagos gracias a diversos mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedero. Entre las estrategias que poseen se encuentra la capacidad de disminuir la expresión de moléculas MHC-II, por lo cual la presentación de antígenos y la estimulación de los linfocitos T CD4+ se ve afectada, en consecuencia se da una menor activación celular, producción de citocinas y reducción de los mecanismos micobactericidas, favoreciendo la supervivencia de las bacterias dentro de los fagocitos.

Otra estrategia propuesta es la evasión de la fusión fagolisosomal, se ha descrito que el 90% de los fagosomas que contienen bacilos vivos retienen una proteína denominada TACO (*tryptophane aspartate-containing coat protein*, también llamada coronina 1 ó P57) cuya función es mantener unida la membrana plasmática con el citoplasma celular para integrar las señales recibidas de manera extracelular; sin embargo, esta proteína tiene la capacidad de evitar esta fusión debido a que regula procesos de señalización dependientes de calcio, así una vez que el macrófago ha sido infectado ocurre un influjo normal de calcio, sin embargo, al encontrarse moléculas de TACO retenidas en el fagosoma hay ausencia de ésta en el citoplasma y por lo tanto no hay actividad de la calcineurina, la cual es necesaria para este mecanismo de degradación (Chávez-Galán *et al.*, 2009).

Como consecuencia de las modificaciones que sufren las APCs en la infección por *M. tuberculosis*, se han estudiado componentes de la micobacteria que pueden ser responsables de la inhibición de la fusión fagolisosomal (Ernst, 2012), tal es el caso de ESAT-6 y LAM (Welin *et al.*, 2008), esta última ha demostrado tener la capacidad de modificar su tamaño, peso y estructura de los dominios “raft” ricos en colesterol-esfingomielina de las membranas fagosomales y en consecuencia, impedir una fusión adecuada para la eliminación bacteriana.

2. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es un importante problema de salud considerada la segunda causa de mortandad a nivel mundial debido a un agente infeccioso; evidencia científica en modelos murinos demuestra la existencia de un depósito de monocitos inmaduros en el parénquima pulmonar; éstos junto con los monocitos circulantes, pueden ser reclutados e infectarse con *M. tuberculosis* antes de diferenciarse en macrófagos, lo que conlleva a alteraciones en su proceso de maduración, debido a la presencia de moléculas lipídicas y proteicas que constituyen a la bacteria (factores de virulencia). Estas modificaciones pueden ser responsables de deficiencias en la funcionalidad de las células presentadoras de antígeno y por lo tanto en su capacidad para activar a los linfocitos T, favoreciendo el establecimiento y diseminación de la infección. Sin embargo, aún no es claro en qué medida los componentes de la micobacteria afectan la respuesta inmunológica del hospedero; por lo cual consideramos que identificar si PIM₆, el cual es un factor de virulencia lipídico de *M. tuberculosis* induce cambios en el fenotipo de maduración de monocitos y macrófagos, podría esclarecerse la función que ejerce dicho lípido en la capacidad de respuesta del hospedero ante la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

Se ha reportado que *M. tuberculosis* altera la diferenciación de monocitos en condiciones *in vitro*; por lo cual el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos estimulados con PIM₆ proveniente de *M. tuberculosis* podría verse afectado mediante alteraciones en la expresión de marcadores de maduración de superficie celular.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar las alteraciones en la expresión de marcadores de superficie celular (CD68, CD80, CD86, TLR2, TLR4, HLA-DR y receptor de TNF I y II) durante el proceso de diferenciación de monocitos y en macrófagos, así como su actividad funcional en presencia de PIM₆.

4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión de los marcadores de superficie celular: CD14, CD68, CD80, CD86, TLR2, TLR4, HLA-DR y receptor de TNF 1 y 2 en monocitos a distintos tiempos, durante el proceso de diferenciación, en presencia y ausencia de estímulos con PIM₆ y PPD.
2. Evaluar la expresión de los marcadores de superficie celular: CD14, CD68, CD80, CD86, TLR2, TLR4, HLA-DR y receptor de TNF 1 y 2 en macrófagos en presencia y ausencia de estímulos con PIM₆ y PPD.
3. Cuantificar la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β al término de la diferenciación de los monocitos en presencia de PIM₆ y PPD.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño Experimental

El presente estudio fue de tipo prospectivo, descriptivo, transversal y observacional.

5.2 Obtención de Células Mononucleares (CMN).

Las células mononucleares se obtuvieron a partir de 20 ml de concentrados leucocitarios provenientes de donadores aparentemente sanos en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012 obtenidos en el banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Las muestras fueron sometidas a centrifugación en un gradiente de densidad Ficoll[®] (Lymphoprep, STEM CELL TECHNOLOGIES) a 800g durante 30 minutos y 18 °C en tubos cónicos de 50 ml. Una vez terminada la separación, se extrajo la interface que contenía a las CMN y se les realizaron 3 lavados con solución Buffer Salino Fosfato (PBS), centrifugando después de cada lavado a 250 rpm durante 10 minutos. Finalmente las células fueron resuspendidas en RPMI suplementado al 10 % de SFB, se cuantificaron y se evaluó el número y la viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul de tripano en un contador electrónico^(Tc20 BD).

5.3 Purificación de Monocitos y Diferenciación a Macrófagos

Para la obtención de monocitos, las CMN se incubaron durante 15 minutos en obscuridad con perlas inmunomagnéticas acopladas al anticuerpo monoclonal murino de isotipo Ig2a anti-CD14^(MACS Miltenyi Biotec), transcurrido el tiempo se les realizó un lavado con PBS y se centrifugaron a 300g durante 10 minutos. Posteriormente se sembró un total de 1×10^6 monocitos en placas de cultivo de 24 pozos^(Costar) en medio complementado (RPMI 1640, HEPES 10mM, L-glutamina 200 mM, SFB 10%) y se mantuvieron en incubación durante 7 días como lo reporta Chávez-Galán *et al.* (En prensa), al 5% de CO₂, 37 °C y una atmosfera

húmeda saturante, sometiéndose a las distintas condiciones experimentales durante su proceso de diferenciación y al término de la misma.

5.4 Estimulación *in vitro* de Monocitos y Macrófagos con Antígenos de *M. tuberculosis*

El liofilizado de Manósido de fosfatidilinositol 6 (PIM₆) proveniente de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv^(Bei resources) [0.25mg] se resuspendió en 250 µl de PBS y fue adicionado a las células a concentraciones de 5 y 7.5 µg/ml durante el proceso de diferenciación de los monocitos (1, 3, 5 y 7 días) en cultivo y durante 24 horas en macrófagos maduros; utilizando células sin estímulo como control negativo y PPD como control positivo a las mismas concentraciones.

5.5 Análisis de Pureza

Para evaluar la pureza de los monocitos, 1×10^6 células se resuspendieron en RPMI y posteriormente se marcaron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los siguientes antígenos: CD14 para monocitos, CD3 para linfocitos T y CD19 para linfocitos B, así mismo se incluyó un control sin tinción. Las células se incubaron en refrigeración durante 30 minutos, posteriormente se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 1% durante 30 minutos, se lavaron y resuspendieron en tampón de tinción^(BD Biosciences), adquiriéndose 10 000 eventos en cada experimento en un citómetro FACSAria II con el software FACS Diva (V.6.1) para su posterior análisis con el software FlowJo (V.10.0).

5.6 Citometría de Flujo Multiparamétrica

Una vez transcurrido los tiempos de estimulación, las células se recuperaron para el análisis multiparamétrico de los distintos marcadores de superficie celular; se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se ajustaron a 5×10^5 cel/tubo, posteriormente se tiñeron durante 30 minutos en oscuridad con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los siguientes antígenos: CD14, TLR2, TLR4, CD68, CD80, CD86, HLA-DR y receptor de TNF 1 y 2^(BioLegend) en distintos fluorocromos

(Tabla 1). Para cada una de las tinciones se incluyeron los respectivos controles de isotipo y FMO (fluorescence minus one). Posteriormente las células se lavaron y resuspendieron en tampón de tinción^(BD Biosciences), adquiriéndose 20 000 eventos en cada experimento en un citómetro FACSaria II con el software FACS Diva (V.6.1) para su posterior análisis con el software FlowJo (V.10.0).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en el marcaje multiparamétrico.

Anticuerpo	Anti-CD14	Anti-CD68	Anti-CD80	Anti-CD86	Anti-HLA-DR
Fluorocromo	PE-Cy7	FITC	PE-Cy5	APC	APC-Cy7
Anticuerpo	Anti-TLR2	Anti-TLR4	Anti- TNF-R1	Anti-TNF-R2	
Fluorocromo	FITC	PE	PE-Cy5	APC	

5.7 Cuantificación de TNF- α e IL-1 β por Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA)

Los sobrenadantes de las células correspondientes al séptimo día de cultivo se recogieron para determinar la presencia de TNF- α e IL-1 β mediante el kit ELISA Max^{MT} Delux Sets^(BioLegend), la cuantificación se obtuvo siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante. Brevemente, se adicionaron 100 μ l/pozo del anticuerpo de captura a una placa para ELISA a una concentración 1:200 para cada citocina y se mantuvo toda la noche a 4°C; al día siguiente se realizaron 4 lavados con PBS tween20 y se añadieron 200 μ l/pozo de solución de bloqueo manteniéndose en agitación mecánica durante 1 hora, transcurrido el tiempo se lavó la placa 4 veces y se realizaron diluciones seriadas de los estándares para cada citocina (Figura 8) adicionándose 100 μ l/pozo de éstas y de las respectivas muestras, la placa se mantuvo en agitación 2 horas y posterior a este tiempo se lavó 4 veces; se colocaron 100 μ l/pozo del anticuerpo de detección a una concentración 1:200 durante 1 hora y después de 4 lavados se mantuvo en incubación durante 30 min con una solución de Avidina-HRP [1:1000], la placa se lavó y se agregaron 100 μ l/pozo de la solución sustrato incubándose en oscuridad durante 15 y 20 min para TNF- α e IL-1 β respectivamente. Finalmente se leyó la absorbancia en un lector de placas^(BioRad) a 450 nm. La concentración de

las muestras se calculó mediante análisis de regresión usando la absorbancia media de pocillos por triplicado.

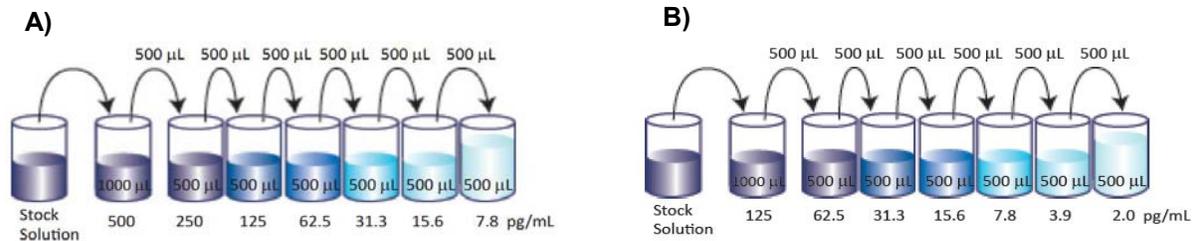


Figura 8. Concentraciones estándar para A) TNF- α y B) IL-1 β

5.8 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de la estimulación *in vitro* corresponden a 3 experimentos independientes. En el análisis estadístico se utilizó la mediana y el intervalo intercuartílico así como el valor mínimo y máximo; las variables cuantitativas se expresaron en frecuencias y porcentajes. Para comparación entre más de dos grupos se realizó un análisis de varianza de Kruskal Wallis con una prueba post-hoc de Dunn considerándose como significativo un valor de $p < 0.05$ bimarginal.

6. RESULTADOS

Con la finalidad de obtener una población lo más homogénea posible, los monocitos fueron purificados a partir de células mononucleadas obtenidas de concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos, por medio de perlas inmunomagnéticas dirigidas al receptor de superficie celular CD14, obteniéndose una pureza superior al 90% (Figura 9) evaluada mediante citometría de flujo para su posterior diferenciación e inmunotipificación.

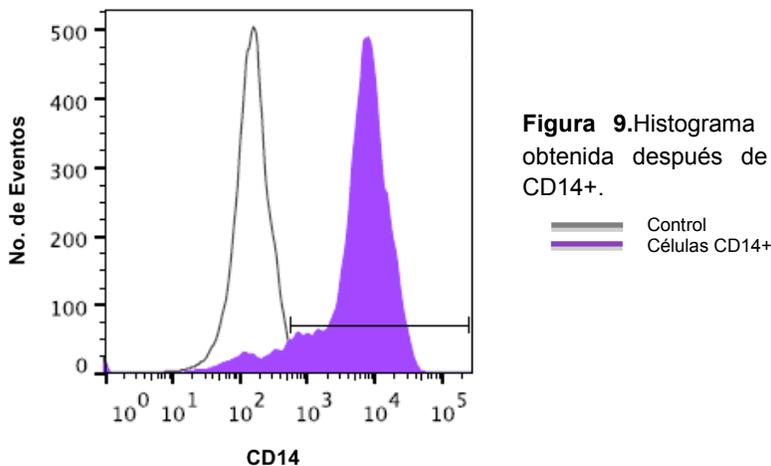


Figura 9. Histograma representativo de la pureza obtenida después de la selección de monocitos CD14+.

Una vez purificada la fracción CD14+, 1×10^6 monocitos se mantuvieron en cultivo durante siete días con la finalidad de evaluar el perfil de expresión de moléculas de superficie celular: TLR2, TLR4, HLA-DR, CD68, CD80, CD86, TNFR1 y 2 bajo diferentes condiciones. A partir de una ventana de tamaño contra complejidad se seleccionó la población de interés (Figura 10) y se utilizó la estrategia de análisis mostrada en las figuras 11-18 para cada uno de los marcadores.

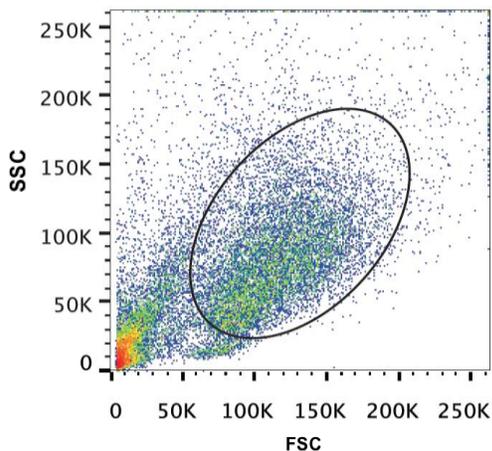
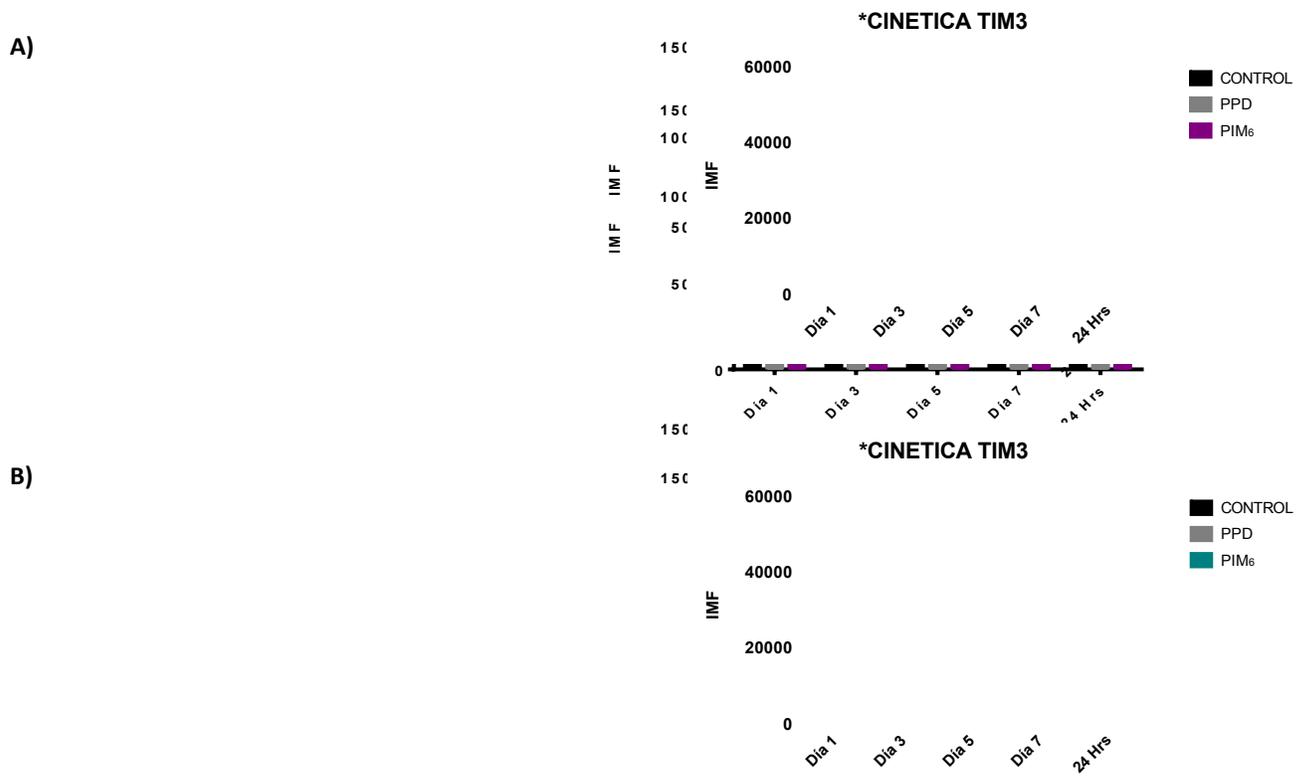


Figura 10. Imagen representativa de la población de interés a partir de una ventana de tamaño y complejidad.

En las gráficas 1A y 1B puede observarse que el porcentaje de expresión de HLA-DR alcanza prácticamente un 100% en todos los tiempos de evaluación, sin presentar diferencias entre las condiciones evaluadas ni entre las concentraciones de estimulación antigénica. La IMF en ambas concentraciones muestra un patrón similar, en donde PIM₆ parece regular negativamente la expresión de HLA-DR durante el proceso de diferenciación de los monocitos en comparación con el control negativo y positivo, sin embargo incrementa la expresión cuando se adiciona el lípido a macrófagos maduros durante 24 Hrs, aunque no lo suficiente para presentar diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 1. Evaluación de HLADR en monocitos durante su diferenciación y en macrófagos estimulados durante 24 Hrs. A) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 5µg/ml de antígeno. B) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 7.5µg/ml de antígeno. Los datos representados son medianas ± intervalo intercuartilico de tres experimentos independientes considerando como significativo un valor de $P < 0.05$ obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis.

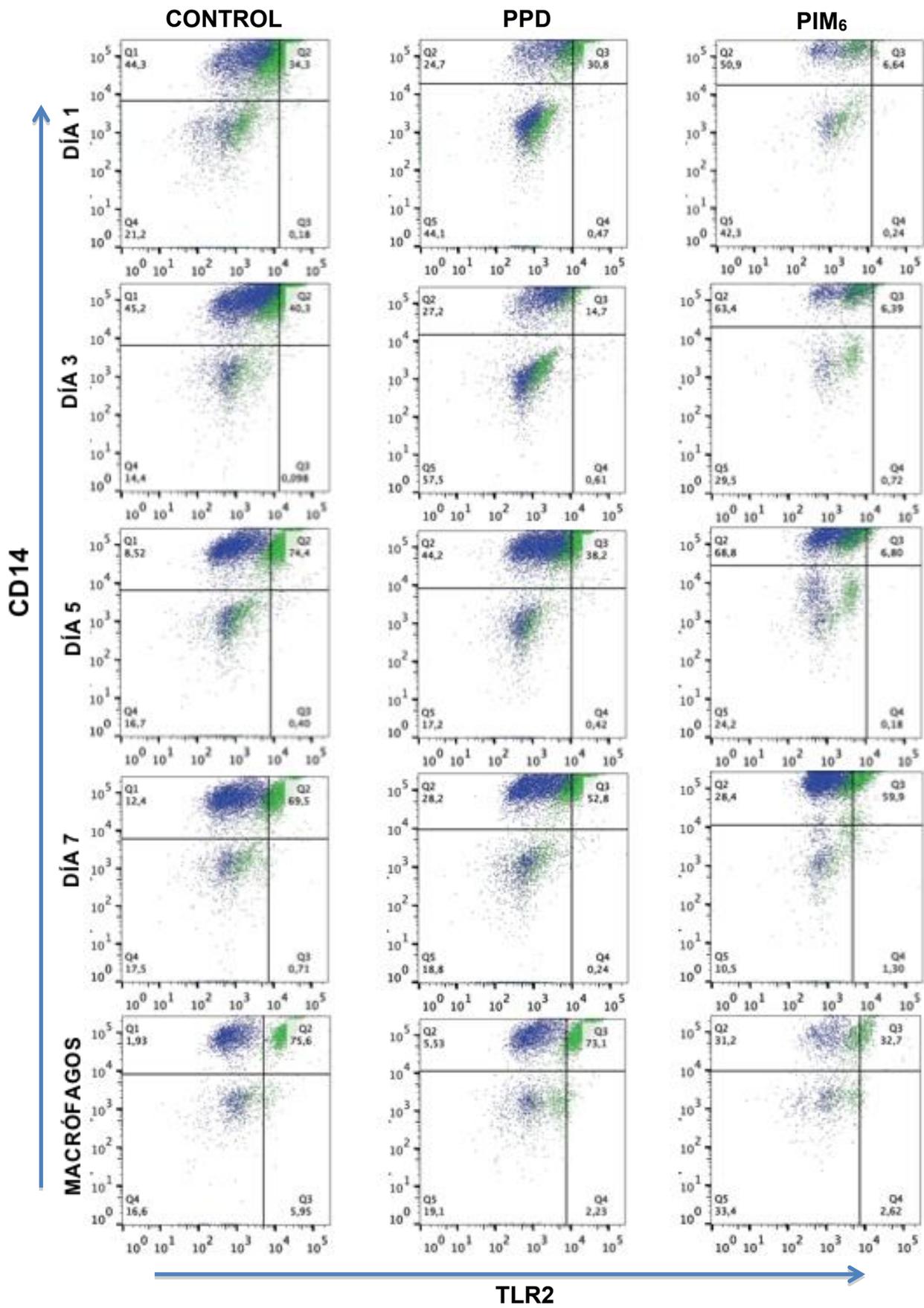
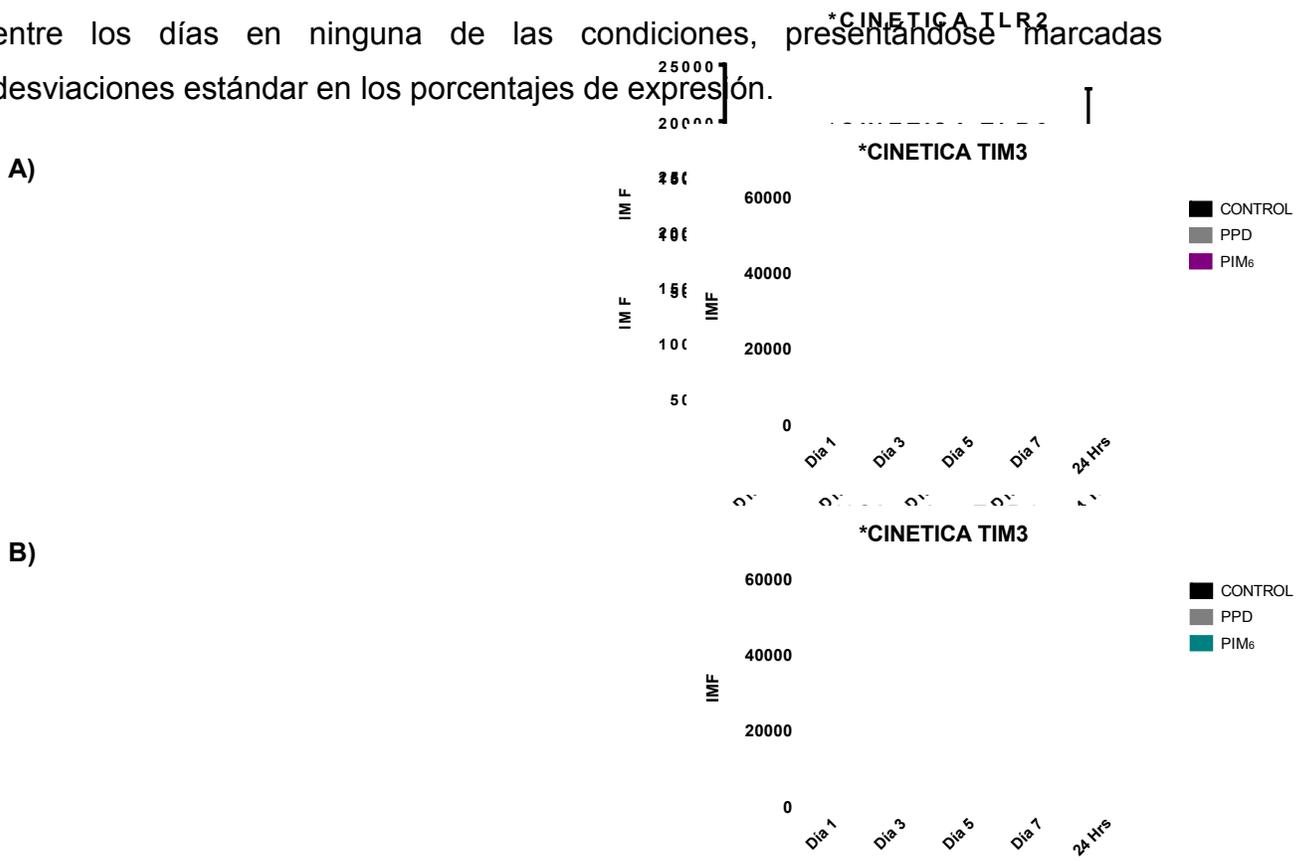


Figura 11. Esquema representativo de tres ensayos realizados por concentración para del porcentaje de expresión de TLR2 durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago y en macrófagos estimulados con PPD y PIM₆. Azul: controles, Verde: células con estímulo.

En la gráfica 2A se puede observar que el porcentaje de expresión para TLR2 en el control negativo aumenta ligeramente durante el proceso de diferenciación de los monocitos, pero cuando se adiciona PIM₆ a una concentración de 5µg/ml, éste regula negativamente la expresión de dicho receptor aún más que el control positivo, lo cual coincide con el patrón observado en la intensidad media de fluorescencia correspondiente a dicha concentración. Así mismo en la gráfica 2B se observa la misma tendencia en los monocitos estimulados con 7.5 µg/ml de PIM₆, con excepción del día 3, en donde el control negativo muestra una disminución en la expresión de TLR2 comparable con el estímulo lipídico; sin embargo, la IMF se mantiene prácticamente igual a la observada con una menor concentración. Finalmente no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los días en ninguna de las condiciones, presentándose marcadas desviaciones estándar en los porcentajes de expresión.



Gráfica 2. Evaluación de TLR2 en monocitos durante su diferenciación y en macrófagos estimulados durante 24 Hrs. A) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 5µg/ml de antígeno. B) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 7.5µg/ml de antígeno. Los datos representados son medianas ± intervalo intercuartílico de tres experimentos independientes considerando como significativo un valor de $P < 0.05$ obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis.

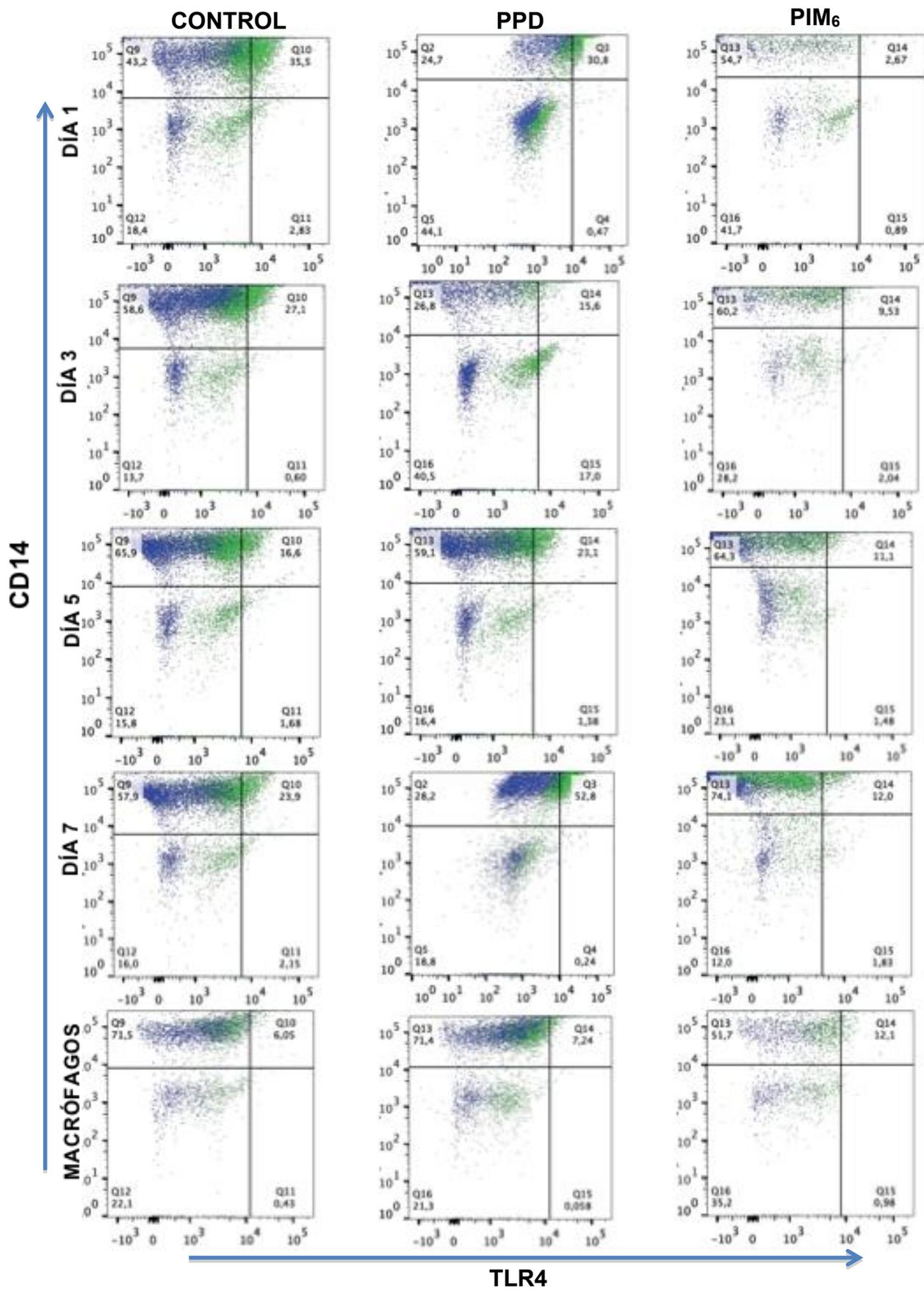
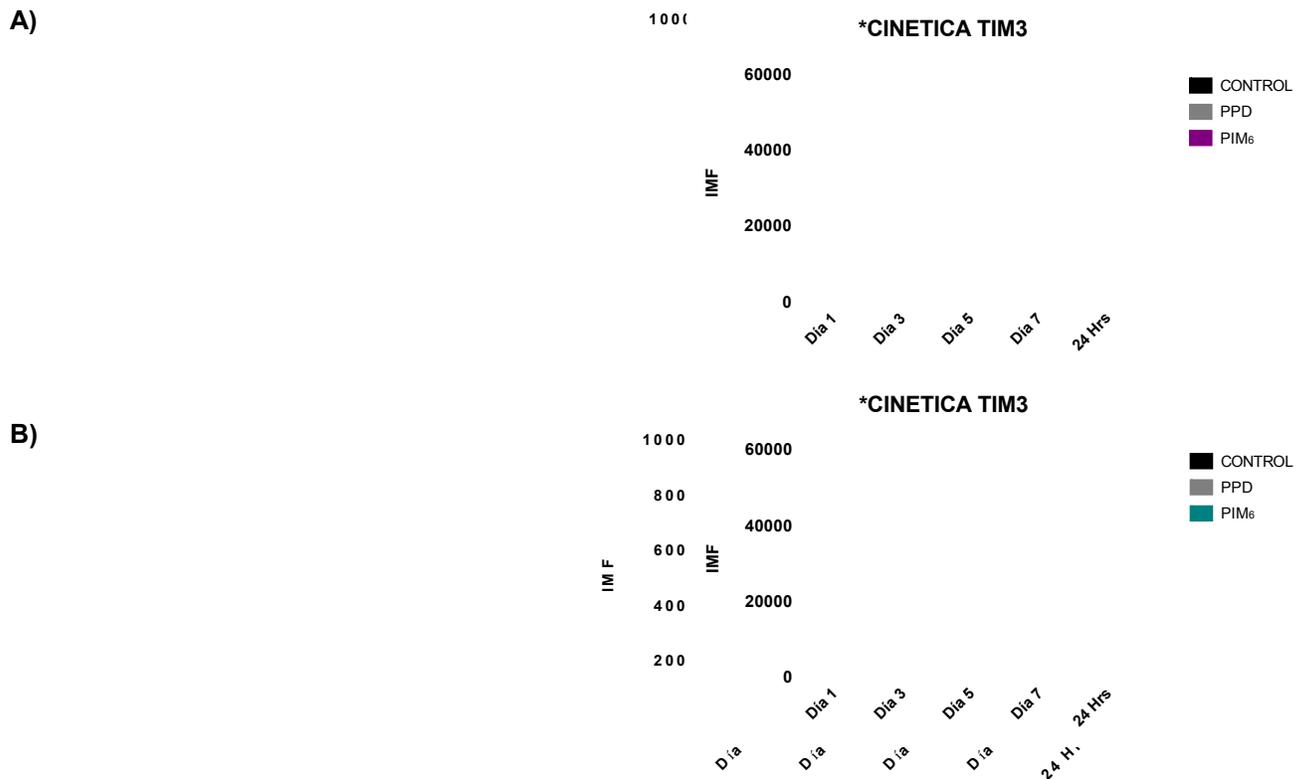


Figura 12. Esquema representativo de tres ensayos realizados por concentración para del porcentaje de expresión de TLR4 durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago y en macrófagos estimulados con PPD y PIM₆. Azul: controles. Verde: células con estímulo.

En la gráfica 3A, se observa un porcentaje de expresión constante de TLR4 en el control negativo hasta el séptimo día, mientras que con PIM₆ se observa una tendencia a aumentar este porcentaje alcanzando un máximo al día 5 y disminuyendo al día 7 y en macrófagos maduros. Con respecto a la gráfica 3B, el control negativo presenta una disminución al día 3 en el porcentaje de expresión, similar a lo observado con TLR2, sin embargo se recupera en el tiempo restante de diferenciación y en macrófagos maduros, sin observarse diferencia entre las diferentes condiciones. La intensidad media de fluorescencia en la figura 3A, se mantiene constante en los controles durante todo el proceso de diferenciación al igual que con PPD y PIM₆, siendo menor la intensidad con el agente proteico y aún más con el lipídico a una concentración de 5µg/mL; la misma tendencia se observa en macrófagos para ambas concentraciones de estímulo.



Gráfica 3. Evaluación de TLR4 en monocitos durante su diferenciación y en macrófagos estimulados durante 24 Hrs. A) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 5µg/ml de antígeno. B) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 7.5µg/ml de antígeno. Los datos representados son medianas ± intervalo intercuartílico de tres experimentos independientes considerando como significativo un valor de $P < 0.05$ obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis.

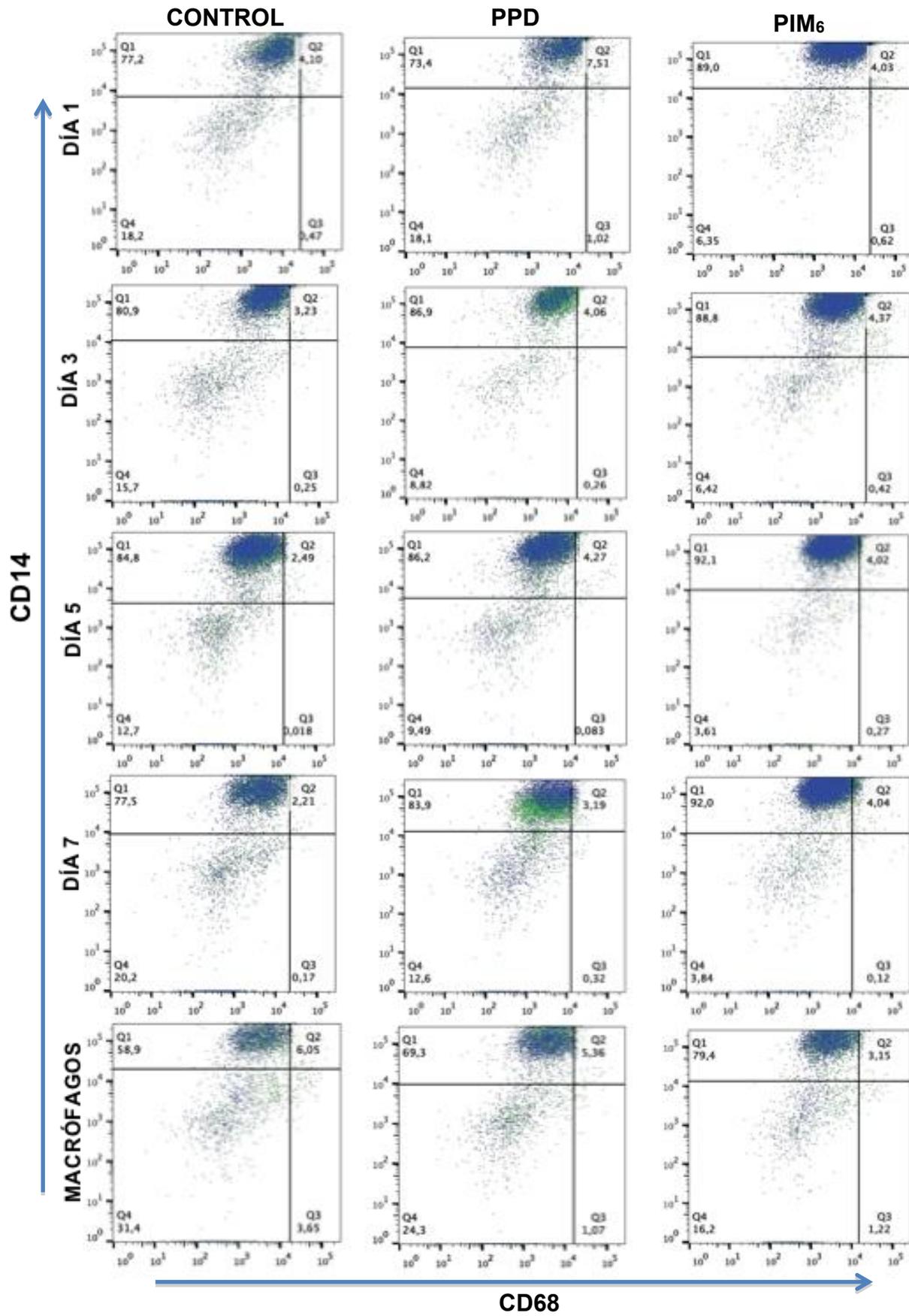
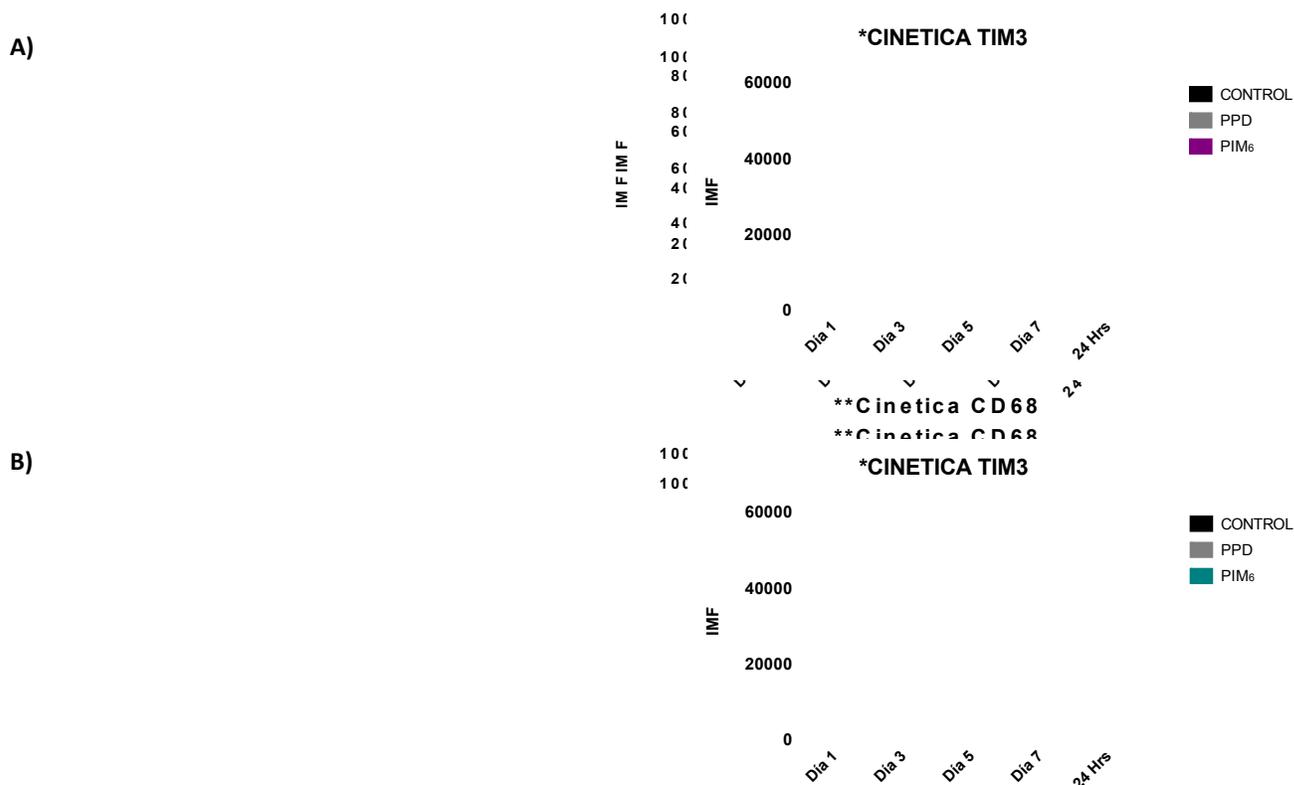


Figura 13. Esquema representativo de tres ensayos realizados por concentración para del porcentaje de expresión de CD68 durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago y en macrófagos estimulados con PPD y PIM₆. Azul: controles. Verde: células con estímulo.

En la gráfica 4A, el porcentaje de expresión del control negativo para CD68 se mantiene constante durante el proceso de diferenciación de los monocitos y muestra un ligero aumento en macrófagos maduros, mientras que PIM₆ incrementa levemente su expresión, rebasando al control negativo al día 7. Por otro lado en la gráfica 4B se observa un porcentaje de expresión constante, con un incremento en el día 3 para el control negativo, sin embargo no se observa diferencia entre los estímulos en los días evaluados. La intensidad media de fluorescencia en ambas concentraciones de estímulo se mantiene constante sin diferencias durante el proceso de diferenciación de los monocitos y en macrófagos.



Gráfica 4. Evaluación de CD68 en monocitos durante su diferenciación y en macrófagos estimulados durante 24 Hrs. A) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 5µg/ml de antígeno. B) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 7.5µg/ml de antígeno. Los datos representados son medianas ± intervalo intercuartilico de tres experimentos independientes considerando como significativo un valor de $P < 0.05$ obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis.

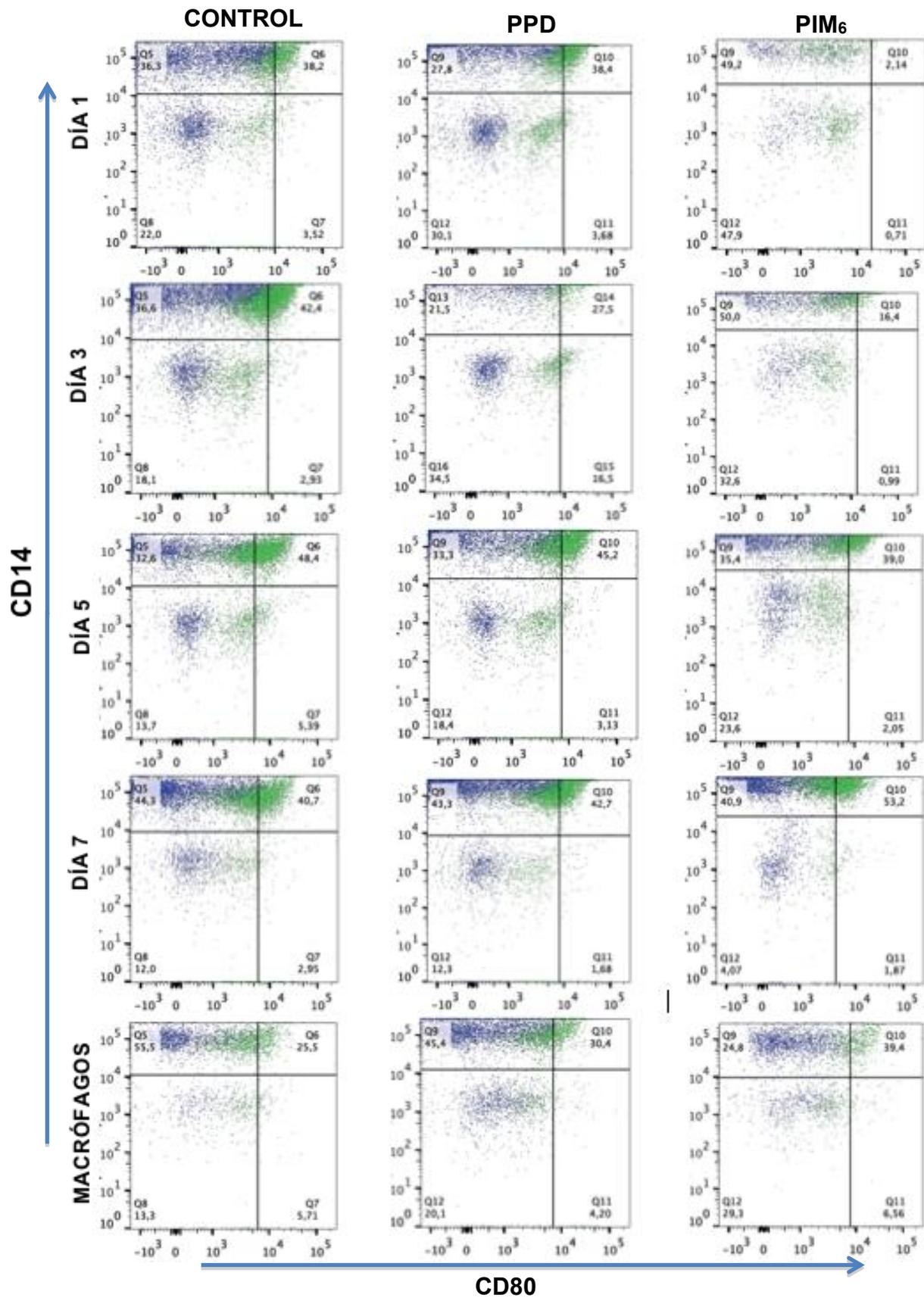
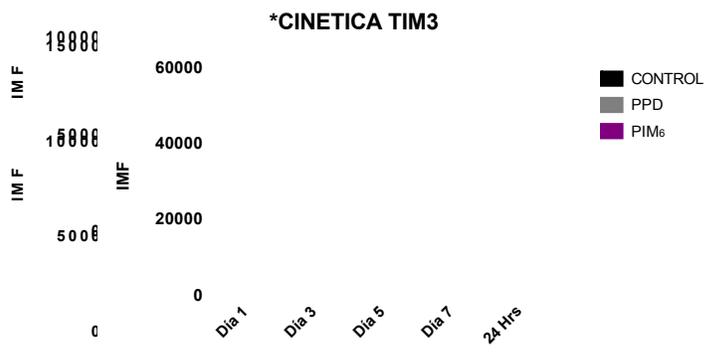


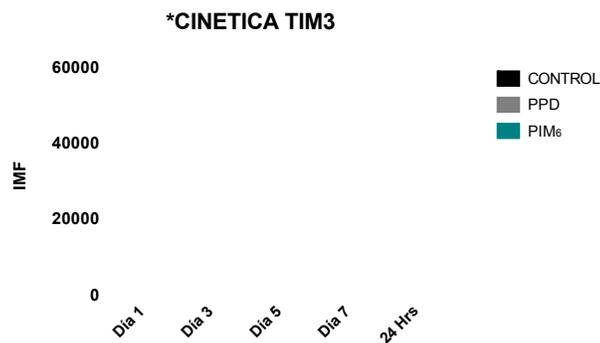
Figura 14. Esquema representativo de tres ensayos realizados por concentración para del porcentaje de expresión de CD80 durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago y en macrófagos estimulados con PPD y PIM₆ Azul: controles. Verde: células con estímulo.

El porcentaje de expresión de CD80 en la gráfica 5A aumentó ligeramente conforme transcurrió el periodo de diferenciación en el control negativo, en las células estimuladas con 5µg/ml de PIM₆ se reguló negativamente la expresión de dicha molécula a partir del día 1, sin embargo, incrementó ligeramente durante los días restantes sin rebasar a los controles; con respecto a macrófagos estimulados con el agente lipídico, el porcentaje incrementó casi al doble en comparación con el día 1 manteniéndose a la par de los controles. En la gráfica 5B el porcentaje de expresión aumentó en el control negativo del día 1 al 7, así mismo el agente lipídico indujo una expresión semejante en ambas concentraciones. Con respecto a la intensidad media de fluorescencia, PIM₆ reguló a la baja CD80 versus control y PPD, manteniéndose constante durante los 7 días de diferenciación en ambas concentraciones, presentando un ligero incremento con respecto a los controles en macrófagos estimulados con 5µg/ml.

A)



B)



Gráfica 5. Evaluación de CD80 en monocitos durante su diferenciación y en macrófagos estimulados durante 24 Hrs. A) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 5µg/ml de antígeno. B) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 7.5µg/ml de antígeno. Los datos representados son medianas ± intervalo intercuartílico de tres experimentos independientes considerando como significativo un valor de $P < 0.05$ obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis.

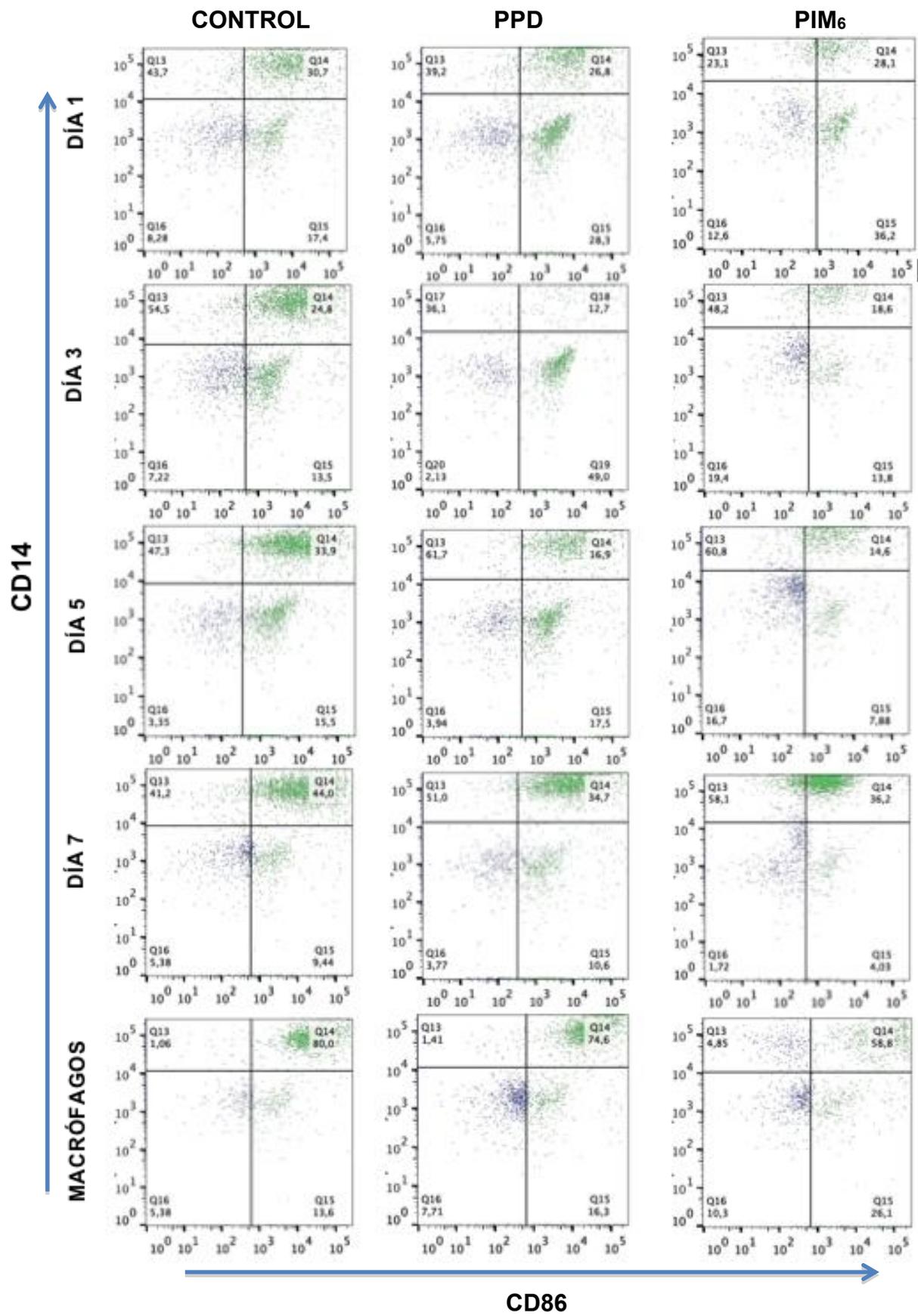
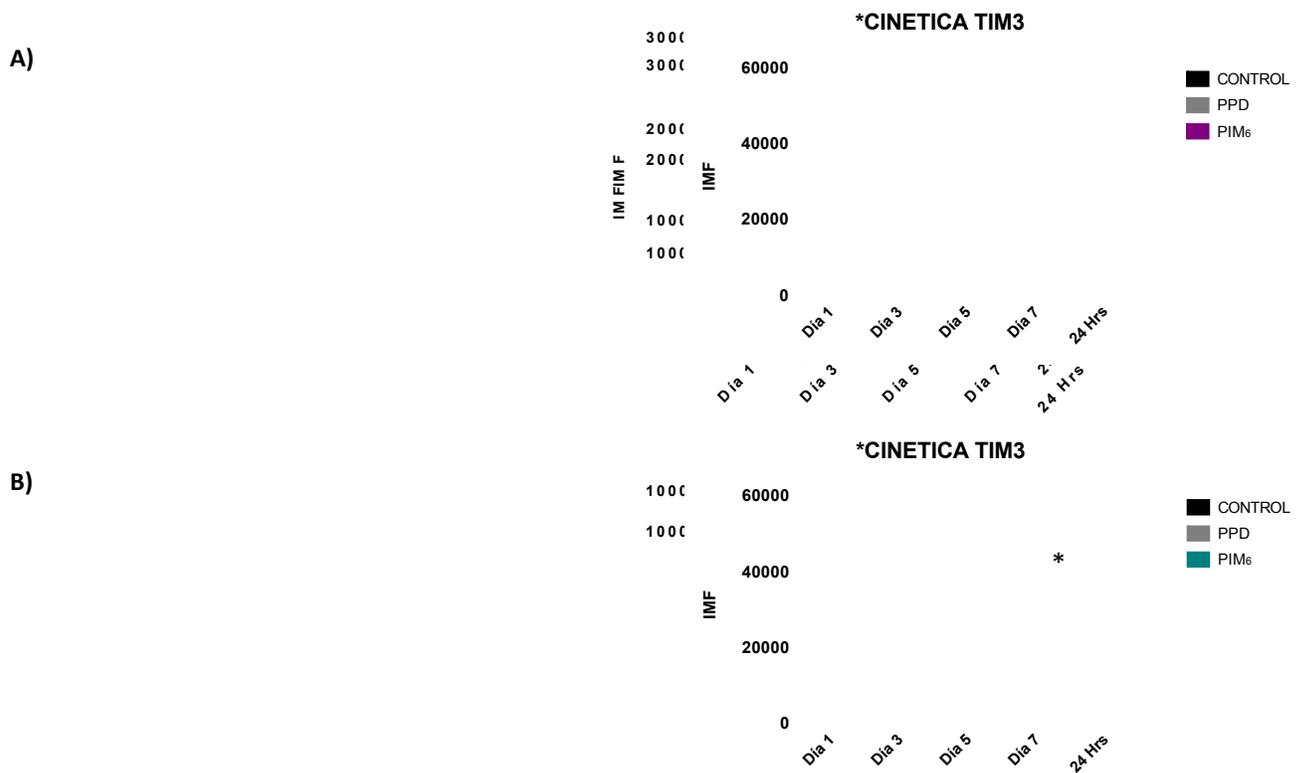


Figura 15. Esquema representativo de tres ensayos realizados por concentración para del porcentaje de expresión de CD86 durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago y en macrófagos estimulados con PPD y PIM₆. Azul: controles. Verde: células con estímulo.

El porcentaje de expresión para el marcador CD86 en la gráfica 6A se mantiene constante en todas las condiciones durante el proceso de diferenciación de los monocitos y presenta un incremento en macrófagos maduros pero sin diferencia entre los grupos. En la gráfica 6B se observa una disminución en el porcentaje de los controles positivo y negativo con respecto a PIM₆ durante el proceso de diferenciación; sin embargo en macrófagos maduros, el porcentaje de CD86 disminuye prácticamente a la mitad en las células estimuladas con PPD y PIM₆ a una concentración de 7.5µg/ml en comparación con el control negativo. Solamente se detectó fluorescencia en macrófagos maduros, en donde células estimuladas con 5µg/ml de antígenos no presentaron diferencia entre las condiciones, caso contrario a lo ocurrido con una mayor concentración en donde no se observa fluorescencia de ésta molécula con el estímulo proteico y lipídico obteniéndose un valor de $p=0.0499$ estadísticamente significativo.



Gráfica 6. Evaluación de CD86 en monocitos durante su diferenciación y en macrófagos estimulados durante 24 Hrs. A) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 5µg/ml de antígeno. B) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 7.5µg/ml de antígeno. Los datos representados son medianas \pm intervalo intercuartílico de tres experimentos independientes considerando como significativo un valor de $P<0.05$ obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis.

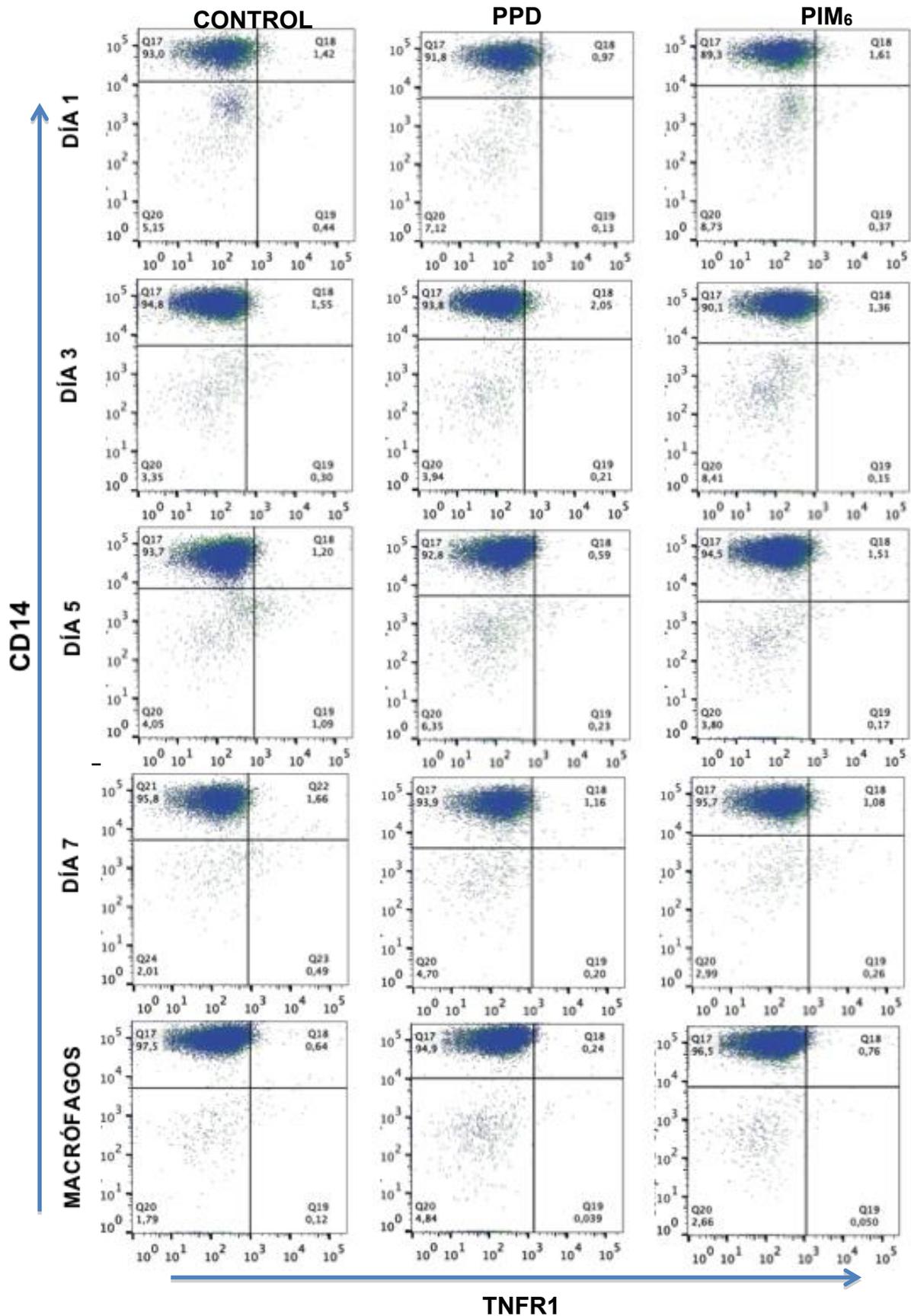
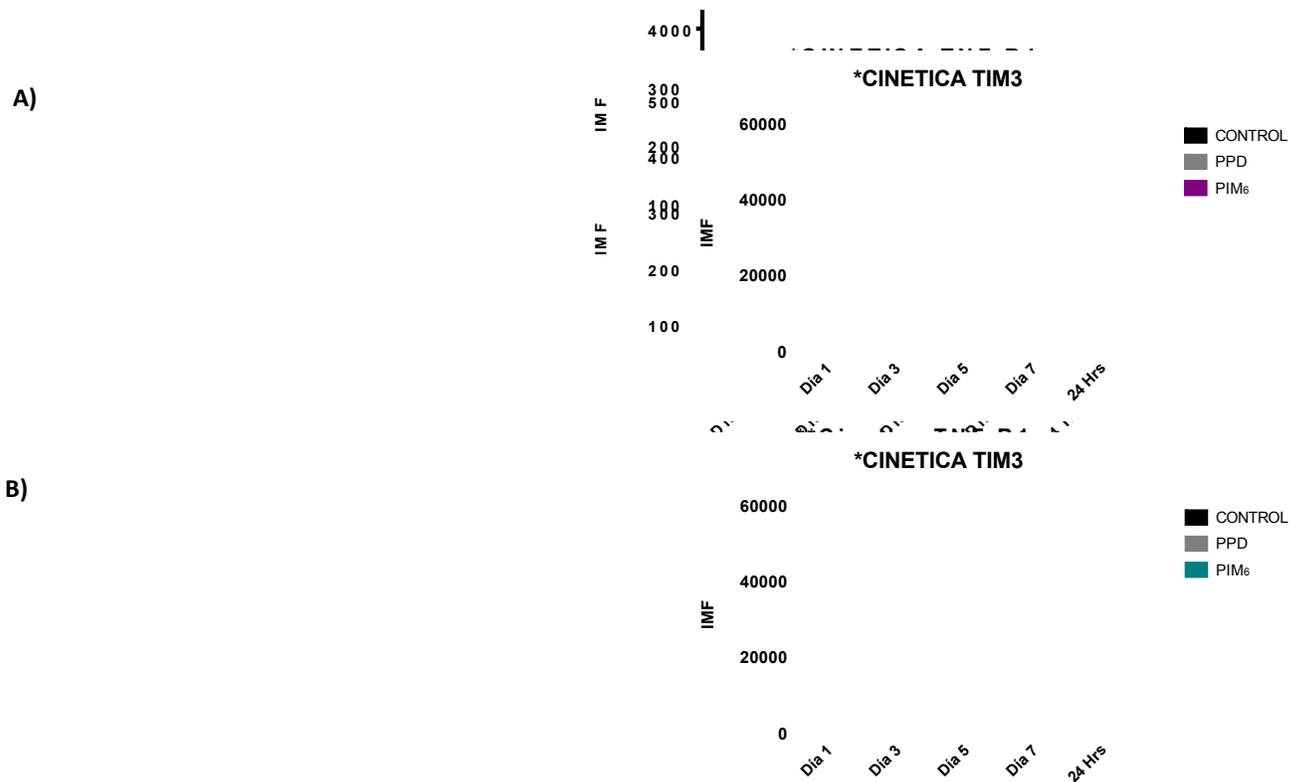


Figura 16. Esquema representativo de tres ensayos realizados por concentración para del porcentaje de expresión de TNFR1 durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago y en macrófagos estimulados con PPD y PIM₆. Azul: controles. Verde: células con estímulo.

El porcentaje de expresión para TNFR1 fue menor al 2% en ambas concentraciones de estímulos (gráficas 7A y 7B); sin embargo, se observó una ligera disminución en la intensidad media de fluorescencia en las células estimuladas a una concentración de 7.5µg/ml de antígenos con respecto al control negativo, pero sin presentar diferencias significativas entre ninguna de las condiciones ni entre los días evaluados



Gráfica 7. Evaluación de TNFR1 en monocitos durante su diferenciación y en macrófagos estimulados durante 24 Hrs. A) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 5µg/ml de antígeno. B) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 7.5µg/ml de antígeno. Los datos representados son medianas \pm intervalo intercuartílico de tres experimentos independientes considerando como significativo un valor de $P < 0.05$ obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis.

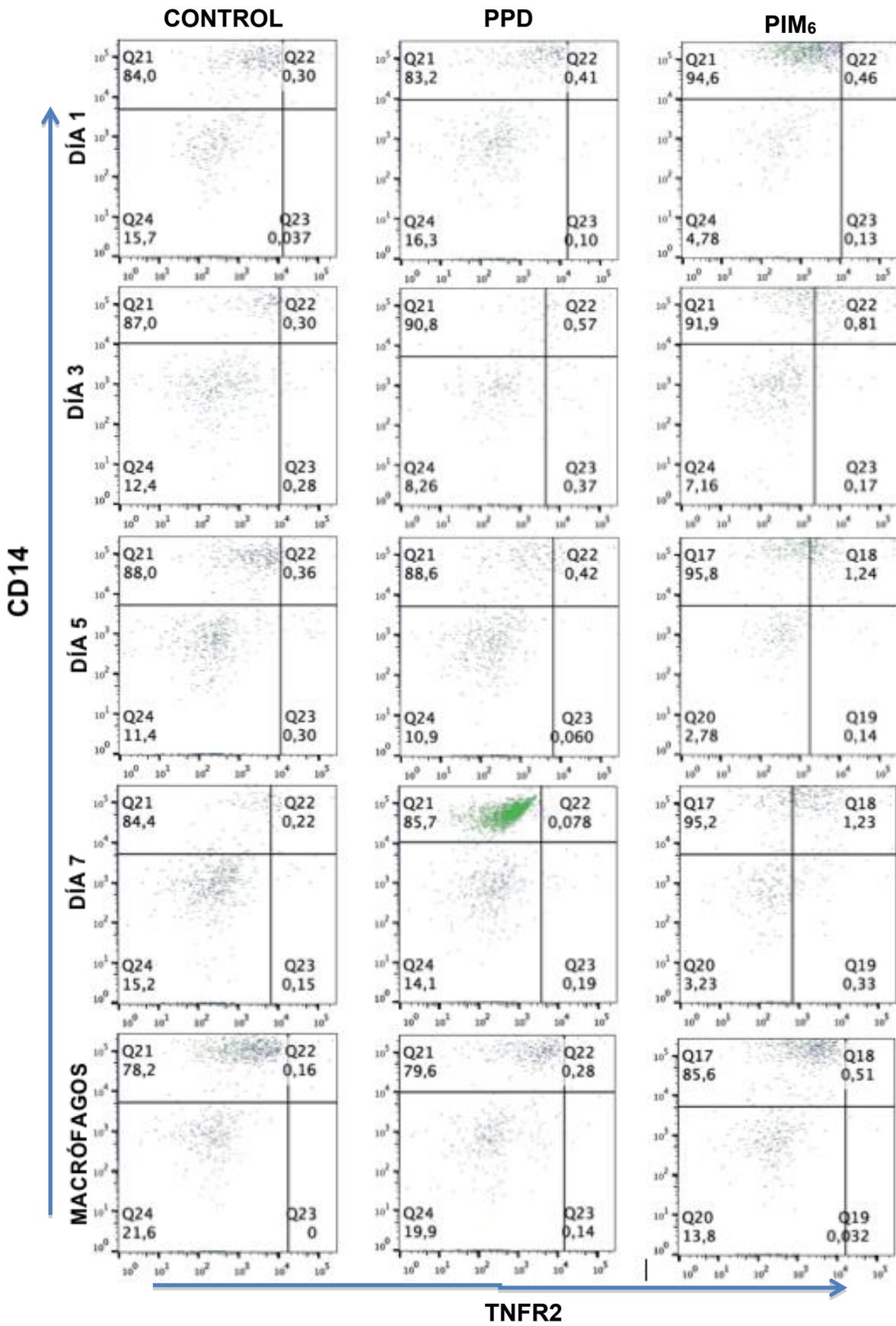
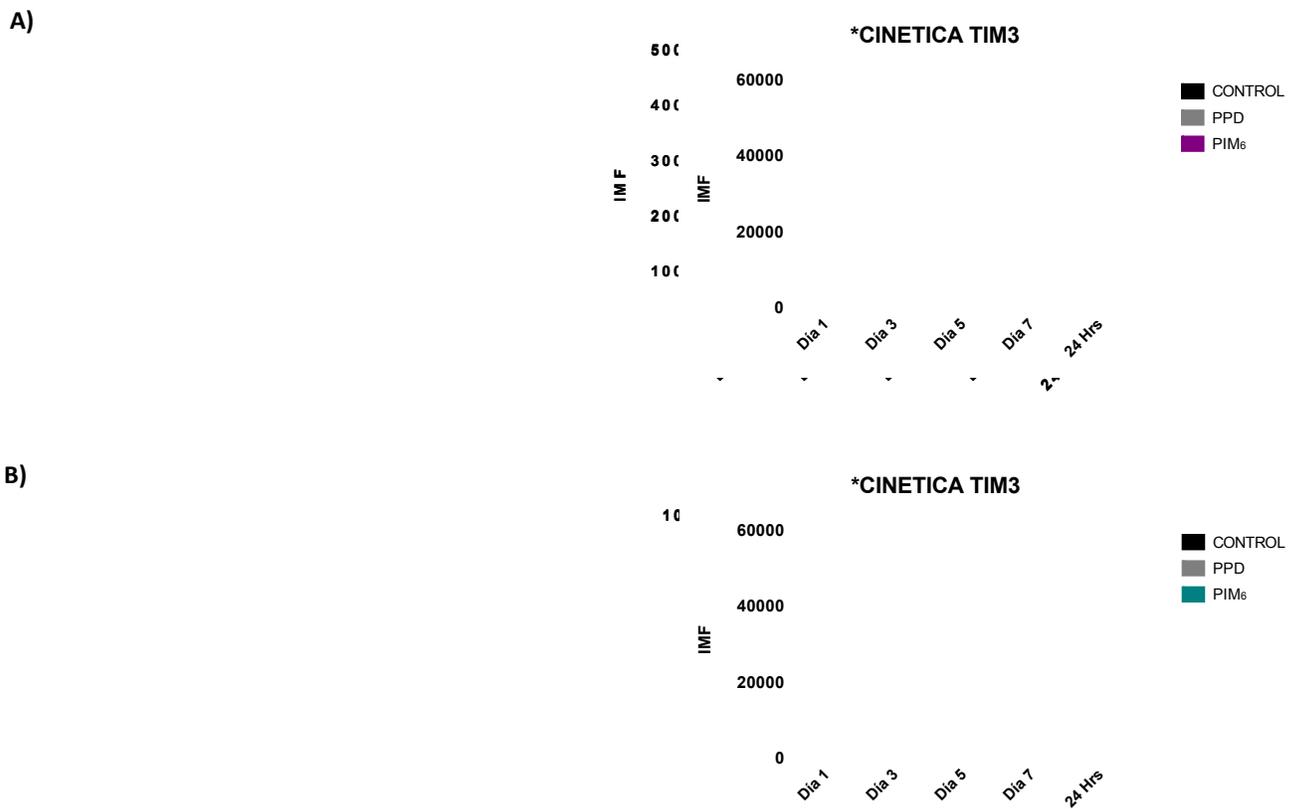


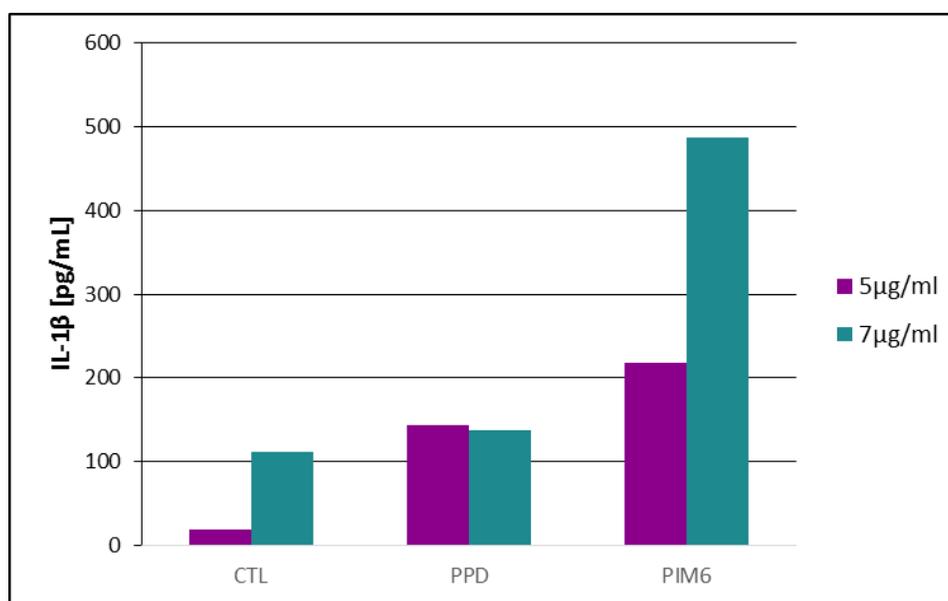
Figura 18. Esquema representativo de tres ensayos realizados por concentración para del porcentaje de expresión de TNFR2 durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago y en macrófagos estimulados con PPD y PIM₆. Azul: controles. Verde: células con estímulo.

De manera similar, se observó un bajo porcentaje de expresión del receptor de muerte celular TNFR2, en donde células en presencia de PIM₆, regularon negativamente su expresión del día 1 al día 7 y en macrófagos (Gráficas 8A y 8B); además no se detectó fluorescencia durante los siete días de diferenciación del monocito; solamente en macrófagos maduros, en donde no hubo diferencia significativa entre los estímulos a una concentración de 5µg/ml, pero sí en las células estimuladas con 7.5ug/ml de PIM₆ y PPD, en donde no se emitió fluorescencia con respecto al control negativo.



Gráfica 8. Evaluación de TNFR2 en monocitos durante su diferenciación y en macrófagos estimulados durante 24 Hrs. A) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 5µg/ml de antígeno. B) Porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de células estimuladas con 7.5µg/ml de antígeno. Los datos representados son medianas ± intervalo intercuartilico de tres experimentos independientes considerando como significativo un valor de $P < 0.05$ obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Con la finalidad de evaluar de manera preliminar la capacidad funcional de las células en presencia de los antígenos de *M. tuberculosis* se decidió cuantificar la secreción de citocinas pro-inflamatorias características del proceso infeccioso al término de la diferenciación de los monocitos, tal fue el caso de IL-1 β , en donde se encontró que monocitos estimulados durante siete días con PIM₆ indujeron la secreción de ésta citocina de una manera dosis dependiente ya que con una mayor concentración de estímulo (7.5 μ g/ml) IL-1 β incrementó más del doble en comparación con 5 μ g/ml (Gráfica 9 y Tabla 2).

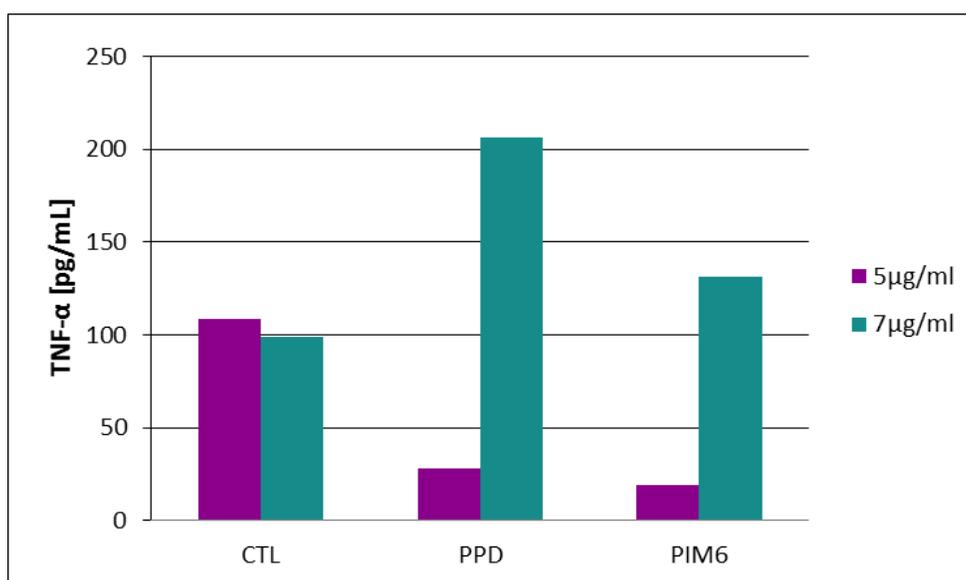


Gráfica 9. Secreción de IL-1 β en monocitos estimulados durante los 7 días de diferenciación.

Tabla 2. Concentración de IL-1 β (pg/ml)

ESTÍMULO	5 μ g/ml	7.5 μ g/ml
CONTROL	18.70	110.96
PPD	143.70	137.58
PIM ₆	218.38	487.84

También se decidió evaluar la secreción TNF- α ya que está bien establecido que juega papeles distintivos en la infección; a dosis fisiológicas impide la reactivación de tuberculosis latente, sin embargo, se sabe que altos niveles de TNF- α contribuyen al daño pulmonar en pacientes con TBP. En nuestros resultados se puede apreciar que los estímulos antigénicos a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ parecen inducir a una baja respuesta inflamatoria por parte de los monocitos estimulados durante siete días, sin embargo si se incrementa la concentración del antígeno se ejerce un efecto contrario, aumentando la secreción de TNF- α de manera importante (Gráfica 10 y Tabla 3).



Gráfica 10. Secreción de TNF- α en monocitos estimulados durante los 7 días de diferenciación.

Tabla 3. Concentración de TNF- α (pg/ml)

ESTÍMULO	5 $\mu\text{g/ml}$	7.5 $\mu\text{g/ml}$
CONTROL	108.83	99.16
PPD	28	206.16
PIM ₆	19	131.5

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La diferenciación de los monocitos en macrófagos se caracteriza por cambios en la activación de factores de transcripción y la expresión de genes, que resultan en cambios en la expresión de moléculas de adhesión, receptores de membrana, producción de citocinas y en la morfología celular. Estos cambios fenotípicos se reflejan en las respuestas efectoras de los fagocitos mononucleares contra patógenos. Así mismo las interacciones entre huésped y las micobacterias se encuentran fuertemente influenciadas por las características de la pared celular que éstas poseen, la cual presenta un alto contenido lipídico, incluyendo lipomanana, lipoarabinomanana y manósidos de fosfatidilinositol que constituyen potentes moduladores de la respuesta inmunológica.

En el presente trabajo se estudió el papel de PIM₆ en el proceso de diferenciación de monocitos y en macrófagos mediante la evaluación de moléculas críticas en la presentación de antígenos, tal es el caso de HLA-DR, en donde se observó que monocitos en presencia de éste lípido no presentaron modificaciones en el porcentaje de expresión de ésta molécula durante su proceso de diferenciación a macrófago, sin embargo, regularon negativamente la IMF, similar a lo reportado por Rocha-Ramírez *et al.*, 2008 en donde macrófagos estimulados con fracciones lipídicas polares de cepas de *M. tuberculosis Canetti* y *Beijing* regularon negativamente dicha expresión. Además, se sabe que una baja expresión de moléculas HLA-DR durante la infección con *M. tuberculosis* inhibe parcialmente el desarrollo de una respuesta celular adquirida contra el patógeno, por lo tanto, es posible que estas alteraciones estén asociadas, al menos en parte a ésta fracción lipídica si los monocitos entran en contacto con la bacteria antes de finalizar su proceso de maduración.

De las moléculas que han sido reportadas como marcadores de maduración en macrófagos derivados de monocitos se encuentran CD80 y CD86, al ser evaluadas se encontró que PIM₆ a una concentración de 5µg/ml no efecto de manera significativa el fenotipo de maduración de monocitos en función del

porcentaje de expresión de éstas moléculas coestimuladoras. Nuestros resultados son comparables con lo reportado por Mazurek *et al.*, 2012, en donde PIM sin fraccionar derivado de *M. tuberculosis* H37Rv no moduló la expresión de estos marcadores inducida por LPS en células dendríticas. Sin embargo, ante una mayor concentración lipídica sí se modificó la Intensidad de fluorescencia del marcador CD86, lo cual sugiere que altas dosis de este compuesto lipídico puede afectar potencialmente la función efectora de ésta molécula y por tanto, tener un impacto negativo en la capacidad de respuesta ante la infección.

Otra molécula que ha sido utilizada como marcador de maduración de monocitos es CD68 (Mayorga, *et al.*, 2015 & Puissegur *et al.*, 2004); sin embargo, existen otros reportes que no consideran a esta molécula relevante en la caracterización de los macrófagos (Pilling *et al.*, 2009). En este trabajo se observó que tanto el porcentaje de expresión como la IMF de CD68 en monocitos diferenciados y en macrófagos se mantuvieron constantes en todas las condiciones y tiempos evaluados, por cual, con base en este resultado, no parece ser un eficaz marcador de diferenciación monocítica.

Con respecto a los receptores de tipo Toll, pudimos observar una tendencia a regular negativamente la expresión de TLR2 durante el proceso de diferenciación de los monocitos y al término de la misma en presencia de PIM₆, estos resultados difieren de lo observado por Gilleron *et al.*, 2003 donde al estimular macrófagos con PIM sin fraccionar, PIM₂ y PIM₆ de *M. bovis* BCG, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* H37Rv, encontraron que estos compuestos lipídicos estimularon la expresión de éste receptor, sin embargo, nuestros hallazgos son similares a lo observado con estímulos lipídicos polares de cepas con mayor virulencia como Beijing. La misma tendencia se observó para TLR4, la expresión de éste receptor concuerda con lo reportado al estimular macrófagos con lípidos polares provenientes de cepas virulentas, en comparación con fracciones lipídicas apolares de cepas no virulentas (Rocha-Ramírez *et al.*, 2008); el comportamiento diferencial en el perfil de expresión de éstos receptores podría estar sujeto al tipo de fraccionamiento utilizado para la obtención de PIM₆ y a la polaridad que

presenta cada fracción lipídica, así como la virulencia de cada cepa y al grado de reactividad que se observa en la población mexicana ante las micobacterias.

Por otra parte, se ha sugerido que no solo la bacteria completa es capaz de inducir muerte celular, sino que algunos de sus componentes en forma independiente también son responsables de éste fenómeno; en la patogenia de la infección por especies de *Mycobacterium* la modulación del proceso apoptótico puede jugar dos papeles opuestos; por una parte promoviendo la supervivencia bacteriana en individuos cuyos mecanismos microbicidas son ineficientes ó por inhibición de la apoptosis, debido principalmente a los factores de virulencia del patógeno (Vega-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, en individuos con una respuesta inmune adecuada la inducción de apoptosis parece limitar la viabilidad y el crecimiento bacteriano, por este motivo evaluamos si PIM₆ afectaba la expresión de receptores de superficie celular involucrados en muerte celular de tipo apoptótica por vía extrínseca en monocitos diferenciados y en macrófagos de donadores sanos, como es el caso de los receptores de la familia de TNFR1 y 2, los cuales necesitan la unión con TNF- α para desencadenar las vías de señalización que dan como resultado la apoptosis celular. Los resultados obtenidos muestran que PIM₆ a una concentración de 7.5 μ g/ml inhibe la expresión de TNFR2, la respuesta que induce éste lípido podría ser utilizada por la micobacteria como un mecanismo para evadir su eliminación del hospedero.

Finalmente existen reportes contradictorios con respecto a la actividad funcional que desencadenan las fracciones lipídicas polares de *M. tuberculosis* en las células infectadas, en donde, por un lado PIM₂ y PIM₆ ejercen actividad antiinflamatoria y por otra parte son documentados como ligeramente proinflamatorios, promoviendo la síntesis de citocinas antibacterianas independientemente del grado de acilación que presenten (Rocha Ramírez *et al.*, 2008). Por lo tanto, con el fin de evaluar de manera preliminar el impacto de PIM₆ en el fenotipo funcional de los monocitos diferenciados a macrófagos se cuantificó mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo de un donador las concentraciones de TNF- α e IL-1 β , mediadores esenciales de la respuesta celular

de tipo Th1, que colaboran a la formación de granulomas y a la contención de la infección.

Las diferencias funcionales que desencadena PIM₆ en monocitos diferenciados parecen estar asociadas a la concentración en que es administrado dicho compuesto ya que las células presentaron una respuesta proinflamatoria, incrementando la secreción de IL-1 β a medida que aumentó la concentración del lípido. Sin embargo al estar en contacto con una baja dosis, las células presentan una respuesta menor en la secreción de TNF- α , la cual se reestablece al aumentar la concentración del antígeno, en donde se hace presente el fenotipo inflamatorio.

Con base en estos resultados y a pesar de las grandes diferencias halladas entre donadores en la expresión de las moléculas evaluadas, se puede observar una tendencia de PIM₆ a modificar el correcto proceso de maduración de los monocitos en el contexto de moléculas de superficie celular, así como en la producción de citocinas lo cual potencialmente puede ser utilizado por parte de la micobacteria como un mecanismo que limite la respuesta inmunológica del hospedero.

8. CONCLUSIÓN

Debido al pequeño número de donadores analizados y a las diferencias halladas entre cada uno de ellos puede concluirse de manera preliminar que:

- PIM₆ regula negativamnete la expresion de CD86, TLR2, TLR4, TNFR2 y HLADR durante la diferenciación de monocito a macrófago.
- CD68 no es un eficaz marcador de diferenciación celular monocítica.
- PIM₆ induce respuestas proinflamatorias en monocitos diferenciados.
- El efecto inducido por PIM₆ parece ser concentración dependiente.

Estas modificaciones potencialmente alterarían la evolución y calidad de la respuesta inmune innata a nivel pulmonar; sin embargo más estudios son necesarios para poder concretar la relevancia fisiopatológica de este fenómeno.

9. PERSPECTIVAS

- Ω Aumentar la (n) para cada uno de los análisis realizados en el presente trabajo .
- Ω Evaluar mecanismos de muerte celular en macrófagos estimulados con PIM₆.
- Ω Evaluar la formación de granulomas *in vitro* en presencia de PIM₆.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ω Abbas A., Lichtman A. and Pillai Shiv. 2008. Inmunología celular y molecular. 6°ed. Elsevier. Pp113-136.
- Ω Banaiee N, Kincaid E, Buchwald U., Jacobs WR, and Ernst J. 2006. Potent Inhibition of Macrophage Responses to IFN-Gamma by Live Virulent *Mycobacterium tuberculosis* is Independent of Mature Mycobacterial Lipoproteins But Dependent on TLR2. *Journal Immunology*. 176(5): 3019-3027.
- Ω Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Genetic Diversity: Mining the Fourth International Spoligotyping Database (SpolDB4) for Classification, Population Genetics and Epidemiology. *BMC Microbiology*. 6: 23.
- Ω Cao B., White J. and Williams S. 2011. Synthesis of Glycoconjugate Fragments of Mycobacterial Phosphatidylinositol Mannosides and Lipomannan. *Beilstein Journal Organic Chemistry*. 7: 369-377.
- Ω Centros para el Control y Prevencion de Enfermedades (CDC). 2015. Disponible en: <http://www.cdc.gov/tb/esp/topic/treatment/default.htm>.
- Ω Constantoulakis P., Filiou E., Rovina N., Chras G., Hamhougia A., Karabela S., Sotiriou A., Roussos C., Poulakis N. 2010. *In Vivo* Expression of Innate Immunity Markers in Patients With *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *BMC Infectious Diseases*. 10: 243-253.
- Ω Cook G., Berney M., Gebhard S., Heinemann M., Cox R., Danilchanka O. and Niederweis M. 2009. Physiology of Mycobacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 55: 281-319.
- Ω Cooper A. and Khader S. 2006. IL-12p40: An Inherently Agonistic Cytokine. *TRENDS in Immunology*. 28(1): 33-38.
- Ω Chávez-Galán L., Arenas-Del Ángel M., Sada-Ovalle I. and Lascurain R. 2009. Principales Mecanismos de Evasión de la Respuesta Inmune por *Mycobacterium tuberculosis*. *Gaceta Médica de México*. 145(4): 323-330.

- Ω Cheng Y. and Schorey J. 2013. Exosomes Carrying Mycobacterial Antigens Can Protect Mice Against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *European Journal of Immunology*. 43: 3279-3290.
- Ω De La Salle H., Mariotti S., Angenieux C., Gilleron M., Garcia-Alles L., Malm D., Berg T., Paoletti S., Maitre B., Mourey L., Salamero J., Cazenave J., Hanau D., Mori L., Puzo G. and De Libero G. 2005. Assistance of Microbial Glycolipid Antigen Processing by CD1e. *Science*. 310(1321): 1321-1324.
- Ω Divangahi M., Mostowy S., Coulombe F., Kozak R., Guillot L., Veyrier F., Kobayashi K., Flavell R., Gros P. and Behr M. 2008. NOD2-Deficient Mice Have Impaired Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection Through Defective Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology*. 181: 7157-7165.
- Ω Driessen N., Ummels R., Maaskant J., Gurcha S., Besra G., Ainge G., Larsen D., Painter G., Vandenbroucke-Grauls C., Geurtsen J., Appelmelk B. 2009. Role of Phosphatidylinositol Mannosides in the Interaction Between *Mycobacteria* and DC-SIGN. *Infection and Immunity*. 77 (10): 4538-4547.
- Ω El Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2013 [en línea] Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reporte_final_mexico.pdf.
- Ω Ernst J. 2012. The Immunological Life Cycle of Tuberculosis. *Nature Immunology*. 12: 581-591.
- Ω Estructura de *Mycobacterium tuberculosis* [en línea]. [2 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://iesicaria.xtec.cat/~DCN/BiologiaCurtis/Seccion%205/5%20%20Capitulo%2027.htm>.
- Ω Geissmann F., Manz M., Jung S., Sieweke M., Merad M., and Ley K. 2010. Development of Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells. *Science*. 327(5966): 656-661.
- Ω Allepuz R., Calasanz M., Carracedo A., Cruz J., Espinós C., Esteller M., Estivill X., Font J., García J., González R., Guillén E., López A., López J.,

- López C., Lorente J., Lluch A., Martín J., Martínez F., Millán J., Moltó M., Iglesias L., Ortube M., Pallardó F., Pérez A., Pérez L., Puig O., Quiroga R., Ramos F., Rueda J., Vilar E. 2015. Nuevas claves sobre la susceptibilidad genética a la tuberculosis. *Genética Médica News*. 2 (20).
- Ω Gilleron M., Quesniaux V. and Puzo G. 2003. Acylation State of the Phosphatidylinositol Hexamannosides from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Its Implication in Toll-like Receptor Response. *The Journal Biological Chemistry*. 278: 29880-29889.
- Ω Gorocica P., Jiménez-Martínez M., Garfías Y., Sada I. Y Lascurain R. 2005. Componentes Glicosilados de la Envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que Intervienen en la Patogénesis de la Tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*. 18 (2):142-153
- Ω Guerin M., Kordula J., Alzari P., Brennan P. and Mary Jackson. 2010. Molecular Basis of Phosphatidylmyo- inositol Mannoside Biosynthesis and Regulation in Mycobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (44): 33577-33583.
- Ω Kind T., Goldsby R. y Osborne B. 2007. Inmunología de Kuby. 6 Ed. Mc Graw Hill. 371-380.
- Ω Kishimoto T., Akira S., Taga T. 1992. Interleukin-6 and Its Receptor: A Paradigm for Cytokines. *Science*. 258: 593-597.
- Ω Koneman E. and Allen S. 2008. Diagnóstico Microbiológico. 5ª Edición. Ed. Médica Panamericana. Pp110.
- Ω Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A., Netea, M. G. and Van Crevel, R. 2011. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical & Developmental Immunology*. 2011: 1-12.
- Ω Kurt-Jones E., Mandell L., Whitney C., Padgett A., Gosselin K., Newburger P. and Finberg R. 2002. Role of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) in Neutrophil Activation: GM-CSF Enhances TLR2 Expression and TLR2-Mediated Interleukin 8 Responses in Neutrophils. *Blood*. 100: 1860-1868.

- Ω Kurt-Jones E., Popova L., Kwinn L., Haynes L., Jones L., Tripp R., Walsh E., Freeman M., Golenbock D., Anderson L. and Finberg R. 2000. Pattern Recognition Receptors. TLR4 and CD14 Mediate Response to Respiratory Syncytial Virus Nature Immunology. *Nature Immunology*. 1(5): 398-401.
- Ω Lin M and Ottenhoff T. 2008. Host-Pathogen Interactions in Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection: Identification of New Targets for Tuberculosis Intervention. *Drug Targets*. 8:15-29.
- Ω Mayer-Barber K., Barber D., Shenderov K., White S., Wilson M., Cheever A., Kugler D., Hieny S., Caspar P., Núñez G., Schlueter D., Sutterwala F. and Sher A. 2010. Caspase-1 Independent IL-1 β Production Is Critical for Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and Does Not Require TLR Signaling *in vivo*. *The Journal of Immunology*. 184(7): 3326-3330.
- Ω Mayorga J., Fafutis-Morris M., Tlacuilo-Parra A. and Guillén-Vargas C. 2015. Expresión de Receptores Tipo Toll 2 y 4 en Macrófagos de Piel de Pacientes con Esporotricosis Cutánea. *Dermatología Revista Mexicana*.59:3-8.
- Ω Mazurek J., Ignatowicz L., Kallenius G., Svenson S., Pawlowski A. and Hamasur B. 2012. Divergent Effects of Mycobacterial Cell Wall Glycolipids on Maturation and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PLoS ONE*. 7(8): 1-13.
- Ω Murphy K., Travers P. and Walport M. 2008. Inmunología de Janeway.7° Ed. Mc Graw Hill.pp58.
- Ω Murray P. and Wynn T. 2011. Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets. *Nature Reviews Immunology*. 11(11): 723-737.
- Ω Organización Mundial de la Salud [en línea]. [2 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>.
- Ω Organización Panamericana de la Salud. Manual Para El Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. 2008. Pp23.
- Ω Palomino J., Cardoso L. and y Rittacco. 2007. Tuberculosis. Argentina. Institute of Tropical Medicine Antiwerp. Pp57, 96.

- Ω Peiser L. and Gordon S. 2001. The Function of Scavenger Receptors Expressed by Macrophages and Their Role in the Regulation of Inflammation. *Microbes and Infection*. 3: 149-159.
- Ω Philips J. and Ernst J. 2012. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*.7:353–84.
- Ω Pilling D., Fan T., Huang D., Kaul B. and Gomer R. 2009. Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages, and Fibroblasts. *PLoS ONE*. 4(10): 1-18.
- Ω Raja A. 2004. Immunology of Tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*.120: 213-232.
- Ω Ramakrishnan L. 2012. Revisiting the Role of the Granuloma in Tuberculosis. *Nature Immunology* .12:352-366.
- Ω Ramírez N., Cocotle B., Méndez A., Arenas J. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 2 (2).
- Ω Reconocimiento inmune de *Mycobacterium tuberculosis*. [en línea]. [23 de agosto de 2015]. Disponible en: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=c%C3%A9lulas+presentadoras+de+ant%C3%ADgenos&lang=2.
- Ω Rivas-Santiago B., Vieyra-Reyes P. and Araujo Z. 2005. Respuesta de Inmunidad Celular en la Tuberculosis Pulmonar. *Revista de Investigación Clínica*.46(4): 0535-5133.
- Ω Schäfer G., Jacobs M., Wilkinson R. & Brown G. 2009. Non-Opsonic Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by Phagocytes. *The Journal Innate Immunity*.1:231-243.
- Ω Silva Miranda M., Breiman A., Allain S., Deknuydt F. and Altare F. 2012. The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria?. *Clinical and Developmental Immunology*: 1-14.
- Ω Silva-Miranda M., Ekaza E., Breiman A., Asehnoune K., Barros-Aguirre D., Pethe K., Ewann F., Brodin P., Ballell-Pages L. and Altare F. 2015. High-

Content Screening Technology Combined with a Human Granuloma Model as a New Approach to Evaluate the Activities of Drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59(1): 693-697.

- Ω Sköld M. and Behar S. 2008. Tuberculosis Triggers a Tissue-Dependent Program of Differentiation and Acquisition of Effector Functions by Circulating Monocytes. *The Journal of Immunology*. 181: 6349-6360.
- Ω Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*.16 (3): 463-496.
- Ω Trejo H., Gorocica P., Porrás F., Chávez R., Lascurain R., Zenteno E. 2003. Bases Moleculares de la Interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con los Macrófagos. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*. 16(1):41-47.
- Ω Vega-Martínez X., López-Vidal Y. and Gutiérrez-Pabello J. 2008. Inducción de Apoptosis por Especies del Genero *Mycobacterium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50 (1-2):48-58.
- Ω Welin A., Winberg M., Abdalla H., Särndahl E., Rasmusson B., Stendahl O. and Lerm M. 2008. Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* Lipoarabinomannan into Macrophage Membrane Rafts Is a Prerequisite for the Phagosomal Maturation Block. *Infection and Immunity*. 76(7):2882-2887.
- Ω Zhou D., Huang C., Linab Z., Zhan S., Kong L., Fang C., Li J. 2014. Macrophage Polarization and Function With Emphasis on the Evolving Roles of Coordinated Regulation of Cellular Signaling Pathways. *Cellular Signalling*. 26: 192-197.
- Ω Zuniga, J., Torres García D., Santos Mendoza T. 2012. Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012: 1-19.