



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS PROVENIENTES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO AL
ESTÍMULO CON *M. avium***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
NATALIA GALEANO BÁEZ**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Laura Bonífaz Alfonzo
Facultad de Medicina, UNAM**

**Dr. Karen Manoutcharian Airapetian
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

MÉXICO, D. F. Noviembre, 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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana (PIMM) de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal. El proyecto se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD2010-C01-140998 y Presupuesto Operativo 2014 y 2015. La aspirante a maestra en Ciencias Bioquímicas Natalia Galeano Báez fue becaria de CONACyT con número de registro 558720.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. Lo único imprescindible, la inspiración auténtica y permanente. Mi propulsor.

A mis amigos. Por recordarme que existe un panorama insondable colmado de posibilidades valiosas y trascendentes que bajo ninguna circunstancia debo perder de vista.

A Manuela Ospina Castro. Mujer admirable. Mi amiga y hermana.

A Juan Fernando Tapias. Por un apoyo incondicional y sincero que perdura e inició incluso antes de conocernos.

A Luis Contreras Castro. Mi hogar, mi amigo, mi colega y parte esencial de mi felicidad.

A la familia Contreras Castro. En quienes he encontrado un segundo hogar.

A mis compañeras del PIMM. Claudia Mayoral Terán y Karla Magnolia Suarez Sánchez por sus aportes a nivel intelectual y por su apoyo incondicional e invaluable a nivel personal.

A mis colegas del PIMM en quienes encontré un apoyo permanente, generoso y oportuno, en especial a Luis Alberto Salazar López, Marisa Cruz Aguilar, Ruth Morales Corona, Gabriela Molina Olvera, Karen Flores Moreno y Claudia Ivette Rivas Ortiz por sus aportes imprescindibles para la ejecución de éste trabajo.

A los doctores: Dr. Fabián Arechavaleta Velasco y Dr. Pablo Enrique Domínguez López gracias a quienes obtuvimos las muestras para este proyecto. Por su constante disposición y amabilidad.

A las Dras. Yolanda López Vidal y Antonia Isabel Castillo Rodal por permitirme trabajar en su laboratorio.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Laura Bonifaz Alfonzo, Dr. Karen Manoutcharian Airapetian, por sus aportes a nivel intelectual y personal.

Al Biol. Gonzalo Asariel Acero Galindo por su apoyo incondicional, los conocimientos compartidos y permanente disposición.

A los miembros del jurado: Dra. Claudia González Espinosa, Dra. Gohar Gevorgyan Markosian, Dra. Paula Licon Limón, Dr. Alejandro Alagón Cano, Dr. Julio César Carrero Sánchez, por sus contribuciones para el buen término de éste manuscrito.

A la UNAM. La razón por la cual decidí emprender este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	15
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Tuberculosis	17
1.2. Género <i>Mycobacterium</i>	18
1.3. Micobacterias.....	19
1.3.1. Clasificación	20
1.3.2. Complejo <i>Mycobacterium avium</i>	21
1.3.3. Prevalencia de las enfermedades por infección con MNT.....	23
1.4. Vacuna BCG	23
1.4.1. La vacuna BCG y las MNT	24
1.5. Células dendríticas	25
1.5.1. Subpoblaciones de CD murinas.....	26
1.5.2. Subpoblaciones de CD humanas	28
1.5.3. Subpoblaciones de CD humanas y su equivalente murino	31
1.6. Estados de maduración de las CD.....	32
1.6.1. CD y tolerancia	33
1.7. CD y micobacterias.....	37
1.8. Fuentes de CD humanas.....	38
1.8.1. Obtención de CMSCU	40
1.8.2. Obtención de CPH	41
1.9. Generación <i>in vitro</i> de CD humanas	42
2. JUSTIFICACIÓN	45
3. HIPÓTESIS.....	46
4. OBJETIVOS.....	47
4.1. Objetivo General	47
4.2. Objetivos Particulares	47
5. METODOLOGÍA	48
5.1. Esquema general.....	48
5.2. Obtención de SCU	51

5.3.	Obtención de CMSCU	52
5.4.	Obtención de CPH	52
5.5.	Determinación de la pureza de las CPH.....	52
5.6.	Inducción de CPH hacia subpoblaciones de CD	56
5.7.	Determinación de la diferenciación hacia subpoblaciones de CD	56
5.8.	Curvas de crecimiento y UFC de las micobacterias.....	59
5.8.1.	M. bovis BCG phipps	59
5.8.2.	M. avium Subsp. hominissuis.....	61
5.9.	Infección de las CD	61
5.10.	Determinación de los estadios de maduración inducidos sobre las CD	62
5.10.1.	Expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras.....	62
5.10.2.	Secreción de citocinas	64
5.1.	Tinción de las células para análisis por citometría de flujo	64
5.2.	Análisis estadístico	65
6.	RESULTADOS	66
6.1.	Obtención de SCU, CMSCU y CPH	66
6.2.	Pureza de las CPH	66
6.3.	Diferenciación hacia subpoblaciones de CD	67
6.4.	Curva de crecimiento y UFC de <i>M. avium</i>	68
6.5.	Estadios de maduración inducidos sobre las CD.....	69
6.5.1.	Expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras.....	69
6.5.2.	Cuantificación de citocinas secretadas por las CD	73
7.	DISCUSIÓN	76
8.	CONCLUSIONES	82
9.	ANEXOS.....	83
9.1.	Criterios para selección de las muestras de SCU	83
9.2.	Carta de consentimiento informado	83
9.3.	Cuestionario	85
10.	REFERENCIAS	87

ABREVIATURAS

APC: Células presentadoras de antígeno
AraLAM: Lipoarabinomanana con una molécula de fosfoinositol y arabinosa. También denominada PILAM
ATP: Adenosina trifosfato
BCG: Vacuna atenuada de *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin)
BDCA: Antígenos de células dendríticas de sangre
BM: Médula ósea
BMDC: Células dendríticas derivadas de médula ósea
cCD: Células dendríticas convencionales o clásicas. Junto con las pCD, constituyen las denominadas CD primarias
CCR7: Receptor de quimiocinas CC tipo 7
CD: Célula dendrítica
CDP: Precursores comunes de CD
Clec9a: Receptor de lectinas tipo c
CLP: Progenitores comunes linfoides
CM: Células mononucleares
CMP: Progenitores comunes mieloides
CMSCU: Células mononucleares de sangre de cordón umbilical
CPH: Células progenitoras hematopoyéticas
CTLA4: Antígeno citotóxico del linfocito T
D.O: Densidad óptica
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DTH: Prueba cutánea de hipersensibilidad de tipo retardada
ELISA: Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
ESAM: Molécula de adhesión endotelial celular
ESM: Sociedad Europea de Micobacteriología
FC: Fracción cristalizable
FCγR: Receptor de la fracción cristalizable de los anticuerpos IgG o Y
FLT-3L: Ligando del receptor fms-like cinasa de tirosinas 3 (CD135 o FLK2)
FSC-A: Forward scatter (dispersion frontal) en area (tamaño)
FSC-H: Forward scatter (dispersión frontal) en altura (tamaño)
GC%: Proporción de guanina-citosina
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HLA: Antígenos leucocitarios humanos
HSC: Células madre hematopoyéticas
IFN-I: Interferón tipo I
IFN-γ: Interferón gamma
IFN-α: Interferón alfa
IgG: Inmunoglobulina G
IL-10: Interleucina 10
IL-12 (p70): Interleucina 12 sub-unidad (p70)
IL-12: Interleucina 12

IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-4: Interleucina 4
IL-4R: Receptor de IL-4
IL-6: Interleucina 6
IMF: Intensidad media de fluorescencia
LAM: Lipoarabinomanana
LB: Linfocito B
LC: Células de Langerhans epidérmicas
Lin-: Ausencia de expresión de los marcadores de linaje CD3, CD14, D16, CD19, CD20 y CD56
LMPP: Progenitores linfoides multipotentes de impronta
LPS: Lipopolisacárido
LT: Linfocito T
LTCD4: Linfocitos T CD4+, vírgenes o naive
LTreg: LT reguladores
MAA: *M. avium* Subsp. *avium*
MAC: Complejo *Mycobacterium avium*
MAC-Others: Subconjunto de aislados de clasificación indeterminada pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium*
MACS: Separación inmuno-magnética
MAH: *M. avium* Subsp. *hominissuis*
manLAM : Lipoarabinomanana manosilada
M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDP: Precursor común para CD y macrófagos
MHC-I: Complejo principal de histocompatibilidad clase I
MHC-II: Complejo principal de histocompatibilidad clase II
MNT: Micobacterias no tuberculosas
MoCD: Células dendríticas derivadas de monocitos. Conocidas también como CD inflamatorias
MOI: Multiplicidad o índice de infección
MOTT: Mycobacteria Other Than Tuberculosis
MTB: *Mycobacterium tuberculosis*
NK: Células asesinas naturales
OMS: Organización mundial de la salud
pCD: Células dendríticas plasmacitoides. Junto con las cCD, constituyen las denominadas CD primarias
PD-1: Receptor de muerte celular programada
PD-L1/PD-L2: Proteínas transmembranales, ligandos de programación de muerte
PILAM: Lipoarabinomanana con una molécula de fosfoinositol y arabinosa. También denominada AraLAM
PIMM: Programa de Inmunología Molecular Microbiana
pre-cCD: Precursores de cCD
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones
RNAr: Ácido ribonucléico ribosomal

RPM: Revoluciones por minuto
RPMI-1640: Medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute-1640
SCF: Factor estimulante de células madre
SCU: Sangre de cordón umbilical
SD: Desviación estándar
SDG: Semanas de gestación
SP: Sangre periférica
SSC-A: Side scatter (dispersión ortogonal o lateral) en área (complejidad)
TACE: Enzima para la conversión de TNF- α
TB: Tuberculosis
TB-MDR: Tuberculosis multidrogo-resistente
TCR: Receptor del linfocito T
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
TLR: Receptor tipo Toll
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TPO: Trombopoyetina
UFC: Unidades formadoras de colonias
UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
Xcr1: Receptor de quimiocina XC 1
 λ : Longitud de onda [nm]

TABLAS

Nombre de la tabla	Página
Tabla 1. Composición del complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC) (Modificado de: Rindi L, et al. 2014).	21
Tabla 2. Propiedades de las células dendríticas maduras e inmaduras. LTCD4: linfocitos T CD4+ vírgenes o naive, CCR7: receptor de quimiocinas CC tipo 7. MHC-I y II: complejo principal de histocompatibilidad clase I y II. (Modificado de: Abbas AK, et al. 2008).	32
Tabla 3. Volumen de las muestras de sangre de cordón umbilical (SCU), número de células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CMSCU) y células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Medias y desviaciones estándar (SD).	66
Tabla 4. Compendio del efecto inducido en la expresión de las moléculas CD86, CD40, CD273 y MHC-II en la superficie de las subpoblaciones de cCD CD1c+, CD1c+/CD141+ y CD141+ estimuladas con <i>M. avium</i> o BCG respecto a las cCD no estimuladas.	78

FIGURAS

Nombre de la figura	Página
Figura 1. Incidencia de tuberculosis (TB) en el año 2013 (<i>Modificado de: WHO, Global Tuberculosis report. 2014</i>).	18
Figura 2. Árbol evolutivo del género <i>Mycobacterium</i> basado en el gen 16S rRNA, incluyendo sus especies representativas (<i>Modificado de: Tortoli E, et al. 2014</i>).	19
Figura 3. Compromiso y diferenciación de las células dendríticas en ratón. La figura muestra que las células dendríticas y los monocitos se originan a partir de progenitores mieloides comunes (CMP) derivados de células madre hematopoyéticas (HSC). Las HSC generan progenitores linfoides comunes (CLP) y CMP. Los CMP se diferencian en progenitores de granulocitos y macrófagos (GMP) los cuales se diferencian en granulocitos y en progenitores de macrófagos y células dendríticas (MDP). Los MDP dan origen a los monocitos y a los progenitores de células dendríticas comunes (CDP). Los CDP se diferencian en células dendríticas plasmacitoides (pDC) o precursores de células dendríticas (pre-DC). Los pre-CD pueden migrar de la médula ósea y diferenciarse en células dendríticas CD8+ o CD11b+ en órganos linfoides, o en células dendríticas CD103+ o CD11b+ en tejido no linfoide. El cuadro gris representa la médula ósea. (<i>Modificado de: Kim SJ, et al. 2015</i>).	27
Figura 4. Comprendiendo el desarrollo de las células dendríticas en humano. Información reciente sugiere que los monocitos y las células dendríticas clásicas (cDCs) y plasmacitoides (pDCs), son generados a partir de distintas vías de desarrollo e intermediarios celulares. Los puntos de ramificación exactos no son claros, pero la impronta de linaje puede ocurrir desde los progenitores linfoides multipotentes de impronta (LMPPs), involucrando de manera potencial modificaciones epigenéticas indicadas por los núcleos coloreados. La existencia de un precursor común de células dendríticas y macrófagos (MDP) o un precursor común para cDCs y pDCs es debatible. Sin embargo, los progenitores restringidos de las cDCs (cDC-P) pueden ser distinguidos de los progenitores específicos de pDCs (pre-pDCs) por la expresión de moléculas de superficie específicas. Las cDC-Ps se diferencian en pre-DCs, las cuales migran a través de la sangre hacia los órganos periféricos. Su diferenciación hacia CDs CD8+/CD103+ y CD11b+ en los tejidos blanco es controlada por los factores de transcripción Batf3 e IRF-4, respectivamente. La diferenciación de pre-pDCs hacia pDCs ocurre en la médula ósea. Las pDCs maduras ingresan al torrente sanguíneo para residir en los órganos periféricos. Los monocitos también se desarrollan en la médula ósea y se originan de progenitores comunes de monocitos (cMoP), distinguidos de las cDC-P y las pre-pDC. Los monocitos migran a través del torrente sanguíneo a los órganos periféricos donde pueden modular su fenotipo y función dependiendo del microambiente, como inflamación (células derivadas de monocitos) (<i>Modificado de: Schraml BU, et al. 2014</i>).	29

Figura 5. Fenotipo de las subpoblaciones de células dendríticas humanas. La figura resume el fenotipo, la localización, el perfil de expresión de receptores de patógenos y el equivalente murino de las subpoblaciones de las células dendríticas humanas. En el recuadro rojo se señala a las cCD BDCA1 que expresan los marcadores exclusivos CD1c+/CD141+, en recuadro verde a las cCD BDCA1 que expresan CD1c+, en recuadro violeta a las cCD BDCA3 que expresan CD141+, en recuadros grises se señalan los marcadores compartidos de cCD CD11c+/Lin-. DC: células dendríticas, pDC: células dendríticas plasmacitoides, cDC: células dendríticas clásicas, BDCA: antígenos de células dendríticas de sangre, LC: células de Langerhans, CD: clúster de diferenciación, TLR: receptores tipo Toll, Lin: linaje, HLA-DR: receptor de superficie celular MHC-II (complejo principal de histocompatibilidad clase II), codificado por el complejo del antígeno leucocitario humano, Necl2: proteína tipo Nectina 2, Xcr1: receptor de quimiocina XC 1, Clec9a: receptor de lectinas tipo C, Dec205: multilectina tipo C, Langerin: langerina, lectina tipo C de las LC, EpCAM: molécula de adhesión epitelial celular, Sirpα: proteína reguladora de señal, E-cadherin: cadherina epitelial, DC-SIGN: no integrina reclutadora de moléculas de adhesión intracelular, específica de células dendríticas, FXIIIa: transglutaminasa, ND: no determinado, PRRS: receptores de reconocimiento de patrones. (Modificado de: Merad M, et al. 2013).

31

Figura 6. Principales moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras involucradas en la activación de los linfocitos T. En gris se esquematiza a los linfocitos T CD4+ vírgenes o naive (LTCD4) que expresan en su superficie a los receptores de linfocitos T (TCR), el receptor proteína de muerte celular programada (PD-1), el antígeno citotóxico del linfocito T (CTLA-4) y los clúster de diferenciación (CD28) y (CD40L). En violeta se esquematiza a las células dendríticas (CD) que expresan en su superficie el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II), los ligandos del receptor de muerte celular programada PD-L1 y PDL-2 (PD-L1/2) y los clúster de diferenciación (CD86), (CD80) y (CD40). En la presentación de antígenos vía MHC-II de las CD a los LTCD4, participan el resto de moléculas citadas proporcionando señales co-estimuladoras (señales positivas) o co-inhibidoras (señales negativas). La activación o inhibición del LTCD4 depende del balance entre las señales positivas y negativas. Las flechas indican que las señales son recibidas por el LTCD4 como producto de su interacción con las CD. Los círculos verdes con signo positivo indican que la unión del receptor en la superficie del LTCD4 con el respectivo ligando en la superficie de la CD, proporciona una señal positiva o de co-estimulación que favorece la activación de los LTCD4 en términos de su proliferación, supervivencia y diferenciación. Los círculos rojos con signo negativo indican que la unión del receptor en la superficie del LTCD4 con el respectivo ligando en la superficie de la CD, proporciona una señal negativa o de co-inhibición que inhibe la activación de los LTCD4 produciendo tolerancia y anergia. El panel izquierdo esquematiza dos escenarios en los que se promovería la activación de los LTCD4. El panel derecho esquematiza dos escenarios en los que se inhibiría la activación de los LTCD4. (Modificado de: Vasaturo A, et al. 2013).

36

Figura 7. Estrategia experimental general. SCU: sangre de cordón umbilical, CMSCU: células mononucleares de sangre de cordón umbilical, CPH: células progenitoras hematopoyéticas, cCD: células dendríticas clásicas, BDCA1/BDCA3: antígenos de células dendríticas clásicas de sangre 1 y 3, UFC: unidades formadoras de colonias, BCG: *Mycobacterium bovis* BCG phipps,

49

M. avium: Mycobacterium avium Subsp. hominissuis.

Figura 8. Estrategia experimental con los métodos empleados en cada etapa. SCU: sangre de cordón umbilical, CMSCU: células mononucleares de sangre de cordón umbilical, CPH: células progenitoras hematopoyéticas, cCD: células dendríticas clásicas, BDCA1/BDCA3: antígenos de células dendríticas clásicas de sangre 1 y 3, MACS: separación inmuno-magnética, CD: clúster de diferenciación, LIN1: coctel de linaje1, RPMI-1640: medio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute)-1640, FLT-3L: ligando del receptor fms-like cinasa de tirosinas 3, SCF: factor estimulante de células madre, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-4: interleucina 4, PD-L2: ligando de muerte programada 2, MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad clase II, IL-12: interleucina 12, IL-6: interleucina 6, IL-1 β : interleucina 1 β , TNF- α : factor de necrosis tumoral α , IL-10: interleucina 10, ELISA: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas, BCG: *Mycobacterium bovis* BCG phipps, *M. avium: Mycobacterium avium Subsp. hominissuis.*

51

Figura 9. Análisis de citometría de flujo de las CMSCU y CPH. Las secciones A1, B1, C1 y D1 corresponden al análisis de CMSCU. Las secciones A2, B2, C2 y D2 corresponden al análisis de CPH. En los gráficos de puntos A1 y A2 se seleccionan los singletes los cuales corresponden al 83,6% de las CMSCU y 76,5% de las CPH, delimitados por áreas de líneas negras. A partir de los singletes se generan los gráficos de puntos emparentados B1 y B2, sobre los que se seleccionan las subpoblaciones de interés las cuales corresponden al 84,4% de los singletes de las CMSCU y 28,1% de los singletes de las CPH, delimitados por áreas de líneas negras. A partir de las subpoblaciones de interés se generan los gráficos de puntos emparentados C1 y C2, sobre los que se seleccionan las células vivas Hoechst+ señaladas con recuadros rojos que corresponden al 97,6% de las CMSCU y 98,2% de las CPH. A partir de las células vivas se generan los gráficos de puntos emparentados D1 y D2, sobre los que se seleccionan las células Hoechst+/CD34+/LIN1- localizadas en el cuadrante Q1 señaladas con recuadros rojos que corresponden al 1,35% de CMSCU y 98,5% de CPH. El porcentaje de las células Hoechst+/CD34+/LIN1- se captura para los subsecuentes análisis estadísticos. MACS: separación inmuno-magnética, CMSCU: células mononucleares de sangre de cordón umbilical obtenidas por separación con gradientes de densidad, previas a MACS, CPH: células progenitoras hematopoyéticas obtenidas por MACS.

55

Figura 10. Análisis de citometría de flujo de la diferenciación de las cCD. En el gráfico de puntos A se seleccionan los singletes los cuales corresponden al 74,2% de las cCD delimitadas por el área de líneas negras. A partir de los singletes se genera el gráfico de puntos emparentado B, sobre el que se selecciona la subpoblación de interés que corresponde al 32,2% de los singletes, delimitada por el área de líneas negras. A partir de la subpoblación de interés se genera el gráfico de puntos emparentado C, sobre el que se seleccionan las células vivas Hoechst+ señaladas con un recuadro rojo, y que corresponden al 95% de la subpoblación de interés. A partir de las células vivas se genera el gráfico de puntos emparentado D sobre el que se seleccionan las células CD11c+/LIN1- localizadas en el cuadrante Q1 señalado con el recuadro rojo, y que corresponden al 23,5% de las células vivas. A partir de las células CD11c+/LIN1- se genera el gráfico de puntos emparentado E sobre el cual se captura el

58

porcentaje de cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD141+, cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+/CD141+ o cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+, localizadas en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 respectivamente. El porcentaje de estas células se captura de forma automática, y es calculado mediante una fórmula matemática en la que se introduce el porcentaje de 23,5% que aparece en el cuadrante Q1 del gráfico de puntos D, señalado con el recuadro rojo y los porcentajes de 2,28%, 92,8% y 2,83% que aparecen en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 del gráfico de puntos E, según la subpoblación de cCD de interés, señalados con recuadros rojos (ver detalle de la fórmula matemática en el texto que antecede a esta figura). Los porcentajes se capturan para los subsecuentes análisis estadísticos. cCD: células dendríticas clásicas.

Figura 11. Curva de crecimiento de *M. bovis* BCG phipps. A una longitud de onda (λ) de 600nm, dicha micobacteria alcanza la fase media logarítmica a una densidad óptica (DO) entre 0,8 y 1, alrededor del décimo día de cultivo. Determinación por triplicado. Medias y desviaciones estándar. (Modificado de: Molina Olvera G. 2013) 60

Figura 12. Análisis de citometría de flujo de la maduración de las cCD. En el gráfico de puntos A se seleccionan los singletes los cuales corresponden al 88,5% de las cCD delimitadas por el área de líneas negras. A partir de los singletes se genera el gráfico de puntos emparentado B, sobre el que se selecciona la subpoblación de interés que corresponde al 26,2% de los singletes, delimitada por el área de líneas negras. A partir de la subpoblación de interés se genera el gráfico de puntos emparentado C, sobre el que se seleccionan las células vivas Hoechst+ señaladas con un recuadro rojo, y que corresponden al 89% de la subpoblación de interés. A partir de las células vivas se genera el gráfico de puntos emparentado D sobre el que se seleccionan las células CD11c+/LIN1- localizadas en el cuadrante Q1 señalado con el recuadro rojo, y que corresponden al 20,6% de las células vivas. A partir de las células CD11c+/LIN1- se genera el gráfico de puntos emparentado E sobre el cual se captura la IMF de las moléculas CD86, CD40, CD273 Y MHC-II mapeando las cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD141+, cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+/CD141+ o cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+, localizadas en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 respectivamente, señalados con recuadros rojos. La IMF se captura de forma automática para los subsecuentes análisis estadísticos. cCD: células dendríticas clásicas. IMF: intensidad media de fluorescencia. 63

Figura 13. Pureza de las CPH. La figura muestra el porcentaje de células que expresan los marcadores Hoechst+/CD34+/LIN1-, determinado por citometría de flujo, previo y posterior a la separación inmuno-magnética (MACS). Cerca del 100% de las CPH expresan los marcadores Hoechst+/CD34+/LIN1-, mientras menos del 3% de las CMSCU expresan estos marcadores. La diferencia en la expresión de los marcadores entre las CMSCU y las CPH es estadísticamente significativa y remarca una pureza de las CPH superior al 95%. CMSCU: células mononucleares de sangre de cordón umbilical (previo a MACS), CPH: células progenitoras hematopoyéticas (posterior a MACS). Prueba estadística T-pareada. Diferencia con significancia estadística * $p < 0,05$. 66

Figura 14. Diferenciación de las CPH a cCD CD1c+, CD1c+/CD141+ o CD1141+. La figura muestra el porcentaje de CD y CPH que expresan los marcadores exclusivos CD1c+, CD141+ o 67

ambos, simultáneo a los marcadores compartidos Hoechst+/CD11c+/LIN1- determinado por citometría de flujo después de ser cultivadas durante 14 días con y sin coctel de diferenciación respectivamente. Cerca del 18% de las células son CD1c+/CD141+ y expresan de forma estadísticamente significativa dichos marcadores respecto a su control de diferenciación y respecto a las células CD1c+ y CD141+. Entre el 3 y 4% de las células expresan CD1c, alrededor del 1% expresan CD141. Ninguna de estos dos grupos de células expresa de forma estadísticamente significativa dichos marcadores respecto a su control de diferenciación, ni entre ellos. CPH: células progenitoras hematopoyéticas, CD: células dendríticas, CD: clúster de diferenciación. Prueba estadística Welch's-no pareada. Significancia estadística *p<0,05.

Figura 15. Curva de crecimiento de *M. avium*. A una longitud de onda (λ) de 600nm, dicha micobacteria alcanza la fase media logarítmica a una densidad óptica (DO) de 1,2, alrededor del tercer día de cultivo. Determinación por triplicado. Medias y desviaciones estándar. 68

Figura 16. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD CD1c+. La figura muestra la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40, la molécula co-inhibidora CD273 y MHC-II por las cCD CD1c+, determinada por citometría de flujo 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. El estímulo con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II en niveles similares y discretamente superiores al inducido por BCG. La molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. La expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. La expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos. Las diferencias que se presentan no poseen significancia estadística. IMF: intensidad media de fluorescencia, cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, CD: clúster de diferenciación, MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad clase II. Pruebas estadísticas: Kruskal Wallis. ANOVA. Diferencias sin significancia estadística. 70

Figura 17. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD CD141+. La figura muestra la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40, la molécula co-inhibidora CD273 y MHC-II por las cCD CD1c+, determinada por citometría de flujo 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. El estímulo con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II en niveles similares y discretamente superiores al inducido por BCG. La molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. La expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. La única diferencia estadísticamente significativa corresponde a la expresión de CD86 en las cCD CD141+ sin infectar e infectadas con BCG La expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos. IMF: intensidad media de fluorescencia, cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, CD: clúster de diferenciación, MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad clase II. Pruebas estadísticas: Kruskal Wallis. ANOVA. Significancia estadística *p<0,05. 71

Figura 18. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD CD1c+/CD141+. La figura muestra la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40, la molécula co-inhibidora CD273 y MHC-II por las cCD CD1c+/CD141+, determinada por citometría de flujo 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. El estímulo con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II en niveles similares y discretamente superiores al inducido por BCG. La molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. La expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. Las diferencias estadísticamente significativas corresponden a la expresión de CD40 en las cCD CD1c+/CD141+ infectadas con *M. avium* respecto a las infectadas con BCG y las no infectadas. La expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos. IMF: intensidad media de fluorescencia, cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, CD: clúster de diferenciación, MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad clase II. Pruebas estadísticas: Kruskal Wallis. ANOVA. Significancia estadística *p<0,05.

73

Figura 19. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD. La figura muestra las concentraciones de IL-1 β secretadas por las cCD determinadas por ELISA 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. La concentración de IL-1 β secretada por las células sin estímulo y las células estimuladas con BCG es cerca de 20pg/mL, mientras que para las células estimuladas con *M. avium* se observó una concentración cercana a 6pg/mL. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-1 β secretadas por los diferentes grupos de estudio. cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, ELISA: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas. Prueba estadística: Mann Whitney. Diferencias sin significancia estadística.

74

Figura 20. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD. La figura muestra las concentraciones de IL-6 secretadas por las cCD determinadas por ELISA 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. Las concentraciones de IL-6 son de aproximadamente 50, 150 y 70pg/mL en los sobrenadantes de células sin estímulo, estimuladas con BCG y *M. avium* respectivamente. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-6 secretadas por las células infectadas con BCG respecto a las secretadas por células infectadas con *M. avium* y no infectadas, así como entre las concentraciones de IL-6 secretadas por las células infectadas con *M. avium* respecto a las secretadas por las células no infectadas. cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, ELISA: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas. Prueba estadística: Mann Whitney. Significancia estadística *p<0,05.

75

RESUMEN

La tuberculosis es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial y la única vacuna recomendada para la prevención de dicha enfermedad (BCG) es ineficaz en algunos casos. La exposición a *M. avium* previa y posterior a la vacunación es causante de la disminución en la efectividad protectora de la vacuna.

En la respuesta inmune protectora contra las infecciones micobacterianas las células dendríticas (CD) maduran expresando moléculas co-estimuladoras y secretando citocinas pro-inflamatorias. En modelo murino, *M. avium* induce una respuesta inmune tolerogénica, caracterizada por la baja expresión de moléculas co-estimuladoras, expresión de moléculas co-inhibidoras, baja secreción de citocinas pro-inflamatorias y secreción de citocinas anti-inflamatorias por parte de las CD. Sin embargo, pocos estudios se han realizado en humanos. Por lo anterior, es importante caracterizar las subpoblaciones de CD humanas, así como el inmuno-fenotipo que *M. avium* induce sobre las mismas.

A partir de sangre de cordón umbilical (SCU) humano se obtuvieron células progenitoras hematopoyéticas (CPH) y se indujo su diferenciación hacia las dos subpoblaciones de células dendríticas clásicas primarias (cCD) CD1c+, CD1c+/CD141+ y cCD141+ o (BDCA1/BDCA3). La diferenciación de las subpoblaciones se determinó mediante la expresión de marcadores exclusivos y compartidos por citometría de flujo. Posteriormente las cCD fueron estimuladas con *M. avium* Subsp. *hominissuis* y *M. bovis* BCG phipps. 24h post-infección se determinó la expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras CD86, CD40, CD273 y MHC-II por citometría de flujo, así como la secreción de citocinas pro y anti-inflamatorias IL-12, IL-6, IL-10, IL-1 β y TNF- α por el ensayo de inmuno-adsorción ligado a enzimas.

Las subpoblaciones de cCD primarias BDCA1 y BDCA3 pudieron ser diferenciadas mediante la inducción de CPH derivadas de SCU humano, siendo la subpoblación BDCA1 cCD CD1c+ la que se diferenció de forma preferencial, lo cual es consecuente con la frecuencia de estas células *in vivo*, es similar a los hallazgos reportados por otros estudios en los que se indujo la diferenciación de las mismas, está en correspondencia con el hecho de que las subpoblaciones de cCD poseen un origen común y representan diferentes estadios de diferenciación de una población similar, es de relevante interés debido a la participación predominante de esta subpoblación en la respuesta inmune contra infecciones micobacterianas y finalmente, guarda similitud con los hallazgos reportados en modelo murino respecto a las subpoblaciones de CD con las que guardan homología fenotípica y funcional.

El efecto en la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y MHC-II sobre las subpoblaciones de cCD humanas, derivado del estímulo con *M. avium* es similar y favorece la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC-II, y no tiene efecto sobre la expresión de la molécula co-inhibidora CD273. Este hallazgo difiere con lo descrito en modelo murino. Adicionalmente, el estímulo de las cCD humanas con *M. avium* conduce a

la disminución en la secreción de citocinas pro-inflamatorias, lo cual es similar a los hallazgos descritos en modelo murino e indicaría que estas cCD modularían una respuesta inmune adaptativa de tipo tolerogénico ya que en el contexto de la activación de los linfocitos T (LT), si bien podrían efectuar una correcta presentación antigénica en términos de la expresión de moléculas de co-estimulación en sus superficie, la disminución en la secreción de citocinas pro-inflamatorias generaría un microambiente desfavorable para la activación de LT, entorpeciendo la modulación hacia una respuesta inmune adaptativa de tipo protector. No obstante, para adjudicar un inmuno-fenotipo determinado a las cCD se podrían estimular LT autólogos con las cCD estimuladas con las micobacterias. Lo cual permitiría identificar las subpoblaciones de cCD que al inducir una respuesta inmune tolerogénica, representarían blancos terapéuticos contra las infecciones con micobacterias entre otras.

Finalmente, se remarca la importancia de la optimización de técnicas empleadas en el presente estudio, que involucrarían sortear las CPH, y las cCD previo estímulo con las micobacterias, lo cual robustecería el estudio con la adquisición de mejores rendimientos, sensibilidad de los ensayos y adquisición de resultados con mayor especificidad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por bacterias pertenecientes al complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). El órgano blanco es el pulmón (TB pulmonar) aunque puede afectar otros sitios, ocasionando la denominada TB extra pulmonar. Las personas con TB pulmonar transmiten la enfermedad vía aerosol por medio de microgotas (por ejemplo mediante el estornudo) mismas que son inhaladas por un nuevo hospedero. Uno de los factores necesarios para desarrollar la enfermedad es la infección con MTB. Sin embargo, al no ser el único factor para desarrollar TB, existe la condición de infección sin enfermedad. La probabilidad de desarrollar TB incrementa considerablemente en individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Frieden TR, et al. 2003).

La TB es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, siendo la enfermedad infecciosa causante del mayor número de muertes y la segunda causa de muerte por un único agente infeccioso a nivel mundial (WHO, *Global Tuberculosis report. 2014*). Anualmente, la tuberculosis produce alrededor de 3 millones de fallecimientos por año, lo que equivale aproximadamente al 18,5% del total de las muertes anuales de adultos entre 15 y 65 años. Una tercera parte de la población mundial (cerca de 1,79 billones de personas), se encuentra infectada con MTB y por lo tanto, se encuentra en riesgo de desarrollar la enfermedad (Mirlekar B, et al. 2013).

El informe del control mundial de la TB del año 2014 de la organización mundial de la salud (OMS), señala que en el año 2013 se presentó un estimado de 9 millones de casos de TB y 1,5 millones de personas murieron a causa de la misma (1,1 millones de muertes entre personas VIH-negativas y 360000 entre personas VIH-positivas). Dentro de estas muertes se incluye un estimado de 210000 casos de TB multi-drogoresistente (TB-MDR), un número importante considerando que el número de casos de TB-MDR fue de aproximadamente 480000. También se reportó que alrededor de 13% de los casos nuevos de TB, se dieron entre personas que fueron VIH positivos (WHO, *Global Tuberculosis report. 2014*) (Figura 1).

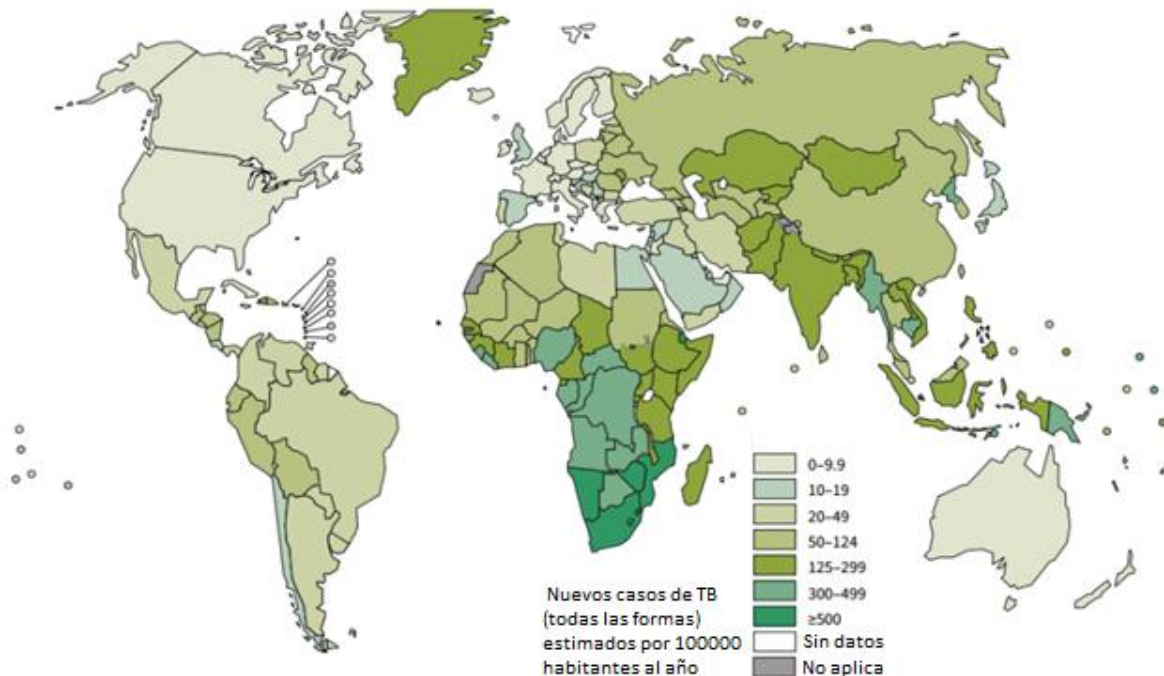


Figura 1. Incidencia de tuberculosis (TB) en el año 2013 (Modificado de: WHO, *Global Tuberculosis report. 2014*).

Si bien, durante los últimos años, el número absoluto de casos, las tasas de incidencia y las defunciones anuales por TB han descendido, este proceso es lento y se acompaña de un ascenso en la susceptibilidad a TB al incrementar el número de casos de pacientes con VIH y la resistencia a medicamentos disponibles, por lo que sigue siendo uno de los mayores problemas de salud pública. Lo anterior, aunado a que la vacuna de bacilos atenuados de *Mycobacterium bovis* recomendada por la OMS contra la infección por MTB ha demostrado ser ineficaz en algunos casos, pone de manifiesto la necesidad de plantear estudios dirigidos al incremento de dicha eficacia, desarrollar nuevas drogas antituberculosas y establecer protocolos de control clínico (Horvath CN, et al. 2013).

1.2. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* es el único miembro que pertenece a la familia Mycobacteriaceae, la cual a su vez pertenece al orden de los Actinomycetales y a la clase Actinomycetos (Hartmans S, et al. 2006). Sus características se basan en tres criterios: resistencia a ácidos y alcoholes, estructura de los ácidos micólicos y proporción de guanina-citosina (GC%) del ácido desoxirribonucleico (DNA) (Brosch R, et al. 2002).

Se han descrito más de 150 especies pertenecientes a éste género dentro de las cuales se encuentran: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium bovis*. Las cuáles son huéspedes de humanos (tres primeras), roedores (cuarta y quinta), bovinos y rumiantes respectivamente. Otras especies denominadas

como MNT las cuales se encuentran en el ambiente preferencialmente en agua, ocasionalmente son responsables de infecciones oportunistas en humanos (Tortoli E, et al. 2014).

El trazo de la evolución del género *Mycobacterium* se realiza empleando el gen 16S rRNA. El sitio de firma genética es en una región correspondiente a la hélice 18 de la estructura secundaria de dicho gen. En el árbol evolutivo, las especies se localizan tanto en ramas como en clústers, dentro de los cuales los grupos o complejos son nombrados después de la especie representativa (Figura 2).

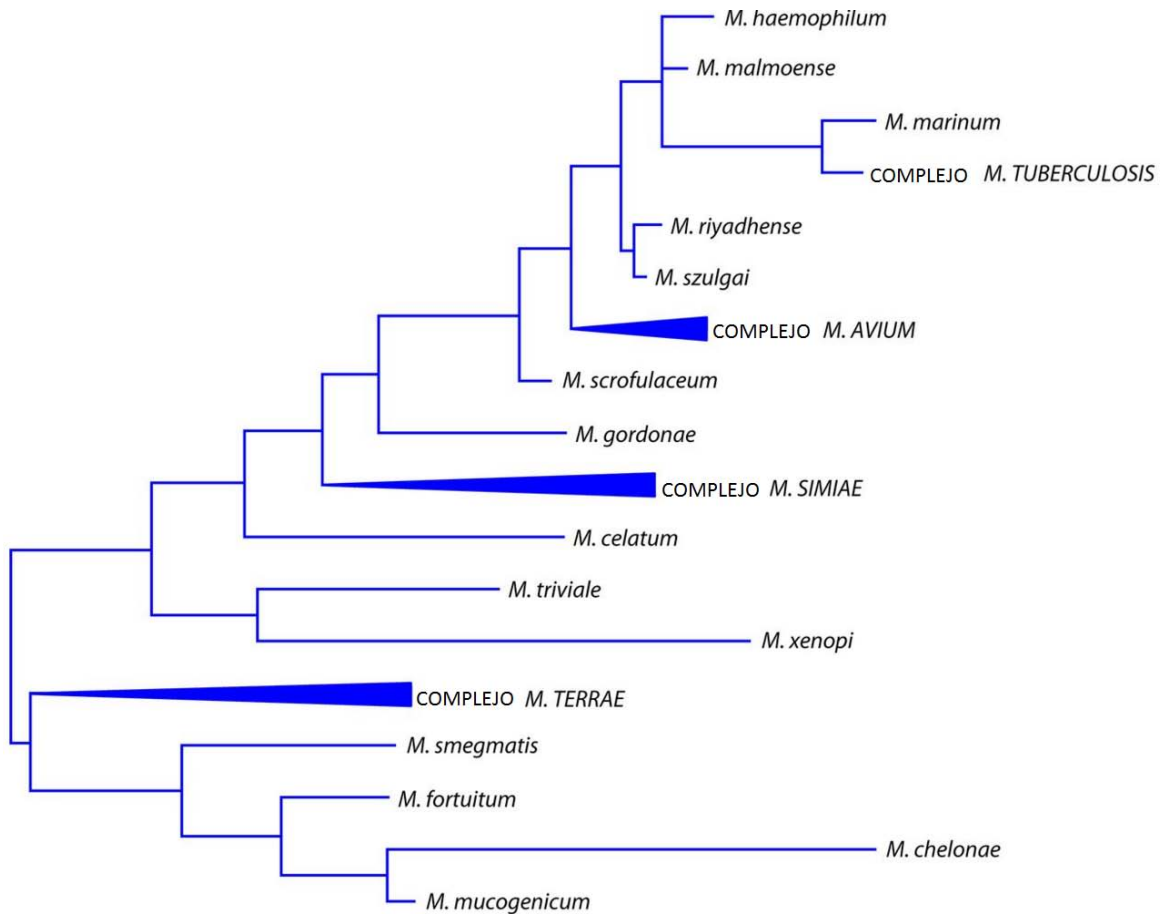


Figura 2. Árbol evolutivo del género *Mycobacterium* basado en el gen 16S rRNA, incluyendo sus especies representativas (Modificado de: Tortoli E, et al. 2014).

1.3. Micobacterias

Las micobacterias son bacilos inmóviles, no esporulados y sin cápsula, ligeramente curvos o rectos que miden aproximadamente 0,2 a 0,6 μm de ancho y 1 a 10 μm de largo. Son aeróbicas, aunque algunas tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones de microaerofilia. Su pared micobacteriana consta de una capa externa y una capa interna alrededor de la membrana plasmática. Aunque las micobacterias no parecen encajar en la categoría gram-positivas desde un punto de vista empírico (es decir, que no retienen el

tinte violeta), se clasifican como bacterias ácido alcohol resistentes gram-positivas (Goodfellow M, et al. 1984).

La capa externa está conformada por proteínas y lípidos que constituyen el 60% de su peso seco y se encuentran asociados con polisacáridos y ácidos grasos de cadena larga y corta. Dentro de los polisacáridos asociados se encuentra la lipoarabinomanana (LAM), anclada a la membrana plasmática y considerada inmunológicamente como el equivalente micobacteriano del lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram-negativas. En las especies patógenas, la arabinosa terminal de LAM está recubierta con residuos de manosa (manLAM), a diferencia de las cepas no patógenas que carecen de ese residuo y en su lugar contienen una molécula de fosfoinositol o una arabinosa (PILAM o AraLAM). La capa interna presenta un complejo molecular de ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano (Brennan PJ, et al. 2003). La composición de la pared celular le confiere a la micobacteria una limitada permeabilidad celular a múltiples compuestos químicos y fármacos. La LAM desempeña un papel fundamental durante la vida intracelular y en la patogénesis, ya que interacciona con algunos componentes del sistema inmune inhibiendo sus funciones efectoras. Por otra parte, la composición lipídica de la pared les confiere la propiedad de ácido alcohol resistencia (Saviola B, et al. 2006).

1.3.1. Clasificación

Las micobacterias se clasifican mediante dos criterios: velocidad de crecimiento e importancia médica de la cual subyacen sub-clasificaciones adicionales. Según el primer criterio, existen especies de lento (más de 7 días) o de rápido crecimiento (menos de 7 días), dependiendo de su tiempo de generación de 13 h y de 2 a 5 h, respectivamente (Levy Frebault VV, et al. 1992). Conforme a su importancia médica existen tres categorías de micobacterias:

1. Complejo *M. tuberculosis*: Responsables de TB en hombre y otros animales. Constituido por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. cannetii* y *M. microti*. Las micobacterias que lo constituyen comparten un 99,9% de identidad a nivel de nucleótidos y secuencias idénticas de ácido ribonucléico ribosomales 16S (RNAr), pero difieren ampliamente en términos del tropismo de la bacteria en los hospederos, de sus fenotipos y su patogenicidad (Tortoli E, et al. 2014).

2. Según el riesgo de infección que suponen para individuos y poblaciones: Clasificadas por la Sociedad Europea de Micobacteriología (ESM) en tres grupos:

- ✓ Grupo I- Patógenos ocasionales: Bajo riesgo de infección para el individuo y la población. Escasamente responsables de enfermedades.
- ✓ Grupo II- Patógenos oportunistas: Riesgo moderado para el individuo.
- ✓ Grupo III- Patógenos estrictos: Riesgo de transmisión por vía aérea. Después de la infección, la enfermedad puede ser grave para el individuo y moderada para la población.

3. **MNT**: Clasificadas bajo el esquema de Runyon que considera el tiempo de crecimiento y la cromogenicidad (Jarzembowski JA, et al. 2008). La creencia de que correspondían a cepas de MTB inusuales, condujo a su denominación como micobacterias atípicas, a partir de lo cual se les ha conferido nombres como: micobacterias anónimas, micobacterias ambientales, micobacterias oportunistas, bacilos Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT) y micobacterias no tuberculosas. A pesar de la inexistencia de un consenso respecto a su denominación, el acrónimo MNT asignado por la Sociedad Americana del Tórax es ampliamente aceptado (Griffith DE, et al. 2007).

Las MNT se encuentran extensamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas a partir de una gran variedad de reservorios ambientales tales como el agua, el suelo, las plantas, los animales y el hombre (Castillo Rodal AI, et al. 2011). Algunas especies establecen relaciones simbióticas con amibas y protozoarios (Cirillo JD, et al. 1997). La resistencia al cloro ha favorecido la adaptación de las MNT a ambientes creados por el hombre como son los sistemas urbanos de distribución de agua, los canales de aguas negras, las albercas y los acuarios (Vaerewijck MJ, et al. 2005). Varias especies de MNT han sido asociadas con enfermedades humanas que involucran a los pulmones, la piel, el sistema linfático, heridas y huesos. Además de causar la diseminación de enfermedades, la infección con MNT puede llegar a ser letal. Alrededor de un tercio de las más de 90 especies conocidas de MNT causan enfermedad en humanos. Algunas de estas especies son: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. paratuberculosis* y *M. scrofulaceum* (Katoch VM, et al. 2004). La diseminación de enfermedades debido a MNT se encuentra asociada con la adquisición de VIH y otras formas de inmunosupresión severa por parte del hospedero. Sin embargo, la incidencia de enfermedades causadas por MNT en humanos inmuno-competentes se encuentra en incremento (Kim JK, et al. 2013).

1.3.2. Complejo *Mycobacterium avium*

Se ha revelado la existencia de una amplia variedad de organismos ambientales y asociados a animales, con diferentes grados de patogenicidad, hospederos y distribución ambiental. Actualmente el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) consta de 9 especies de micobacterias de crecimiento lento y un subconjunto de aislados de clasificación indeterminada denominada (MAC-others). Se muestra la composición del MAC (Rindi L, et al. 2014) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) (Modificado de: Rindi L, et al. 2014)

Especie	Sub-Especie	Patogenicidad	Hospedero Preferencial
	Subsp. <i>avium</i> (MAA)	TB aviar	Aves
		Infecciones pulmonares	

<i>M. avium</i>	Subsp. <i>hominissuis</i> (MAH)	Linfadenitis cervical Infecciones de tejido blando Infecciones diseminadas	Humanos Cerdos
	Subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	Enfermedad de John's	Rumiantes
	Subsp. <i>silvaticum</i> (MAS)	Enfermedad similar a TB	Palomas torcaces
<i>M. intracellulare</i>		Infecciones pulmonares	Humanos
<i>M. colombiense</i>		Infecciones diseminadas Linfadenopatías	
<i>M. chimaera</i>		Infecciones pulmonares	
<i>M. marseillense</i>			
<i>M. timonense</i>			
<i>M. boucherdurhonense</i>		Linfadenopatías Heridas	
<i>M. vulneris</i>			
<i>M. arosiense</i>		Osteomielitis	
<i>MAC-others</i>	Infecciones pulmonares Infecciones diseminadas		

***M. avium* Subsp. *hominissuis* (MAH)**

Es un patógeno ambiental responsable de infecciones oportunistas en humanos y cerdos a nivel mundial. Ocasionalmente ha sido aislado de animales como perros, aves, ganado, ciervos y caballos. El agua y suelo son considerados sus reservorios naturales. MAH puede sobrevivir hasta 26 meses en agua, así como al interior de amebas. El agua potable y los aerosoles de grifo son consideradas las principales fuentes de infección por MAH en humanos. No obstante, las fuentes de infección en cerdos se encuentran menos esclarecidas ya que podrían adjudicarse a gran variedad de factores relacionados con su alimentación y condiciones de vida.

Se considera que MAH es el miembro de mayor importancia clínica en humanos dentro del MAC. El organismo es un patógeno intracelular facultativo en individuos que carecen de inmunidad adecuada de LT. Durante los primeros años de la epidemia del VIH, la mayoría de los organismos del MAC (ahora identificados como MAH), causaron infección diseminada en un 25-50% de pacientes VIH positivos severamente inmunocomprometidos. Después del desarrollo de la terapia anti-retroviral, la morbilidad y mortalidad por infección con MAH en pacientes VIH positivos han reducido dramáticamente con tasas de infección tan bajas como 2,5% durante los años 2003-2007.

No obstante, MAH aún representa una amenaza para los pacientes recién diagnosticados, para los pacientes que no pueden acceder a la terapia anti-retroviral y para aquellos en los cuales dicha terapia es inefectiva. En pacientes inmuno-competentes, ocasionalmente MAH es causante de infecciones pulmonares, linfadenitis cervical (típicamente en niños) e infecciones de tejido blando. En cerdos, usualmente MAH es causante de lesiones localizadas en nódulos linfáticos.

1.3.3. Prevalencia de las enfermedades por infección con MNT

La epidemiología de las enfermedades ocasionadas por MNT es de difícil determinación puesto que en la mayoría de los países el reporte de las enfermedades no es obligatorio. Por otra parte, no se cuenta con un consenso en la distinción entre enfermedad e infección (*Casadevall A, et al. 2000*). Si bien, la incidencia y prevalencia de las infecciones con MNT varían significativamente entre diferentes estudios, ya que cada uno implementa una metodología particular y emplea poblaciones de estudio diferentes, los datos epidemiológicos sugieren que ambos parámetros se encuentran en incremento e incluso exceden los asociados con TB (*Daley CL, et al. 2010*).

En años recientes, estudios realizados en Canadá, Estados Unidos, Taiwan, Dinamarca y los Países Bajos, han documentado un incremento en la frecuencia de aislamiento de MNT. El que la mayoría sean estudios de prevalencia de aislamiento, establece una limitación ya que no todos los aislados de MNT se encuentran asociados con enfermedad. Sin embargo, son un primer paso para la determinación de la prevalencia de la enfermedad ocasionada por MNT (*Daley CL, et al. 2010*). La mayoría de las infecciones por MNT a nivel mundial, son adjudicadas al MAC. Las especies involucradas varían dependiendo de la región, mientras que nuevas especies se han visto implicadas en enfermedad pulmonar (*Kendall BA, et al 2013*).

1.4. Vacuna BCG

La única vacuna disponible recomendada por la OMS para la prevención de la TB, fue desarrollada entre 1908 y 1921 por Albert Calmette y Camile Guérin adoptando el nombre de *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG). Para su elaboración, se realizaron 230 cultivos sucesivos *in vitro* de una cepa de *M. bovis* aislada de un caso de mastitis bovina. Durante la primera mitad del siglo XX, la vacuna fue distribuida a diferentes países para su uso y producción. Los procedimientos de subcultivos así como la conservación de las cepas, favoreció la aparición de cambios fenotípicos y genotípicos que constituyen las variantes de la vacuna BCG inicial que dieron origen a las conocidas subcepas de BCG (*Luca S, et al. 2013*). En la actualidad, la vacuna BCG consiste en un liofilizado de bacterias vivas atenuadas de *M. bovis*. Desde su creación ha sido aplicada a más de mil millones de personas y su administración previene las manifestaciones graves de TB: TB meníngea y TB miliar (*Colditz GA, et al. 1995*).

Si bien, el meta-análisis de los estudios de protección indicó que la vacuna BCG reduce en un 50% el riesgo de desarrollar TB (*Colditz GA, et al. 1994*), estudios realizados en diversas poblaciones y áreas geográficas, evidenciaron una eficacia variable de 0 a 80% en la prevención de TB pulmonar proporcionada por la vacuna (*Fine PE, et al. 1995*). Como explicación a dicha variación han surgido diversas hipótesis, dentro de las cuáles las más relevantes aluden a la susceptibilidad genética del hospedero, la pérdida progresiva de la inmunidad inducida por la vacuna, la prevalencia de la infección por MTB en la región estudiada, el surgimiento de cepas de MTB con mayor virulencia, la utilización de distintas vacunas BCG que inducen inmunidad protectora a diferente nivel y la exposición a MNT (*Brandt L, et al. 2002*).

1.4.1. La vacuna BCG y las MNT

La hipótesis vigente y preferencialmente adoptada para abordar el problema de la variabilidad en la protección contra TB pulmonar conferida por la vacuna BCG, propone que la exposición a las MNT disminuye dicha eficacia protectora (*Andersen P, et al. 2005*). Algunos estudios han revelado que los habitantes de regiones tropicales (caracterizadas por la abundancia y diversidad de las MNT), que se encuentran mayormente expuestos a las mismas, presentan los índices más bajos de protección conferida por la vacuna (*Dye C, et al. 1999*). Por otra parte, estudios basados en pruebas cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) contra antígenos de MNT, validan la exposición a MNT de los habitantes de estas regiones (*Von Reyn CF, et al. 1993*). No obstante, el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo dicha exposición no ha sido determinado. La transmisión de MNT de persona a persona no ha sido confirmada. Sin embargo, los aislamientos más frecuentes de MNT se han logrado a partir de fuentes naturales y de distribución de agua, por lo cual se ha sugerido a ésta como el vehículo principal para la transmisión. (*Rusin PA, et al. 1997*).

Con respecto a la acción de la vacuna, la inmunidad protectora conferida por BCG contra la infección con MTB se fundamenta en el establecimiento de una respuesta de tipo celular inducida por la producción de interferón gamma (IFN- γ) (*Jouanguy E, et al. 1996*). Estudios que evalúan la respuesta de IFN- γ atribuible a la vacunación con BCG en habitantes de regiones tropicales con evidencia de exposición a MNT, encontraron respuestas con disminución de dicha molécula (*Black GF, et al. 2003*). Lo anterior no se observa en habitantes de regiones templadas en los que no se evidenció exposición a MNT, dando soporte a la hipótesis que sugiere la interferencia de las MNT sobre la respuesta inmune inducida por BCG (*Weir RE, et al. 2006*).

Los hallazgos del efecto desfavorable que las MNT ejercen sobre la eficacia protectora de la vacuna BCG en humanos, propulsaron el emprendimiento de estudios en animales con el fin de determinar el mecanismo empleado por las MNT para lograr dicho efecto. En un estudio en cobayos expuestos a *M. avium* previa vacunación con BCG, se encontró un bajo nivel de protección (evaluado mediante la presencia de lesiones macroscópicas y conteo bacteriano en bazo y pulmones). Es decir, la eficacia observada en ausencia de exposición

disminuye o es comprometida en los cobayos cuando son expuestos a MNT antes de ser vacunados con BCG (Lisle GW, et al. 2005). En el modelo murino, en ratones expuestos a las especies de MNT pertenecientes al complejo *M. avium*, se encontró que BCG induce una respuesta inmune transitoria con baja frecuencia de células antígeno específicas, acompañada con ausencia de inmunidad protectora contra MTB. Es decir, el contacto con *M. avium* previo a la vacunación bloquea completamente la actividad de BCG (Brandt L, et al. 2002). Otros estudios revelaron que la respuesta de IFN- γ específica a BCG disminuye notablemente cuando existe un contacto previo con *M. avium*, lo cual repercute en la ausencia de protección contra la infección con MTB (Demangel C, et al. 2005). Sin embargo, el efecto desfavorable de la exposición a *M. avium* sobre la respuesta inducida por BCG, no se limita a situaciones particulares de exposición previa a vacunación. Efectos similares se han observado cuando la exposición a MNT sucede posterior a la vacunación. En un estudio en ratones vacunados con BCG y posteriormente expuestos a dosis repetidas de *M. avium*, se observó reducción en el número de linfocitos T (LT) productores de IFN- γ (Flaherty DK, et al. 2006). Por otra parte, experimentos en bovinos han proporcionado un modelo para investigar el efecto de las MNT sobre la respuesta inducida por vacunación. Se ha determinado que al igual que en humanos, estos animales se encuentran expuestos de forma natural a micobacterias del MAC. Bajo esta premisa, bovinos expuestos a *M. avium* fueron vacunados con BCG y con cepas atenuadas de *M. bovis* y desafiados con una cepa virulenta de *M. bovis*. Los resultados mostraron reducción significativa en la producción de IFN- γ , sugiriendo que la exposición a *M. avium* afecta adversamente la eficacia protectora subsecuente de la vacunación con BCG (Buddle BM, et al. 2002).

Los estudios citados ponen de manifiesto el efecto negativo que la exposición a *M. avium* previa o posterior a la vacunación con BCG, ejerce sobre la eficacia protectora de la misma. Dentro de estos hallazgos, la disminución de la respuesta antígeno específica de los LT es un punto de especial relevancia, pues sugiere que la exposición a *M. avium* induce un mecanismo modulador hacia estas células del sistema inmune (Brosch R, et al. 2000).

1.5. Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son una familia de células profesionales presentadoras de antígeno que desempeñan un papel importante en la unión entre la respuesta inmune innata y adaptativa y participan en la inducción de tolerancia a antígenos propios. Fueron descubiertas por Ralph Steinman y Zanvil Cohn en los años 70's. Posterior a la identificación de las CD en nódulos linfoides, se encontró que las CD compartían características inmunogénicas con células provenientes de progenitores embrionarios denominadas células de Langerhans epidérmicas (LC), descritas por primera vez en 1868 por Paul Langerhans. Lo anterior condujo a la idea de que debía existir más de una subpoblación dentro de la familia de las CD. Esta idea fue apoyada por estudios que

revelaron la existencia en órganos no linfoides de células que compartían características fenotípicas entre sí y que tras la interacción con antígenos, migraban a los nódulos linfoides y se localizaban en la zona de LT para presentar antígenos a los mismos. Lo anterior, dio pie a la definición clásica de las CD como las centinelas del sistema inmune cuya función fundamental consiste en vigilar el microambiente y dirigir la respuesta inmune adaptativa consecuente con las señales periféricas detectadas.

La identificación de un subconjunto de células morfológicamente similares a las plasmáticas (productoras de interferón alfa (IFN- α) ante estímulos virales), condujo a postular una subdivisión importante de las CD. Estas células fueron llamadas células dendríticas plasmacitoides (pCD), para ser distinguidas de las CD responsables de la protección a enfermedades bacterianas nombradas como CD clásicas o convencionales (cCD). Así mismo se identificó a las denominadas CD derivadas de monocitos (MoCD), las cuales se diferencian a partir de monocitos en condiciones de inflamación (*Merad M, et al. 2013*).

1.5.1. Subpoblaciones de CD murinas

Las CD de ratón pueden ser clasificadas en cCD, pCD y MoCD. Los precursores de cCD (pre-cCD) y pCD se derivan de precursores comunes de CD (CDP) que se desarrollan en la médula ósea bajo la influencia del factor de crecimiento ligando del receptor fms-like cinasa de tirosinas 3 (FLT-3L). Se ha propuesto que los CDP y los progenitores de monocitos se derivan del precursor de macrófagos y CD (MDP). Los Pre-cCD migran desde la médula ósea y se localizan en tejido linfoide y periférico donde se diferencian hacia dos subpoblaciones de cCD. En tejido linfoide estas dos subpoblaciones pueden distinguirse por la expresión de CD8 y CD11b, mientras en tejido no linfoide se distinguen por la expresión de CD103. Las subpoblaciones de cCD CD8⁺ y CD103⁺ se caracterizan por la expresión del receptor de quimiocina XC 1 (Xcr1) y el receptor de lectinas tipo c (Clec9a). En contraste, las cCD CD11b⁺ representan una población heterogénea de la que subsecuentes subpoblaciones pueden identificarse por la expresión de la glicoproteína CD4 y la molécula de adhesión endotelial celular (ESAM). La diferenciación y supervivencia de las cCD CD8⁺ y CD11b⁺ son moduladas por diferentes factores de transcripción y estímulos como el ácido retinoico y quimiocinas. Las cCD y pCD son dependientes de FLT-3L y son diferentes de los macrófagos, mientras que las MoCD se diferencian de los monocitos en condiciones de inflamación. Diferentes tipos de MoCD han sido descritos pero su ontogenia y función no ha sido clarificada y demanda más estudios. Las pCD se localizan en sangre y en tejidos linfoides (Figura 3) (*den Haan JM, et al. 2014*).

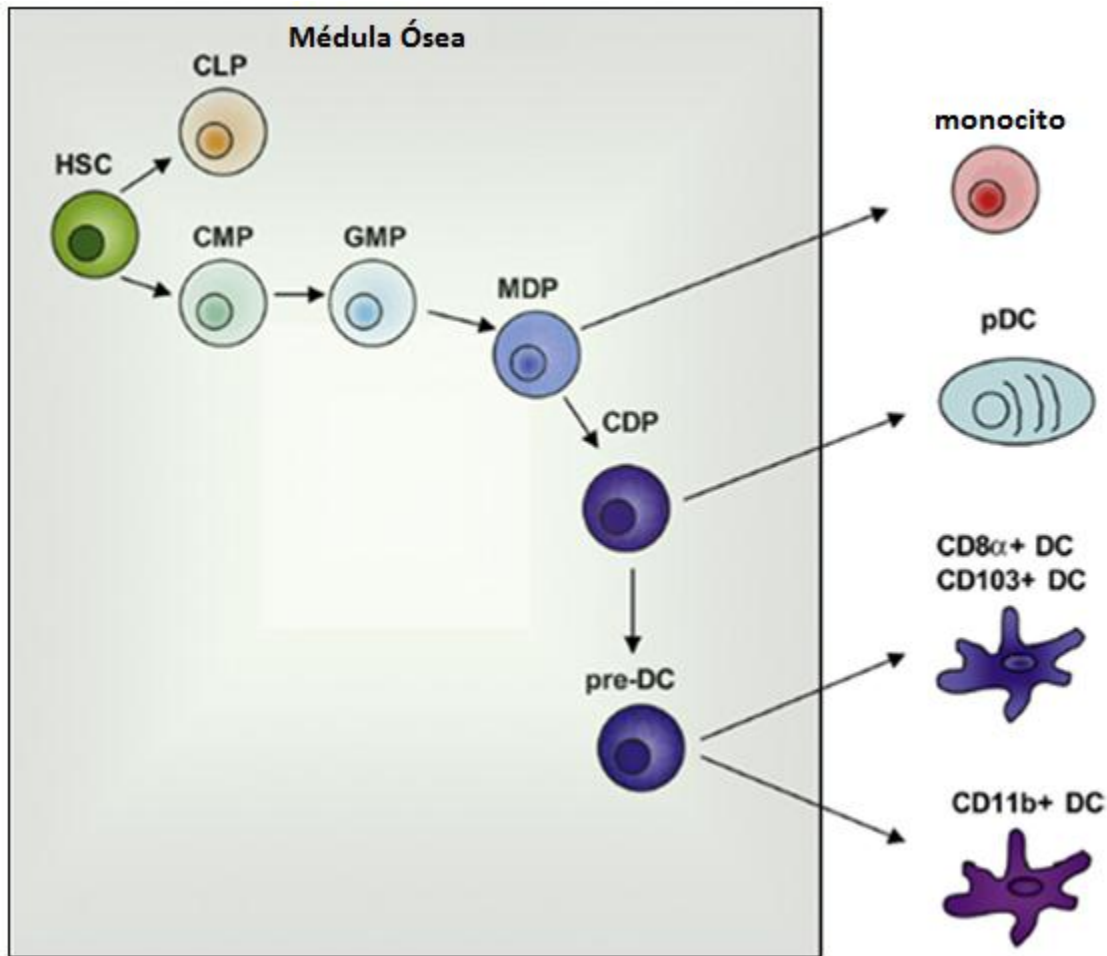


Figura 3. Compromiso y diferenciación de las células dendríticas en ratón. La figura muestra que las células dendríticas y los monocitos se originan a partir de progenitores mieloides comunes (CMP) derivados de células madre hematopoyéticas (HSC). Las HSC generan progenitores linfoides comunes (CLP) y CMP. Los CMP se diferencian en progenitores de granulocitos y macrófagos (GMP) los cuales se diferencian en granulocitos y en progenitores de macrófagos y células dendríticas (MDP). Los MDP dan origen a los monocitos y a los progenitores de células dendríticas comunes (CDP). Los CDP se diferencian en células dendríticas plasmacitoides (pDC) o precursores de células dendríticas (pre-DC). Los pre-DC pueden migrar de la médula ósea y diferenciarse en células dendríticas CD8 α + o CD11b+ en órganos linfoides, o en células dendríticas CD103+ o CD11b+ en tejido no linfoide. El cuadro gris representa la médula ósea. (Modificado de: Kim SJ, et al. 2015).

La característica más relevante de las pDC es la capacidad de producir cantidades masivas de interferón tipo 1 (IFN-I) ante estímulo viral. Las subpoblaciones de cCD poseen funciones especializadas en la activación de la respuesta inmune. Las cCD CD8 α + de tejido linfoides y las cCD CD103+ de tejido no linfoides poseen el mismo origen y comparten perfiles fenotípicos y atributos funcionales, producen IL-12 e IL-15 citocinas involucradas en la diferenciación de LTCD8 citotóxicos y se especializan en el procesamiento y

presentación cruzada la cual consiste en la presentación de antígenos extracelulares (presentes en sangre, tejidos y asociados con células necróticas) vía MHC-I. En la presentación cruzada, los antígenos no se procesan por la vía endógena del proteasoma, por lo cual después de una infección los recursos de la CD son empleados exclusivamente en la presentación de antígenos endógenos vía MHC-II (Lozza L, et al. 2014). Las cCD CD8+ y CD103+ son esenciales en respuestas anti-virales y anti-tumorales de LTCD8. Ambas subpoblaciones contribuyen en la tolerancia central y periférica de LT. Sus funciones independientes aún deben ser esclarecidas.

Las cCD CD11b+ de tejido linfóide y no linfóide expresan diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRS) a los expresados por las cCD CD8+ y CD103+. Las cCD CD103+ poseen un papel principal en la presentación de antígenos vía MHC-II, son las mejores activadoras de LTCD4 cooperadores, producen IL-23 e inducen respuestas de tipo Th17, estimulan respuestas de LB dependientes de LT. Son esenciales en respuestas inmunes humorales y anti-bacteriales. También contribuyen en tolerancia central y periférica (Merad M, et al. 2013; den Haan JM, et al. 2014).

1.5.2. Subpoblaciones de CD humanas

Uno de los principales retos para la determinación de la contraparte humana de las CD descritas en ratón es la ausencia de la expresión constitutiva de CD8 por parte de las CD linfoides humanas. Aunque se ha determinado que la expresión de dicha molécula es inducida ante estímulos específicos como el virus del herpes simple tipo I, se asumió que dicha subpoblación no existía en humanos hasta la reciente identificación del equivalente humano de las CD8+/CD103+ murinas (Schuster P, et al. 2015). Los estudios más recientes en humanos sugieren que las cCD, pCD y las MoCD se originan a partir de diferentes vías de diferenciación e intermediarios celulares. Los puntos de bifurcación exactos aún no se conocen, sin embargo se hipotetiza que el compromiso o impronta hacia un linaje particular se adquiere desde los progenitores multilinfoides de impronta (LMPP) involucrando modificaciones epigenéticas.

La existencia de un precursor común para CD y macrófagos (MDP), así como de un precursor para cCD y pCD aún se encuentra en debate. Sin embargo, se han identificado progenitores restringidos a cCD que se distinguen de los progenitores específicos de pCD mediante la expresión diferencial de moléculas de superficie que los caracterizan (Schraml BU, et al. 2014) (Figura 4).

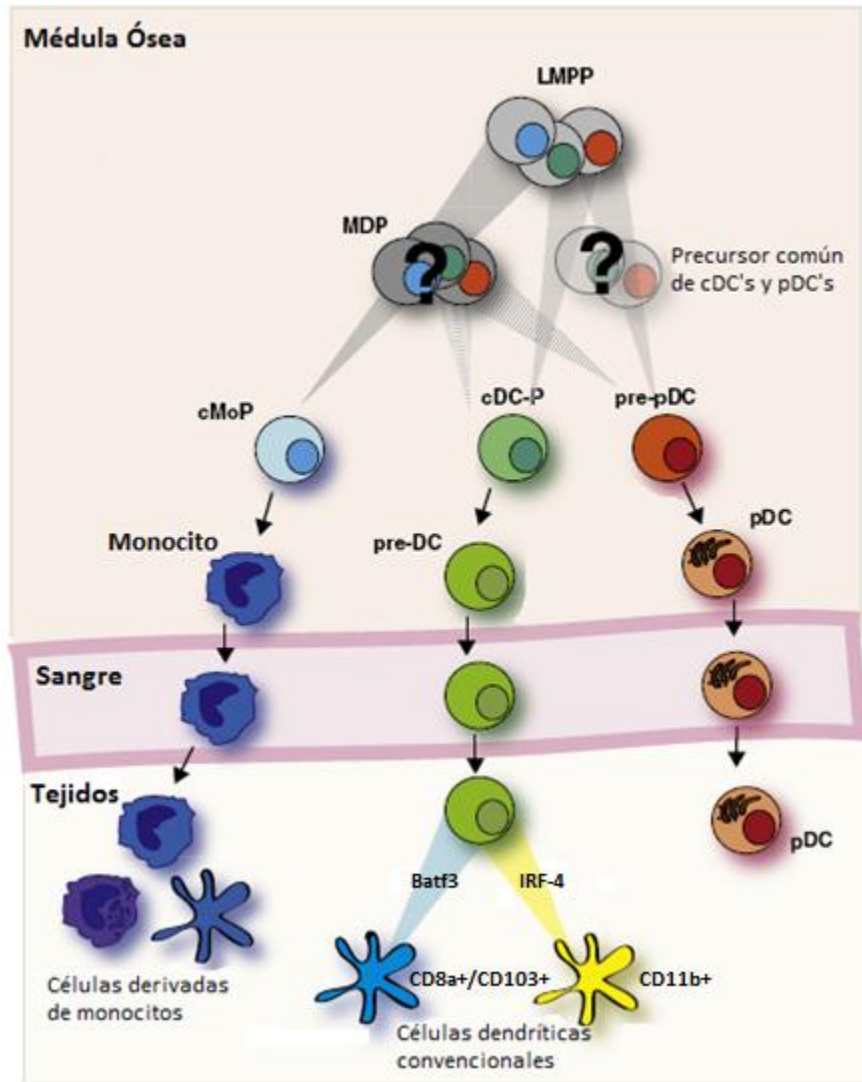


Figura 4. Comprendiendo el desarrollo de las células dendríticas en humano. Información reciente sugiere que los monocitos y las células dendríticas clásicas (cDCs) y plasmacitoides (pDCs), son generados a partir de distintas vías de desarrollo e intermediarios celulares. Los puntos de ramificación exactos no son claros, pero la impronta de linaje puede ocurrir desde los progenitores linfoides multipotentes de impronta (LMPPs), involucrando de manera potencial modificaciones epigenéticas indicadas por los núcleos coloreados. La existencia de un precursor común de células dendríticas y macrófagos (MDP) o un precursor común para cDCs y pDCs es debatible. Sin embargo, los progenitores restringidos de las cDCs (cDC-P) pueden ser distinguidos de los progenitores específicos de pDCs (pre-pDCs) por la expresión de moléculas de superficie específicas. Las cDC-Ps se diferencian en pre-DCs, las cuales migran a través de la sangre hacia los órganos periféricos. Su diferenciación hacia CDs CD8a+/CD103+ y CD11b+ en los tejidos blanco es controlada por los factores de transcripción Batf3 e IRF-4, respectivamente. La diferenciación de pre-pDCs hacia pDCs ocurre en la médula ósea. Las pDCs maduras ingresan al torrente sanguíneo para residir en los órganos periféricos. Los monocitos también se desarrollan en la médula ósea y se originan de progenitores

comunes de monocitos (cMoP), distinguidos de las cDC-P y las pre-pDC. Los monocitos migran a través del torrente sanguíneo a los órganos periféricos donde pueden modular su fenotipo y función dependiendo del microambiente, como inflamación (células derivadas de monocitos) (*Modificado de: Schraml BU, et al. 2014*).

Las CD humanas en sangre, están definidas como células que constitutivamente expresan el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y carecen de los marcadores de linaje CD3, CD14, D16, CD19, CD20 y CD56 (Lin-). CD3 se expresa en los LT, CD14 se expresa en monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, CD16 se expresa en células naturales asesinas (NK) en homeostasis, macrófagos, monocitos y neutrófilos, CD19 y CD20 se expresa en linfocitos B (LB), CD56 se expresa en NK activadas y en homeostasis. Así mismo, dependiendo de la subpoblación las CD humanas expresan antígenos de células dendríticas de sangre (BDCA) específicos.

Las pCD humanas se caracterizadas como (CD303 o BDCA2)+ (CD304 o BDCA4)+ Lin- MHC-II+, mientras que las cCD son Lin- MHC-II+ CD11c+, aunque en humanos CD11c es expresado en monocitos y macrófagos. En contraste con el ratón en el que los pre-cCD se diferencian en cCD en los tejidos periféricos, en humano las dos subpoblaciones de cCD que expresan los marcadores no superponibles (CD1c o BDCA1) o (CD141 o BDCA3) se encuentran en circulación sanguínea. Las CD1c+ representan por mucho a las cCD mayoritarias en sangre, mientras que las cCD CD141+ representan una pequeña subpoblación. Otra subpoblación de CD Lin- MHC-II+ que expresan CD16 también denominadas Slan-CD han sido identificadas en sangre humana, sin embargo a diferencia de las cCD CD141+ y CD1c+ no se encuentran en tejidos y podrían representar una subpoblación de monocitos.

Las CD141+ expresan Xcr1, Clec9a, Batf3 e IRF8 y no expresan IFR4, presentando homología con las CD8+ linfoides y CD103+ no linfoides murinas. Expresan TLR3 pero no TLR7 y producen gran cantidad de IL-12 e IFN-I cuando son activadas por agonistas de TLR3. Han sido encontradas en dermis así como en nódulos linfáticos y tejidos linfoide y no linfoide. Poseen la capacidad de fagocitar células muertas y realizar presentación cruzada de antígenos solubles y asociados a células posterior a la activación con el ligando de TLR3 poli (I:C), con mayor eficiencia que otras subpoblaciones de CD dérmicas.

Las CD1c+ presentan homología con las CD11b+ linfoides y no linfoides murinas, también producen IL-12 y presentación cruzada de antígenos a los LTCD8 citotóxicos. No obstante, se ha descrito que esta habilidad se encuentra potenciada en as CD141+. Algunos autores han reportado presentación cruzada preferencialmente por parte de las CD141+ (*Merad M, et al. 2013; den Haan JM, et al. 2014*).

1.5.3. Subpoblaciones de CD humanas y su equivalente murino

A continuación, se presentan las subpoblaciones de CD descritas en humano de acuerdo a la expresión de moléculas de superficie, la expresión de PRRS, el equivalente murino al que corresponden y su localización en el organismo (Figura 5).

	pDC	BDCA1 ⁺ (CD1c) ⁺	BDCA3 ⁺ (CD141) ⁺	LC	CD14 ⁺	CD1a ⁺
Fenotipo:	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ^{low} CD1a ⁻ CD123 ^{hi} BDCA2 ⁺ BDCA4 ⁺	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁻ BDCA1 ⁺ BDCA3 ^{+/-} CD11b ^{low}	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁻ BDCA1 ⁻ BDCA3 ⁺ CD11b ^{low} CD141 ⁺ Necl2 ⁺ Xcr1 ⁺ Clec9a ⁺ Dec205 ^{hi}	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁺ CD14 ⁻ BDCA1 ⁺ Langerin ⁺ CD141 ⁺ EpCAM ⁺ Sirpα ⁺ CD11b ^{+/-} E-cadherin ⁺	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁻ CD14 ⁺ BDCA1 ⁺ Langerin ⁻ EpCAM ⁻ DC-SIGN ⁺ FXIIIa ⁻ CD163 ⁻	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁺ CD14 ⁻ BDCA1 ⁺ Langerin ⁻ EpCAM ⁻ Sirpα ⁺ CD11b ^{hi}
PRRS:	TLR1 ⁺ , TLR2 ⁻ , TLR3 ⁻ , TLR4 ⁻ , TLR6 ⁺ , TLR7 ⁺ , TLR8 ⁻ , TLR9 ⁺	ND	TLR1 ⁺ , TLR2 ⁺ , TLR3 ⁺ , TLR4 ⁻ , TLR6 ⁺ , TLR7 ⁻ , TLR8 ⁺ , TLR9 ⁻	TLR1 ⁺ , TLR2 ⁺ , TLR3 ^{lo} , TLR4 ⁻ , TLR6 ⁺ , TLR7 ⁻ , TLR8 ⁻ , TLR9 ⁻	ND	ND
Equivalente Murino:	pDC	cDC	CD8 ⁺ cDC	LC	ND	DC Dérmicas
Localización:	Sangre, tejido linfoide y no linfoide			Tejido cutáneo		
				Epidermis	Dermis	

Figura 5. Fenotipo de las subpoblaciones de células dendríticas humanas. La figura resume el fenotipo, la localización, el perfil de expresión de receptores de patógenos y el equivalente murino de las subpoblaciones de las células dendríticas humanas. En el recuadro rojo se señala a las cCD BDCA1 que expresan los marcadores exclusivos CD1c⁺/CD141⁺, en recuadro verde a las cCD BDCA1 que expresan CD1c⁺, en recuadro violeta a las cCD BDCA3 que expresan CD141⁺, en recuadros grises se señalan los marcadores compartidos de cCD CD11c⁺/Lin⁻. DC: células dendríticas, pDC: células dendríticas plasmacitoides, cDC: células dendríticas clásicas, BDCA: antígenos de células dendríticas de sangre, LC: células de Langerhans, CD: clúster de diferenciación, TLR: receptores tipo Toll, Lin: linaje, HLA-DR: receptor de superficie celular MHC-II (complejo principal de histocompatibilidad clase II), codificado por el complejo del antígeno leucocitario humano, Necl2: proteína tipo Nectina 2, Xcr1: receptor de quimiocina XC 1, Clec9a: receptor de lectinas tipo C, Dec205: multilectina tipo C, Langerin: langerina, lectina tipo C de las LC, EpCAM: molécula de adhesión epitelial celular, Sirpα: proteína reguladora de señal, E-cadherin: cadherina epitelial, DC-SIGN: no integrina reclutadora de moléculas de adhesión intracelular, específica de células dendríticas, FXIIIa:

transglutaminasa, ND: no determinado, PRRS: receptores de reconocimiento de patrones.
(Modificado de: Merad M, et al. 2013).

En general tanto en humano como en ratón, otra categorización para la denominación de las CD según su origen, es la de CD primarias las cuáles son heterogéneas en fenotipo, función y localización (corresponden a las denominadas cCD y pCD) y la de CD inflamatorias que son las CD derivadas de monocitos (Lozza L, et al. 2014).

1.6. Estados de maduración de las CD

Las CD presentan estadios de maduración que difieren en su fenotipo y funcionalidad. Mientras que en otros tipos celulares la inmadurez se asocia con ausencia de funcionalidad, la inmadurez aplicada a las CD posee una connotación diferente. Las CD inmaduras son funcionalmente aptas para ejercer dos papeles esenciales:

1. Capturar antígenos en los tejidos periféricos y procesarlos de manera adecuada
2. Sensar las propiedades de los fenómenos de inflamación, infección o lesión en el tejido periférico para orquestar la subsecuente respuesta inmune adquirida

La segunda función ilustra una característica esencial de las CD: su plasticidad. Gracias a esta propiedad, las mismas CD enfrentadas a diferentes procesos de inflamación, infección o lesión podrán madurar hacia perfiles diferentes los cuáles difieren tanto en la expresión de receptores de co-estimulación o de co-inhibición (llamados en conjunto receptores de co-señalización o moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras), como en el patrón de citocinas y quimiocinas que producirán, lo cual repercutirá en la orientación de la respuesta inmune adaptativa (Steinman RM, et al. 2003). Por su parte, la función esencial de las CD maduras es activar a los linfocitos T CD4+ o CD8+ vírgenes o naive (LTCD4 o LTCD8), a partir de lo cual se inicia la respuesta inmune adaptativa. A continuación, se presentan las principales propiedades de las CD maduras e inmaduras (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades de las células dendríticas maduras e inmaduras. LTCD4: linfocitos T CD4+ vírgenes o naive, CCR7: receptor de quimiocinas CC tipo 7. MHC-I y II: complejo principal de histocompatibilidad clase I y II. (Modificado de: Abbas AK, et al. 2008)

	ESTADIO DE MADURACIÓN DE LAS CD	
	INMADURAS	MADURAS
UBICACIÓN	Tejidos periféricos	Órganos linfoides secundarios
CAPACIDAD ENDOCÍTICA	Alta	Baja
CAPACIDAD DE PROCESAMIENTO	Alta	Baja
MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS Y MHC I Y II	Expresión baja	Expresión alta
CAPACIDAD DE PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA A LTCD4	Baja	Alta
EXPRESIÓN DE CCR7	Baja	Alta

En los tejidos periféricos e interfaces continuamente desafiadas por microorganismos potencialmente patógenos como piel y mucosas, hay una presencia permanente de CD, cuya función especial es capturar antígenos y sensor la aparición de procesos inflamatorios o infecciosos nacientes. Poseen una tasa de recambio relativamente rápida, asociada con su capacidad de transitar y migrar de un tejido a otro, las cuales son características particulares de esta población. En respuesta al desarrollo de procesos inflamatorios locales y debido al incremento de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio local y a la producción de quimiocinas, los precursores de las CD y las propias CD circulantes son reclutadas rápidamente en el tejido lesionado e incrementan así su presencia en el foco inflamatorio. Las CD inmaduras son capaces de capturar y procesar antígenos con eficacia, pero son ineficientes activadoras de LTCD4. Presentan baja expresión de moléculas co-estimuladoras en superficie e incapacidad de producir citocinas pro-inflamatorias como la interleucina 12 (IL-12) necesaria para la proliferación de LT, y poseen baja expresión de moléculas MHC clase II que se encuentran “secuestradas” en los endosomas.

Un tipo representativo de CD inmadura son las LC. Constituyen menos del 1% de la población celular local y se caracterizan por poseer largos procesos citoplasmáticos denominados dendritas, que le permiten acceder en forma continua a un 25% de la superficie epidérmica. Ante la entrada de un antígeno y el comienzo de una respuesta inflamatoria local, estas CD, perciben señales de alarma, capturan y procesan antígenos, migran hacia los ganglios linfáticos regionales y completan su proceso de maduración. (Cavanagh LL, et al. 2002).

La migración y maduración de las CD es estimulada por lesión, inflamación o infección y se lleva a cabo a través de los vasos linfáticos. Lo anterior permite que la CD localizada en la periferia se dirija a los sitios de lesión, infección o inflamación mientras madura fenotípica y funcionalmente. Posterior a esto, en los ganglios linfáticos las CD estimulan a los LTCD4 para activarlos. La determinación del inmuno-fenotipo (maduro, semi-maduro o inmaduro) de las CD en términos de la expresión de moléculas de co-señalización y la secreción de citocinas pro o anti-inflamatorias, no se encuentra formalmente establecido. Para lo anterior, se realizan ensayos funcionales en los que se cocultiva a las CD con LTCD4 y se evalúa la proliferación y producción de citocinas de los LTCD4 inducida por su interacción con las CD.

1.6.1. CD y tolerancia

La tolerancia inmunológica se define como un estado fisiológico de no respuesta al cual se han atribuido tres mecanismos de causalidad: eliminación clonal, anergia clonal e inducción de LT reguladores.

La eliminación clonal ha sido descrita como el principal mecanismo de tolerancia central. A través de éste mecanismo, se produce la apoptosis de LT y LB que reconocen antígenos propios durante su maduración en los órganos linfoides centrales: timo y médula ósea

respectivamente. Los LB reconocen antígenos propios de forma nativa, mientras que los LT reconocen antígenos procesados y presentados a través del MHC-I y MHC-II por las células presentadoras de antígeno (APC). Algunos experimentos sugieren que en este contexto las APC protagonistas son las CD y células epiteliales medulares (*Brocker T, et al. 1997*). La tolerancia periférica es el conjunto de mecanismos que silencian a los LT y LB maduros que reconocen antígenos propios en tejidos periféricos. En este escenario también se efectúa la eliminación clonal por inducción de apoptosis pero adicionalmente se produce la anergia clonal la cual consiste en la inactivación funcional prolongada o irreversible de los linfocitos, inducida por la interacción con antígenos bajo condiciones determinadas.

La denominada “hipótesis de las señales” ha sido ampliamente aceptada para abordar la activación de los LT. Mediante dicha hipótesis, se plantea que para su activación, los LT requieren como primera señal el reconocimiento del antígeno a través de los TCR. En este punto es importante la avidéz de los LT para unirse con las APC que expresan complejos MHC-péptido, la cual está determinada tanto por la afinidad del TCR por el péptido como por su organización en la superficie celular (expresión de co-receptores). La segunda señal consiste en la presencia de moléculas co-estimuladoras cuya expresión en las APC modula la respuesta de los LT. La tercera y última señal proporcionada principalmente por las citocinas IL-12 e IFN- γ para la formación de LT antígeno específicos efectoros y de memoria, indica la necesidad de al menos una de estas citocinas para la expansión de LTCD8 en respuesta a múltiples patógenos. Las señales de IL-12 e IFN- γ inducen conjuntos de genes diferentes pero superponibles, lo cual explica la dependencia dispar en ciertas infecciones. Además de inducir proliferación, la señal de citocinas, influencia el proceso de diferenciación (*den Haan JM, et al. 2014*).

A partir de la identificación del antígeno citotóxico del LT (CTLA4), el cual es un receptor de co-inhibición (al que también se une CD80), y del ligando secundario B7-2 o CD86 (que se une tanto a CTLA4 como a CD28), el modelo de las señales empezó a vislumbrarse como un complejo sistema de regulación. CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de LT vírgenes y proporciona una señal co-estimuladora esencial para el crecimiento y la supervivencia de los LT tras el reconocimiento de CD80 y CD86 expresados en las APC. La expresión de CTLA4 en los LT activados por antígeno, usualmente es transitoria y sirve como mecanismo para limitar la expansión de los mismos. Cuando CTLA4 es sobre-regulado, la expresión de CD28 es subsecuentemente sub-regulada por endocitosis. En este proceso CTLA4 escinde a CD80 y CD86 de la superficie de las APC impidiendo las interacciones de éstas con CD28 (*Qureshi OS, et al. 2011*). Adicional a los receptores de co-estimulación mencionados, se ha descrito que el receptor CD40 también posee función co-estimuladora relevante cuando su ligando CD40L se une a él. (*Chen L, et al. 2013*). Así mismo, las APC expresan las proteínas trans-membranales ligandos de programación de muerte PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC o CD273), consideradas como moléculas co-inhibidoras debido a su capacidad de unión al receptor de muerte celular programada (PD-1). Se ha demostrado que la unión de los ligandos al receptor PD-1 repercute en la inhibición de la proliferación y producción de citocinas mediadas por el TCR de LT activados y promueve el arresto del ciclo celular. Otros estudios han demostrado de forma

particular las propiedades co-inhibidoras de CD273 sobre la respuesta del LTCD4 (*Latchman Y, et al. 2001*).

En general, la expresión de CD80, CD86 y demás moléculas de co-estimulación, es modulada por el estado de activación de las APC. El reconocimiento de infección, estrés y daño celular a través de los receptores innatos activa a las APC e induce la transcripción, traducción y el transporte de las moléculas de co-estimulación a la superficie celular. Por consiguiente, la modulación de los receptores y ligandos de los LT y las APC, proporcionan múltiples niveles de regulación para la activación de los LT, promoviendo la respuesta de los LT ante antígenos no propios y previniendo o limitando respuestas auto-reactivas (*Dzionic A, et al. 2001; den Haan JM, et al. 2014*). Si bien, es claro que la expresión de ligandos y receptores de co-estimulación en la superficie celular tanto de las APC como de los LT, es regulada de forma transcripcional y post-transcripcional, cabe resaltar que la expresión de dichas moléculas opera simultáneamente a la proliferación y diferenciación de las células. Esta observación ha dado lugar al concepto de que las interacciones en la superficie celular y la subsecuente señalización intracelular, están variando continuamente en respuesta a las condiciones dinámicas del microambiente, en las que citocinas secretadas no sólo por las APC y los LT, sino por otras células del sistema inmune como la interleucina 10 (IL-10), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) entre otras, estarían jugando un papel importante. El papel principal de IL-6 en la inmunidad innata es estimular la síntesis de proteínas de la fase aguda por los hepatocitos y de esta forma contribuir a la respuesta de la fase aguda, estimula la producción de neutrófilos a partir de progenitores de médula ósea, habitualmente actuando de manera concertada con factores estimuladores de las colonias. Por otra parte, el TNF- α y la IL-1 β son los principales mediadores de la respuesta inflamatoria aguda, estimulando la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activando a estas células para que erradiquen a los microorganismos (*Abbas AK, et al. 2008*).

IL-10 es conocida como una citocina anti-inflamatoria o inmuno-supresora que funciona como amortiguador de la respuesta inmune al inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la presentación de antígenos. Así mismo, después de la eliminación de un patógeno, los procesos de regulación suprimen la respuesta inmune para el restablecimiento de condiciones fisiológicas homeostáticas a través de la destrucción de células efectoras del sistema inmune. Los principales actores son los LT reguladores (LTreg) y las CD inmaduras los cuales suprimen la respuesta inmune con sus propios productos o induciendo la síntesis de citocinas inmuno-supresoras como IL-10, interleucina 35 (IL-35) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) por parte de otras células (*Garib FY, et al. 2015; Ray A, et al. 2015*). Se sabe que los LTreg expresan CD28 y CTLA4 de forma constitutiva impactando su función. Comprender la regulación de estas células es de gran importancia ya que suprimen enfermedades autoinmunes y producen tolerancia a trasplantes. Se ha sugerido que el estado de maduración de las CD puede influenciar el desarrollo y función de diferentes tipos de LTreg y promover tolerancia. Considerando lo anterior, se estudió el

papel de CD86 y CD80 en la modulación de la función de LTreg vía CD28 y CTLA4 en respuesta a CD alogénicas, y se encontró que la interacción CD86-CD28 representa una potente señal que interfiere con la función inhibidora de los LTreg, mientras que la interacción CD80-CTLA4 promueve la regulación inmuno-supresora de los Treg. Adicionalmente se sabe que ambos ligandos se expresan en la superficie de APC y proporcionan co-estimulación a través de CD28, pero poseen diferentes patrones de expresión. En general, CD86 se expresa mayoría y más ampliamente expresado que CD80, y en estudios con ratones carentes de CD86 se determinó que CD86 es el activador de co-estimulación más importante para los LT (Zheng Y, et al. 2004).

El papel de co-estimulación o co-inhibición de las anteriores moléculas, da soporte a la idea de que un balance entre las señales negativas y positivas durante la interacción entre la CD y el LT es determinante en la inducción de tolerancia o inmunidad (Probst HC, et al. 2005). Por ejemplo, se ha observado la hipo-respuesta o no respuesta de LTCD4 efectores posterior a la estimulación con CD parcialmente maduras (Fu BM, et al 2009). A continuación, se presenta el compendio de las señales positivas y negativas proporcionadas por las moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras hasta ahora descritas (Figura 6).

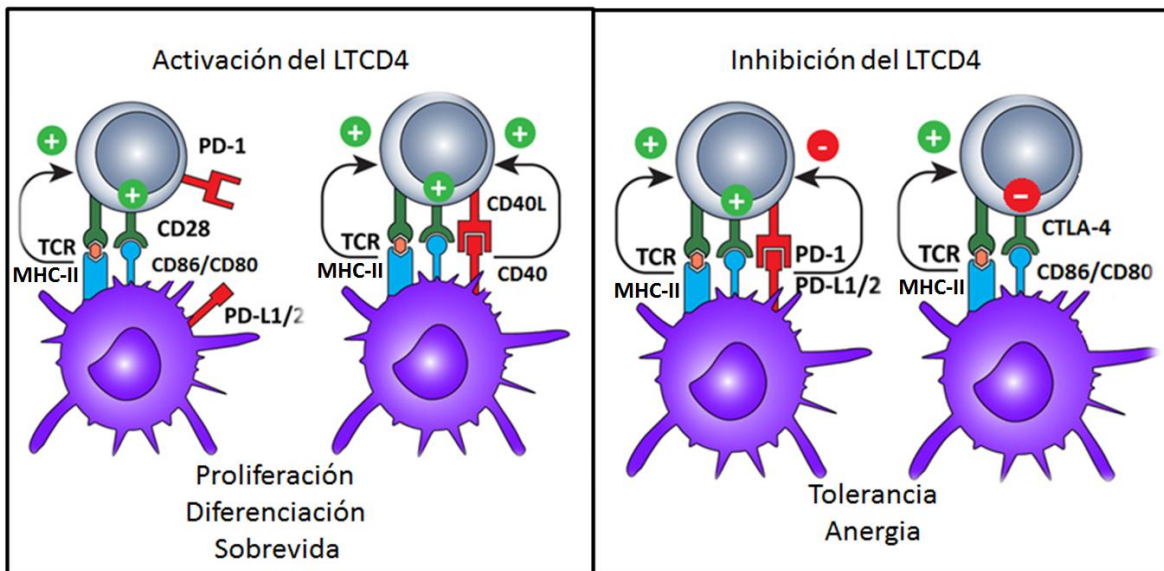


Figura 6. Principales moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras involucradas en la activación de los linfocitos T. En gris se esquematiza a los linfocitos T CD4+ vírgenes o naive (LTCD4) que expresan en su superficie a los receptores de linfocitos T (TCR), el receptor proteína de muerte celular programada (PD-1), el antígeno citotóxico del linfocito T (CTLA-4) y los clúster de diferenciación (CD28) y (CD40L). En violeta se esquematiza a las células dendríticas (CD) que expresan en su superficie el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II), los ligandos del receptor de muerte celular programada PD-L1 y PDL-2 (PD-L1/2) y los clúster de diferenciación (CD86), (CD80) y (CD40). En la presentación de antígenos vía MHC-II de las CD a los LTCD4, participan el resto de moléculas citadas proporcionando señales co-estimuladoras (señales positivas) o

co-inhibidoras (señales negativas). La activación o inhibición del LTCD4 depende del balance entre las señales positivas y negativas. Las flechas indican que las señales son recibidas por el LTCD4 como producto de su interacción con las CD. Los círculos verdes con signo positivo indican que la unión del receptor en la superficie del LTCD4 con el respectivo ligando en la superficie de la CD, proporciona una señal positiva o de co-estimulación que favorece la activación de los LTCD4 en términos de su proliferación, supervivencia y diferenciación. Los círculos rojos con signo negativo indican que la unión del receptor en la superficie del LTCD4 con el respectivo ligando en la superficie de la CD, proporciona una señal negativa o de co-inhibición que inhibe la activación de los LTCD4 produciendo tolerancia y anergia. El panel izquierdo esquematiza dos escenarios en los que se promovería la activación de los LTCD4. El panel derecho esquematiza dos escenarios en los que se inhibiría la activación de los LTCD4. (Modificado de: Vasaturo A, et al. 2013)

1.7. CD y micobacterias

Evidencias recientes han sugerido que el tipo de respuesta inmune dirigida contra las micobacterias es orquestada desde la inmunidad innata. Sin embargo, los mecanismos concretos que median la defensa contra las micobacterias son poco conocidos. Dentro de los elementos de la inmunidad innata, las CD son clave para definir la respuesta de LT hacia una respuesta tolerogénica o inmunogénica (Steinman RM, et al. 2003). Para lograr una respuesta inmunogénica después de una infección micobacteriana, las DC desarrollan procesos de maduración y activación que involucran la expresión de moléculas en la superficie celular y síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Demangel C, et al. 2000). En la etapa inmadura, las CD residentes en los tejidos periféricos se especializan en la captura de antígenos, tienen una capacidad endocítica elevada y baja presentación antigénica. Después de endocitar al antígeno, las CD maduran y se activan presentando cambios morfológicos característicos que dependen del citoesqueleto, aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras que favorecen la correcta presentación antigénica (CD40, CD80, CD86 y MHC-II), así como la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Mihret A, et al. 2011).

Se ha descrito que las CD pueden presentar un fenotipo semi-maduro, que es influenciado por el microambiente y los productos bacterianos (Bachmann MF, et al. 2006). Fenotípicamente, presentan características consistentes con la maduración, pero la expresión de moléculas co-estimuladoras y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias están disminuidas. En consecuencia, la presentación antigénica de las CD conduce a la activación de LTreg y procesos de tolerancia inmunológica (Howard ST, et al. 2000). Diferentes patógenos microbianos, han desarrollado mecanismos que modulan la función de las CD, interviniendo en su maduración y favoreciendo la respuesta tolerogénica (Mendoza Coronel, et al. 2011). En el caso de micobacterias, estudios previos en humano han demostrado que la interacción de CD con MTB o BCG, resulta en la maduración y activación de las mismas (Mihret A, et al. 2011). Mientras que en modelo murino, diferentes subespecies de *M. avium* inducen CD parcialmente maduras con expresión

significativamente baja de los marcadores de activación y citocinas pro-inflamatorias (Mendoza Coronel, et al. 2011; Lei L, et al. 2007). Este fenotipo semi-maduro también se caracterizó por la alta expresión de PD-L2 dependiente de la síntesis de IL-10. Interesantemente, este fenotipo fue mantenido al estimular CD derivadas de médula ósea (BMDC) con *M. avium in vitro* previa o posteriormente a la estimulación con BCG (Mendoza Coronel, et al. 2011). Resultados similares se observaron con el mismo modelo *in vivo* después de la pre-inmunización de ratones con *M. avium*, los cuales respondieron ineficientemente a la estimulación con BCG (Young SL, et al. 2007). Estos datos aportan evidencias de que la exposición a algunas especies de MNT modulan la activación de CD, afectando su capacidad para inducir una respuesta celular pro-inflamatoria.

Puesto que los hallazgos reportados hasta este punto, derivaban de estudios realizados en modelo murino, al interior del Programa de Inmunología Molecular Microbiana (PIMM) perteneciente al departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se realizó el trabajo de investigación de maestría: “Evaluación de la respuesta inmune innata y adquirida en células de sangre periférica de humano, estimuladas con diferentes micobacterias no tuberculosas aisladas del medio ambiente” (Vieyra Lobato MR. 2014), iniciando los estudios en humano y extrapolando al modelo murino. En este estudio, CD derivadas de sangre periférica (SP) y de cordón umbilical (SCU) humano fueron estimuladas con MNT y BCG, y se determinó el inmuno-fenotipo inducido sobre éstas. Las CD derivadas de ambas fuentes, presentaron inmuno-fenotipos diferentes y dependientes del estímulo. Sin embargo, la presencia de los inmuno-fenotipos inmaduro y semi-maduro de las CD estimuladas con *M. avium* se convirtió en el foco de interés, pues permitió hipotetizar que lo anterior podría deberse a la presencia de diversas subpoblaciones de CD que surgieron durante el proceso de diferenciación.

Por otra parte, la mayoría de estudios en humano frente a la infección por MTB se han realizado en CD inflamatorias (CD derivadas de monocitos) y poco se conoce sobre la susceptibilidad y el papel funcional de las CD primarias (cCD y pCD) (Lozza L, et al. 2014). Con los antecedentes previos nace el interés de realizar estudios encaminados a la diferenciación de las subpoblaciones de CD primarias cCD, derivadas de SCU humano para estimularlas con *M. avium* y determinar el inmuno-fenotipo inducido sobre las mismas.

1.8. Fuentes de CD humanas

En la actualidad, no se cuenta con líneas celulares de CD humanas, por lo cual se extraen de los sitios anatómicos en los que se encuentran como: piel, médula ósea (BM), mucosas, órganos, tejidos linfoides y no linfoides de biopsias de pacientes cuyo padecimiento demanda la intervención del sitio. El hecho de que las CD extraídas no son CD primarias constituye una limitación importante e inherente a la imposibilidad de un modelo de estudio humano. Ante esta limitante existe la alternativa de inducir la diferenciación de CD a partir de monocitos o CPH provenientes de BM, SCU o SP, cultivadas con factores de crecimiento y citocinas recombinantes que emulan la diferenciación de las CD en hematopoyesis. La elección de determinada fuente para la adquisición de CD, dependerá

del alcance del estudio para el cuál serán empleadas. Por ejemplo, para llevar a cabo estudios *in vitro* que precisen CD inmaduras de humano, partir de CPH e inducir su diferenciación es una buena alternativa.

A partir del primer trasplante exitoso de CPH para el tratamiento de anemia, se identificó a la proteína transmembrana CD34 como el antígeno de superficie mayormente expresado en CPH de SCU y BM humanas, y minoritariamente expresado en progenitores endoteliales, células vasculares endoteliales, fibroblastos embrionicos y algunas células del tejido nervioso fetal y adulto. Otra característica importante de las CPH consiste en que no expresan marcadores de linaje. Es decir, aún no se encuentran comprometidas hacia la diferenciación a una estirpe celular específica, por lo cual son linaje negativas.

La densidad de expresión de CD34 decrece con la maduración y no es expresada por células maduras. Por lo anterior, la presencia de ésta proteína es empleada para la adquisición de CPH usando anticuerpos monoclonales anti-CD34 conjugados con un soporte sólido, generalmente partículas o perlas magnéticas que se unen selectivamente a las células que poseen CD34 en su superficie (*Mehrishi JN, et al. 2013*). Al ser una glicofosfoproteína de membrana, no posee actividad cinasa intrínseca así como no la poseen los receptores de citocinas. El ligando natural de CD34 en CPH de BM es desconocido. Las CD34 endoteliales se unen a L-selectinas, por lo que por analogía se estima las CPH se unan a proteínas similares a las L-selectinas (*Felschow DM, et al. 2001*).

Por otra parte, se sabe que en comparación con las CPH de BM adulta en humano, las CPH de SCU se encuentran mayormente enriquecidas en progenitores primitivos pluripotentes, con capacidad de expansión a largo plazo, alta proliferación de células y muy baja inmunogenicidad. La SCU contiene células mononucleares de las cuales aproximadamente el 40% son monocitos, 40% linfocitos, 10% neutrófilos y otros tipos de leucocitos, y el 10% restante corresponde a células madre y células progenitoras dentro de las que se encuentran: CPH CD34+, células madre multipotentes CD133+ y células madre mesenquimales CD105+ (*Jaing TH, et al. 2014*).

Adicionalmente, se ha demostrado que las CPH provenientes de SCU y las CPH provenientes de SP de adulto difieren significativamente en su funcionalidad. Las CPH derivadas de SCU proliferaron y se expandieron en cultivos suplementados con el ligando del receptor fms-like tirosin cinasa 3 (FLT-3L) y trombopoyetina (TPO) por más de 16 días, generando un número significativo de CPH. En contraste, bajo las mismas condiciones de cultivo, las CPH derivadas de SP de adulto fueron incapaces de expandirse y proliferar. Considerando lo anterior, estudios subsecuentes encontraron que al suplementar los cultivos con factor estimulante de células madre (SCF), TPO y FLT-3L la capacidad de expansión de las CPH derivadas de SCU fue significativamente superior al de las derivadas de SP de adulto. Así mismo, éstas células repoblaron ratones inmuno-deficientes, no así sus contrapartes derivadas de SP de adulto. Diferentes estudios han permitido adjudicar dichas diferencias funcionales a que las células de SCU avanzan más rápidamente de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular y poseen telómeros más largos que los de las células de SP. La potente actividad hematopoyética de las CPH derivadas de SCU puede ser

atribuida al hecho de que la SCU es una fuente de células madre que se encuentran inmaduras respecto a las mismas células derivadas de SP de adulto. Lo anterior, junto con el hecho de que a medida que una célula sufre procesos de maduración, su proliferación disminuye hasta hacerse nula cuando madura por competencia (*Chularojmontri L, et al. 2009; Canque B, et al. 2003*).

Finalmente, la elección de SCU como fuente de CPH ofrece las siguientes ventajas:

- Disponibilidad: el cordón umbilical es considerado un desecho biológico. Por lo anterior, la adquisición de SCU no repercute en conflictos de interés ni transgrede aspectos bioéticos
- Fácil adquisición: a diferencia de fuentes como la BM y SP, la adquisición de SCU no produce molestias ni supone un riesgo potencial para el donante
- Fácil almacenamiento: el almacenamiento de la SCU es más barato y sencillo que el de BM
- Bajo riesgo de reactividad cruzada: puesto que las células de SCU son inmaduras, son excelentes candidatos para ser trasplantadas con un bajo riesgo de rechazo. La SCU trasplantada no requiere compatibilidad completa entre los antígenos leucocitarios humanos (HLA) del donante y el receptor, posibilitando que un receptor adquiera SCU de diferentes donantes de ser necesario. (*Revencu T, et al. 2013*).

1.8.1. Obtención de CMSCU

Un método ampliamente aceptado para el aislamiento de células mononucleares (CM) provenientes de BM, células madre movilizadas de SP o de SCU y empleado desde 1968, consiste en el establecimiento de un gradiente de densidad mediante centrifugación de la sangre en una solución de densidad determinada. La diferencia entre las densidades de las CM y las células sanguíneas restantes (mayoritariamente eritrocitos y granulocitos) favorece su separación a través de un medio de densidad conocida e intermedia entre las anteriores (inferior a la densidad de los eritrocitos y granulocitos pero superior a la de las CM). Lo anterior aunado a la centrifugación, genera un gradiente de densidad a través del cual las células migran permitiendo su separación (*Chularojmontri L, et al. 2009*).

El Ficoll es un polímero sintético de alto peso molecular fácilmente soluble en agua. compuesto por diatrizoato de sodio y ácido de calcio disodio etilendiamintetraacético se encuentra en una solución acuosa con una densidad de 1.077 ± 0.001 g/mL. Ésta molécula posee numerosas ramificaciones, es aproximadamente esférica y posee una conformación compacta. Tiene una baja viscosidad comparado con polisacáridos lineales del mismo peso molecular y posee una baja presión osmótica. El diatrizoato de sodio le confiere a la solución de Ficoll poseer alta densidad y baja viscosidad y su función principal es proporcionar la densidad y osmolaridad óptimas para separar las CM del resto de células presentes en la sangre.

Numerosos factores contribuyen al éxito de la separación. Mientras se centrifugan, las células de sangre se sedimentan hacia la inter-fase sangre-solución de Ficoll, en donde entran en contacto con el Ficoll. Los eritrocitos y granulocitos se agregan eficientemente a temperatura ambiente al interaccionar con este agente, incrementando la tasa de sedimentación y permitiendo que estas células se posicionen en el vértice del tubo y debajo de la capa de solución de Ficoll, separándose de los linfocitos. Por otra parte, el proceso anterior es facilitado por el incremento en la densidad de las células debido al contacto con la solución de Ficoll la cual se encuentra levemente hipertónica con respecto a las células. Los linfocitos, monocitos y plaquetas no son lo suficientemente densos para penetrar en la capa de solución de Ficoll. Por lo cual se localizan formando un anillo por encima de este, mismo que puede recolectarse y lavarse. La re-suspensión celular resultante consta de linfocitos y monocitos purificados que pueden ser empleados para aplicaciones subsecuentes. Sin embargo, cuando se separan células provenientes de SP de infantes y de adultos bajo las mismas condiciones, a diferencia de lo que sucede con las CM provenientes de SP de adulto, la capa de CM proveniente de SP de infantes se encuentra contaminada con eritrocitos y con precursores de eritrocitos. Las células contaminantes pueden ser removidas mediante lisis empleando una solución hipotónica. Este tratamiento no afecta la viabilidad ni la funcionalidad de las CM (*McGuckin C, et al. 2008*).

La técnica de lisis de eritrocitos toma ventaja de que los eritrocitos carecen de núcleo y orgánulos, por lo que no pueden repararse y cuando se “desgastan” mueren más rápidamente que las células que si poseen dicha maquinaria de reparación. Este proceso está influenciado por la tonicidad del medio en el que se encuentran los eritrocitos. En una solución hipotónica con respecto al eritrocito, éste pasa por un estado de turgencia y luego estalla debido a la presión. Por otra parte, los eritrocitos y células como las del epitelio del riñón son particularmente permeables al agua. Lo anterior, debido a la presencia de una proteína formadora de canales de agua denominada CHIP28 (proteína integral formadora de canales). Los canales que forma esta proteína son muy selectivos para el agua y no permiten el paso de iones u otros solutos pequeños. Esta particularidad podría explicar cómo la interacción con la solución hipotónica, durante el tiempo y a la temperatura adecuada, afecta exclusivamente a los eritrocitos induciendo su lisis y no afecta a las CM que no presentan dicha susceptibilidad exacerbada a la lisis hipotónica (*Maria LF, et al. 1998*).

1.8.2. Obtención de CPH

Como se ha mencionado con anterioridad, la inducción de CD *in vitro* a partir de CPH de SCU, se lleva a cabo adicionando factores de crecimiento y citocinas recombinantes (coctel de diferenciación) a las CPH en condiciones de cultivo. Sin embargo, dependiendo de la fuente de las CPH existen dos métodos generalmente empleados. El primer método consiste en la obtención de CPH de SCU mediante separación inmuno-magnética (MACS)

(por sus siglas en inglés: magnetic activated cell sorting), antecedido por la separación de CMSCU y el cultivo de éstas CPH adicionando el coctel de diferenciación. El segundo, denominado método de adherencia plástica se basa en el aislamiento de CMSCU valiéndose de su capacidad de adherencia sobre la superficie de placas de cultivo a las cuales se adiciona el coctel de diferenciación y se genera gran cantidad de CD. Sin embargo, un estudio que compara los diferentes métodos reveló que si bien, mediante ambos métodos se producen CD, éstas difieren en sus vías de diferenciación, fenotipo y funciones. Las CD diferenciadas y obtenidas mediante el método de adherencia fueron más maduras y fueron incapaces de ser mantenidas en cultivo por más de 9-10 días, mientras que las obtenidas por MACS fueron fenotípicamente estables y pudieron ser mantenidas por más de 3 semanas en cultivo, mostraron mayor homogeneidad y mayor rendimiento y viabilidad. Sin embargo, no hay que perder de vista que mediante ambos métodos se incurre en el aislamiento de subpoblaciones de monocitos, lo cual afecta el fenotipo y las funciones de las CD resultantes (Bie Y, et al. 2015).

1.9. Generación *in vitro* de CD humanas

La diferenciación y expansión de linajes específicos de CD *in vitro*, son regulados extrínsecamente por diferentes citocinas que participan en etapas tempranas de la hematopoyesis, como FLT-3L, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y TPO. Aunque las CD generadas empleando estas citocinas comparten características fenotípicas, funcionales y de desarrollo con sus contrapartes *in vivo* no son idénticas. Por ejemplo, las cCD generadas en cultivos estimulados con FLT-3L se asemejan fenotípicamente a las células residentes de nódulos linfoides pero no expresan algunos marcadores murinos característicos *in vitro*. Sin embargo, al ser transferidas a ratón se inicia la expresión de dichos marcadores. Lo anterior, evidencia que las propiedades de los modelos *in vitro* no son idénticas a las de sus contrapartes *in vivo*, resaltando la importancia de validar *in vivo* los hallazgos adquiridos *in vitro*. Algunas de las citocinas más empleadas para la generación de CD humanas *in vitro* son las siguientes:

FLT-3L

Es un regulador clave para el compromiso de las células hacia el linaje de CD en hematopoyesis, estimula la proliferación de células hematopoyéticas de etapas tempranas. Es producido por células de tejido, estroma, endotelio y por LT activados. El receptor tirosin cinasa para el ligando FLT-3L, también llamado CD135 o FLK2 es expresado en CPH repobladoras de corto plazo, CLP y subpoblaciones de CMP y su expresión disminuye a medida que los progenitores se comprometen a linajes diferentes al de CD. Carecen de éste receptor leucocitos circulantes y de tejidos, con la excepción de las pre-cCD y pCD. Se encuentra en las cCD de tejidos con la excepción de las LC, que no se afectan por la pérdida del ligando o del receptor. Por sí solo el ligando FLT-3L no estimula la proliferación de las células hematopoyéticas tempranas pero ejerce un efecto de

sinergia con otros factores de células madre e interleucinas para inducir crecimiento y diferenciación. A diferencia de SCF, FLT-3L no ejerce función alguna sobre los mastocitos. FLT-3L recombinante humana es una proteína soluble constituida por 155 residuos de aminoácidos con una masa atómica de 17,6kDa

El receptor también está expresado en CD derivadas de BM cultivadas en presencia de FLT-3L, mientras que se encuentra ausente en CD derivadas de monocitos. La disminución en la expresión del receptor en progenitores hematopoyéticos, correlaciona con la pérdida del potencial de diferenciación hacia CD, mientras que el incremento en dicha expresión en progenitores que carecen del potencial de diferenciación a CD, restauran o adquieren dicho potencial. Finalmente, ratones carentes de FLT-3L o su receptor, poseen número reducidos de cCD y pCD. Consecuentemente, la inyección o sobreexpresión de FLT-3L en ratón y humanos conduce a una expansión considerable de cCD y pCD en tejidos linfoides y no linfoides así como en sangre. Adicional a su rol en la diferenciación, FLT-3L también regula la proliferación de CD periféricas para el mantenimiento del número de CD en homeostasis.

GM-CSF

Es un factor de crecimiento hematopoyético que controla la diferenciación del linaje mieloide. Esta citocina es clave para promover la diferenciación de CPH y monocitos tanto humanos como murinos a células que se asemejan a las cCD localizadas en el bazo de ratón. Estimula el desarrollo de neutrófilos y macrófagos y promueve la proliferación y desarrollo de CPH eritroides, megacariocíticos y eosinofílicos. Es producido por células endoteliales, monocitos, fibroblastos y LT. Inhibe la migración de neutrófilos y potencia la actividad funcional de células maduras. GM-CSF recombinante humano es una proteína globular constituida por 128 residuos de aminoácidos con masa molecular de 14,6kDa.

Estudios recientes confirman que la ausencia de GM-CSF no afecta el desarrollo de cCD en tejidos linfoides pero producen disminución de cCD en intestino, dermis y pulmón presentando defectos pro-apoptóticos que sugieren el papel de GM-CSF como regulador crítico de la supervivencia de las cCD en tejidos no linfoides, y ningún efecto desfavorable sobre las cCD de tejidos linfoides.

SCF

El SCF es una citocina que puede existir en forma soluble o unida a la superficie celular de forma transmembranal las cuales parecen diferir en sus funciones. Es expresada por fibroblastos y células endoteliales a través del cuerpo. SCF es ligando del receptor tirosina quinasa c-kit, es esencial en hematopoyesis, melanogénesis y fertilidad. SCF actúa en varios niveles de jerarquía de la hematopoyesis promoviendo la supervivencia, proliferación, diferenciación, adhesión y activación funcional de diferentes células. SCF actúa en la diferenciación de mastocitos, linajes eritroides, células madre multipotentes, megacariocitos y subpoblaciones de progenitores linfoides. Existen múltiples isoformas del receptor c-kit en diferentes tipos celulares. El SCF recombinante humano producido en

E.coli es un polipéptido que contiene 165 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 18,409kDa (Lennartsson J, et al. 2012).

IL-4

Es una proteína globular constituida por 130 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 15,1kDa. Esta citocina pleiotrópica, regula diversas respuestas de los LT y LB incluyendo proliferación, supervivencia y expresión génica. Es producida por mastocitos, LT y células estromales de BM. Regula la diferenciación de LTCD4 hacia linfocitos cooperadores Th2, los cuáles conducen a una respuesta inmune humoral. Otra función importante de IL-4 es la regulación del cambio de isotipo IgG1 a IgE. IL-4 media sus efectos a través de cualquiera de los dos tipos de receptores de IL-4 (IL-4R). Tipo I (IL-4R α y la cadena Y común) o tipo II (IL-4R α e IL-13R α 1).

En combinación con GM-CSF, la IL-4 promueve la diferenciación de monocitos humanos a CD en condiciones fisiológicas o patológicas, ambas citocinas son producidas por múltiples subpoblaciones celulares como los linfocitos cooperadores Th2, células NK, mastocitos y queratinocitos. Se ha descrito que la diferenciación de monocitos a CD es llevada a cabo por GM-CSF e IL-4 mediante la interrupción de la osteoclasto-génesis, para lo cual éstas citocinas producen el desprendimiento del receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), mediante la sub-regulación de la enzima de la conversión de TNF- α (TACE) (Chen W, et al. 2004; Hiasa M, et al. 2009; Poulin LF, et al. 2010; Mayani H, et al. 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune protectora conferida por la vacuna BCG inicia con el procesamiento profesional de antígenos por las CD y su presentación a los LT, en este proceso las CD maduran incrementando la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de citocinas pro-inflamatorias.

La exposición a *M. avium* previa y posterior a la vacunación con BCG es una de las causantes de la disminución en la efectividad protectora conferida por la vacuna. Por otra parte, en modelo murino se sabe que *M. avium* induce un inmuno-fenotipo semi-maduro sobre BMDC, que conducen a una respuesta inmune adaptativa tolerogénica (*Mendoza CE, et al. 2011*). Sin embargo, estos hallazgos no se evidenciaron en el estudio con CD derivadas de SCU humano, en el que posterior a la exposición a *M. avium* se detectó la participación de más de una subpoblación de CD (*Vieyra Lobato MR. 2014*). Es importante caracterizar las subpoblaciones de CD derivadas de SCU humano así como el inmuno-fenotipo que *M. avium* induce sobre las mismas para comparar estos hallazgos con los descritos en modelo murino.

3. HIPÓTESIS

Las subpoblaciones de cCD primarias BDCA1 y BDCA3 podrán diferenciarse mediante la inducción de CPH derivadas de SCU humano.

Las subpoblaciones de cCD primarias BDCA1 y BDCA3 estimuladas con *M. avium* adquirirán inmuno-fenotipos diferenciales en términos de la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y MHC-II, y la secreción de citocinas pro o anti-inflamatorias.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar el inmuno-fenotipo de las subpoblaciones de cCD (BDCA1/BDCA3) derivadas de CPH de SCU humano estimuladas con *M. avium* Subsp. *hominissuis*.

4.2. Objetivos Particulares

- Diferenciar las subpoblaciones de cCD (BDCA1/BDCA3) *in vitro*, a partir de CPH de SCU humano.
- Estimular las subpoblaciones de cCD (BDCA1/BDCA3) con *M. avium* Subsp. *hominissuis*.
- Evaluar el perfil inmunológico (expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras y secreción de citocinas pro y anti-inflamatorias) de las subpoblaciones de cCD (BDCA1/BDCA3) estimuladas.

5. METODOLOGÍA

5.1. Esquema general

Se extrajeron células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CMSCU) mediante la técnica de separación por gradientes de densidad y lisis de eritrocitos. Posteriormente, a partir de las CMSCU se obtuvieron CPH mediante la técnica de MACS positiva con perlas magnéticas acopladas al marcador CD34⁺. La pureza de las CPH se verificó mediante citometría de flujo empleando el anticuerpo anti CD34 y el coctel de linaje LIN1.

Las CPH se cultivaron durante 14 días en medio de cultivo con solución de antibióticos, y coctel de diferenciación para inducir su diferenciación hacia las subpoblaciones de cCD, adicionando al día 7 más coctel de diferenciación y monitoreando la densidad celular. Los controles de diferenciación fueron CPH cultivadas bajo las mismas condiciones exceptuando la adición de coctel de diferenciación y realizando cambio de medio cada 3 días. Al completarse el tiempo de diferenciación se empleó citometría de flujo para determinar las subpoblaciones de cCD diferenciadas empleando marcadores de superficie compartidos y exclusivos para cada subpoblación.

Por otra parte, se realizaron las curvas de crecimiento y la determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante el método de dilución en placas para *M. avium*. (Ya se contaba con los datos de *M. bovis BCG*). Con base en lo anterior, se determinó el volumen de re-suspensión de micobacterias requerido para realizar la infección de las CD con un índice de infección (MOI) de 1:1 (micobacteria: CD). Las CD se mantuvieron en contacto con las micobacterias durante 24 horas bajo condiciones de cultivo, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se analizaron mediante ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación de secreción de citocinas. Se cosecharon las células para determinar el inmuno-fenotipo inducido por las micobacterias sobre las CD en términos de la expresión de moléculas de co-estimulación, mediante citometría de flujo. La metodología se presenta de forma general e indicando los métodos empleados en cada etapa (Figura 7 y 8).

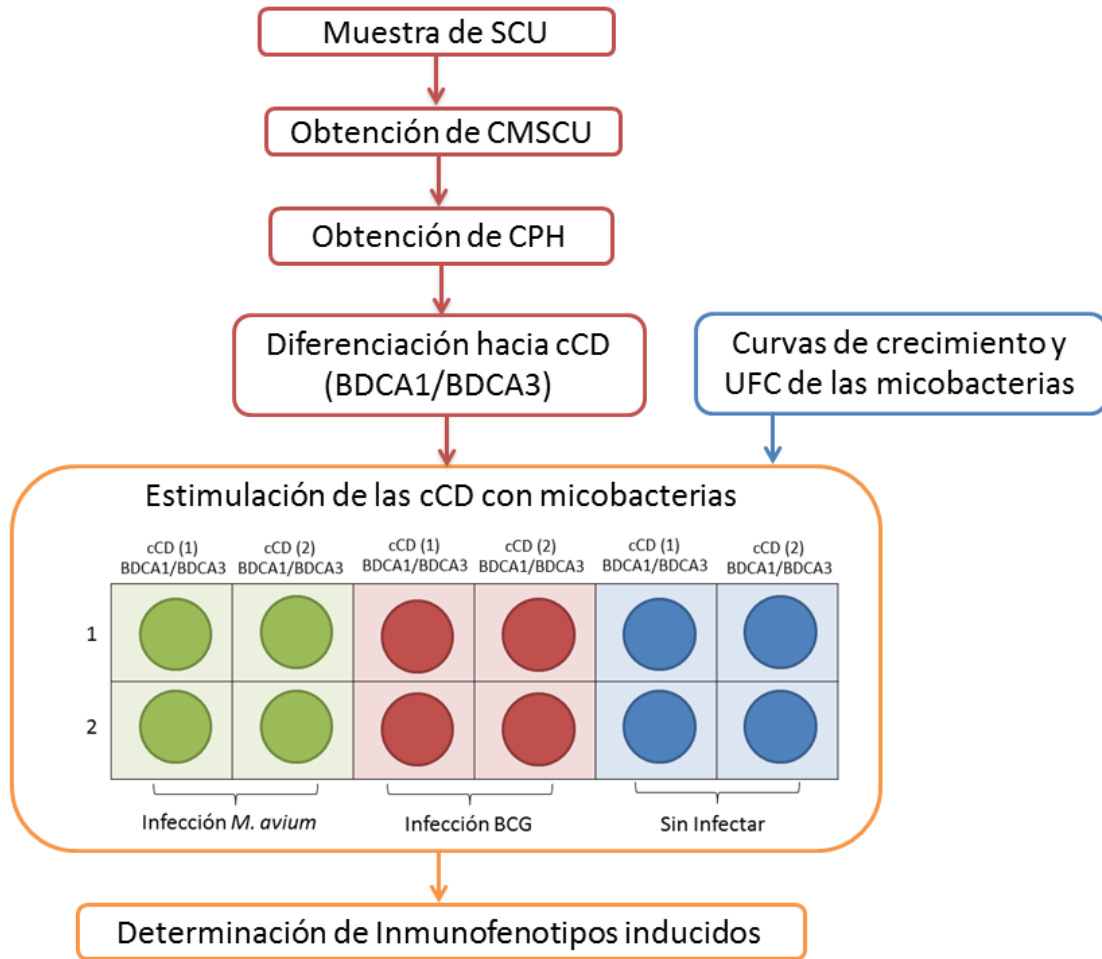
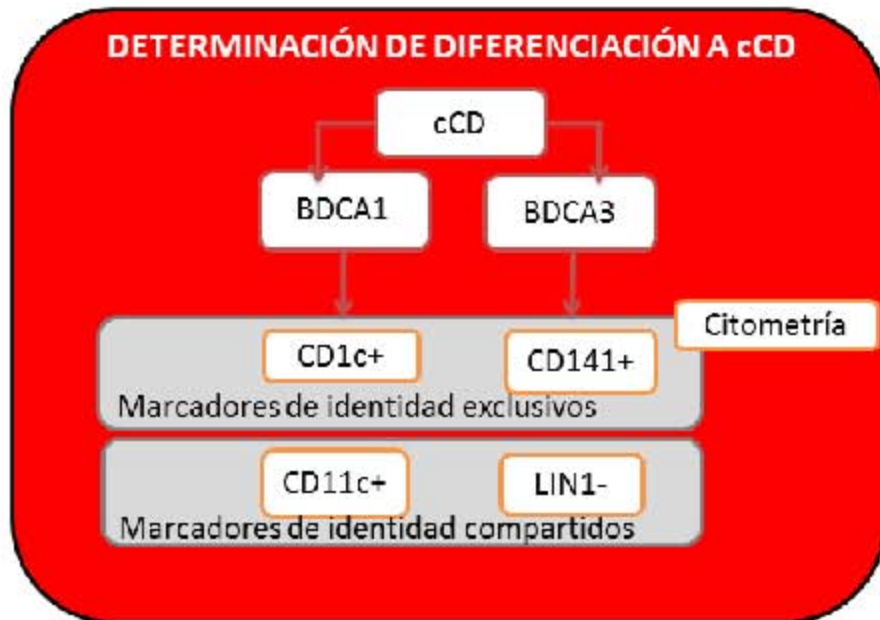
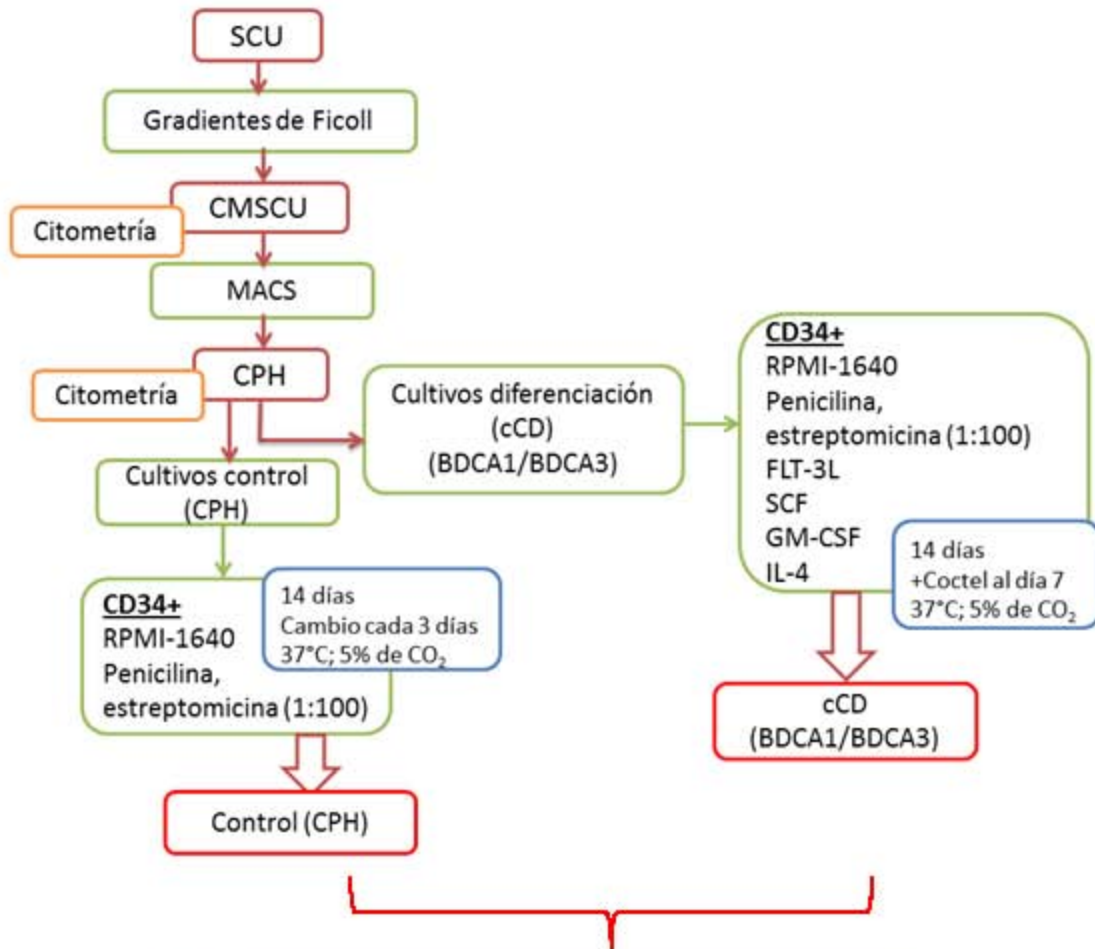


Figura 7. Estrategia experimental general. SCU: sangre de cordón umbilical, CMSCU: células mononucleares de sangre de cordón umbilical, CPH: células progenitoras hematopoyéticas, cCD: células dendríticas clásicas, BDCA1/BDCA3: antígenos de células dendríticas clásicas de sangre 1 y 3, UFC: unidades formadoras de colonias, BCG: *Mycobacterium bovis* BCG phipps, *M. avium*: *Mycobacterium avium* Subsp. *hominissuis*



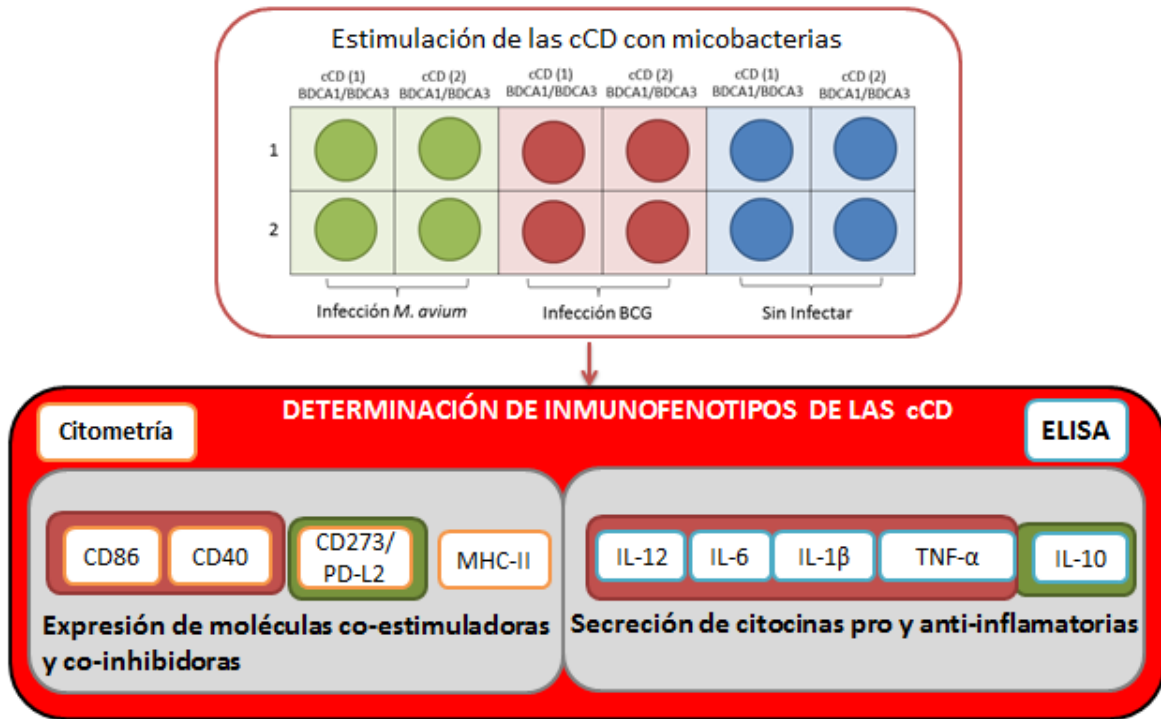


Figura 8. Estrategia experimental con los métodos empleados en cada etapa. SCU: sangre de cordón umbilical, CMSCU: células mononucleares de sangre de cordón umbilical, CPH: células progenitoras hematopoyéticas, cCD: células dendríticas clásicas, BDCA1/BDCA3: antígenos de células dendríticas clásicas de sangre 1 y 3, MACS: separación inmunomagnética, CD: clúster de diferenciación, LIN1: coctel de linaje1, RPMI-1640: medio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute)-1640, FLT-3L: ligando del receptor fms-like cinasa de tirosinas 3, SCF: factor estimulante de células madre, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-4: interleucina 4, PD-L2: ligando de muerte programada 2, MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad clase II, IL-12: interleucina 12, IL-6: interleucina 6, IL-1β: interleucina 1β, TNF-α: factor de necrosis tumoral α, IL-10: interleucina 10, ELISA: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas, BCG: *Mycobacterium bovis* BCG phipps, *M. avium*: *Mycobacterium avium* Subsp. *hominissuis*

5.2. Obtención de SCU

Se obtuvo SCU de partos a término completo con consentimiento informado de mujeres clínicamente sanas que cumplieron con los criterios de inclusión del presente estudio (Anexo 1), en el Hospital de Ginecología 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

La SCU se obtuvo al momento del parto por punción de la vena del cordón y drenaje por gravedad, almacenándose en una bolsa de recolección de sangre fabricada para dicho fin (Terumo-1BB*1CD256Z8B). La bolsa tiene la capacidad de 250mL, incluye aguja y 35mL de solución anticoagulante citrato, fosfato, dextrosa, adenina (CPDA) la cual extiende la sobrevivencia de las células sanguíneas proporcionando adenina para el mantenimiento de

niveles óptimos de adenosina trifosfato (ATP). Una vez obtenida, la SCU fue transportada al laboratorio a temperatura ambiente y se procesó antes de 6h a partir de su obtención. Antes de ser procesada la sangre se mantuvo a temperatura ambiente con agitación moderada para evitar su coagulación.

5.3. Obtención de CMSCU

Se empleó la solución de Ficoll (Sigma-Histopaque-1077) para proceder a la separación de CMSCU y se preparó una solución de cloruro de amonio, bicarbonato de sodio y ácido etilendiaminotetraacético para lisar eritrocitos y purificar CMSCU. Se adicionaron 35mL de SCU en 20mL de Ficoll previamente colocado en tubos falcon de 50mL a temperatura ambiente (TA) usando pipetas de transferencia desechables evitando no romper la interfase entre la sangre y la solución de Ficoll. Los tubos fueron centrifugados a 800xg/30min/freno 6/TA, se extrajo el anillo de CMSCU localizado en la inter-fase entre la solución de Ficoll y el plasma. Las CMSCU fueron centrifugadas a 500xg/20min/freno 6/TA, re-suspendidas en solución de lisis de eritrocitos e incubadas bajo condiciones de cultivo de 37°C con 5% de CO₂ durante 10min.

Las células se lavaron 2 veces con solución salina de fosfatos (PBS-1X), y se re-suspendieron en 1mL del medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (Gibco- 31800-014) suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 10% conteniendo solución de antibióticos penicilina- estreptomina (Sigma aldrich-P4333) en una relación (1:100). Se evaluó viabilidad y número celular con el método de exclusión con azul de tripano en cámara de Neubauer (Brand Germany). Las células se re-suspendieron en 4mL de medio RPMI y se cultivaron en caja de petri bajo las condiciones de cultivo previamente mencionadas hasta el día siguiente en que fueron procesadas para la obtención de CPH.

5.4. Obtención de CPH

Se empleó el kit de MACS positiva (Miltenyi biotec- CD34 Microbead Kit-130-046-703) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las CMSCU se incubaron con perlas magnéticas anti-CD34. La suspensión de células y perlas se pasó a través de una columna acoplada a un separador que provee un campo magnético que atrae a las perlas permitiendo capturar la fracción de CMSCU CD34+ sin atraer la fracción de CMSCU CD34-. La viabilidad y el número celular fueron evaluados por exclusión con azul de tripano.

5.5. Determinación de la pureza de las CPH

La pureza de las CPH obtenidas se determinó por citometría de flujo mediante la expresión de los marcadores CD34 y LIN1 de la forma CD34+/LIN1-. Para lo cual se tiñeron CMSCU y CPH obtenidas de las mismas. Las células se marcaron con el coctel de linaje 1

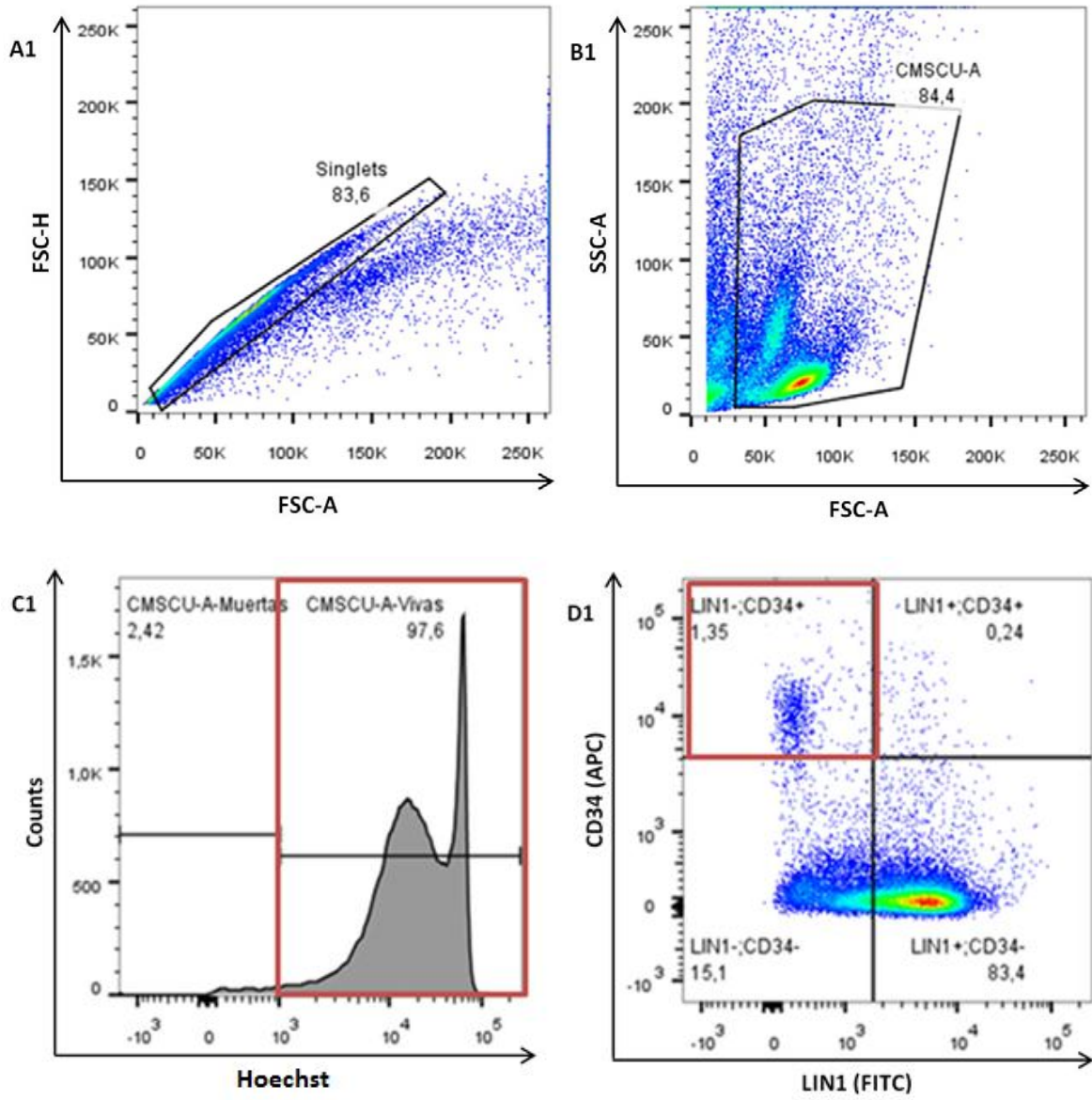
(Becton dickinson-FITC anti-human LIN1 antibody-340546), con el anticuerpo anti-CD34 (BioLegend-APC- anti-human CD34 antibody-343608) y con el colorante fluorescente Hoechst 33342 (H21492- Invitrogen), el cual es una bisbenzimidida que atraviesa la membrana celular y se une al surco menor de la doble hélice de DNA en células vivas. Las células sobreviven a la tinción con este colorante, por lo cual es empleado para la visualización de núcleos y mitocondrias, y en nuestro caso para la identificación de las células vivas. El coctel de linaje LIN1 contiene los anticuerpos: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56. CD3 se expresa en los LT, CD14 se expresa en monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, CD16 se expresa en NK, macrófagos, monocitos y neutrófilos, CD19 y CD20 se expresa en LB, CD56 se expresa en NK activadas y en homeostasis.

En el análisis de los datos de citometría de flujo, el primer escrutinio consistió en la generación de gráficos de puntos (dot plot) de tamaño en área versus tamaño en altura (FSC-A vs FSC-H) tanto para las CMSCU como para las CPH. Sobre éstos gráficos se generaron ventanas (gates) en las que se seleccionaron los singletes (singlets) distribuidos en la diagonal. Los singletes son los eventos obtenidos tras la interrogación de células individuales y no tras la interrogación de dos o más células unidas (Figura 9-A1 y A2).

A partir de las ventanas de singletes, se generaron gráficos de puntos emparentados de tamaño versus complejidad ambos en área (FSC-A vs SSC-A), en los cuales se generaron ventanas para la selección de las poblaciones de interés, considerando la no inclusión de detritos y de subpoblaciones celulares que no son de interés. Se seleccionaron las CMSCU (subpoblaciones de progenitores de linfocitos y monocitos) (Figura 9-B1), y las CPH (progenitores de linfocitos) (Figura 9-B2). Para lo anterior se tuvo en cuenta el tamaño, la granularidad y la densidad celular de las subpoblaciones de interés (*Xiaoyang Wang, et al. 2012; Gaipa G, et al. 2002; Gratama JW. 2001*).

A partir de las ventanas de subpoblaciones de interés se generaron histogramas de intensidad media de fluorescencia (IMF) del fluorocromo Hoechst versus número de células (counts) (Hoechst vs Counts) emparentados, sobre los cuales mediante el empleo de una herramienta denominada (bisector) se separaron la distribuciones en dos ventanas abiertas, una positiva y otra negativa para el fluorocromo. A partir de las ventanas de poblaciones positivas para Hoechst (células vivas), señaladas con rojo (Figuras 9-C1 y C2), se generaron gráficos de puntos emparentados de FITC versus APC para contrastar la expresión de las moléculas marcadas con dichos fluorocromos LIN1 vs CD34. De forma automática éstos gráficos de puntos generan cuatro cuadrantes en los que se distribuyen las subpoblaciones conforme a la expresión de los marcadores seleccionados en los ejes (Q1: LIN-/CD34+; Q2: LIN+/CD34+; Q3: LIN-/CD34-; Q4: LIN+/CD34-). Se seleccionaron los cuadrantes de interés Q1: LIN1-/CD34+ (Figura 9-D1 y D2) y se capturaron los datos del porcentaje de células que se ubican en los cuadrantes Q1 para su subsecuente análisis estadístico.

CMSCU- Previo a MACS



CPH- Posterior a MACS

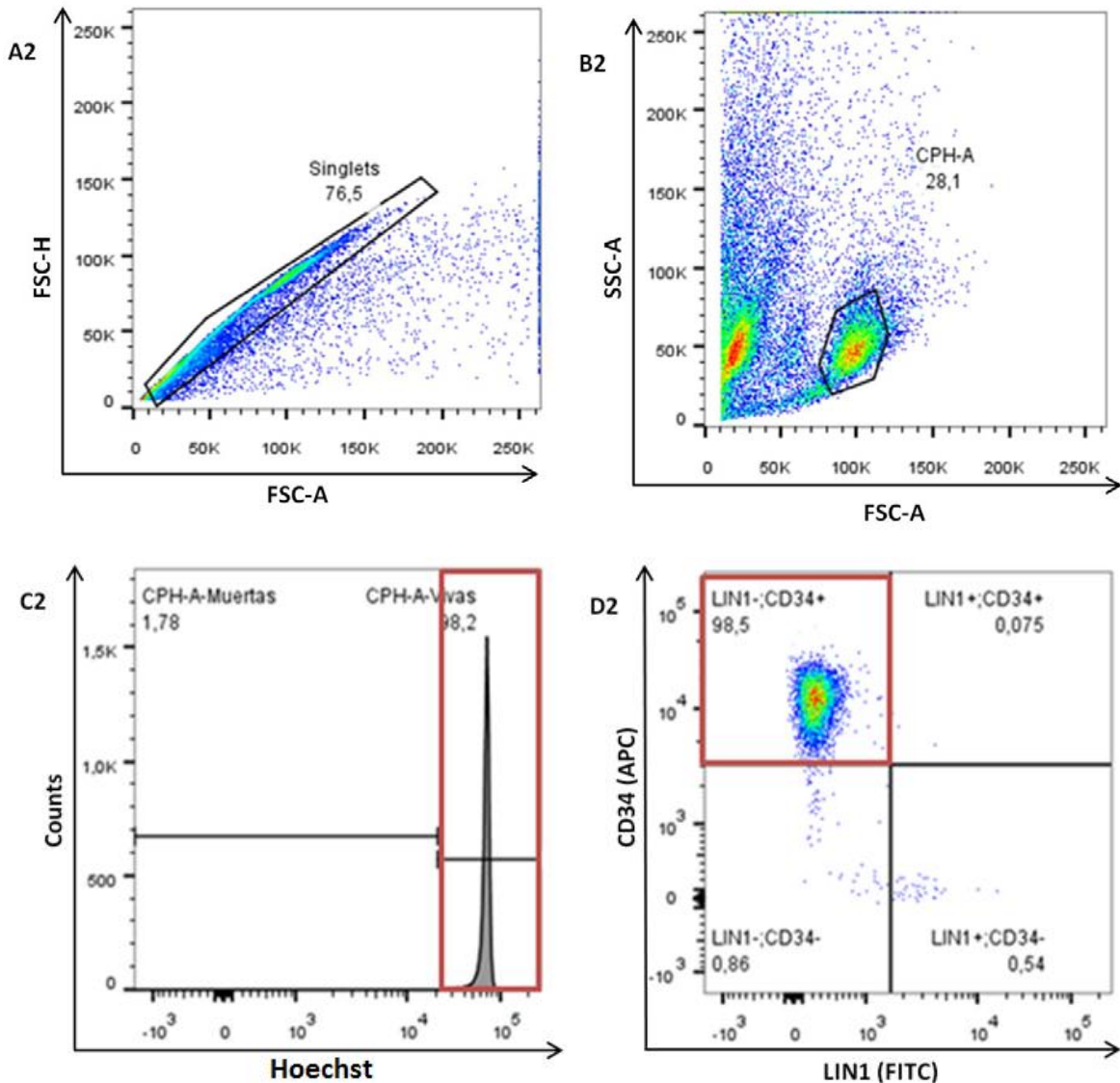


Figura 9. Análisis de citometría de flujo de las CMSCU y CPH. Las secciones A1, B1, C1 y D1 corresponden al análisis de CMSCU. Las secciones A2, B2, C2 y D2 corresponden al análisis de CPH. En los gráficos de puntos A1 y A2 se seleccionan los singlets los cuales corresponden al 83,6% de las CMSCU y 76,5% de las CPH, delimitados por áreas de líneas negras. A partir de los singlets se generan los gráficos de puntos emparentados B1 y B2, sobre los que se seleccionan las subpoblaciones de interés las cuales corresponden al 84,4% de los singlets de las CMSCU y 28,1% de los singlets de las CPH, delimitados por áreas de líneas negras. A partir de las subpoblaciones de interés se generan los gráficos de puntos emparentados C1 y C2, sobre los que se seleccionan las células vivas Hoechst+ señaladas con recuadros rojos que corresponden al 97,6% de las CMSCU y 98,2% de las CPH. A partir de las células vivas se generan los gráficos de puntos emparentados D1 y D2, sobre los que se seleccionan las células Hoechst+/CD34+/LIN1- localizadas en el cuadrante

Q1 señaladas con recuadros rojos que corresponden al 1,35% de CMSCU y 98,5% de CPH. El porcentaje de las células Hoechst+/CD34+/LIN1- se captura para los subsecuentes análisis estadísticos. MACS: separación inmuno-magnética, CMSCU: células mononucleares de sangre de cordón umbilical obtenidas por separación con gradientes de densidad, previas a MACS, CPH: células progenitoras hematopoyéticas obtenidas por MACS.

5.6. Inducción de CPH hacia subpoblaciones de CD

La diferenciación de las subpoblaciones de cCD se realizó a partir de 200 a 800 x 10⁵ CPH/mL, se cultivaron en placas de 24 pozos (Costar-3524) en medio RPMI y solución de antibióticos (mismo empleado en la obtención de CMSCU) y los siguientes factores de crecimiento y citocinas recombinantes que constituyeron el coctel de diferenciación:

Coctel de diferenciación para las subpoblaciones de cCD: BDCA3 y BDCA1

- ✓ 20ng/mL de GM-CSF (20µg/mL- Peprotech-300-03)
- ✓ 100ng/mL de FLT-3L (10µg/mL-Peprotech-300-19)
- ✓ 20ng/mL de SCF (10µg/mL-Peprotech-300-07)
- ✓ 20ng/mL de IL-4 (20µg/mL-Peprotech-200-04)

Las CPH se mantuvieron en incubadora durante 14 días bajo condiciones de cultivo de 37°C y 5% de CO₂. Al día 7 se adicionó más coctel de diferenciación. Los controles negativos de las células diferenciadas (cCD) consistieron en CPH cultivadas durante el mismo tiempo con medio RPMI y solución de antibióticos, sin adición de coctel de diferenciación con cambio de medio cada 3 días.

5.7. Determinación de la diferenciación hacia subpoblaciones de CD

Transcurridos 14 días de cultivo se evaluó viabilidad y número celular por exclusión con azul de tripano de las cCD y CPH, mismas que fueron teñidas para analizar la diferenciación por citometría de flujo. Los anticuerpos compartidos y exclusivos de las subpoblaciones de cCD empleados fueron los siguientes:

cCD BDCA3 y BDCA1

Anticuerpo exclusivo- BDCA1

- ✓ CD1c (APC/Cy7): BioLegend-331520

Anticuerpo exclusivo- BDCA3

- ✓ CD141 (PE/Cy7): BioLegend-344110

Anticuerpos compartidos

- ✓ CD11c (APC): BD Pharmigen-559877

✓ Lineage cocktail 1 (LIN1) (FITC): BD-340546

En el análisis de los datos de citometría de flujo, la selección de los singletes, de las subpoblaciones de interés y de las células vivas se realizó siguiendo la estrategia para la determinación de la pureza de las CPH mencionado con anterioridad (Figura 10-A, B y C). Posteriormente se generó un gráfico de puntos emparentado de FITC versus APC a partir de la población de células vivas, para contrastar la expresión de las moléculas marcadas con dichos fluorocromos LIN1 vs CD11c. Se selecciona el cuadrante de interés Q1 correspondiente a los marcadores compartidos por las cCD CD11c+/LIN1- (Figura 10-D). A partir de éste cuadrante se generó un gráfico de puntos emparentado de APC/Cy7 versus PE/Cy7 para contrastar la expresión de las moléculas marcadas con dichos fluorocromos CD1c vs CD141, que corresponden a los marcadores exclusivos de las subpoblaciones de cCD (Figura 10-E), y se captura el porcentaje de células vivas Hoechst + que expresan los marcadores compartidos CD11c+/LIN1- y simultáneamente alguno de los marcadores exclusivos CD141+, CD1c+/CD141+ o CD1c+, localizadas en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 respectivamente. El porcentaje se obtiene de forma automática, no obstante se reporta la fórmula a partir de la cual se obtiene:

Ejemplo para el cálculo del porcentaje de cCD CD1c+, es decir cCD que simultáneamente expresan los marcadores Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+:

$$\% \text{ cCD CD1c+} = (\% \text{ células CD11c+ / LIN1-}) * \left(\frac{\% \text{ células CD1c+}}{100\%} \right)$$

En donde:

% células CD11c+/LIN1- equivale al 23,5% localizado en el cuadrante Q1 señalado con recuadro rojo (Figura 10-D).

% células CD1c+ equivale al 2,38% localizado en el cuadrante Q3 señalado con recuadro rojo (Figura 10-E).

Por lo tanto, el porcentaje de cCD CD1c+ corresponde al 0,67% de las células totales, mismo que fue capturado para el subsecuente análisis estadístico. Igualmente, la captura de estos valores se realizó para la determinación de los porcentajes de cCD CD1c+/CD141+ y CD1c+.

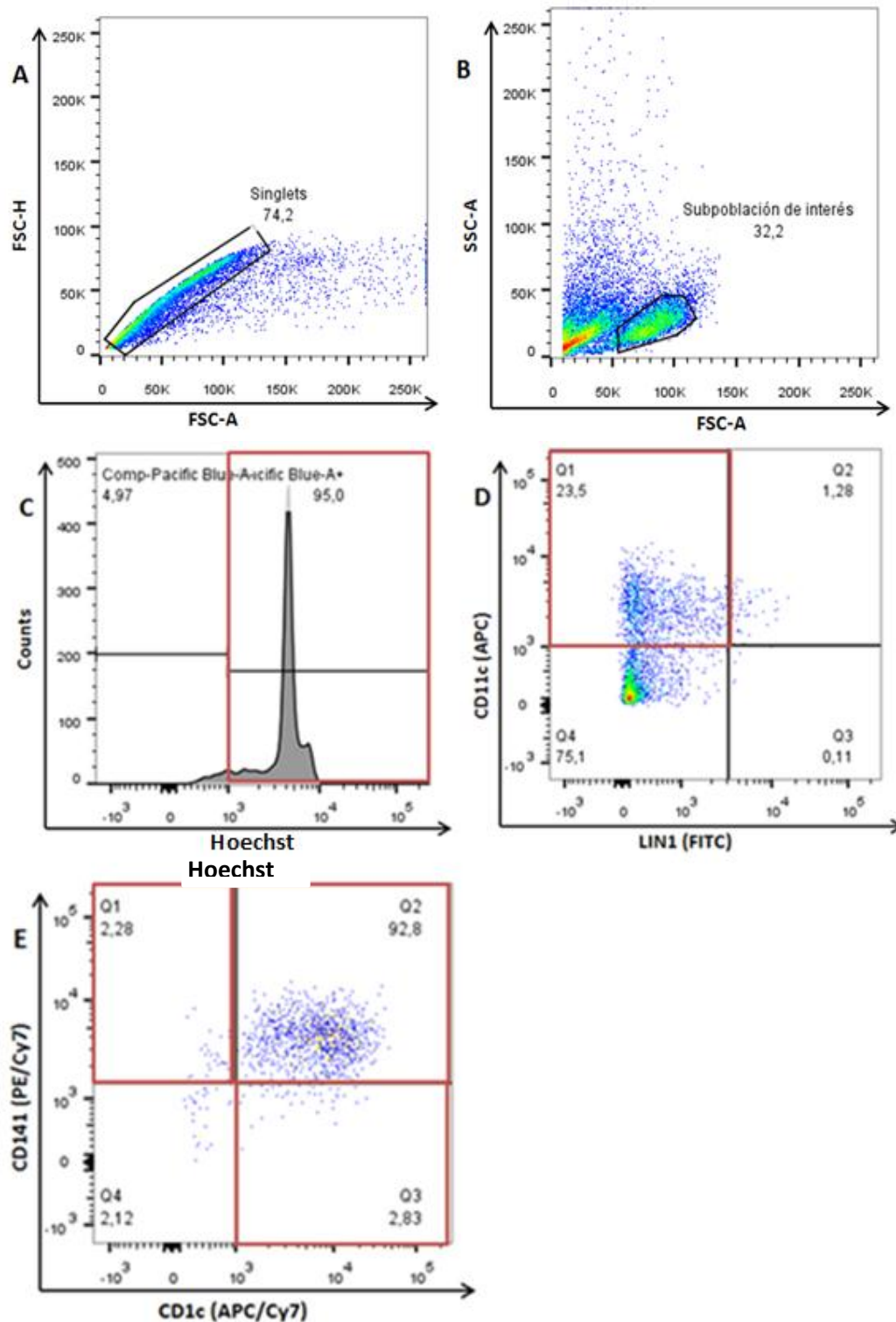


Figura 10. Análisis de citometría de flujo de la diferenciación de las cCD. En el gráfico de puntos A se seleccionan los singletes los cuales corresponden al 74,2% de las cCD delimitadas por el área de líneas negras. A partir de los singletes se genera el gráfico de puntos emparentado B, sobre el que se selecciona la subpoblación de interés que

corresponde al 32,2% de los singletes, delimitada por el área de líneas negras. A partir de la subpoblación de interés se genera el gráfico de puntos emparentado C, sobre el que se seleccionan las células vivas Hoechst+ señaladas con un recuadro rojo, y que corresponden al 95% de la subpoblación de interés. A partir de las células vivas se genera el gráfico de puntos emparentado D sobre el que se seleccionan las células CD11c+/LIN1- localizadas en el cuadrante Q1 señalado con el recuadro rojo, y que corresponden al 23,5% de las células vivas. A partir de las células CD11c+/LIN1- se genera el gráfico de puntos emparentado E sobre el cual se captura el porcentaje de cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD141+, cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+/CD141+ o cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+, localizadas en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 respectivamente. El porcentaje de estas células se captura de forma automática, y es calculado mediante una fórmula matemática en la que se introduce el porcentaje de 23,5% que aparece en el cuadrante Q1 del gráfico de puntos D, señalado con el recuadro rojo y los porcentajes de 2,28%, 92,8% y 2,83% que aparecen en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 del gráfico de puntos E, según la subpoblación de cCD de interés, señalados con recuadros rojos (ver detalle de la fórmula matemática en el texto que antecede a esta figura). Los porcentajes se capturan para los subsecuentes análisis estadísticos. cCD: células dendríticas clásicas.

5.8. Curvas de crecimiento y UFC de las micobacterias

5.8.1. *M. bovis* BCG phipps

Mediante la curva de crecimiento de *M. bovis* BCG phipps (Molina Olvera G. 2013), se sabe que a una longitud de onda (λ) de 600nm, dicha micobacteria alcanza la fase media logarítmica a una densidad óptica (D.O) entre 0,8 y 1 alrededor del día 10 de cultivo (Figura 11).

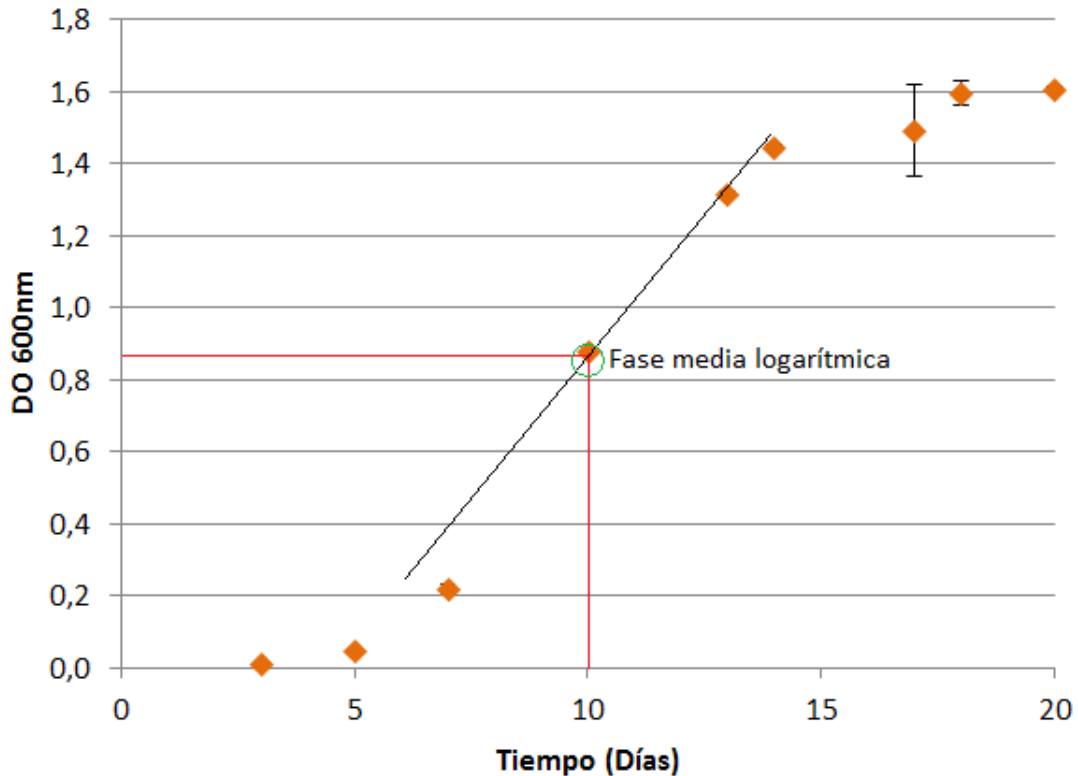


Figura 11. Curva de crecimiento de *M. bovis* BCG phipps. A una longitud de onda (λ) de 600nm, dicha micobacteria alcanza la fase media logarítmica a una densidad óptica (DO) entre 0,8 y 1, alrededor del décimo día de cultivo. Determinación por triplicado. Medias y desviaciones estándar. (Modificado de: Molina Olvera G. 2013)

En la fase media logarítmica, la velocidad de crecimiento del microorganismo es máxima y el tiempo de generación es mínimo. El número de nuevas bacterias que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población actual por lo que si el crecimiento no se limita, la duplicación continuará a un ritmo constante, por lo tanto, el número de microorganismos de la población se duplica con cada período de tiempo consecutivo. Durante esta fase, las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.

Los viales de suspensión bacteriana de *M. bovis* BCG phipps, se encontraban a una concentración de $1,42 \times 10^9$ UFC/mL en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% y 15% de glicerol, conservados a -70°C . Los viales fueron descongelados en hielo y centrifugados a 3000 revoluciones por minuto (RPM) durante 5min a 4°C , tras lo cual se re-suspendió a las bacterias en 1mL de RPMI-1640 (misma suplementación a la empleada para el cultivo de las células). Posteriormente la suspensión bacteriana fue almacenada en incubadora con agitación moderada en condiciones de cultivo a 37°C ; $5\% \text{CO}_2$ durante 24h previas a la infección de las CD.

5.8.2. *M. avium* Subsp. *hominissuis*

Se determinó la curva de crecimiento de *M. avium* y las UFC.

Curva de crecimiento

A partir del vial de una cepa de *M. avium* aislada de aguas residuales de la Ciudad de México se inoculó *M. avium* en medio sólido middlebrook 7H10 enriquecido con OADC (BD-Difco-262710). La incubación se realizó a 37°C con CO₂ al 5% y se observaron las placas cada 24h hasta la formación de colonias, lo cual se consiguió al tercer día de cultivo. Se realizó el pre-cultivo inoculando una colonia en 10mL de medio líquido middlebrook 7H9 enriquecido con ADC (BD-Difco-262710) bajo las condiciones de cultivo previamente indicadas, y se midió la D.O a una $\lambda=600\text{nm}$ con espectrofotómetro (Biomates, Thermo Spectronic, Engand) hasta adquirir una D.O entre (0,8 a 1,0) para obtener bacilos con metabolismo activo. Una vez adquiridas estas condiciones se tomó 1mL del pre-cultivo y se inoculó en 125mL del medio líquido en matraz de 250mL, bajo las condiciones de cultivo previamente descritas. A partir de este cultivo se realizaron las mediciones de D.O a una $\lambda=600\text{nm}$ cada 6 horas por triplicado para la determinación de la curva de crecimiento.

UFC

Se cosechó el cultivo de *M. avium* en la fase media logarítmica. A partir de 1mL de suspensión ($1/1 \times 10^0$) y se realizaron 8 diluciones seriadas ($1/1 \times 10^1$ hasta $1/1 \times 10^8$). Las diluciones se realizaron en 900 μl de medio líquido tomando 100 μl del mL de punto de partida. Se inocularon 100 μl de cada dilución en cada caja de petri conteniendo medio sólido 7H10 por triplicado, se incubaron bajo las condiciones de cultivo mencionadas durante 3 días (tiempo en el que se obtuvo la fase media logarítmica mediante la curva de crecimiento), para proceder al conteo de las colonias. La dilución que se selecciona para la determinación de las UFC/mL es aquella en la cual el conteo de colonias independientes se encuentra entre 25 a 250 colonias (Molina Olvera G. 2013).

El principio del conteo se basa en que bajo las condiciones de fase media logarítmica, una bacteria será responsable de generar una colonia, por lo cual una colonia equivale a una UFC. La fórmula para determinar el número de UFC/mL consiste en el producto entre el número de colonias contadas y el inverso de la dilución en la que se contaron dichas colonias y considerando que el volumen de suspensión bacteriana inoculado en las placas, por dilución fue de 100 μl .

5.9. Infección de las CD

Se infectaron alrededor de 100000 CD de cada subpoblación, con *M. bovis* BCG phipps o con *M. avium* Subsp. *hominissuis* empleando una MOI de (1:1) (CD:micobacteria) y se mantuvieron por 24 horas en condiciones de cultivo de 37°C y 5% de CO₂ (Vieyra Lobato

MR. 2014). Las CD estimuladas con *M. bovis* BCG constituyeron el control positivo pues se sabe que dicha micobacteria induce un inmuno-fenotipo maduro sobre las CD, caracterizado por la expresión de moléculas co-estimuladoras y secreción de citocinas pro-inflamatorias. Las CD estimuladas con *M. avium* son las células experimentales. Los controles negativos fueron CD sin estímulo.

La cosecha de las células y recolección de sobrenadantes se realizó centrifugando las placas de cultivo a 300xg durante 5min a 21°C, tras lo cual 1,5 mL de los sobrenadantes fueron adquiridos y centrifugados a 3500 RPM durante 5min a TA para precipitar bacterias y eliminar detritos, y fueron almacenados a -70°C. Las células fueron marcadas con anticuerpos para determinar la expresión de MHC-II y de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras: CD40, CD86 y CD273 mediante citometría de flujo. Los sobrenadantes se emplearon para la determinación de citocinas pro y anti-inflamatorias: IL-12, IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10, mediante ensayos de inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA).

5.10. Determinación de los estadios de maduración inducidos sobre las CD

5.10.1. Expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras

Para determinar el estadio de maduración o el inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD por la infección con *M. avium*, se tiñeron dichas células y sus controles (cCD sin infectar y cCD infectadas con BCG) con los anticuerpos para los marcadores compartidos LIN1, CD11c, los marcadores exclusivos CD141, CD1c y de las moléculas MHC-II y co-estimuladoras y co-inhibidoras CD86, CD40 y CD273 para mapear a las subpoblaciones de cCD y sobre las mismas determinar el nivel de expresión de las moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II.

En el análisis de los datos de citometría de flujo, la selección de los singletes, de la subpoblación de interés, de las células vivas y de las subpoblaciones de cCD se realizó siguiendo la estrategia de análisis de la diferenciación de las cCD mencionado con anterioridad (Figura 12-A, B, C, D y E). Posteriormente, sobre las subpoblaciones de cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD141+, cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+/CD141+ o cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+CD141+, localizadas en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 respectivamente señalados con recuadros rojos en el gráfico de puntos E, se capturaron los datos de IMF de los marcadores de CD86, CD40, CD273 y MHC-II, los cuales son calculados de forma automática mapeando las subpoblaciones de interés. Las IMF se capturan para su subsecuente análisis estadístico (Figura 12-E).

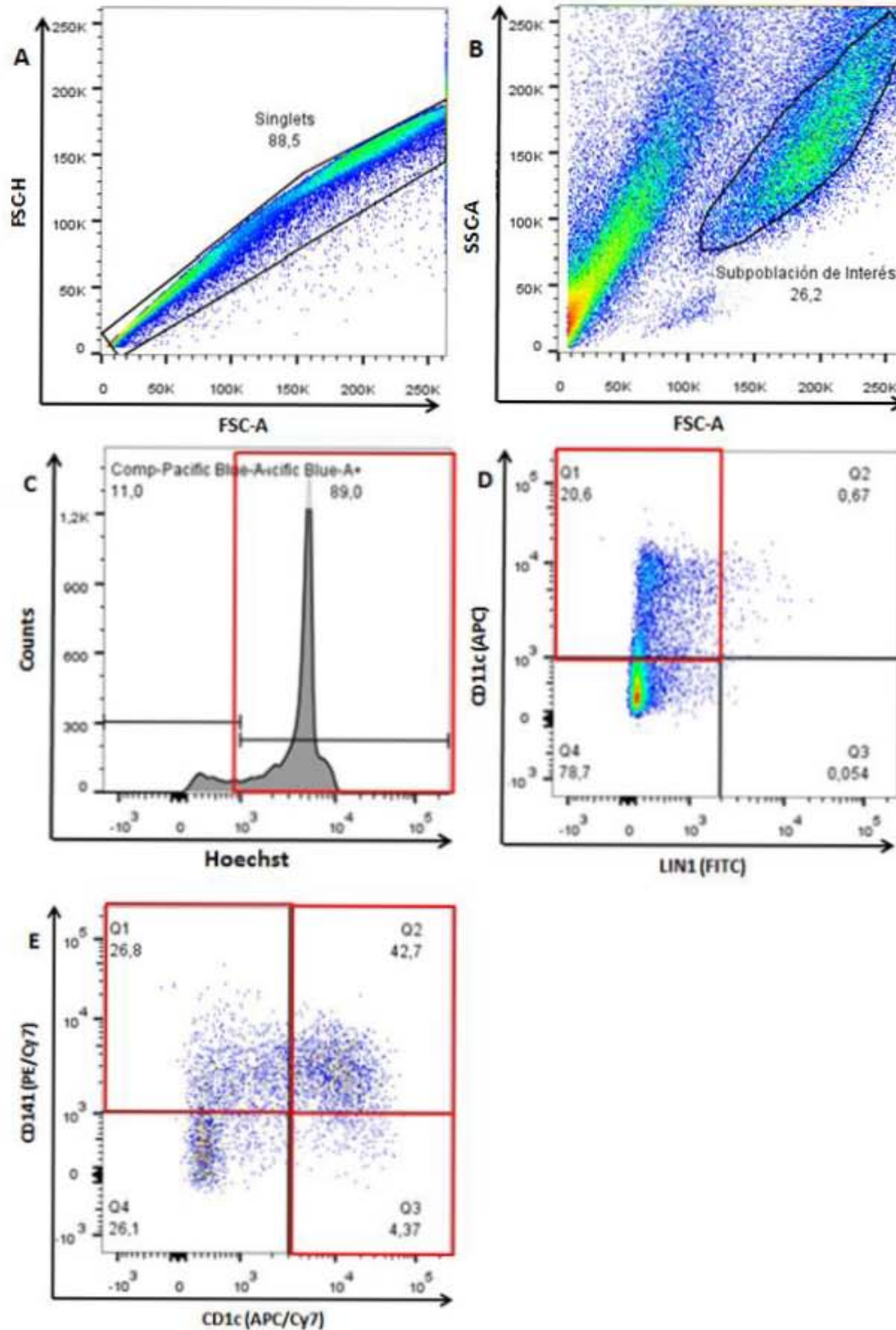


Figura 12. Análisis de citometría de flujo de la maduración de las cCD. En el gráfico de puntos A se seleccionan los singlets los cuales corresponden al 88,5% de las cCD delimitadas por el área de líneas negras. A partir de los singlets se genera el gráfico de puntos emparentado B, sobre el que se selecciona la subpoblación de interés que corresponde al 26,2% de los singlets, delimitada por el área de líneas negras. A partir de

la subpoblación de interés se genera el gráfico de puntos emparentado C, sobre el que se seleccionan las células vivas Hoechst+ señaladas con un recuadro rojo, y que corresponden al 89% de la subpoblación de interés. A partir de las células vivas se genera el gráfico de puntos emparentado D sobre el que se seleccionan las células CD11c+/LIN1- localizadas en el cuadrante Q1 señalado con el recuadro rojo, y que corresponden al 20,6% de las células vivas. A partir de las células CD11c+/LIN1- se genera el gráfico de puntos emparentado E sobre el cual se captura la IMF de las moléculas CD86, CD40, CD273 Y MHC-II mapeando las cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD141+, cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+/CD141+ o cCD Hoechst+/CD11c+/LIN1-/CD1c+, localizadas en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 respectivamente, señalados con recuadros rojos. La IMF se captura de forma automática para los subsecuentes análisis estadísticos. cCD: células dendríticas clásicas. IMF: intensidad media de fluorescencia.

5.10.2. Secreción de citocinas

En el ELISA tipo “sándwich” se emplea un anticuerpo murino monoclonal para recubrir una placa de 96 pozos. Este anticuerpo quedará inmovilizado en la superficie de los pozos y se denomina anticuerpo de captura. Los estándares y las muestras se introducen en los pozos y los antígenos de interés (citocinas) se unen al anticuerpo de captura. Posteriormente un anticuerpo murino monoclonal biotinilado denominado anticuerpo de detección, se adiciona a los pozos. La unión del antígeno con el anticuerpo de detección produce un “sándwich” anticuerpo de captura-antígeno-anticuerpo de detección. La adición de una peroxidasa y la solución sustrato produce una coloración azul proporcional a la concentración de antígeno contenida en cada pozo. Finalmente, la solución de paro vira el color azul de la reacción a amarillo. Posteriormente la absorbancia de cada pozo puede ser determinada en un lector de placas a una λ de 450nm.

Se determinó la concentración de las citocinas: IL-6, TNF- α , IL-12 (p70), IL-10 e IL-1 β en los sobrenadantes de los cultivos de cCD infectadas durante 24h con *M. avium* y sus controles (cCD sin infectar y cCD infectadas con BCG), por la técnica de ELISA siguiendo las indicaciones establecidas por los fabricantes (Biolegend- ELISA MAX Deluxe Sets: 430504, 430204, 431704, 430604 y 437004 respectivamente). La técnica se realizó 4 días después de la recolección de los sobrenadantes, los cuales se encontraban almacenados a -70°C. La absorbancia de las placas fue leída a una λ de 450nm en el lector para ELISAS (Dinex Opsys MR). Los datos de absorbancia fueron capturados para su subsecuente análisis estadístico.

5.1. Tinción de las células para análisis por citometría de flujo

La tinción de las células se realizó a TA con la mínima luminosidad posible, ya que los anticuerpos son fotosensibles. La concentración óptima de los anticuerpos fue determinada por titulación mediante el cálculo de la razón de intensidad media de fluorescencia (IMF), el cual es el cociente entre el número de células que expresan la

molécula detectada por el anticuerpo (positivas), y el número de células que no la expresan (negativas). En la titulación la razón se calcula a diferentes concentraciones del anticuerpo y se selecciona la concentración de anticuerpo a la cual se obtiene el mayor cociente. Las células se lavaron con PBS-1X, suplementado con 2% de SBF. Los receptores inespecíficos de los anticuerpos de interés (inmunoglobulinas IgG1, κ e IgG2a, κ en su totalidad), se bloquearon con una solución de IgG humana (Octagam-Octapharma). La viabilidad celular se determinó por citometría de flujo con el colorante Hoechst 33342 (H21492- Invitrogen). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Sciences-15710). La interacción entre los anticuerpos y las células se mantuvo a 4°C en oscuridad durante 30 minutos ya que algunos tipos celulares, como las células mieloides, están metabólicamente activas a temperatura ambiente, y podrían internalizar los anticuerpos unidos a la superficie. La fluorescencia de las células fijadas fue leída en citómetro (BD- Facs Canto II) y los datos proporcionados fueron analizados con el software para análisis de citometría de flujo (FlowJo V10).

5.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el software Graph-Pad Prism 5. Las pruebas estadísticas empleadas fueron: T- student Welch, T-pareada, Kruskal Wallis y Mann Whitney para el análisis de los datos de diferenciación de las CD (dos grupos no pareados), pureza de las CPH (dos grupos pareados), maduración de las CD (tres grupos pareados) y de cuantificación de citocinas secretadas por las CD (tres grupos pareados) respectivamente. El análisis de varianza (ANOVA) fue empleado para comparar más de dos grupos de estudio. Se emplearon gráficas de barras y bigotes que esquematizan las medias y las desviaciones estándar (SD) respectivamente. Finalmente la significancia estadística se determinó con un nivel de significación de 0,05. Los resultados estadísticamente significativos se señalan con asteriscos e indican la ocurrencia de un valor de probabilidad p inferior a 0,05 ($p < 0,05$), lo cual señala que la probabilidad de que el resultado haya sido producto del azar es inferior a 0,05.

6. RESULTADOS

6.1. Obtención de SCU, CMSCU y CPH

Los resultados de este proyecto fueron obtenidos mediante el procesamiento independiente de ocho unidades de SCU. Del volumen total de SCU se obtuvieron CMSCU mediante la técnica de separación por gradientes de densidad. A partir de las CMSCU se obtuvieron CPH con el uso de MACS. Ambos linajes celulares presentaron viabilidad superior al 95% determinada por exclusión con azul de tripano. El número de células varió dependiendo del volumen de SCU. Se presenta la media y SD del volumen de SCU, número de CMSCU y CPH obtenido, así como el porcentaje que representan las CPH al interior de las CMSCU (Tabla 3).

Tabla 3. Volumen de las muestras de sangre de cordón umbilical (SCU), número de células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CMSCU) y células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Medias y desviaciones estándar (SD)

Muestra de SCU	Media \pm SD
Volumen de SCU (mL)	51 \pm 32,5
CMSCU ($\times 10^7$)	9,3 \pm 5
CPH ($\times 10^6$)	1 \pm 0,9
%CPH dentro de CMSCU	1 \pm 0,5

6.2. Pureza de las CPH

La pureza de las CPH determinada por citometría de flujo, fue superior al 95%. El porcentaje de células que expresan los marcadores característicos de CPH CD34+/LIN1- previo a MACS, es inferior al 2%, mientras que posterior al uso de MACS alcanza el 99%, con una diferencia estadísticamente significativa (Figura 13).

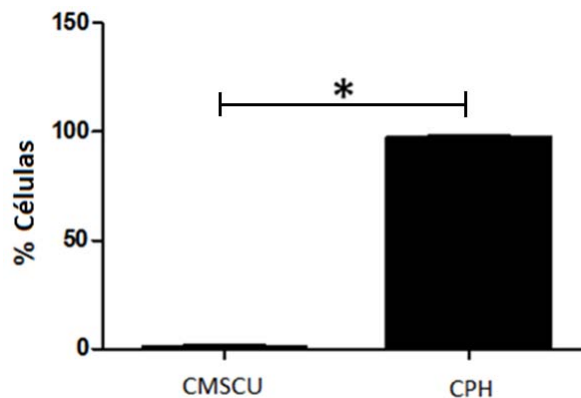


Figura 13. Pureza de las CPH. La figura muestra el porcentaje de células que expresan los marcadores Hoechst+/CD34+/LIN1-, determinado por citometría de flujo, previo y posterior a la separación inmuno-magnética (MACS). Cerca del 100% de las CPH expresan

los marcadores Hoechst+/CD34+/LIN1-, mientras menos del 3% de las CMSCU expresan estos marcadores. La diferencia en la expresión de los marcadores entre las CMSCU y las CPH es estadísticamente significativa y remarca una pureza de las CPH superior al 95%.

CMSCU: células mononucleares de sangre de cordón umbilical (previo a MACS), CPH: células progenitoras hematopoyéticas (posterior a MACS). Prueba estadística T-pareada. Diferencia con significancia estadística * $p < 0,05$.

6.3. Diferenciación hacia subpoblaciones de CD

Las CPH se diferenciaron mayoritariamente hacia la subpoblación de cCD: BDCA1 (CD1c+). Las células experimentales (cCD) son CPH que se indujeron hacia cCD mediante cultivo con coctel de diferenciación. Los controles son CPH con las mismas condiciones de cultivo sin coctel de diferenciación. Cerca de un 4% de las células experimentales que expresan los marcadores compartidos CD11c+/LIN1-, expresan el marcador exclusivo CD1c, mientras que sus controles corresponden a un porcentaje inferior al 2%, presentando diferencias sin significancia estadística. Por otra parte, un porcentaje inferior al 2% de estas células expresa el marcador exclusivo CD141, sin embargo no hay diferencias respecto al discreto porcentaje a la baja (también inferior al 2%) de las células control que expresan éste marcador. Por otra parte, cerca de un 18% de las células expresan los marcadores CD1c/CD141 de forma simultánea, siendo este porcentaje estadísticamente significativo respecto al porcentaje de células control que expresan los mismos marcadores, y respecto al porcentaje de células CD1c+ y CD141+ (Figura 14).

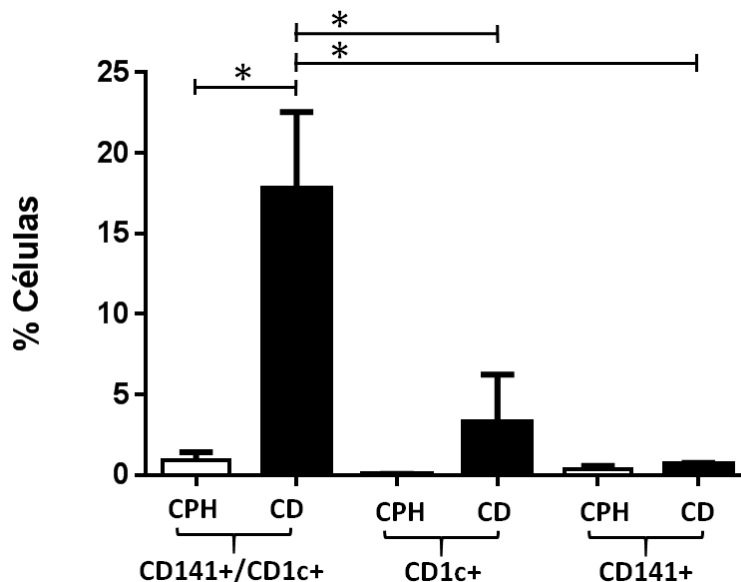


Figura 14. Diferenciación de las CPH a cCD CD1c+, CD1c+/CD141+ o CD1141+. La figura muestra el porcentaje de CD y CPH que expresan los marcadores exclusivos CD1c+, CD141+ o ambos, simultáneo a los marcadores compartidos Hoechst+/CD11c+/LIN1-

determinado por citometría de flujo después de ser cultivadas durante 14 días con y sin coctel de diferenciación respectivamente. Cerca del 18% de las células son CD1c+/CD141+ y expresan de forma estadísticamente significativa dichos marcadores respecto a su control de diferenciación y respecto a las células CD1c+ y CD141+. Entre el 3 y 4% de las células expresan CD1c, alrededor del 1% expresan CD141. Ninguna de estos dos grupos de células expresa de forma estadísticamente significativa dichos marcadores respecto a su control de diferenciación, ni entre ellos. CPH: células progenitoras hematopoyéticas, CD: células dendríticas, CD: clúster de diferenciación. Prueba estadística Welch's-no pareada. Significancia estadística *p<0,05.

6.4. Curva de crecimiento y UFC de *M. avium*

Curva de crecimiento

Mediante la curva de crecimiento, se determinó que la fase media logarítmica de *M. avium* se alcanzó en un tiempo de aproximadamente 3 días a una D.O de 1,2 a una $\lambda=600\text{nm}$ (Figura 15).

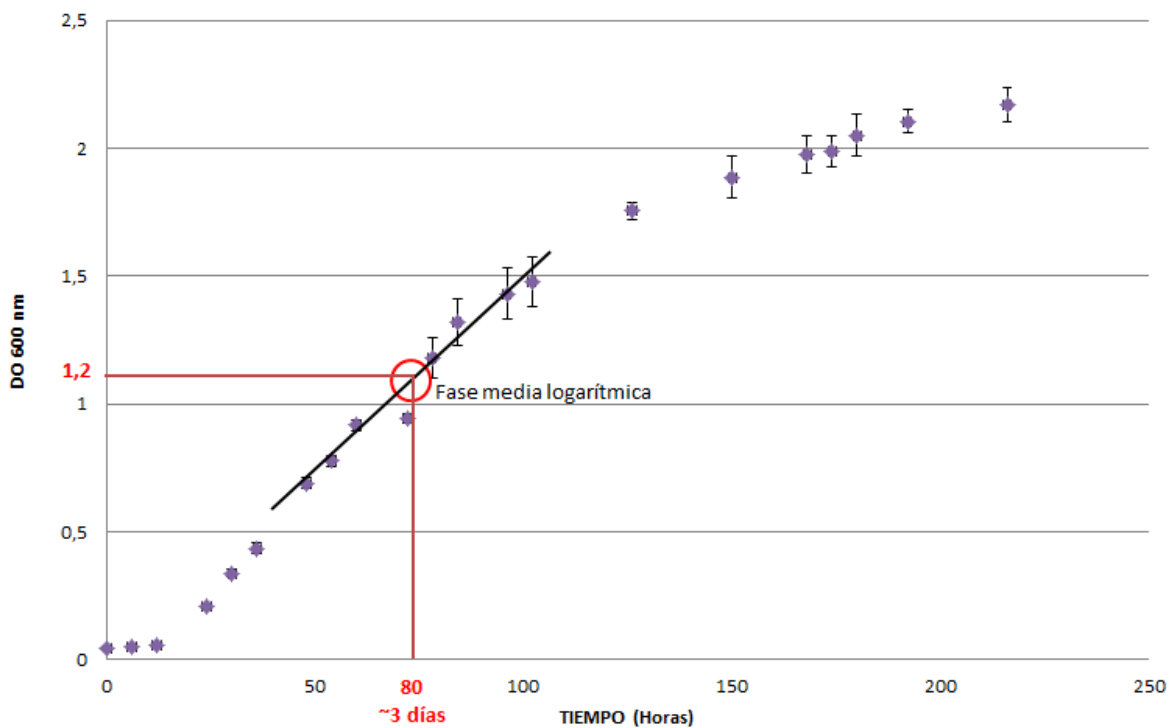


Figura 15. Curva de crecimiento de *M. avium*. A una longitud de onda (λ) de 600nm, dicha micobacteria alcanza la fase media logarítmica a una densidad óptica (DO) de 1,2, alrededor del tercer día de cultivo. Determinación por triplicado. Medias y desviaciones estándar.

UFC

Posterior al conteo de las colonias de cada placa, la dilución seleccionada para la determinación de las UFC/mL fue la de $1/1 \times 10^5$ y se contaron 199 colonias en promedio. Considerando lo anterior, se aplicó la fórmula para la determinación de las UFC/mL: $\text{UFC}/100\mu\text{L} = 199 * (1 \times 10^5) = 19900000$ bacterias/100 μL . Es decir: En 1mL de *M. avium* a una D.O de 1,2 a una $\lambda = 600\text{nm}$ se tienen 199×10^6 bacterias.

6.5. Estadios de maduración inducidos sobre las CD

6.5.1. Expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras

CD BDCA1 (CD1c+)

En general, el estímulo de las cCD CD1c+ con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II en niveles similares y discretamente superiores al inducido por el estímulo con BCG. La molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. Por otra parte, la expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. Las diferencias que se presentan no poseen significancia estadística. Por otra parte, la expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos.

La expresión de CD86 en las células sin estímulo presenta una IMF de alrededor de 250 e inferior a la de las células estimuladas con *M. avium* y BCG, respectivamente, entre las cuáles la IMF para *M. avium* es superior. Sin embargo, las diferencias son ligeramente apreciables. La expresión de CD40 en las células sin estímulo reporta una IMF entre 400 y 500, la cual es superior a la IMF de alrededor de 300 de las células estimuladas con BCG y discretamente inferior a la IMF de las estimuladas con *M. avium*. La IMF de la expresión de CD73 en las células sin estímulo es inferior a 250 y superior a las IMF para las células con estímulo, siendo superior la IMF de las células estimuladas con *M. avium*. La IMF de la expresión de MCH-II en las células sin estímulo es de aproximadamente 600 e inferior a las IMF de aproximadamente 800 y 850 correspondientes a los estímulos con BCG y *M. avium*. Ninguna de las diferencias presentó significancia estadística (Figura 16).

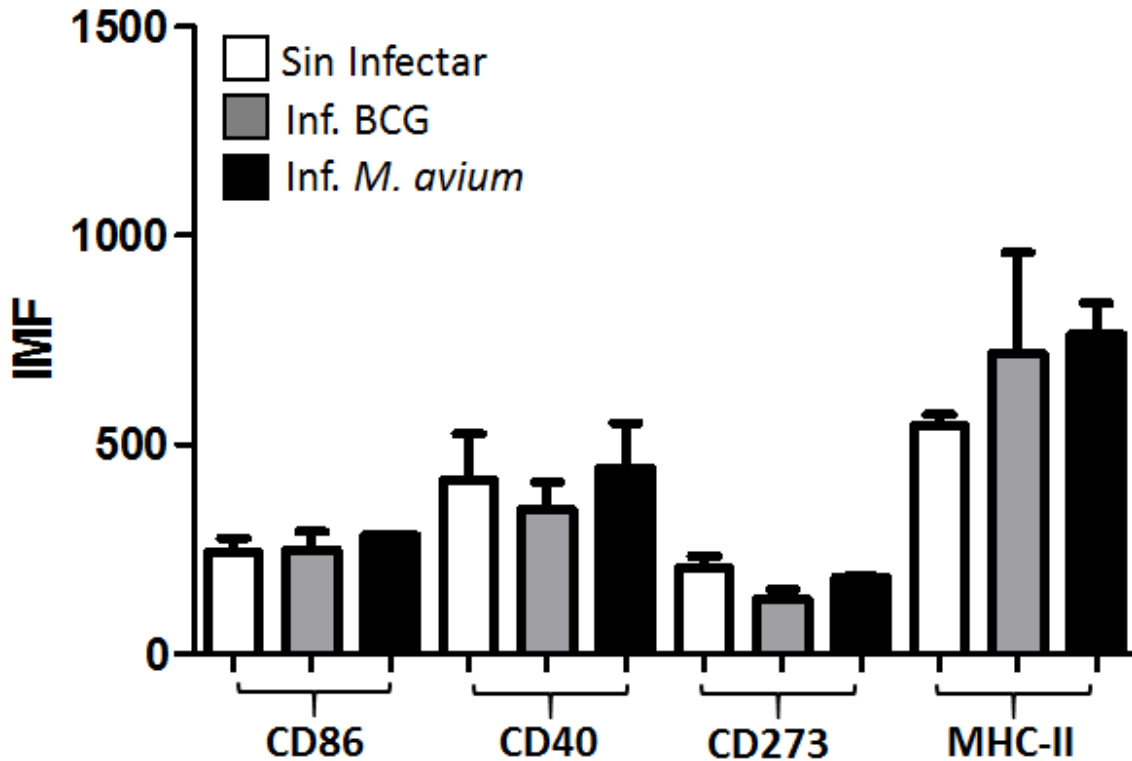


Figura 16. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD CD1c+. La figura muestra la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40, la molécula co-inhibidora CD273 y MHC-II por las cCD CD1c+, determinada por citometría de flujo 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. El estímulo con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II en niveles similares y discretamente superiores al inducido por BCG. La molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. La expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. La expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos. Las diferencias que se presentan no poseen significancia estadística. IMF: intensidad media de fluorescencia, cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, CD: clúster de diferenciación, MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad clase II. Pruebas estadísticas: Kruskall Wallis. ANOVA. Diferencias sin significancia estadística.

cCD BDCA3 (CD141+)

En general, el estímulo de las cCD CD141+ con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II a niveles similares y discretamente superiores a los inducidos con el estímulo con BCG. La molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con la expresión de CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. Por otra parte, la expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. La única diferencia estadísticamente significativa

corresponde a la expresión de CD86 en las cCD CD141+ sin infectar e infectadas con BCG. Por otra parte, la expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos.

Este comportamiento global es similar al presentado por las cCD (CD1c+) pero implicando niveles de IMF tres veces inferiores, como se evidencia en los ejes de las ordenadas con valores máximos de IMF de 1500 y 500 para las cCD CD1c+ y cCD CD141+ respectivamente. La expresión de CD86 en las células sin estímulo tiene una IMF cercana a 300, superior a la de las células estimuladas con BCG y *M. avium* de 210 y 250 respectivamente. La expresión de CD40 en las células sin estímulo reporta una IMF cercana a 200 la cuál es inferior a las IMF de alrededor de 270 y 300 de las células estimuladas con BCG y *M. avium* respectivamente. La IMF de la expresión de CD73 en las células sin estímulo es inferior a 100 y muy similar a las IMF de las células estimuladas. La IMF de la expresión de MHC-II en las células sin estímulo es de aproximadamente 280, igual a la IMF de las células estimuladas con BCG e inferior a la IMF de cerca de 350 de las estimuladas con *M. avium* (Figuras 16 y 17).

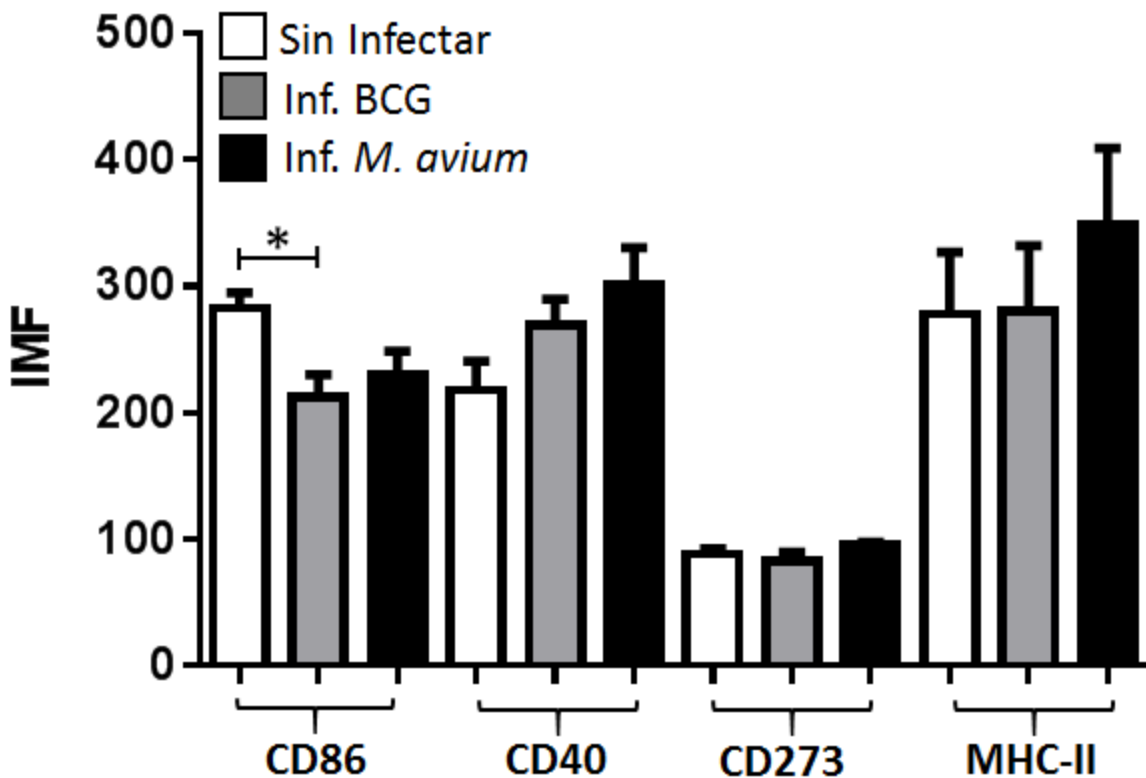


Figura 17. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD CD141+. La figura muestra la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40, la molécula co-inhibidora CD273 y MHC-II por las cCD CD1c+, determinada por citometría de flujo 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. El estímulo con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II en niveles similares y discretamente superiores al inducido por BCG. La

molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. La expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. La única diferencia estadísticamente significativa corresponde a la expresión de CD86 en las cCD CD141+ sin infectar e infectadas con BCG. La expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos. IMF: intensidad media de fluorescencia, cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, CD: clúster de diferenciación, MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad clase II. Pruebas estadísticas: Kruskal Wallis. ANOVA. Significancia estadística * $p < 0,05$.

cCD BDCA3 (CD1c+/CD141+)

En general, el estímulo de las cCD CD1c+/CD141+ con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II a niveles similares y discretamente superiores a los inducidos con el estímulo con BCG. La molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con la expresión de CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. Por otra parte, la expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. Las diferencias estadísticamente significativas corresponden a la expresión de CD40 en las cCD CD1c+/CD141+ infectadas con *M. avium* respecto a las infectadas con BCG y las no infectadas. Por otra parte, la expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos.

Este comportamiento global es similar al presentado por las cCD CD1c+ y CD141+ pero implicando niveles superiores de IMF de cerca de 1,3 y 4 veces respectivamente. Lo anterior, se evidencia en los ejes de las ordenadas con valores máximos de IMF de 1500, 500 y 2000 para las cCD CD1c+, CD141+ y CD1c+/CD141+ respectivamente. La expresión de CD86 en las células sin estímulo tiene una IMF cercana a 350, superior a la de las células estimuladas con BCG y *M. avium* de cerca de 550 y 600 respectivamente. La expresión de CD40 en las células sin estímulo reporta una IMF cercana a 500 la cuál es inferior a las IMF de alrededor de 550 y 900 de las células estimuladas con BCG y *M. avium* respectivamente. La IMF de la expresión de CD73 en las células sin estímulo es cercana a 200 y muy similar a las IMF de las células estimuladas. La IMF de la expresión de MHC-II en las células sin estímulo es de aproximadamente 800, superior a la IMF de las células estimuladas con BCG de 700 e inferior a la IMF de cerca de 1250 de las estimuladas con *M. avium* (Figuras 16, 17 y 18).

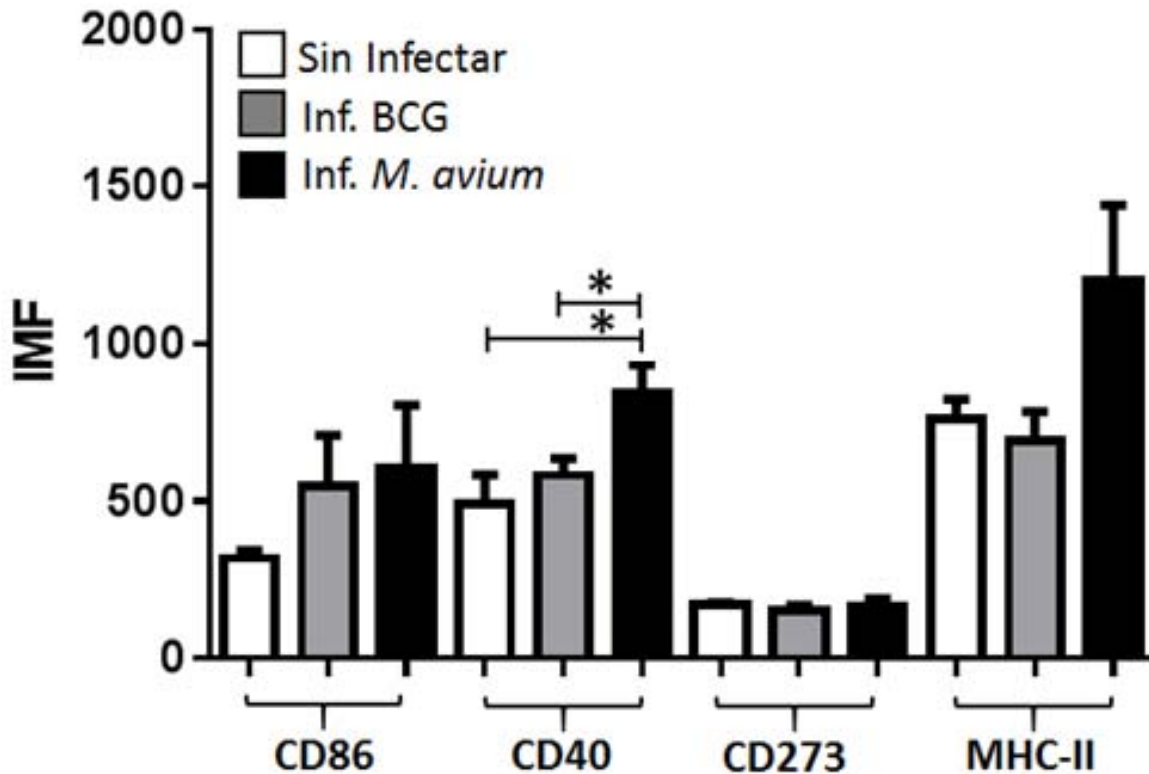


Figura 18. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD CD1c+/CD141+. La figura muestra la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40, la molécula co-inhibidora CD273 y MHC-II por las cCD CD1c+/CD141+, determinada por citometría de flujo 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. El estímulo con *M. avium* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II en niveles similares y discretamente superiores al inducido por BCG. La molécula co-estimuladora CD40 se expresa mayoritariamente al compararse con CD86, mientras que la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 es inferior a las anteriores. La expresión de la molécula MHC-II alcanza los niveles más altos con respecto a las demás moléculas de superficie determinadas. Las diferencias estadísticamente significativas corresponden a la expresión de CD40 en las cCD CD1c+/CD141+ infectadas con *M. avium* respecto a las infectadas con BCG y las no infectadas. La expresión de las moléculas mencionadas por parte de las células sin estímulo varía en cada uno de los casos. IMF: intensidad media de fluorescencia, cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, CD: clúster de diferenciación, MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad clase II. Pruebas estadísticas: Kruskal Wallis. ANOVA. Significancia estadística *p<0,05.

6.5.2. Cuantificación de citocinas secretadas por las CD

La concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de células sin estímulo y de células estimuladas con BCG es cerca de 20pg/mL, mientras que para las células estimuladas con *M. avium* se observó una concentración cercana a 6pg/mL. No se presentaron diferencias

estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-1 β secretadas por los diferentes grupos de estudio (Figura 19).

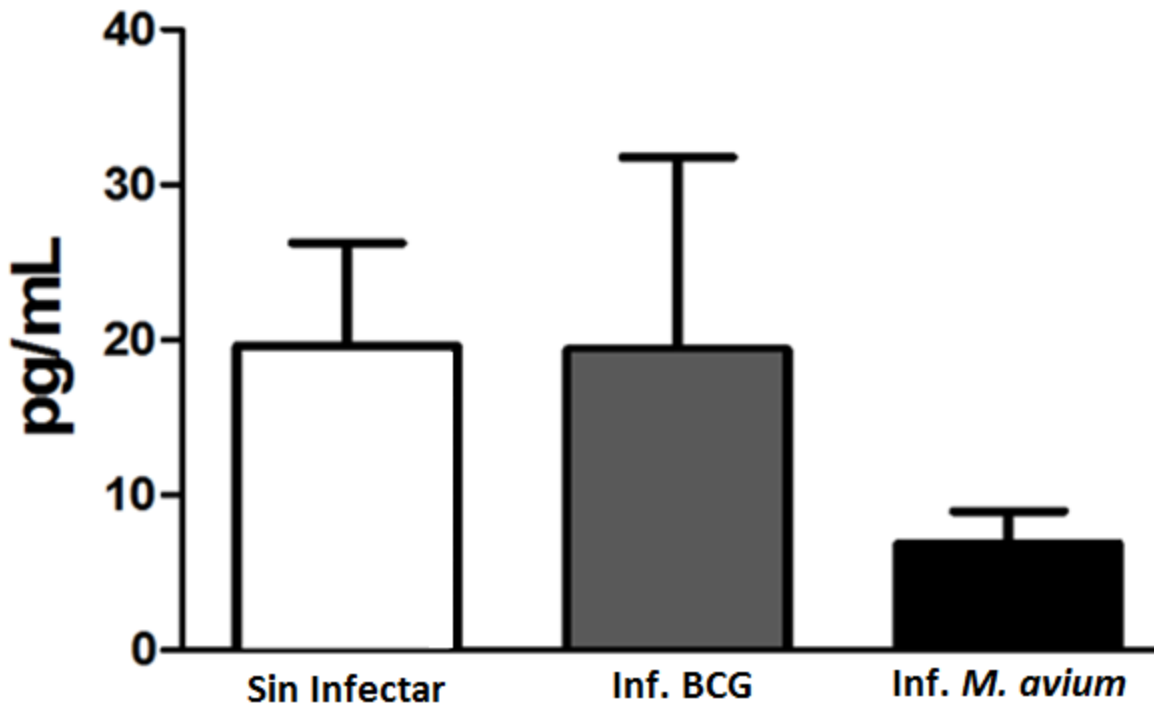


Figura 19. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD. La figura muestra las concentraciones de IL-1 β secretadas por las cCD determinadas por ELISA 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phippis (Inf. BCG) y no infectadas. La concentración de IL-1 β secretada por las células sin estímulo y las células estimuladas con BCG es cerca de 20pg/mL, mientras que para las células estimuladas con *M. avium* se observó una concentración cercana a 6pg/mL. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-1 β secretadas por los diferentes grupos de estudio. cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, ELISA: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas. Prueba estadística: Mann Whitney. Diferencias sin significancia estadística.

Las concentraciones de IL-6 son de aproximadamente 50pg/mL, 150pg/mL y 70pg/mL en los sobrenadantes de células sin estímulo, células estimuladas con BCG y *M. avium* respectivamente. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-6 secretadas por las células infectadas con BCG respecto a las secretadas por células infectadas con *M. avium* y no infectadas, así como entre las concentraciones de IL-6 secretadas por las células infectadas con *M. avium* respecto a las secretadas por las células no infectadas (Figura 20).

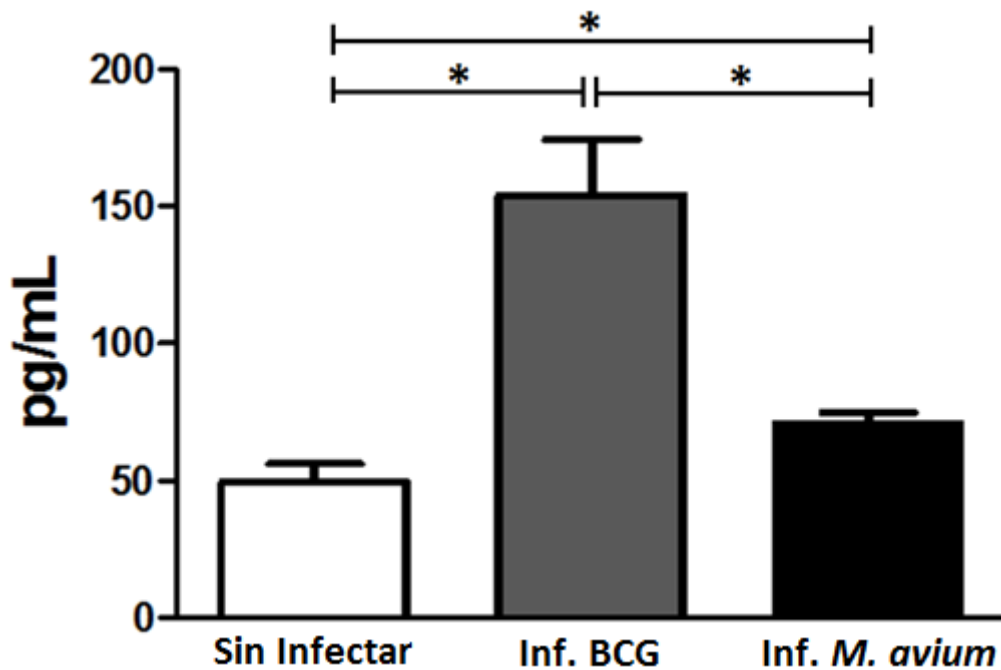


Figura 20. Inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD. La figura muestra las concentraciones de IL-6 secretadas por las cCD determinadas por ELISA 24h post-infección con *M. avium* Subsp. *hominissuis* (Inf. *M. avium*), *M. bovis* BCG phipps (Inf. BCG) y no infectadas. Las concentraciones de IL-6 son de aproximadamente 50, 150 y 70pg/mL en los sobrenadantes de células sin estímulo, estimuladas con BCG y *M. avium* respectivamente. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-6 secretadas por las células infectadas con BCG respecto a las secretadas por células infectadas con *M. avium* y no infectadas, así como entre las concentraciones de IL-6 secretadas por las células infectadas con *M. avium* respecto a las secretadas por las células no infectadas. cCD: células dendríticas clásicas o convencionales, ELISA: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas. Prueba estadística: Mann Whitney. Significancia estadística * $p < 0,05$

7. DISCUSIÓN

Poco se ha estudiado sobre el papel que desempeñan las CD primarias en la infección con MTB en humanos, ya que la mayoría de los estudios realizados en este contexto, han sido llevados a cabo en CD inflamatorias, es decir en MoCD. Se ha comprobado que las cCD poseen perfiles de expresión génica únicos y diferentes a los que presentan los monocitos y las MoCD, reivindicando el enfoque del presente estudio en cCD primarias (*Dzionek, et al. 2000; MacDonald, et al. 2002*).

En este trabajo se indujo la diferenciación de cCD primarias a partir de un 95% de CPH de SCU (Figura 13). Las CPH fueron obtenidas empleando MACS, partiendo de CMSCU que a su vez fueron obtenidas de SCU mediante separación por gradientes de densidad. Los rendimientos en porcentaje, número de células y volumen son similares a los reportados en la literatura, indicando que se realizó la idónea estandarización de los métodos relacionados con la obtención de los diferentes tipos celulares (*Pranke P, et al. 2005*) (Tabla 3).

La diferenciación de las CPH hacia cCD se dió preferencialmente hacia la subpoblación de cCD BDCA1 CD1c+/CD141+ (señalada por recuadros rojos en la Figura 5). Cerca del 18% de las células vivas expresa los marcadores Hoechst+/CD11c+/LIN-/CD1c+/CD141+ (Figura 14), presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al porcentaje de células control que expresaron los mismos marcadores, y respecto al porcentaje de células CD1c+ y CD141+ (señaladas con recuadros verdes y violetas respectivamente en la Figura 5). El porcentaje de células CD1c+ cercano al 4% es superior al de cerca de 1% de CD141+, sin embargo, no presenta significancia estadística respecto al porcentaje de células control que expresan los mismo marcadores, ni respecto al porcentaje de células CD1c+/CD141+. Lo anterior, remarca que la inducción de las CPH hacia cCD favorece la diferenciación de la subpoblación cCD CD1c+/CD141+ sobre las cCD CD1c+ y CD141+. No obstante, se encuentra ampliamente reportado que la caracterización de las subpoblaciones de cCD se da en términos de la expresión no superponible de los marcadores exclusivos CD1c y CD141, lo cual indicaría que la condición de expresión simultánea de los mismos, corresponde a una subpoblación en vía de diferenciación, es decir, se encuentra en uno de los estadios de un proceso de diferenciación caracterizado por un primer escenario de expresión exclusiva de CD1c, que antecede a un segundo estadio en el que se da la expresión simultánea de CD1c/CD141, para posteriormente pasar a una tercera etapa de expresión exclusiva de CD141. Es así como la expresión simultánea de CD1c/CD141 obedecería a una condición transitoria de diferenciación hacia el desarrollo de la subpoblación CD141+, por lo cual a esta subpoblación transitoria se le denomina BDCA1 y no BDCA3 (señalada con recuadro rojo en la Figura 5). Es decir, tienen más similitud con la subpoblación de cCD CD1c+ que con las CD141+. Lo anterior se soporta con reportes que señalan que además de estar caracterizadas por marcadores no superponibles, las dos subpoblaciones de cCD parecen tener un origen común y representan diferentes estadios de una subpoblación similar (*Lindstedt, et al. 2005; Merad*

M, et al. 2013; den Haan JM, et al. 2014). Por otra parte, la expresión discretamente superior del marcador exclusivo CD1c respecto al marcador CD141 está en consonancia con la frecuencia *in vivo* de estas subpoblaciones en sangre humana, en donde las CD1c+ representan la subpoblación de cCD mayoritaria, mientras las CD141+ representan una muy pequeña subpoblación. De forma interesante, un estudio en ratones humanizados a los que se administró FLT-3L después de la reconstitución de células hematopoyéticas para investigar la expansión, el fenotipo y la función de las CD, se encontró un incremento en el número de las cCD CD1c+ y CD141+, y en menor proporción incremento de las pCD en sangre, bazo y médula ósea de los ratones humanizados. Las cCD CD1c+ y CD141+ se expandieron en la misma proporción en bazo y sangre, con una clara tendencia hacia la expansión preferencial de la subpoblación cCD CD1c+ en médula ósea. De forma importante, las cCD y pCD humanas generadas después del tratamiento con FLT-3L de los ratones humanizados, fueron fenotípica y funcionalmente similares a sus contrapartes en sangre (*Shortman K, et al. 2014*), lo cual se encuentra en consonancia con los hallazgos obtenidos en el presente estudio.

Con respecto al estadio de maduración o inmuno-fenotipo inducido sobre las cCD tras la infección con *M. avium*, el efecto global sobre la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II producido por el estímulo con BCG y *M. avium* sobre las subpoblaciones de cCD CD1c+, CD1c+/CD141+ y CD141+ es similar. En las tres subpoblaciones la expresión de las moléculas tras el estímulo con *M. avium* es superior a la expresión tras el estímulo con BCG. No obstante, la subpoblación cCD CD1c+ presenta niveles de IMF tres veces superiores a los alcanzados por la subpoblación cCD CD141+, mientras las cCD CD1c+/CD141+ presentan niveles de IMF cerca de 4 y 1,3 veces más altos que los alcanzados por las CD141+ y las CD1c+ respectivamente, lo cual se evidencia en los valores de los ejes de las ordenadas, con valores máximos de IMF de 2000, 1500 y 500 para las subpoblaciones cCD CD1c+/CD141+, CD1c+ y CD141+ respectivamente, señalando una participación mayoritaria de las cCD CD1c+ en el contexto de la infección con las micobacterias, correlacionando con estudios realizados en humanos infectados con MTB, en los que se demostró que las CD1c+ no sólo internalizan mayoritariamente a la micobacteria, sino que responden con mayor eficiencia que las CD141+ ante la infección (*Lozza L, et al. 2014*) (Figuras 16, 17 y 18).

Para realizar un análisis más exhaustivo sobre el efecto en la expresión de cada una de las moléculas de superficie en las subpoblaciones de cCD estimuladas, respecto a las cCD no estimuladas, se presenta un compendio de los resultados extraídos de las Figuras 16, 17 y 18 en la Tabla 4.

Tabla 4. Compendio del efecto inducido en la expresión de las moléculas CD86, CD40, CD273 y MHC-II en la superficie de las subpoblaciones de cCD CD1c+, CD1c+/CD141+ y CD141+ estimuladas con *M. avium* o BCG respecto a las cCD no estimuladas

Moléculas de superficie	Subpoblaciones de cCD y estímulos							
	CD1c+		CD1c+/CD141+		CD141+		Efecto global	
	<i>M. avium</i>	BCG	<i>M. avium</i>	BCG	<i>M. avium</i>	BCG	<i>M. avium</i>	BCG
CD86	Inc	---	Inc	Inc	Dism	Dism*	Inc	---
CD40	Inc	Dism	Inc*	Inc**	Inc	Inc	Inc	Inc
CD273	---	Dism	---	---	Inc	---	---	---
MHC-II	Inc	Inc	Inc	Dism	Inc	---	Inc	---

**Diferencia estadísticamente significativa entre la IMF de CD40 expresada por las cCD

CD1c+/CD141+ estimuladas con *M. avium* y las cCD CD1c+/CD141+ estimuladas con BCG.

*Diferencias estadísticamente significativas entre las IMF de las moléculas expresadas por las cCD estimuladas con *M. avium* o BCG y las expresadas por las cCD no infectadas. Inc: incremento.

Dism: disminución. --- sin efecto.

Como puede verse en las últimas dos columnas de la Tabla 4, el efecto global sobre la expresión de moléculas de superficie en las cCD posterior al estímulo con las micobacterias es de incremento o de ausencia de efecto en comparación con las cCD no estimuladas, siendo el estímulo con *M. avium*, el que induce efectos superiores respecto a los producidos por BCG. Es interesante resaltar que no hay efecto en la expresión de la molécula co-inhibidora CD273 por el estímulo con ninguna de las micobacterias, se favorece el incremento en la expresión de la molécula co-estimuladora CD40 por ambos estímulos y particularmente *M. avium* induce el incremento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD68 y de MHC-II, en contraste con la ausencia de efecto en la expresión de dichas moléculas derivada del estímulo con BCG. Lo anterior, muestra como el estímulo de *M. avium* induce sobre las cCD una maduración similar o incluso más potente que la inducida por el estímulo con BCG, en lo que a la expresión de moléculas co-estimuladoras respecta. Lo cual es contrario a los hallazgos que se han encontrado previamente en modelo murino, en el que el estímulo con *M. avium* impide la maduración de las CD al impactar de forma negativa la expresión de moléculas co-estimuladoras y favorecer la expresión de las co-inhibidoras, mientras BCG induce una maduración efectiva sobre las CD, remarcando que la modulación de la respuesta inmune frente a *M. avium* en humano respecto a la expresión de moléculas de superficie, difiere sustancialmente de la modulación que se lleva a cabo en modelo murino. Estudios en humanos infectados con MTB han encontrado que en particular las cCD CD1c+ regulan de forma positiva la expresión de MHC-II y CD40 necesarias pero no suficientes para la activación de los LTCD4 (*Greal IS, et al 1995*), lo cual además de ser acorde con los resultados obtenidos en este estudio, resalta aún más el papel importante de las cCD CD1c+ ante la infección con micobacterias.

Por otra parte, se sabe que las cCD CD141+ presentan homología con las cCD CD8+ linfoides y CD103+ no linfoides murinas productoras de IL-12, IL-15 e IFN-I, citocinas involucradas en la diferenciación de LTCD8 citotóxicos, y se especializan en el procesamiento y presentación cruzada de antígenos extracelulares provenientes de sangre, tejidos o células necróticas vía MHC-I, por lo cual son esenciales en respuestas anti-virales y anti-tumorales de LTCD8, así como contribuyen a la tolerancia central y

periférica (Lozza L, et al. 2014). Por otra parte, las cCD CD1c+ presentan homología con las CD11b+ linfoides y no linfoides murinas, expresan diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRS) a los expresados por las cCD CD8+ y CD103+, y aunque también producen IL-12 y realizan presentación cruzada de antígenos a los LTCD8 citotóxicos, estas funciones se encuentran potenciadas en las cCD CD141+. Las cCD CD103+ poseen un papel principal en la presentación de antígenos vía MHC-II, son mejores activadoras de LTCD4 cooperadores, producen IL-23, inducen respuestas de tipo Th17 y estimulan respuestas de LB dependientes de LT. Son esenciales en respuestas inmunes humorales, anti-bacteriales y contribuyen la tolerancia central y periférica (Merad M, et al. 2013; den Haan JM, et al. 2014). Lo anterior soporta el papel protagónico de las cCD CD1c+ en la respuesta ante micobacterias aunado a que múltiples estudios se han enfocado en resaltar que las cCD CD141+ están especializadas en la presentación cruzada, la cual, si bien participa en la respuesta inmune contra micobacterias, no es el mecanismo fundamental contra este tipo infecciones, por lo cual el papel fundamental de las cCD CD141+ en la inducción de LTCD8 citotóxicos sugeriría que representan candidatos para alternativas vacunales contra cáncer, virus y otro tipo de patógenos, mientras las cCD CD1c+ serían el candidato de interés para alternativas terapéuticas contra infecciones micobacterianas (Jongbloed SL, et al. 2010). Por otra parte, el estudio en humanos infectados con MTB encontró que las cCD CD141+ se localizan preferencialmente en las zonas de LT y LB de nódulos linfáticos, respecto a las CD1c+, demostrando el papel fundamental de las CD141+ en la inducción de la respuesta inmune adaptativa y el de las CD1c+ en la respuesta inmune innata contra esta infección (Lozza L, et al. 2014).

Como complemento a nuestro análisis encontramos que en general las concentraciones de IL-6 secretadas por las cCD fueron cerca de cinco veces superiores a las de IL-1 β , lo cual se evidencia en los valores máximos de las ordenadas de 200 y 40 pg/mL para IL-6 e IL-1 β respectivamente. En general, las cCD estimuladas con *M. avium* secretaron concentraciones menores de estas citocinas que las secretadas por las células estimuladas con BCG, ya sea que se encuentren por debajo o por encima de la concentración basal (Figuras 19 y 20). De forma particular, el estímulo con BCG no produjo efecto sobre la secreción de IL-1 β , mientras que el estímulo con *M. avium* reduce cerca de 4 veces la secreción de ésta citocina respecto a las cCD sin estímulo, con concentraciones de 5 y 20pg/mL respectivamente. Las diferencias en las concentraciones de IL-1 β secretada por las cCD ante los diferentes estímulos y sin estímulo, no presentan significancia estadística (Figura 19). Por otra parte, el estímulo con BCG induce cerca de 3 veces más la secreción de IL-6 por las cCD respecto a las cCD sin estímulo, mientras el estímulo con *M. avium* apenas consigue hacerlo cerca de 1,4 veces. Es decir, ambos estímulos inducen la secreción de IL-6 respecto a las cCD sin estímulo, pero BCG logra una inducción cerca de 2 veces más alta que la proporcionada por *M. avium*. Las diferencias en las concentraciones de IL-6 secretada por las cCD ante los diferentes estímulos y sin estímulo, presentan significancia estadística (Figura 20). Las concentraciones de las citocinas IL-12(p70), TNF- α , e IL-10 secretadas por las cCD ante los diferentes estímulos, fueron indetectables mediante la técnica empleada. Los hallazgos en términos de la secreción de citocinas van de la mano con lo encontrado en cCD CD1c+ de humanos infectados con MTB que

produjeron IL-6 e IL-1 β (IL-6 en mayor proporción), pero no IL-12(p70) cuya secreción es dependiente de la señalización vía TLR4/7/8 y promovida por IFN- γ o CD40L, estímulos ausentes bajo nuestras condiciones de infección (Nizzoli G, et al 2013). Para reforzar lo anterior, dicho estudio demostró que los macrófagos quienes son las principales APC productoras de IL-12 (p70) en la infección con MTB, requieren IFN- γ para producir IL-12 (p70). Lo cual apunta a que la no producción de IL-12 (p70) por parte de las cCD del presente estudio se debe a la ausencia del estímulo requerido. Además de ser producida por fagocitos mononucleares, la IL-6 es producida por otros subtipos celulares como LT, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, y es potenciada por la presencia de IL-1 y TNF en el microambiente, lo cual estaría indicando que además de que la IL-1 β está potenciando la secreción de IL-6, son varios los tipos de células (además de las cCD) las responsables de su producción, explicando su concentración mayoritaria respecto a IL-1 β (Abbas AK, et al. 2008). Por otra parte, se sabe que TNF- α es predominantemente producido por macrófagos activados y en menor proporción por otros fagocitos, mientras que la IL-1 β es producida por un mayor número de tipos celulares distintos a los macrófagos, lo cual estaría explicando la ausencia de TNF- α , dado que los sobrenadantes sobre los que se determinaron las concentraciones de citocinas en el presente estudio, provinieron de cultivos de células estimuladas en las que no sólo se encontraban las cCD sino otros subtipos celulares (Abbas AK, et al. 2008). Con respecto a las concentraciones indetectables de IL-10, se sabe que el reconocimiento de manLAM por los receptores DC-SIGN inhibe la función de MoCD e induce la secreción de IL-10 (Geijtenbeek TB, et al. 2003). Sin embargo, las CD primarias no expresan receptores DC-SIGN ni receptores de manosa, lo cual explicaría la ausencia de IL-10 en cultivos en los que justamente se indujo la diferenciación de cCD primarias como es el caso del presente estudio (Osugi Y, et al 2002). Finalmente, se sabe que la expresión de CD273 es dependiente de IL-10. Lo cual daría indicios del porqué se observa una baja expresión de CD273 por las cCD bajo los diferentes estímulos (Mendoza CE, et al. 2011).

En general la secreción de citocinas, no puede ser adjudicada específicamente a las cCD o a sus subpoblaciones, no así la expresión de las moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de MHC-II que mediante el uso de los marcadores adecuados, pueden ser conferidos específicamente a las subpoblaciones de cCD por citometría de flujo. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de plantear optimizaciones metodológicas como sortear a las cCD previo a su estimulación o realizar tinción intracelular de las citocinas para adjudicar la secreción de las mismas a determinada subpoblación de cCD.

La función de la IL-6 en la inmunidad innata es estimular la síntesis de proteínas de la fase aguda por los hepatocitos y de esta forma contribuir a la respuesta de la fase aguda. Favorece la producción de neutrófilos a partir de progenitores de médula ósea, habitualmente actuando de manera concertada con factores estimuladores de las colonias. Por otra parte, el TNF- α y la IL-1 β son los principales mediadores de la respuesta inflamatoria aguda, estimulando la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activando a estas células para que erradiquen a los microorganismos. Lo anterior, pone en evidencia que los resultados del presente estudio corresponden a una

respuesta inmune innata temprana o de fase aguda de cCD primarias frente a la infección con BCG y *M. avium*, caracterizada por la secreción de citocinas como IL-6 e IL-1 β y en la cual los estímulos inducen la sobre-expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras, no así la sobre-expresión de moléculas co-inhibidoras como CD273. El incremento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras es inducido por el estímulo con *M. avium* en contraste con BCG, mientras que la secreción de las citocinas IL-6 e IL-1 β disminuye con dicho estímulo en contraste con el estímulo de BCG. Lo cual señala que si bien, el estímulo de *M. avium* sobre las cCD favorece levemente la expresión de moléculas co-estimuladoras, el efecto sobre la secreción de citocinas pro-inflamatorias es de reducción respecto al nivel basal o inferior al efecto producido por BCG, lo que sugiere que estas cCD modularían una respuesta inmune adaptativa de tipo tolerogénico ya que en el contexto de la activación de los LT, si bien podrían efectuar una correcta presentación antigénica en términos de la expresión de moléculas de co-estimulación en sus superficie, la disminución en la secreción de citocinas pro-inflamatorias generaría un microambiente desfavorable para la activación de LT, entorpeciendo la modulación hacia una respuesta inmune adaptativa de tipo protector e inclinando dicha modulación hacia una respuesta de tipo tolerogénico. La realización de ensayos en los que se estimulen LT con las cCD previamente estimuladas con las micobacterias, representa una alternativa que no debe perderse de vista en posteriores etapas del presente estudio. Determinar el tipo de respuesta que efectuarían los LT inducidos por las cCD evaluando la secreción de citocinas y la expresión de moléculas de superficie que se induzcan sobre los mismos, complementa la caracterización del inmuno-fenotipo de las cCD inducido por los diferentes estímulos y permitiría identificar las subpoblaciones de cCD que podrían representar bancos terapéuticos subsecuentes. Más aún, se ha reportado que las CD pueden ser activadas por señales endógenas recibidas de células estresadas, viralmente infectadas o muertas por necrosis, pero no por células sanas o que mueren por apoptosis.

La manipulación inherente al mantenimiento de las CD en cultivo, así como la acción mecánica ejercida involucrada en las metodologías de separación por gradientes de densidad, lisis de eritrocitos, MACS, y en general por procedimientos concernientes al cultivo celular como los cambios de medio periódicos en los que las células son sometidas a centrifugación, son fuentes de activación endógena que actuarían como adyuvantes naturales de estimulación de respuestas inmunes primarias, y podrían explicar el comportamiento variable en términos de la expresión de moléculas de superficie de las cCD sin estímulo del presente estudio, presuntamente asociado a la activación de las cCD por causas diferentes al estímulo con las micobacterias (*Gallucci S, et al. 1999*). Lo anterior, resalta la importancia de la optimización de técnicas empleadas en el presente estudio, que involucrarían sortear las CPH en vez de emplear MACS, y las subpoblaciones de cCD previo estímulo con las micobacterias, así como realizar el estímulo de los LT autólogos con las cCD estimuladas como se mencionó con anterioridad. Lo anterior, robustecería el presente estudio en términos de la adquisición de mejores rendimientos, sensibilidad de los ensayos y adquisición de resultados con mayor especificidad.

8. CONCLUSIONES

Las subpoblaciones de cCD primarias BDCA1 y BDCA3 fueron diferenciadas mediante la inducción de CPH derivadas de SCU humano, siendo la subpoblación BDCA1 la que se diferenció de forma preferencial.

El efecto en la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y MHC-II sobre las subpoblaciones de cCD humanas, derivado del estímulo con *M. avium* es similar y favorece la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC-II, y no tiene efecto sobre la expresión de la molécula co-inhibidora CD273. Este hallazgo difiere con lo descrito en modelo murino, en el que el estímulo con *M. avium* reduce la expresión de moléculas co-estimuladoras e incrementa la expresión de la molécula co-inhibidora CD273. Adicionalmente, el estímulo de las cCD humanas con *M. avium* conduce a la disminución en la secreción de citocinas pro-inflamatorias, lo cual es similar a los hallazgos descritos en modelo murino.

9. ANEXOS

9.1. Criterios para selección de las muestras de SCU

Criterios de inclusión

- Contar con el consentimiento informado
- Embarazo de término (32-42) semanas de gestación (SDG)
- Sangre venosa de cordón umbilical
- Embarazo de bajo riesgo
- Pacientes mayores de 18 años y menores de 35 años

Criterios de exclusión

- Ausencia de consentimiento informado
- Toda paciente con antecedente de patología obstétrica:
 - Amenaza de aborto
 - Placenta previa
 - Infecciones durante el embarazo
 - Distocia en el trabajo de parto
 - Parto prematuro (<32 SDG)
 - Fiebre materna (>38°C)
 - Presencia de meconio en líquido amniótico
 - Sufrimiento fetal
 - Anemia materna (<10,5g/dl)
 - Enfermedad infecciosa transmisible (VIH)

Criterios de eliminación

- Sangre coagulada

9.2. Carta de consentimiento informado

- I. La tuberculosis es un problema grave de salud pública en México y en el mundo, es una de las principales causas de mortalidad. El agente infeccioso que ocasiona esta enfermedad es *M. tuberculosis* u otras micobacterias no tuberculosas (MNT) que se encuentran en el ambiente (tierra, agua, etc...). Este estudio pretende identificar cuál de estos dos grupos de micobacterias es el responsable de su infección.
Es importante su participación como donador voluntario de células de sangre de cordón umbilical.

- II. Los beneficios serán para usted como contribuyente para un proyecto que permita identificar la diferencia entre estos dos grupos de micobacterias con el fin de establecer el esquema terapéutico indicado.
- III. Este estudio no es financiado por ninguna institución privada y no persigue intereses económicos, por lo que no se dará ningún estímulo remunerativo en dinero ni en ningún otro bien material, de esta manera la donación de su sangre es de forma totalmente voluntaria. Las instituciones públicas involucradas en el estudio son la Universidad Nacional Autónoma de México y el Hospital de Ginecología 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social. Todo el material requerido para la toma de sangre será proporcionado por las instituciones y usted no asumirá ningún costo.
- IV. La obtención de sangre se realizará con todas las medidas higiénicas que incluyen material estéril y desechable. El tiempo de toma de sus células es de sólo algunos minutos. Sin ningún riesgo para el procedimiento.
- V. En caso de que usted tuviera alguna duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios o cualquier asunto relacionado con esta investigación, por favor háganoslo saber con la completa seguridad de que se le responderá hasta que quede completamente satisfecho.
- VI. Todos los resultados de este estudio se publicarán con carácter científico. Su nombre o identidad estará bajo completa confidencialidad, respetando así su privacidad y manteniendo el anonimato.
- VII. Usted puede decidir no participar como donador voluntario en el momento que así lo decida sin que ello represente ningún tipo de represalia y/o afecte su atención y tratamiento por parte del médico y demás trabajadores de la salud.

Con fecha _____, habiendo comprendido completamente lo establecido anteriormente y una vez que me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación ACEPTO DONAR SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL VOLUNTARIAMENTE para que sea empleada en el estudio: “Caracterización inmunológica de las subpoblaciones de células dendríticas provenientes de sangre de cordón umbilical humano al estímulo con *M. avium*”

Antecedentes médicos

- | | | |
|--------------------------|------|------|
| 1. Diabetes Mellitus | (sí) | (no) |
| 2. Hipertensión arterial | (sí) | (no) |
| 3. Hepatitis viral | (sí) | (no) |
| 4. Alcoholismo | (sí) | (no) |
| 5. Tabaquismo | (sí) | (no) |
| 6. SIDA | (sí) | (no) |
| 7. Cáncer | (sí) | (no) |

Declaro que he comprendido completamente el fin de este cuestionario y que todos los datos que he proporcionado son verdad. Autorizo el uso de esta información para fines de ésta investigación

Nombre, firma e identificación

10. REFERENCIAS

- Abbas AK, et al. (2008). *Inmunología celular y molecular*. ELSEVIER. Sexta edición. ISBN: 9788480863117.
- Adler AJ, et al (1998). CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow derived antigen-presenting cells. *J Exp Med*. 187:1555-64.
- Andersen P, et al (2005). The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 3:656-62.
- Bachmann MF, et al (2006). Chemokines: more than just road signs. *Nature Rev. Immunol*. 6: 159-164.
- Banchereau J, et al (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392: 245–252.
- Bie Y, et al (2015). Isolation of dendritic cells from umbilical cord blood using magnetic activated cell sorting or adherence. *Oncol Lett*. Jul;10(1):67-70.
- Black GF, et al (2003). Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, nonmycobacterium bovis BCG-vaccinated Malawian young adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:602-11.
- Brandt L, et al (2002). Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 70:672-8.
- Brennan PJ, et al (2003). Structure, function and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(1-3):91-7. 1.
- Bretscher PA, et al (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:185-90.
- Brockner T, et al (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med*. 186:1223-32.
- Bros M, et al (2007). A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. *Blood*. 109:3820-9.
- Brosch R, et al (2000). Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 290:143-52.

- Brosch R, et al (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 19; 99(6): 3684–3689.
- Buddle BM, et al (2002). Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 20:1126-33.
- Canque B, et al (2003). In vitro generation of dendritic cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitors cells. *Methods Mol Biol*.215:311-25.
- Casadevall A, et al (2000). Host-Pathogen Interactions: Basic Concepts of Microbial Commensalism, Colonization, Infection, and Disease. *Infect Immun*. Dec;68(12):6511-8.
- Castillo-Rodal AI, et al (2011). Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* May 2012, Volume 31, Issue 5, pp 683-694.
- Chen L, et al (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. Apr;13(4):227-42.
- Chen W, et al (2004). Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood*. Apr 1;103(7):2547-53.
- Chularojmontri L, et al (2009). Isolation and characterization of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *J Med Assoc Thai*. Jun 92 Suppl 3:S88-94.
- Cirillo JD, et al (1997). Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun*. Sep; 65(9):3759-67.
- Colditz GA, et al (1995). The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature *Pediatrics* 96:29-35.
- Colditz GA, et al (1994). Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *Jama* 271:698-702.
- Collins AV, et al (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 17:201-20.
- Daley CL, et al (2010). Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int J Tuberc Lung Dis*. Jun;14(6):665-71.

Demangel C, et al (2000). Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol.* 78: 318–324.

Demangel C, et al (2005). Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infect Immun* 73:2190-6.

den Haan JM, et al (2014). The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett.* Dec;162(2 Pt B):103-12. doi: 10.1016/j.imlet.2014.10.011. Epub Oct 16.

Dye C, et al (1999). Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 282:677-86.

Dzionic A, et al. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med.* 194:1823-34.

Felschow DM, et al (2001). The adapter protein CrkL associates with CD34. *Blood.* Jun 15;97(12):3768-75.

Fine PE, et al (1995). Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* Nov 18;346 (8986):1339-45.

Finkelman FD, et al (1996). Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* 157:1406-1414.

Flaherty DK, et al (2006). Exposure to *Mycobacterium avium* can modulate established immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection generated by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *J Leukoc Biol* 80:1262-71.

Frieden TR, et al (2003). Tuberculosis. *Lancet* Sep 13;362(9387):887-99.

Fu BM, et al (2009). Tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by the activation of antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory cells. *Exp Clin Transplant.* 7:149-56.

Gaipa G, et al (2002). Characterization of CD34⁺, CD13⁺, CD3⁻ cells, a rare subset of immature human hematopoietic cells. *Haematologica.* Apr;87(4):347-56.

Gallucci S, et al (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* Nov;5(11):1249-55.

Gao GF, et al (2000). Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today*. Dec;21(12):630-6.

Garib FY, et al (2015). T-Regulatory Cells as Part of Strategy of Immune Evasion by Pathogens. *Biochemistry (Mosc)*. Aug;80(8):957-71. doi: 10.1134/S000629791508001?.

Geijtenbeek TB, et al. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*. Jan 6;197(1):7-17.

Global Tuberculosis report. 2014.

González Cantú, et al (2008). Las células dendríticas en la inmunopatología de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Mex Patol Clin*. Núm. 2, pp 72-78.

Gratama JW, et al (2001). Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *Semin Hematol*. Apr;38(2):139-47.

Grewal IS, et al. (1995). Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*. Dec 7;378(6557):617-20.

Griffith DE, et al (2007). An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*; 175:367-416.

Hartmans S, et al (2006). The Genus mycobacterium-Nonmedical. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 3th ed: Springer 2006:889-918.

Hiasa M, et al (2009). GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood*. Nov 12;114(20):4517-26. doi: 10.1182/blood-2009-04-215020. Epub 2009 Sep 17.

Horvath CN, et al (2013). Immunization strategies against pulmonary tuberculosis: considerations of T cell geography. *Adv Exp Med Biol*. 783:267-78.

Howard ST, et al (2000). The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. *Microbes Infect*. 2: 1845-1853.

Huys G, et al (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev*. Nov;29(5):911-34.

Jaing TH, et al (2014). Umbilical cord blood: a trustworthy source of multipotent stem cells for regenerative medicine. *Cell Transplant*. 23(4-5):493-6.

Jarzembowski JA, et al (2008). Nontuberculous mycobacterial infections Arch Pathol Lab Med. Aug;132(8):1333-41

Jongbloed SL, et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. J Exp Med. Jun 7;207(6):1247-60. doi: 10.1084/jem.20092140. Epub 2010 May 17.

Jouanguy E, et al (1996). Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. N Engl J Med 335:1956-61.

Katoch VM, et al (2004). Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res. Oct;120(4):290-304. 1.

Kendall BA, et al. (2013). Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. Semin Respir Crit Care Med. Feb;34(1):87-94. doi: 10.1055/s-0033-1333567. Epub 2013 Mar 4.

Kim SJ, et al. (2015). Modulation of tolerogenic dendritic cells and autoimmunity May;41:49-58. doi: 10.1016/j.semcd.2014.04.020. Epub 2014 Apr 18.

Kurts C, et al (1997). Class I-restricted crosspresentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. J Exp Med. 186:239-45

Latchman Y, et al (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol. 2:261-8.

Lei L, et al (2007). Limited phenotypic and functional maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells following Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in vitro. Vet Immunol Immunopathol. 120: 177-186.

Lennartsson J, et al (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. Physiol Rev. Oct;92(4):1619-49. doi: 10.1152/physrev.00046.2011

Levy-Frebault VV, et al. (1992). Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species. Int J Syst Bacteriol 42:315-23.

Li L, et al (2007). Hepatoma cells inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells and increase the production of regulatory T cells. Immunol Lett. 114:38-45.

Lindstedt M, et al. (2005). Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. J Immunol. Oct 15;175(8):4839-46.

Lisle GW, et al (2005). The efficacy of live tuberculosis vaccines after presensitization with *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis (Edinb)* 85:73-9.

Lozza L, et al (2014). Communication between Human Dendritic Cell Subsets in Tuberculosis: Requirements for Naive CD4(+) T Cell Stimulation. *Front Immunol.* Jul 14;5:324.

Luca S, et al (2013). History of BCG Vaccine. *Maedica (Buchar)*. Mar;8(1):53-8.

María LF, et al (1998). *Biología funcional de los animales*. Siglo veintiuno editores. ISBN 968-23-2136-0. México. Pag. 42.

Mayani H. (2012). In vitro biology of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Hematology*. Apr;17 Suppl 1:S181-4.

McGuckin C, et al (2008). Culture of embryonic like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. *Nat Protoc.* 3(6):1046-55.

Mehrishi JN, et al (2013). A novel method of CD34+ cell separation from umbilical cord blood. *Transfusion*. Nov; 53(11):2675-80.

Mendoza Coronel E, et al (2011). PD-L2 induction on dendritic cells exposed to *Mycobacterium avium* downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis*. 91: 36-46.

Merad M, et al (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 31:563-604.

Milhret A, et al (2011). Dendritic cells activate and mature after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Research Notes*. 4: 247-254.

Mirlekar B, et al (2013). *Mycobacterium tuberculosis*: approach to development of improved strategies for disease control through vaccination and immunodiagnosis. *Indian J Lepr.* Apr-Jun;85(2):65-78.

Molina Olvera G (2013). Caracterización de la respuesta inmune innata inducida por *Mycobacterium bovis* BCG en macrófagos humanos. Tesis de maestría. UNAM. México.

Nizzoli G, et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood*. Aug 8;122(6):932-42. doi: 10.1182/blood-2013-04-495424. Epub 2013 Jun 21.

Osugi Y, et al. (2002). Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood*. Oct 15;100(8):2858-66.

Pfyffer GE, et al (2002). Mycobacterium: general characteristics, isolation and staining procedures. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. 532-535.

Poulin LF, et al (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 alpha+ dendritic cells. *J Exp Med*. Jun 7;207(6):1261-71

Pranke P, et al (2005). Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. *Braz J Med Biol Res*. Dec;38(12):1775-89

Probst HC, et al (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol*. Mar;6(3):280-6.

Qureshi OS, et al (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. Apr 29;332(6029):600-3.

Ray A, et al (2015). IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action *Int Immunol*. Nov;27(10):531-6. doi: 10.1093/intimm/dxv033. Epub 2015 May 20.

Revenu T, et al (2013). Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood. *Rom J Morphol Embryol*. 54(2):291-7.

Rindi L, et al (2014). Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet Evol*. Jan;21:375-83.

Rusin PA, et al (1997). Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev Environ Contam Toxicol* 152:57-83.

Sallusto F, et al (1999). Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med*. 189:611-4.

Saviola B, et al. (2006). The Genus mycobacterium-Medical. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 3th ed: Springer 919-933.

Schraml BU, et al (2014). Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. Dec 2;32C:13-20.

Schuster P, et al (2015). A subset of human plasmacytoid dendritic cells expresses CD8 α upon exposure to herpes simplex virus type 1. *Front Microbiol*. Jun 2;6:557. doi: 10.3389/fmicb.2015.00557. eCollection 2015.

Shortman K, et al (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2:151-61. 59.

Shortman K, et al (2014). FLT3-ligand treatment of humanized mice results in the generation of large numbers of CD141+ and CD1c+ dendritic cells in vivo. *J Immunol.* Feb 15;192(4):1982-9. doi: 10.4049/jimmunol.1302391. Epub 2014 Jan 22.

Steinman RM, et al (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 21: 685-711.

Tortoli E, et al (2014). Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev.* Oct;27(4):727-52.

Vasaturo A, et al (2013). Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Front Immunol.* Dec 3;4:417.

Vieyra Lobato MR (2014). Evaluación de la respuesta inmune innata y adquirida en células de sangre periférica de humano estimuladas con diferentes micobacterias no tuberculosas aisladas de medio ambiente. Tesis de maestría. UNAM. México.

Volkman A, et al (1997). Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J Immunol.* 158:693-70.

Von Reyn CF, et al (1993). Evidence of previous infection with *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex among healthy subjects: an international study of dominant mycobacterial skin test reactions. *J Infect Dis* 168:1553-8.

Weir RE, et al (2006). The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacilli Calmette-Guerin vaccination in southern England and northern Malawi. *Clin Exp Immunol* 146:390-9.

Xiaoyang W, et al (2012). Multiparametric Immunophenotyping of Human Hematopoietic Stem Cells and Progenitor Cells by Flow Cytometry. *BD Biosciences Application Note.*

Yao W, et al (2008). Influence of co-culture ex vivo of CD34+ cells from different two units of cord blood on their homing-related adherent molecules expression. *Apr;16(2):368-72.*

Yoneyama H, et al (2005). Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med.* Aug 1;202(3):425-35.

Young SL, et al (2007). Environmental strains of *Mycobacterium avium* interfere with immune responses associated with *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infection and Immunity.* 75(6): 2833-2840.

Zal T, et al (1994). Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med.* 180:2089-99.

Zheng Y, et al (2004). CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol.* Mar 1;172(5):2778-84.