



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES ASOCIADOS A LA FAGOCITOSIS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN MACRÓFAGOS HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

ANGÉLICA MONCADA MORALES



Ciudad Universitaria, CD. MX.

AÑO 2023



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **CERVANTES PEREDO ALICIA BEATRIZ**

VOCAL: **Profesor:** **RODRÍGUEZ SOTRES ROGELIO**

SECRETARIO: **Profesor:** **HERRERA BARRIOS MARÍA TERESA**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **CAMACHO CRUZ ALEJANDRO**

2°. SUPLENTE: **Profesor:** **LÓPEZ MACIAS CONSTANTINO III ROBERTO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS

ASESOR DEL TEMA:

HERRERA BARRIOS MARÍA TERESA

FIRMA

SUSTENTANTE:

MONCADA MORALES ANGÉLICA

FIRMA

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Epidemiología de la tuberculosis	1
1.1.1 Epidemiología en México.....	3
1.2 Agente etiológico.....	4
1.3 Estructura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.4 Inmunidad innata	8
1.4.1 Fagocitos.....	9
1.4.2 Fagocitos mononucleares.....	9
1.4.3 Desarrollo de macrófagos.....	10
1.4.4 Macrófagos.....	10
1.5 Fagocitosis	14
1.5.1 Reconocimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
1.5.2 Formación de fagosomas	17
1.5.3 Maduración del fagosoma temprano	18
1.5.4 Fagosoma tardío.....	18
1.5.5 Fagolisosoma.....	18
1.6 Evasión de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.7 Evasión del sistema inmunitario.....	22
2. Justificación.....	26
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos particulares.....	26
5. Materiales y métodos.....	27
5.1 Donadores para obtener poblaciones celulares	27

5.2	Criterios de exclusión para la selección de individuos donadores	27
5.3	Obtención de la muestra biológica.....	27
5.4	Microrganismo.....	28
5.5	Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	28
5.6	Viabilidad y total de células recuperadas	29
5.7	Purificación de monocitos por selección positiva	29
5.7.1	Determinación de la pureza de monocitos por citometría de flujo	30
5.7.2	Caracterización de monocitos por su morfología.....	31
5.8	Obtención de macrófagos derivados de monocitos	31
5.9	Ensayos de infección de macrófagos derivados de monocitos con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
5.10	Separación de poblaciones de macrófagos derivados de monocitos y análisis de pureza.....	32
5.10.1	Determinación de la pureza por análisis microscópico de las poblaciones separadas	33
5.11	Extracción de RNA total.....	34
5.12	Análisis de pureza e integridad de RNA total purificado.....	35
5.13	Síntesis del <i>cDNA</i>	36
5.14	Análisis de la expresión de genes relacionados con la fagocitosis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	37
5.15	Procesamiento de datos	37
5.16	Análisis estadístico	38
6.	Resultados	39
6.1	Características de los donadores de quienes se obtuvieron las poblaciones de monocitos para el estudio	39
6.2	Pureza de la población de monocitos.....	40
6.2.1	Por citometría de flujo.....	40

6.2.2	Por tinción celular	42
6.3	Macrófagos derivados de monocitos.....	44
6.4	Infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	44
6.5	Estrategia de separación de las poblaciones de macrófagos derivados de monocitos infectados y no infectadas por el método de sorting.....	47
6.6	Pureza de la población de macrófagos derivados de monocitos.....	49
6.7	Concentración de RNA.....	52
6.8	Integridad de RNA.....	53
6.9	Análisis de la expresión génica	55
7.	Discusión.....	57
8.	Conclusiones	64
9.	Referencias	65

Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
CD	Célula dendrítica
cDNA	Ácido dexociribonucleico complementario
CR	Receptores de complemento
DAF	Diacetato de fluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FCR	Receptores para Fc
HSC	Células troncales hematopoyéticas
IL	Interleucina
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
INF- γ	Interferón gamma
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
NO	Óxido nítrico
LPS	Lipopolisacárido
MDM	Macrófagos derivados de monocitos
MCH	Complejo principal de histocompatibilidad
MN	Monocitos
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MOI	Multiplicidad de infección
MR	Receptores de manosa
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a microorganismo patógenos
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PE	Ficoritrina

Abreviaturas

PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RIN	Numero de integridad de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real
SR	Receptores scavenger
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TBP	Tuberculosis pulmonar
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Resumen

Introducción

Mycobacterium tuberculosis es el agente causante de la tuberculosis en humanos y afecta principalmente a los pulmones causando la tuberculosis pulmonar. La micobacteria ingresa al organismo a través del tracto respiratorio y al superar las barreras de defensa finalmente puede llegar a los alveolos pulmonares que son la unidad funcional de intercambio gaseoso. En este sitio *Mycobacterium tuberculosis* tiene su primer contacto con los macrófagos alveolares, que son parte de la inmunidad innata y la primera línea de defensa, los cuales, son los encargados de fagocitar a la micobacteria con la finalidad de eliminarla para no permitir la progresión de la enfermedad. Sin embargo, a través de la evolución *Mycobacterium tuberculosis* ha desarrollado diversas estrategias para evadir los mecanismos de la defensa del hospedero que le permitan sobrevivir. Se ha descrito que la presencia de la micobacteria dentro de los macrófagos altera los mecanismos intracelulares para utilizarlo como nicho, pero no se ha descrito en particular los cambios que causa durante la fagocitosis.

Es de nuestro interés investigar en los macrófagos humanos los genes asociados a la fagocitosis que son modificados por la presencia intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivo

Investigar las implicaciones que tiene la presencia intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en los macrófagos humanos sobre la expresión de genes asociados a la fagocitosis.

Materiales y métodos

A partir de una muestra de sangre periférica de 5 voluntarios sanos se purificaron las células mononucleares por gradiente de densidad, y posteriormente, a partir estas células se purificaron los monocitos por columna y selección positiva.

Se hizo la tinción de superficie de los monocitos con el anticuerpo anti-CD14 con PE para determinar la pureza por citometría de flujo. Posteriormente, los monocitos se cultivaron durante 7 días a 37°C y 5% CO₂ en medio RPMI suplementado con suero humano y se dejaron diferenciar a macrófagos. Los macrófagos fueron infectados con una cepa atenuada de *Mycobacterium tuberculosis*, H37Ra, previamente teñida con diacetato de fluoresceína y posteriormente se separaron las poblaciones de macrófagos infectados y macrófagos no infectados por citometría de flujo. Se analizó el porcentaje de fagocitosis y la pureza de estas poblaciones purificadas por citometría de flujo y tinción de Kinyoun. Se hizo la extracción de ácido ribonucleico por columna de las poblaciones separadas, se determinó su concentración e integridad y se realizó la síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario, el cual, fue utilizado para analizar la expresión de 84 genes asociados a la fagocitosis humana utilizando el arreglo.

Resultados

Los datos de laboratorio de los voluntarios muestran que sus valores están dentro de los considerados como normales y referente a la pureza de los monocitos purificados fue de más del 96% con contaminación de linfocitos (no adherentes). La fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* por los macrófagos fue en promedio del 47% y la pureza de las poblaciones de los macrófagos infectados y los no infectados fue en promedio de 89.6 y 95.1% respectivamente. La cantidad de ácido ribonucleico obtenido de cada uno de los voluntarios y condición (infección y no infección) fue con un índice de su integridad mayor a 8 cumpliendo con lo requerido para este tipo análisis.

Se identificaron solo 14 genes con cambios diferenciales en su expresión entre los macrófagos infectados y no infectados, de los cuales, 8 genes se encuentran regulados al alza que favorecen la fagocitosis (*COLEC12*, *FCGR1A*, *IL1R1*) y reconocimiento (*SIGLEC1*, *GM-CSF*) de *Mycobacterium tuberculosis*, procesamiento del fagosoma (*TNFSF11*) y traducción de señales (*AXL*, *RAPGEF3*). Además, se identificaron 6 genes regulados a la baja que afectan el reconocimiento (*C3*, *CR1*), el procesamiento fagosomal (*SFTPD*) y la traducción de señales (*PRKCE*, *FYN*, *DOCK1*).

La expresión de estos genes pueden ser el reflejo de la respuesta del macrófago ante la presencia intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*, pero al mismo tiempo la micobacteria puede tratar de contrarrestar los mecanismos bactericidas del macrófago con sus componentes estructurales o la secreción de sus factores de virulencia (*ESAT-6/CFP-10*) para poder permanecer y sobrevivir dentro del macrófago.

Conclusiones

El estudio de la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* por los macrófagos, nos permitió identificar los genes modificados por la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, y pone en evidencia el aumento en la expresión de genes relacionados a la fagocitosis, reconocimiento, maduración fagosomal y traducción de señales. Sin embargo, al mismo tiempo hay disminución en la expresión de otros genes involucrados en la traducción de señales.

Esto puede reflejar la interacción y competencia entre la respuesta del macrófago para tratar de eliminar a la micobacteria, y, por otra parte, la micobacteria trata de resistir y sobrevivir en un ambiente poco favorable dentro del macrófago.

1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), una bacteria que frecuentemente afecta a los pulmones, sin embargo, es una enfermedad curable y prevenible. La TB constituye la decimotercera causa de muerte en el mundo, y es la enfermedad infecciosa más mortífera después del COVID-19 (1).

M. tuberculosis se transmite de una persona a otra por el aire, las micobacterias se liberan al medio ambiente cuando una persona con TB pulmonar (TBP) tose, estornuda o escupe y las personas que se encuentran cerca pueden ser infectadas por ellas. Cuando una persona inhala *M. tuberculosis*, la micobacteria puede alojarse en los pulmones y comienza a multiplicarse y desde ahí, puede diseminarse a través de la sangre a otras partes del cuerpo, como los riñones, la columna vertebral y el cerebro causando las formas extrapulmonares de la enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se manifiesta como TB pulmonar (1).

1.1 Epidemiología de la tuberculosis

De acuerdo con el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) a nivel mundial se registraron 10.6 millones de nuevos casos de TB en 2021, lo que equivale a 134 casos por cada 100,000 habitantes. Entre todos los casos de TB, el 6.7 % corresponden a personas que viven con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (2).

Se estima que alrededor de una cuarta parte de la población mundial ha sido infectada con *M. tuberculosis*, pero la mayoría de las personas no desarrollarán la TB en su forma activa por lo que no podrán transmitirla y algunas otras personas eliminarán la infección (2).

Geográficamente, la mayoría de los casos de TB en 2021, se localizaron en las regiones de Asia sudoriental (45%), África (23%) y el Pacífico occidental (18%), con porcentajes más pequeños en el Mediterráneo oriental (8.1%), las Américas (2.9%) y Europa (2.2%) (2), como se puede observar en la figura 1.

Del mismo modo, se estima que la tasa de incidencia de TB (nuevos casos por cada 100,000 habitantes por año) ha aumentado en un 3.6% entre 2020 y 2021. Este retroceso en el control de la TB refleja el impacto de las interrupciones en los servicios esenciales de salud de TB durante la pandemia de COVID-19 (2).

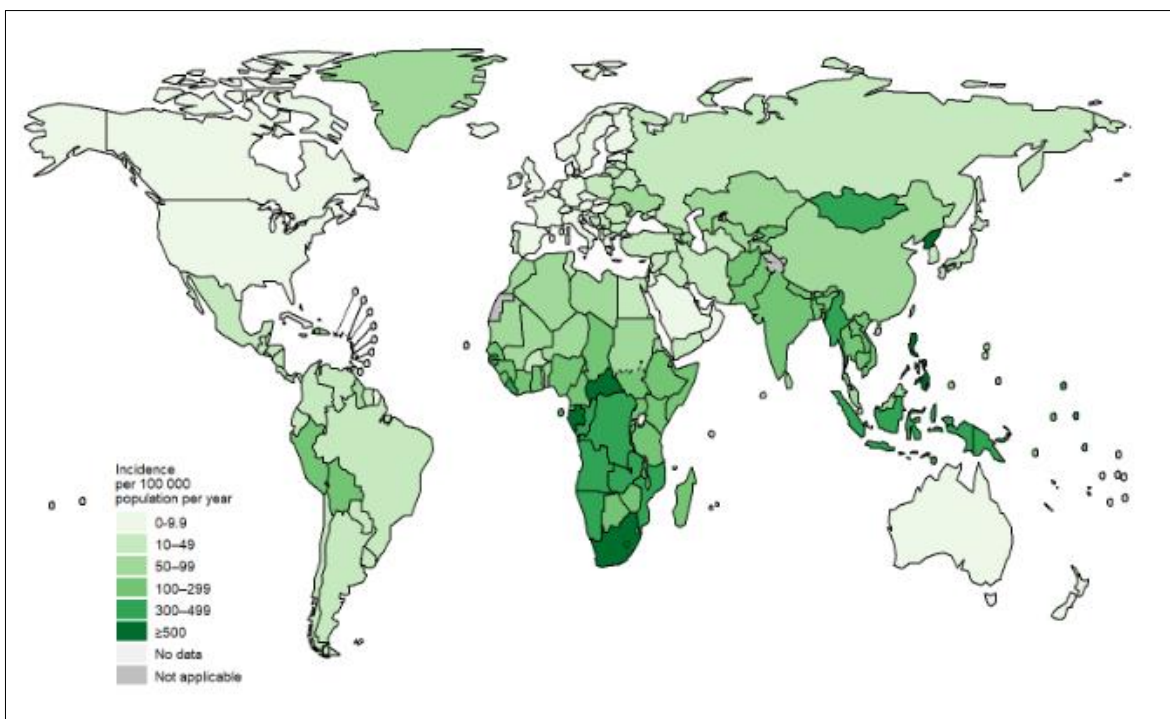


Figura 1. Incidencia de TB en el mundo, 2021

Casos nuevos de TB co-infectadas con el VIH donde fue más alta en los países de la Región de África (2).

La TB afecta a personas en ambos sexos y todos los grupos de edad, con la mayor carga en hombres adultos (57%), en comparación, con las mujeres adultas (33%) y los niños (11%).

Esta información se puede observar en la figura 2, en la que se puede corroborar que el rango de edad en el que hay mayor incidencia es entre 15-24 años en el caso de las mujeres y 25-34 años en el caso de los hombres (2).

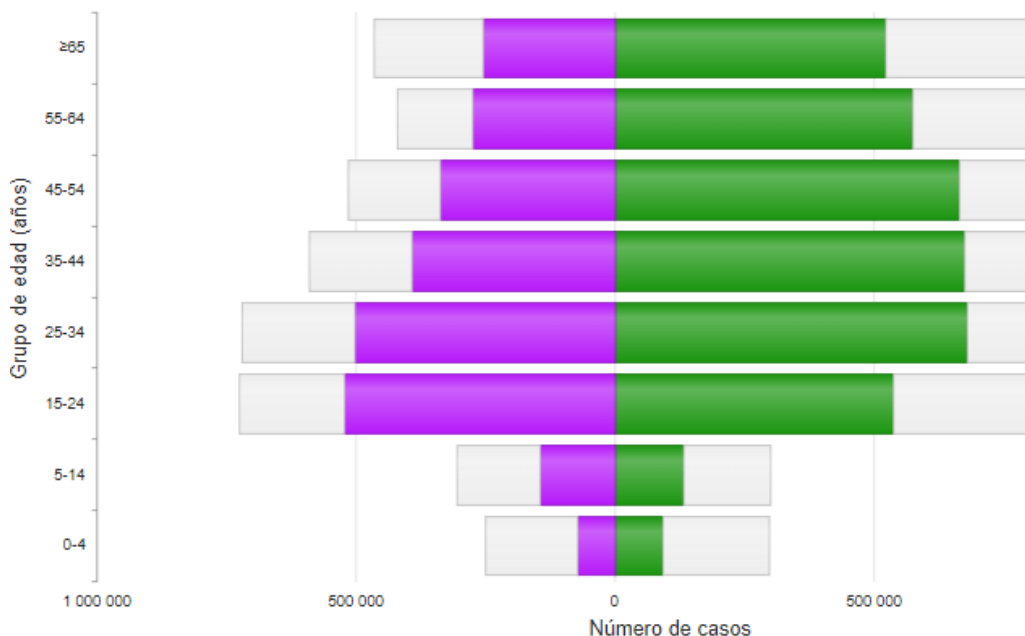


Figura 2. Estimaciones mundiales de las cifras de incidencia de TB

Cifras de incidencia de la TB y notificaciones de casos desglosadas por edad y sexo, mujer (morado) y hombre (verde) (2).

A nivel mundial, el número anual de muertes por TB disminuyó entre 2005 y 2019, pero esta tendencia se invirtió en 2020 y 2021. En 2021, se estima que hubo 1.4 millones de muertes por TB que ocurrieron entre las personas VIH negativas y 187,000 entre las personas VIH positivas, para un total de 1.6 millones (2).

1.1.1 Epidemiología en México

En México, en el 2021 la incidencia total de TB fue de 32,000 personas con una tasa de 24 casos por cada 100,000 habitantes, dentro de los cuales se encuentran 4,100 casos de TB en personas VIH positivas.

Del número total de incidencias en el país, el 35% fueron mujeres mayores de 15 años, 62% en hombres mayores de 15 años y 3% en niños de 0 a 14 años. El porcentaje de incidencia de TB aumento un 13% del 2015 al 2020. Las muertes por TB en el 2021 fueron 4,760 con una tasa de 3.8 por cada 100,000 habitantes (2).

1.2 Agente etiológico

M. tuberculosis es el causante de la TB y fue descubierto por Robert Koch en 1882. Pertenece al género *Mycobacterium*, que agrupa a más de 120 especies, la mayoría de ellas ambientales y no patógenas, a las que se conoce como micobacterias no tuberculosas (MNT). *M. tuberculosis*, está integrado en el complejo *M. tuberculosis*, con otras 5 especies que son: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. canetti* (3).

Es un bacilo grampositivo, aerobio, con preferencia por tejidos ricos en oxígeno, la vía de entrada al organismo es a través del tracto respiratorio y afecta principalmente a los pulmones. Se transmite de una persona a otra a través de gotitas de aerosol suspendidas en el aire expulsadas por personas con TB pulmonar activa (3) como se puede observar en la figura 3.

Cuando una persona desarrolla la TB activa, los síntomas como tos, fiebre, sudores nocturnos o pérdida de peso, pueden ser leves durante muchos meses y esto puede retrasar la búsqueda de atención médica y resultar en la transmisión de la micobacteria a otras personas. La persona con TB activa pueden infectar a otras 5 o 15 personas a través del contacto cercano en el transcurso de un año. Sin el tratamiento adecuado, el 45% de las personas VIH negativas con TB, y la gran mayoría de las personas VIH positivas con TB, tendrán una alta morbilidad (4).

La TB se puede curar mediante la administración de un tratamiento durante 4, 6 o 9 meses según sea el esquema. El esquema de 4 meses incluye Rifapentina y Moxifloxacina mientras que el de 6 a 9 meses consiste en administrar Rifampina, Isoniacida, Pirazinamida y Etambutol (4).

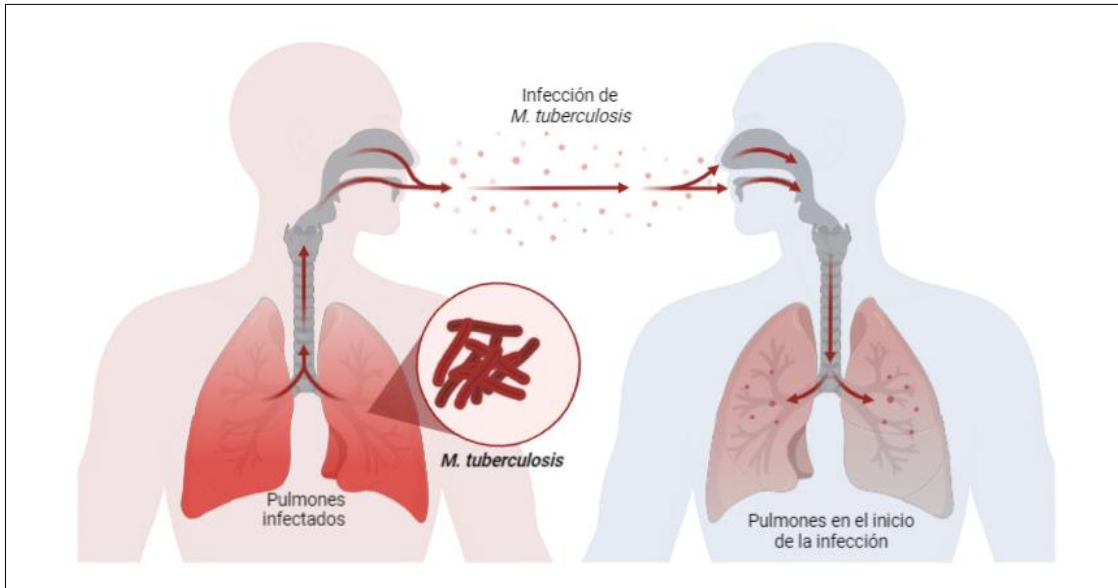


Figura 3. Transmisión de la TB

La TB se transmite de persona a persona a través del aire cuando las personas con TB pulmonar tosen, estornudan o escupen, expulsando a *M. tuberculosis* al aire. Una persona necesita inhalar solo algunas micobacterias para poder infectarse (4).

1.3 Estructura de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis puede persistir en su hospedero humano hasta décadas evadiendo la respuesta inmune y sobreviviendo dentro de los macrófagos debido a que puede crear un nicho intracelular. De esta manera, la micobacteria está protegida de la respuesta inmunitaria mientras tiene acceso a los nutrientes del hospedero, como son los lípidos y el hierro. Cabe mencionar que *M. tuberculosis* tiene una pared celular gruesa lipofílica que consta de glucolípidos, polisacáridos y peptidoglucanos, la cual, le brinda protección ante el ambiente hostil y bactericida dentro de los macrófagos, así como contra los antibióticos debido a su baja permeabilidad complicando el tratamiento de la enfermedad, como se puede observar en la figura 4 (5).

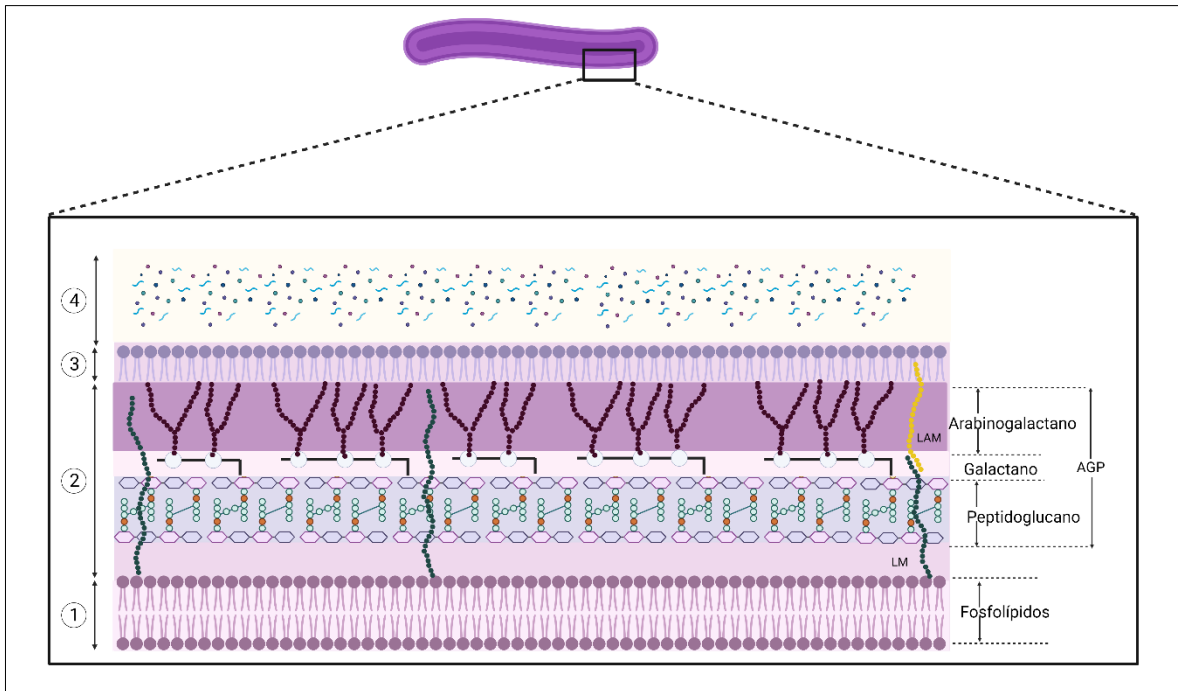


Figura 4. Estructura de la envoltura externa y la pared celular de *M. tuberculosis*

La envoltura celular de *M. tuberculosis* comprende cuatro capas principales: **(1)** la membrana plasmática o membrana interna, **(2)** el periplasma, **(3)** la membrana externa y **(4)** la cápsula externa. Todas estas capas son importantes para su infección inicial y la persistencia en el hospedero ya que la organización estructural, le confieren baja permeabilidad (5).

En el interior de la envoltura celular se encuentra la llamada membrana interna micobacteriana o membrana plasmática (PM). Esta bicapa lipídica consiste principalmente de fosfolípidos a base de glicerol, principalmente aminas de fosfatidiletanol (cefalinas) y los fosfatidilinositolmanósidos (PIM), los cuales son glicoconjugados biológicamente activos en la pared celular de *M. tuberculosis* (5).

Conectado a la membrana plasmática está el periplasma, que consta de lipomanoano (LM) y lipoarabinomanoano (LAM) siendo éste último un factor de virulencia conocido de la TB (5).

Asociado de forma no covalente al periplasma se encuentra el complejo de arabinogalactano y peptidoglucano (AGP). De este complejo, el peptidoglucano (PG) le proporciona a la bacteria la forma y estabilidad osmótica debido a que se entrecruza con enlaces peptídicos, lo que le da rigidez a la pared celular (6). Unido covalentemente a PG está el arabinogalactano, que es un sacárido polimérico que se extiende por una gran parte de la pared celular total y se ramifica para conectarse a los ácidos micólicos (5).

Los ácidos micólicos son el componente principal en la membrana externa micobacteriana, formando la membrana lipofílica gruesa que es característica de las micobacterias. Los glucolípidos a base de ácido micólico forman una red entrelazada de largas cadenas de ácido micólico alifático (C70-C90) que contribuyen a la fluidez de la pared celular (7). La membrana externa tiene una amplia gama de moléculas lipofílicas como sulfoglicolípidos (SHL), diaciltrehalosas (DAT) poliaciltrehalosa (PAT) y dimicocerosato de ftiocerol/ftiodiolona (PMID) (5).

La pared celular tiene un compartimiento más externo llamada cápsula que consiste principalmente de polisacáridos y péptidos (8). Se ha observado que la cápsula está débilmente unida a la pared celular y puede desprenderse del medio de cultivo conservando propiedades fisicoquímicas similares (5).

Dado que la envoltura de la célula micobacteriana se encuentra en la interfaz con las células del hospedero, sus constituyentes juegan un papel clave en la patogenicidad de *M. tuberculosis*, pero también en las respuestas inmunes del hospedero (9). Por lo tanto, la identificación de los lípidos y su función molecular exacta es fundamental para comprender los mecanismos de supervivencia y virulencia de *M. tuberculosis*, pero también para entender la respuesta inmunitaria. Además, los estudios sobre los componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* pueden ayudar significativamente al descubrimiento de nuevos blancos de los antibióticos, adyuvantes de vacunas y biomarcadores para el diagnóstico de TB (10).

1.4 Inmunidad innata

En los seres humanos, el sistema inmunitario ayuda a combatir las infecciones causadas por virus, bacterias u hongos y por esta razón ha desarrollado diferentes respuestas para combatir cada tipo de patógeno, siendo capaz de responder con rapidez a cantidades reducidas de diferentes microbios que pueden ingresar en cualquier parte del cuerpo (11).

Las respuestas inmunitarias innatas frente a un patógeno se desarrollan rápidamente y no requieren una exposición previa. Las células efectoras y moléculas inmunitarias innatas están presentes en cantidades suficientes incluso antes de la infección y son totalmente funcionales o se activan con rapidez por los patógenos para impedir, controlar o eliminar las infecciones (12).

El sistema inmunitario innato reconoce estructuras moleculares que son producidas por los microorganismos patógenos. Las sustancias de los patógenos que estimulan a la inmunidad innata son con frecuencia compartidas por distintas clases de ellos y se denominan patrones moleculares asociados a microorganismo patógenos (PAMP). El sistema inmunitario innato al reconocer los PAMP detecta la presencia de infección, pero no los patógenos específicos y activa la defensa del hospedero independientemente de la especie del patógeno particular (13).

Los receptores de la inmunidad innata son específicos frente a estructuras que son comunes a grupos de microbios relacionados y no distinguen las sutiles diferencias que hay entre ellos.

Los principales componentes de la inmunidad innata son: 1) barreras físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas (CD), mastocitos, linfocitos *natural killer* (NK) y 3) proteínas sanguíneas, como miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación.

Muchas células inmunitarias innatas, como las CD, algunos macrófagos y los mastocitos, residen en los tejidos y se mantienen atentos ante los microbios que pueden invadir los tejidos (13).

Las células que desempeñan funciones especializadas en las repuestas inmunitarias innatas son los fagocitos. Casi todas derivan de células troncales hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea, que se diferencian a lo largo de linajes que se ramifican (14).

1.4.1 Fagocitos

Entre los fagocitos se encuentran los neutrófilos y los macrófagos, que son las células cuya función principal es ingerir y destruir los patógenos y los tejidos dañados. Las funciones de los fagocitos en la defensa del hospedero consisten en una secuencia de pasos: reclutamiento de las células en las zonas de infección, reconocimiento de los patógenos y activación por ellos, ingestión de los patógenos por el proceso de la fagocitosis y la destrucción de los patógenos ingeridos. Además, mediante el contacto directo y la secreción de citocinas, los fagocitos se comunican con otras células en diversas formas que promueven o regulan las respuestas inmunitarias (15).

1.4.2 Fagocitos mononucleares

El sistema fagocítico mononuclear comprende células circulantes procedentes de la médula ósea denominadas monocitos, muchos de los cuales se convierten en macrófagos cuando migran a los tejidos, y los macrófagos residentes en los tejidos. Después del nacimiento, las células del linaje monocito-macrófago surgen de células precursoras comprometidas en la médula ósea, dirigidas por una citocina conocida como factor estimulador de colonias de monocitos (M-CSF). Estos precursores maduran en monocitos, que entran y circulan por la sangre, donde tienen una vida corta de 1 a 7 días aproximadamente.

Los monocitos sanguíneos son reclutados con eficiencia hacia focos de infección o lesión de los tejidos, y por este motivo la mayor parte de los macrófagos de los focos inflamatorios proceden de los monocitos (16).

1.4.3 Desarrollo de macrófagos

Durante las reacciones inflamatorias, los precursores de la médula ósea dan lugar a monocitos circulantes que entran en los tejidos periféricos y maduran para formar macrófagos, de vida corta, que son activados de forma local. Muchos macrófagos residentes en tejidos se desarrollan en la vida fetal a partir de precursores hematopoyéticos y la médula ósea. Estas células asumen fenotipos especializados dependiendo del órgano, como las células de Kupffer que recubren las sinusoides en el hígado, los macrófagos alveolares en el pulmón y las células microgliales en el encéfalo (17).

1.4.4 Macrófagos

Los macrófagos realizan funciones cruciales en las respuestas inmunitarias innata y adaptativa a las infecciones y en la reparación de los tejidos dañados. Los macrófagos que residen en los tejidos detectan la presencia de microorganismos y responden secretando citocinas que inician y posteriormente amplifican la respuesta protectora frente a los microorganismos. Algunas de estas citocinas actúan sobre las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos para incrementar el reclutamiento de los monocitos y de otros leucocitos desde la sangre hasta los focos de infección (17).

1.4.4.1 Receptores de macrófagos y su activación

Los macrófagos son activados por productos microbianos, como el lipopolisacárido, y por el interferón gamma (IFN- γ), derivado de los linfocitos NK.

El proceso de activación de los macrófagos lleva a la activación de factores de transcripción, la transcripción de diversos genes y la síntesis de proteínas que median las funciones de estas células como se puede observar en la figura 5 (17).

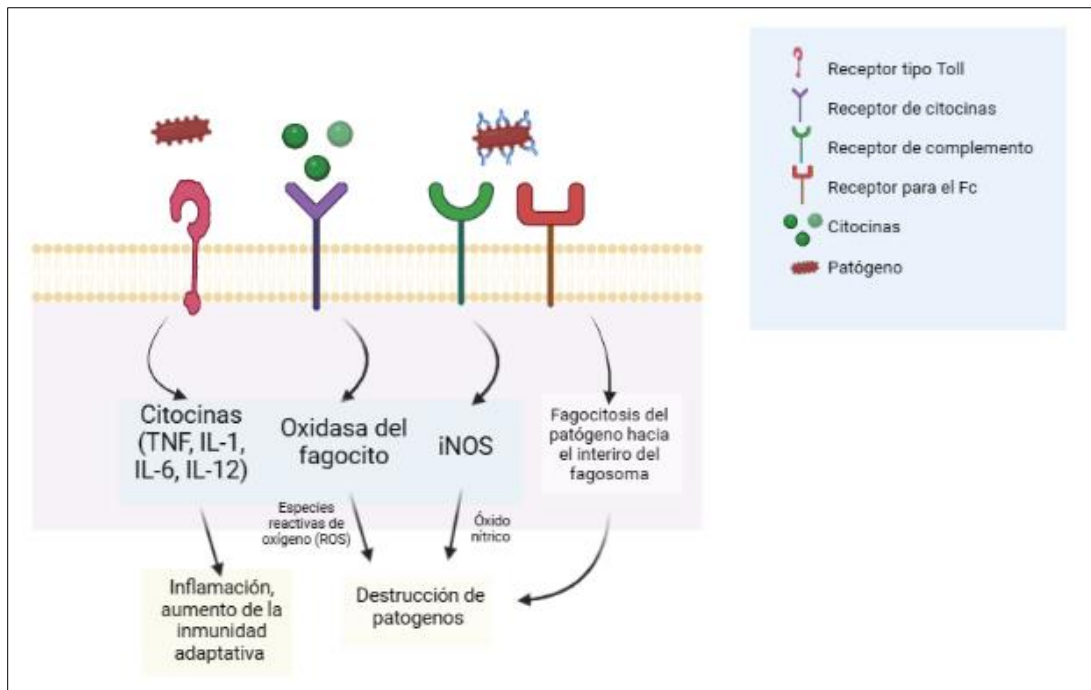


Figura 5. Funciones de los macrófagos

Los macrófagos se pueden activar por diversos receptores desencadenando funciones particulares (17).

Los macrófagos se activan para realizar sus funciones al reconocer muchos tipos diferentes de moléculas microbianas, así como moléculas del hospedero producidas en respuesta a las infecciones y lesiones. Estas diferentes moléculas activadoras se unen a receptores específicos producto de señales localizados en la superficie del macrófago. Un ejemplo de estos son los receptores tipo *Toll* (TLR), que son importantes en la inmunidad innata (17).

Los macrófagos también se activan cuando otros receptores presentes en su membrana plasmática se unen a opsoninas en la superficie de los patógenos como los receptores para el complemento CR1, CR3/CR4 o unidos a las superficies microbianas como los receptores para Fc.

También existen receptores de manosa, receptores *scavenger* y receptores para la proteína surfactante A, de dominio de oligomerización nuclear (NOD) o receptores NOD-*like* (NLR) y receptores de lectina tipo C (CLR), involucrados en la eliminación de las micobacterias (18). Todos contribuyen al inicio de diferentes vías de muerte, incluidas la apoptosis y la piroptosis.

1.4.4.2 Subpoblaciones de macrófagos

Los macrófagos pueden adquirir capacidades funcionales, dependiendo de los tipos de estímulos activadores a los que se exponen: macrófagos M1 activados clásicamente y macrófagos M2 activados alternativamente.

Los macrófagos M1 funcionan principalmente en el reclutamiento de células Th1 para la resistencia a patógenos y el control de tumores a través de la respuesta inmune innata. Estos macrófagos se activan a través de patógenos, lipopolisacárido (LPS) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y muestran una capacidad de presentación de antígeno alta y una producción elevada de citocinas pro-inflamatorias como INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-12, IL-23, IL-6 y sobre expresan el receptor IL-1, complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, TLR 2 y 4 y producen componentes microbicidas como especies reactivas de oxígeno (ERO) (19) como se esquematiza en la figura 6.

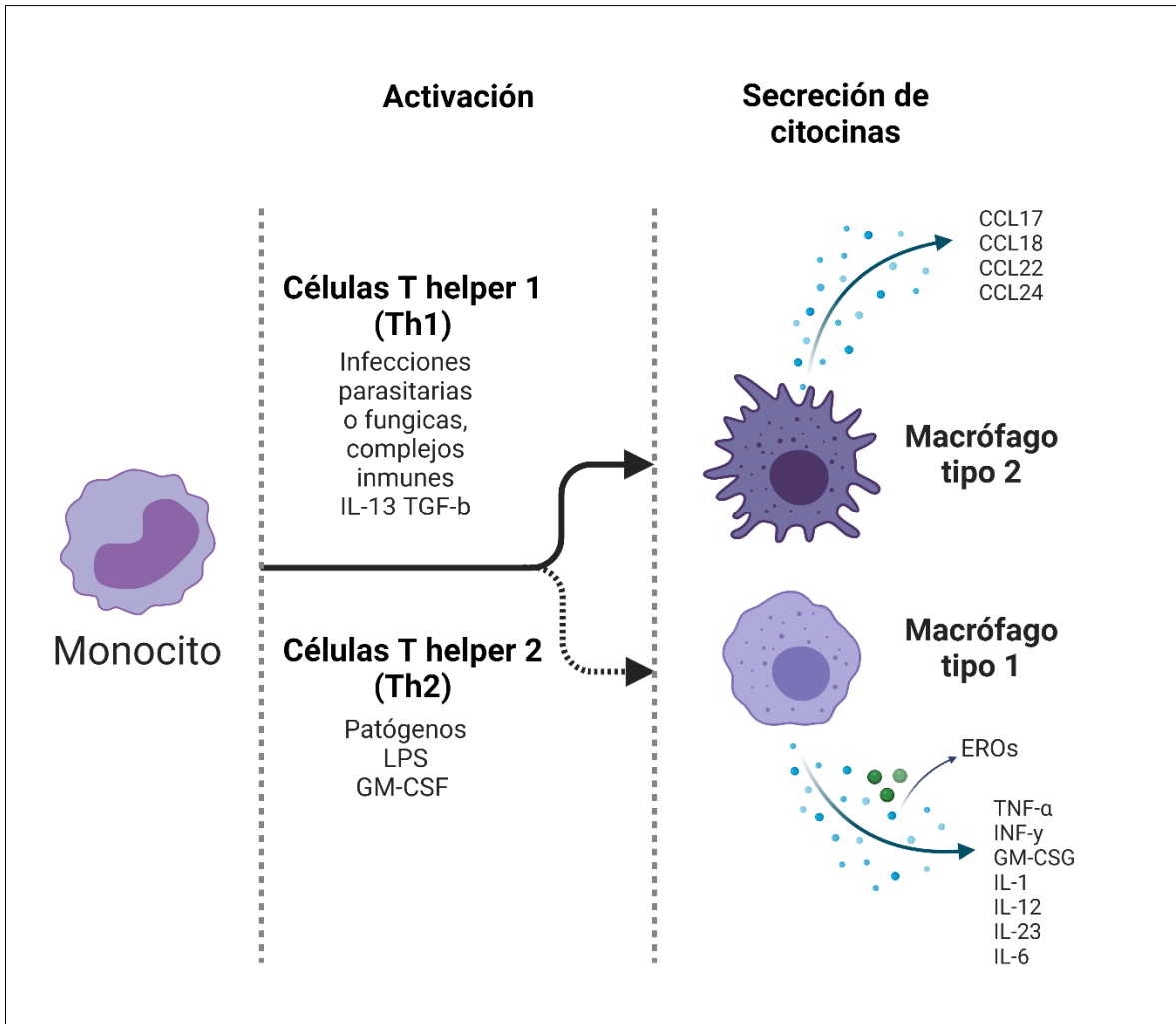


Figura 6. Polarización de los macrófagos a M1 o M2

Los macrófagos juegan un papel esencial en la inflamación, respondiendo al entorno con la diferenciación de dos fenotipos denominados M1 y M2 (19).

Por otra parte, los macrófagos M2 funcionan en la depuración de patógenos, la respuesta inflamatoria y el metabolismo, así como en la cicatrización de heridas, remodelación de tejidos, inmunorregulación, progresión tumoral y neoplasias expresando CD206, CD163, CD209. Estos macrófagos se activan a través de las infecciones parasitarias o fúngicas, de los complejos inmunes (IL-23, TGF-β). Además, producen quimiocinas como CCL1, CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24 como se esquematiza en la figura 6 (19).

Los macrófagos tienen la capacidad de cambiar su polarización en respuesta a diferentes estímulos. Por ejemplo, el fenotipo de los macrófagos cambia durante la reparación tisular, cambiando de fenotipo pro-inflamatorio (similar a M1) a un fenotipo antiinflamatorio (similar a M2). Además, diferentes marcadores de polarización y activación de macrófagos similares a M1 y M2 pueden coexistir en los tejidos. Por ejemplo, se demostró un alto porcentaje de macrófagos circulantes que expresan marcadores de superficie M1 (CD80, CD86 y TLR4) y M2 (CD204, CD163 y CD206) en humanos con enfermedad pulmonar intersticial.

Con el análisis de los perfiles transcriptómicos se ha informado que los macrófagos polarizados similares a M1 o M2 impulsados por citocinas pueden repolarizarse posteriormente a otro fenotipo con poca o ninguna memoria de la historia de polarización. Por lo tanto, el fenotipo in vivo y la función de los macrófagos aún no se ha definido en microambientes tisulares específicos (19).

1.5 Fagocitosis

M. tuberculosis es fagocitada por macrófagos alveolares, que son la primera línea de defensa y reclutan diferentes tipos de macrófagos durante la infección temprana a través de múltiples mecanismos, bactericidas como es la producción de ERO, especies reactivas de nitrógeno (ERN), producción de citocinas, la acidificación del fagosoma y la autofagia (20).

La fagocitosis es un proceso celular de la inmunidad innata, el cual, consiste en el reconocimiento y la ingestión de partículas, microorganismos, células apoptóticas o materiales inertes de más de 0.5 μm . Los macrófagos y los neutrófilos llevan a cabo este proceso y se les conoce como fagocitos profesionales, los cuales, expresan receptores de la membrana plasmática que median el reconocimiento fagocítico (20).

1.5.1 Reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis*

La primera fase de la fagocitosis es el reconocimiento del patógeno mediada por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), dichos receptores son los primeros en interaccionar con las bacterias cuando entran en contacto con la membrana celular y reconocen los PAMP (21).

Los receptores no opsónicos reconocen directamente grupos moleculares en la superficie de los patógenos y son miembros de la familia de receptores de lectina de tipo C como la lectina-1 de tipo C asociada a CD (DECTIN1), la lectina de tipo C inducida por macrófagos (Mincle), lectina tipo C de macrófagos (MCL), receptor inmunoactivador de CD (DCAR); también lectina de tipo C como el miembro A de la familia 9 del dominio de lectina de tipo C (DNGR1) y TLR. Cada TLR tiene un subconjunto específico de PAMP a los que puede unirse; sin embargo, se siguen descubriendo ligandos. Por la familia de estos receptores, *M. tuberculosis* es reconocido principalmente por TLR2, TLR4 y TLR9, con un papel dominante para TLR2.

Después del reconocimiento de *M. tuberculosis* por parte de los TLR, se activa una cascada de señalización intracelular que recluta la proteína adaptadora de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (*MyD88*) a los dominios intracelulares de los TLR (21).

Mientras que los receptores opsónicos reconocen las opsoninas derivadas del hospedero que se unen a los microorganismos y favorecen la ingestión, estas opsoninas incluyen anticuerpos, factores del complemento, fibronectina y lectina de unión a manosa. Cabe mencionar que los receptores mejor caracterizados son los receptores para Fc (FcR) y para factores del complemento (CR) (22).

Existen otros receptores como los Scavenger (SR) los cuales son una familia de receptores unidos a la membrana que inicialmente se pensó que se unían e internalizaban lipoproteínas modificadas (LDL), aunque se sabe que se unen a una variedad de ligandos, incluidas proteínas endógenas y patógenos, estos receptores se han clasificado en 10 familias eucariotas, definidas como Clases A-J.

Estos receptores se clasifican según sus secuencias, aunque en cada clase se clasifican en función de las variaciones de la secuencia. Su capacidad para unirse a una gama de ligandos se refleja en las funciones biológicas, como la eliminación de lipoproteínas modificadas y patógenos. Algunos SR importantes en el reconocimiento de *M. tuberculosis* son CD36 y el receptor de macrófagos con estructura parecida a colágena (MARCO) (22).

Dichos receptores, tanto opsónicos, como no opsónicos y *Scavenger*, se pueden observar en la figura 7, donde de igual forma se puede ver que reconocen a cada uno de estos grupos.

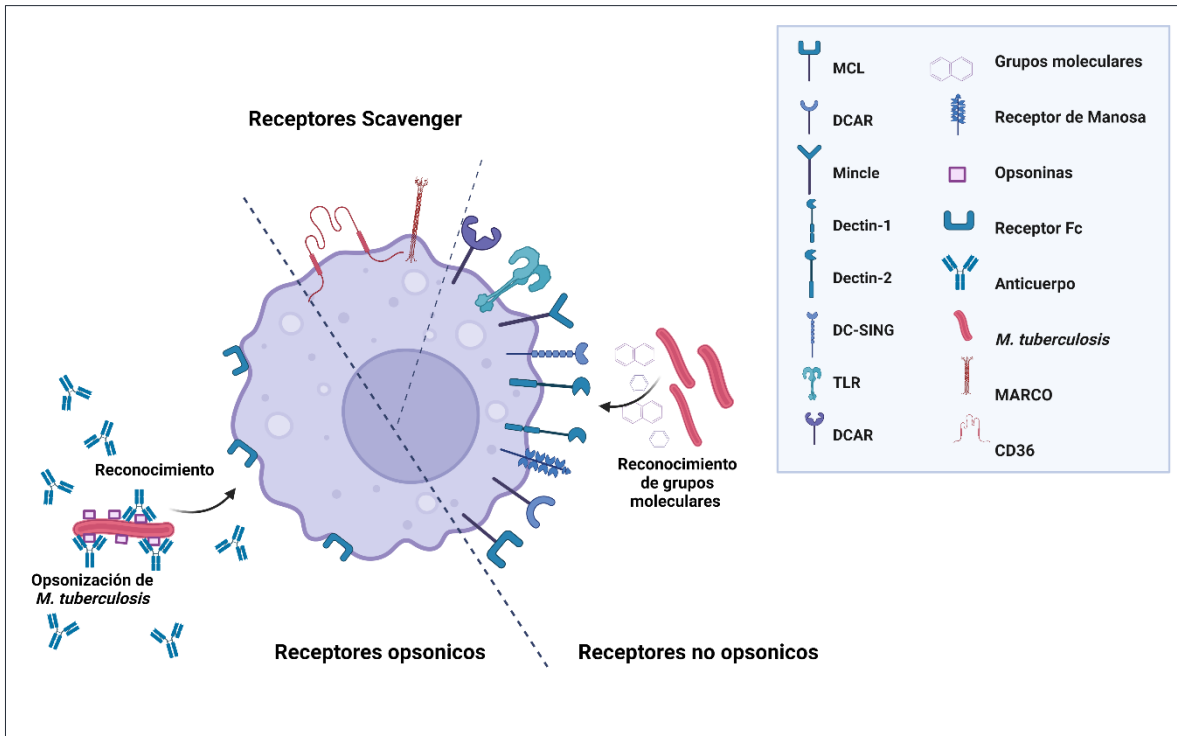


Figura 7. Receptores de reconocimiento de patrones implicadas en la defensa inmunitaria innata frente a *M. tuberculosis*

Diferentes receptores asociados a macrófagos para el reconocimiento de diversos patógenos .

1.5.2 Formación de fagosomas

Después que se ha dado el reconocimiento del patógeno, los receptores activan vías de señalización que cambian la composición de la membrana y controlan el citoesqueleto de actina, lo que da como resultado la formación de protuberancias de membrana para cubrir al patógeno. Finalmente, estas protuberancias se fusionan en la parte distal creando una nueva vesícula que se desprende de la membrana plasmática que contiene la partícula ingerida llamada fagosoma (23). Durante la formación del fagosoma, la membrana cambia su composición lipídica que implica la formación y degradación de diferentes moléculas de lípidos de la membrana del fagosoma de manera ordenada como se puede observar en la figura 8.

1.5.3 Maduración del fagosoma temprano

El nuevo fagosoma se combina con los endosomas tempranos en un proceso que involucran eventos de fusión de membrana regulados por la guanosina trifosfatasa (GTPasa) y RAB5. El RAB5 recluta la molécula del antígeno 1 del endosoma temprano (EEA1) promoviendo la fusión del nuevo fagosoma con los endosomas tempranos. EEA1 funciona como un puente entre los primeros endosomas y las vesículas endocíticas y promueve el reclutamiento de otras proteínas, como RAB7 como se puede observar en la figura 8 (24).

1.5.4 Fagosoma tardío

A medida que avanza la maduración del fagosoma, *RAB5*, se pierde y *RAB7* se recluta en la membrana el cual media la fusión del fagosoma con endosomas tardíos. Al mismo tiempo, hay una acumulación de moléculas de V-ATPasa (*Vacuolar-type ATPase*) en la membrana del fagosoma. Esta V-ATPasa es responsable de la acidificación (pH 5,5-6,0) del interior del fagosoma mediante la translocación de protones (H⁺) como se puede observar en la figura 8 (25).

1.5.5 Fagolisosoma

En la última etapa de la maduración del fagosoma, estos se fusionan con los lisosomas para convertirse en fagolisosoma, siendo un compartimiento celular dotado de mecanismos para degradar a los microorganismos.

En primer lugar, los fagolisosomas son ácidos (pH menor a 5) debido a la acumulación de la V-ATPasa en su membrana (26). La membrana del fagolisosoma también presenta el complejo enzimático de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH oxidasa), que es responsable de producir ERO, como el superóxido (O²⁻) (268).

El superóxido se dismuta a peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que a su vez puede reaccionar con iones cloro para formar ácido hipocloroso, una sustancia microbicida muy potente y esta última reacción es catalizada por la enzima mieloperoxidasa. Además, el fagolisosoma contiene varias enzimas hidrolíticas como: catepsinas, proteasas, lisozimas y lipasas, que contribuyen a degradar los microorganismos ingeridos como se puede observar en la figura 8 (27).

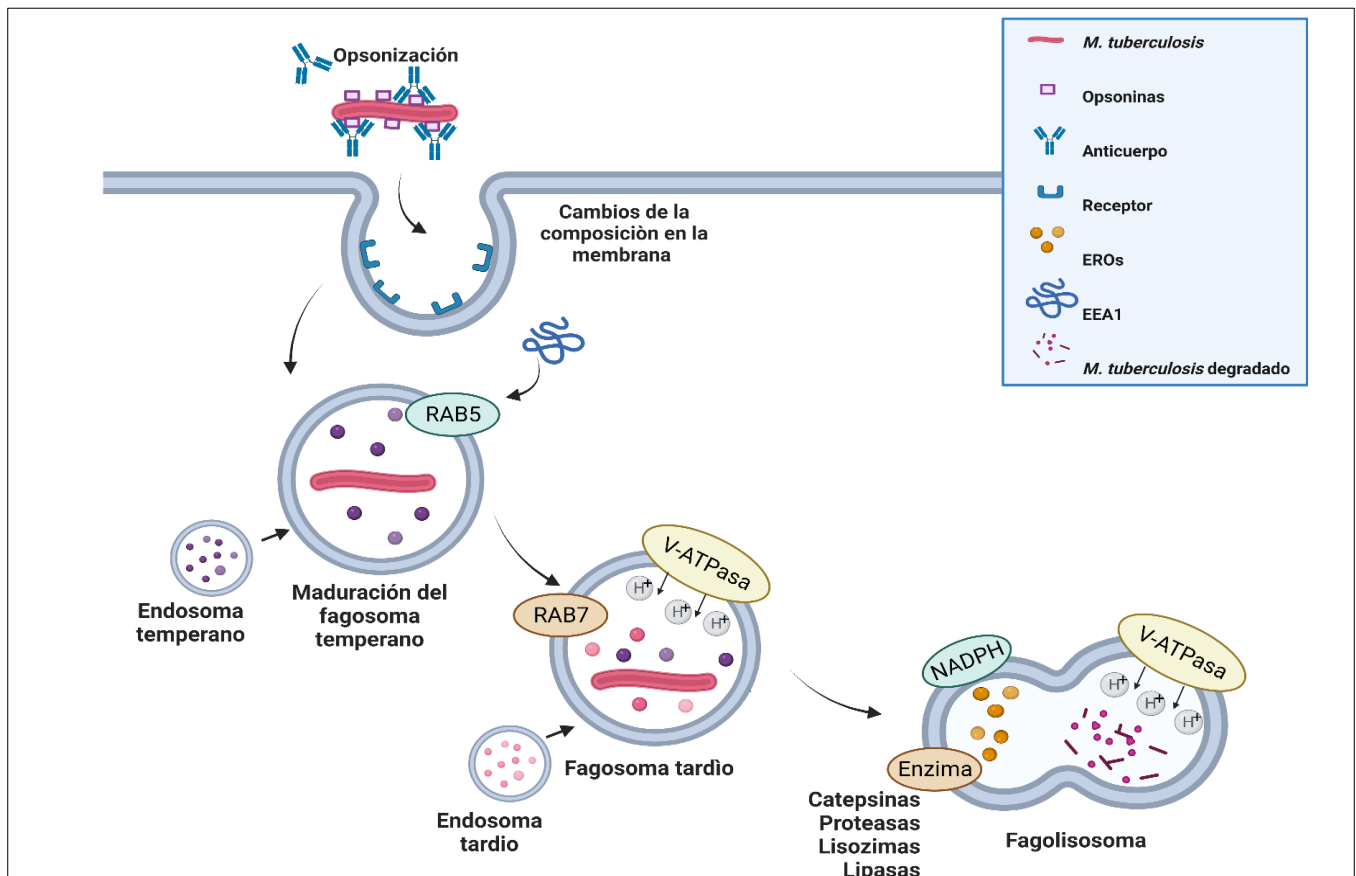


Figura 8. Fagocitosis de *M. tuberculosis* mediada por opsoninas

El proceso de fagocitosis consta principalmente de 4 etapas: **I)** cambio en cuanto a la composición en la membrana, **II)** la maduración del fagosoma temprano, **III)** el fagosoma tardío y **IV)** el fagolisosoma (27).

1.6 Evasión de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es un patógeno exitoso causante de la TB que ha evolucionado con los humanos como su especie hospedera (28). Esta relación persistente ha dado una forma única al genoma micobacteriano para codificar mecanismos que le permitan resistir al ataque y la eliminación por parte del sistema inmunitario, aunque tanto la inmunidad innata como la adaptativa modifican el curso de la infección. Sin embargo, *M. tuberculosis*, puede persistir y causar enfermedad incluso en hospederos inmunocompetentes (29).

Una característica de la patogénesis de la TB es la capacidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir en diversos ambientes intracelulares dentro de una variedad de poblaciones de células mieloides (30). Antes de su interacción con las células fagocíticas, *M. tuberculosis* se encuentra en el líquido de revestimiento alveolar, que es una mezcla compleja de lípidos y proteínas secretadas por las células epiteliales alveolares, que incluye proteínas surfactantes e hidrolasas que interactúan con glucolípidos de la superficie micobacteriana. Este líquido mejora la interacción y muerte de patógenos por los macrófagos alveolares y tienen un impacto en las interacciones con las células epiteliales alveolares (31).

Una vez que los macrófagos alveolares fagocitan a *M. tuberculosis*, se inicia una serie de mecanismos bactericidas, cuyo objetivo es la eliminación de las micobacterias. Dichos mecanismos requieren la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa para producir anión superóxido y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) para producir óxido nítrico (NO); iNOS es una enzima cuya función en macrófagos es inducida por las citocinas proinflamatorias TNF- α e INF- γ . Su función favorece la formación de NO cuando es reclutada en los fagosomas. Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que los fagosomas donde se encuentra *M. tuberculosis* excluyen a iNOS (32).

El reclutamiento secuencial de RAB5, RAB7 y fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) normalmente promueve la maduración de los fagosomas tempranos a tardíos, pero *M. tuberculosis* retrasa la maduración fagosómica previniendo el reclutamiento de RAB5 y RAB7 a través de su proteína nucleósido difosfato cinasa (NDKA), mientras que la proteína KATG limita la adquisición de NADPH, reduciendo a producción de ERO (32).

M. tuberculosis tiene sistemas de secreción de proteínas y se ha descrito que el sistema SecA2 que es importante para la liberación de la enzima superóxido dismutasa (SodA) cuya función es mantener el fagosoma sin radicales libres, debido a que SodA actúa sobre el ion superóxido para convertirlo en H₂O₂. De igual forma se ha descrito que SecA2 es un mecanismo importante que evita que el macrófago infectado produzca citocinas inflamatorias, así como causa una disminución de iNOS (33).

Los eventos que se desencadenan en la fagocitosis están relacionados con la vía de entrada, de los patógenos. Ya que cuando la fagocitosis es mediada por los receptores *Fc* se induce el estallido respiratorio favoreciendo la respuesta inflamatoria en macrófagos, y cuando es mediada por los receptores de CR3 se evita la activación de los macrófagos (33).

La inhibición de la fusión de fagosomas-lisosomas, evita la maduración del fagosoma en los macrófagos. Los estudios han demostrado que el factor de transcripción proinflamatorio, factor nuclear kappa B, (NF-κB) regula la liberación de enzimas lisosomales en los fagosomas, regulando así la eliminación de patógenos. Además, el NF-κB aumenta la producción de moléculas de transporte de membrana, lo que regula la fusión de los fagolisosomas durante la infección (34).

Por otra parte, la composición de la micobacteria puede impedir que mecanismos de defensa del hospedero la eliminen. Por ejemplo, el PDIM, forma una barrera que impide la permeabilidad de la envoltura de las micobacterias (35).

El sulfolípidido de trehalosa (SL), es una molécula de ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, pero sustituidos por grupos sulfatos que facilitan que la micobacteria escape de la acción de los macrófagos inhibiendo la fusión del fagosoma-lisosoma; así mismo, esta molécula se une a los receptores *scavenger* en macrófagos favoreciendo la entrada de la micobacteria a la célula del hospedero (35).

Cuando los macrófagos infectados entran en apoptosis evitan la propagación del patógeno; sin embargo, *M. tuberculosis* utiliza factores de virulencia como el antígeno designado como diana antigénica secretora temprana de 6 kDa (ESAT-6), CpnT y PDIM para inducir necrosis y promover su diseminación, la replicación celular y la inmunopatología, promoviendo el daño a la membrana fagosómica (35).

El lípido micobacteriano PDIM puede propagarse a las membranas epiteliales y modular la respuesta inmune, se ha observado que los macrófagos alveolares (MA) infectados con *M. tuberculosis* migran fuera del espacio alveolar hacia el intersticio pulmonar en un proceso dependiente de la señalización por IL-1 β del hospedero y un sistema de secreción de *M. tuberculosis* tipo VII, ESX-1 (*ESX homeobox 1*) (36).

1.7 Evasión del sistema inmunitario

Los macrófagos pueden favorecer la permanencia de *M. tuberculosis* al convertirse en un nicho para la replicación o en su defecto en la formación de granulomas, los cuales, contienen macrófagos, macrófagos transformados a células gigantes multinucleadas, células epitelioideas y células espumosas, rodeados de linfocitos T.

Los macrófagos espumosos tienen una capacidad disminuida para mediar la fagocitosis y el procesamiento de antígenos aunado a una mayor secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Estos macrófagos pueden ser inducidos por componentes de *M. tuberculosis*, incluidos los ácidos micólicos, los lipopéptidos y el factor de virulencia ESAT-6, lo que causa la acumulación de lípidos del hospedero, que favorecen la nutrición micobacteriana y su persistencia (37).

Se ha considerado que el granuloma tuberculoso es una estructura protectora para el hospedero, que contiene macrófagos, neutrófilos y linfocitos, que protege a las micobacterias ya que se ha observado que las micobacterias llegan a mejorar la formación de granulomas y se han adaptado para al final romper dichas estructuras para su diseminación (38).

Los linfocitos T CD4 y la producción del TNF- α son cruciales para la formación de los granulomas bien organizados para la protección del hospedero. Las personas con disminución de linfocitos T CD4 por infección por VIH o las tratadas con inhibidores del TNF- α no logran formar granulomas bien organizados, y tienen un riesgo alto de desarrollar TB activa e infección diseminada (38).

Cuando el número de micobacterias aumenta los macrófagos mueren por apoptosis que deja micobacterias viables dentro de las células muertas. Al mismo tiempo, se reclutan macrófagos no infectados para el granuloma naciente que van a fagocitar a las micobacterias.

Este proceso permite una expansión mediada por un sistema de secreción de micobacterias ESX-1 secretando el factor de virulencia ESAT-6. ESAT-6 induce la apoptosis de macrófagos y la expresión de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) del hospedero en las células epiteliales que rodean el granuloma naciente (39). Si la función de MMP9 del huésped disminuye, la infección se atenúa y se reduce la formación de granulomas.

Sin embargo, se ha observado que si existe una formación y hay una ruptura del fagosoma completa, ESAT-6 puede permeabilizar la membrana fagosómica lo suficiente como para exponer el DNA micobacteriano a la vía de detección del DNA citosólico del huésped. Cantidades elevadas en la producción de TNF- α y una respuesta intensa de los linfocitos T llevan a los macrófagos a necrosis causando el desarrollo de las micobacterias en el espacio extracelular. La metaloproteinasa de matriz 1 (MMP1) causa cavitaciones en el granuloma y en consecuencia la micobacteria entra a las vías respiratorias para ser eliminada al exterior del hospedero (40).

Las CD derivadas de monocitos expresan receptores de manosa (MR) y DC-SIGN, que son capaces de reconocer ligandos de *M. tuberculosis*, como la lipoproteína LprG y los fosfatidilinositol manósidos hexamanoilados (PIM) (40).

Durante la infección, la unión de DC-SIGN con *Mannose-capped lipoarabinomannan* (ManLAM) de *M. tuberculosis* induce la producción de IL-10 que afecta la maduración de DC y la expresión de moléculas coestimuladoras; ManLAM también es capaz de inducir una señal negativa que inhibe la producción de IL-12, que es una citocina que promueve el desarrollo de una respuesta inmune Th1 que confiere protección a la TB, lo que pone en evidencia que *M. tuberculosis* modula las funciones de las DC para evitar el desarrollo de la inmunidad adaptativa (41).

Durante la infección con *M. tuberculosis*, hay un retraso en la migración de las CD a los pulmones. En el genoma de *M. tuberculosis* se ha descrito el gen *nuoG* de virulencia responsable de inhibir la apoptosis de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) infectados y la absorción de antígenos por parte de las DC. Una vez que las DC infectados llegan al ganglio linfático, *M. tuberculosis* afecta su capacidad para interactuar con las células T CD4 al degradar los antígenos como la proteína HIP1 degrada GroEL2 (*Chaperonin GroEL 2*), exportar antígenos fuera de la célula e inhibir el procesamiento de antígenos (*mediado por EsxH*) (42).

M. tuberculosis ha desarrollado estrategias para evadir a las células del sistema inmunitario con la finalidad de persistir y sobrevivir. Aunado a que componentes propios de la micobacteria como los factores de virulencia ESAT-6, y el antígeno secretado de 10 kDa (CFP-10) componentes como ácidos micólicos, lipopéptidos, LAM, ManLAM y el gen *nuoG* contribuyen a la inhibición de la respuesta inmune de hospedero.

Actualmente existen pocos estudios que han abordado el análisis de la expresión de genes que es alterada por la presencia de las micobacterias durante la fagocitosis. Respecto a esto, se han utilizado los microarreglos para conocer la respuesta de macrófagos alveolares de pacientes con TBP y sujetos sanos (43).

Se ha observado que los genes de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α y IL-1 (α y β), son regulados a la baja, siendo mediadores importantes para el control de la infección por *M. tuberculosis* (44). De igual forma el factor de transcripción nuclear NF- κ B y CD44, están regulados a la baja, demostrando que *M. tuberculosis* puede modificar la respuesta inmune del hospedero, y dentro de ella, en particular a la fagocitosis (45).

También existen genes regulados al alza como *LRRK02* (*leucine rich repeat kinase 2*), el cual está involucrado en la respuesta de IFN- γ y la respuesta del hospedero a los patógenos, ya que los IFN tipo I inducen inmunidad celular contra infecciones virales mediada por la regulación ascendente de otros genes como *ISG* (*Interferon-stimulated gene*), *IFI44* (*Interferon Induced Protein 44*), *IFI44L* (*Interferon Induced Protein 44 Like*) y *HERC5* (*HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 5*) (46,47). Estos trabajos han puesto en evidencia que la presencia de *M.tuberculosis* altera la expresión de genes involucrados en la defensa del hospedero, y en este trabajo se abordó el estudio de genes involucrados solamente en la fagocitosis en una población pura de macrófagos (48).

2. Justificación

La TB sigue siendo una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Esta enfermedad es causada por *M. tuberculosis* siendo la TB pulmonar la forma más frecuente. Los macrófagos alveolares, son una de las células más importantes de defensa en los alveolos ya que fagocitan a *M. tuberculosis* para eliminarla, por lo que es importante profundizar en los mecanismos de la respuesta inmune innata en respuesta a la infección, con un énfasis particular en la fagocitosis.

3. Hipótesis

La expresión de los genes involucrados en las distintas etapas de la fagocitosis de *M. tuberculosis* puede estar disminuida como parte de un mecanismo de evasión inducido por la micobacteria al tratar de sobrevivir dentro del macrófago.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar los genes asociados a la fagocitosis de *M. tuberculosis*, cuya expresión es alterada por la presencia de la micobacteria en los macrófagos humanos y la posible repercusión en la defensa del hospedero.

4.2 Objetivos particulares

- Purificar monocitos y obtener macrófagos derivados de monocitos.
- Separar las poblaciones de macrófagos infectados y no infectados con *M. tuberculosis* por citometría de flujo.
- Evaluar el porcentaje de fagocitosis de *M. tuberculosis* por citometría de flujo.
- Determinar la pureza de las poblaciones separadas por citometría de flujo.
- Analizar la expresión de genes implicados en la fagocitosis de *M. tuberculosis*.

5. Materiales y métodos

Este protocolo de investigación fue desarrollado en el Departamento de Investigación en Microbiología, y aprobado por los Comités de Investigación Ética en Investigación y de Bioseguridad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas con número de protocolo B12-18.

5.1 Donadores para obtener poblaciones celulares

En el estudio se incluyeron 5 voluntarios sanos como donadores de sangre, hombres y mujeres con edades entre 18 y 59 años, se les realizaron estudios de laboratorio que incluyeron biometría hemática y química sanguínea. Además, todos los voluntarios proporcionaron su consentimiento de participación voluntaria por escrito.

5.2 Criterios de exclusión para la selección de individuos donadores

Dentro de los criterios de exclusión se consideró que no tuvieran comorbilidades como diabetes, hipertensión, serología positiva para el virus de inmunodeficiencia adquirida o estar embarazadas en el caso de donadoras mujeres.

5.3 Obtención de la muestra biológica

A los voluntarios seleccionados se les tomó una muestra de 180 mililitros (ml) de sangre periférica por flebotomía estándar con heparina como anticoagulante. También, se les aplicó un cuestionario estructurado para conocer algunos aspectos sobre su historial clínico personal y familiar.

5.4 Microorganismo

Para los ensayos de infección y de acuerdo con el objetivo propuesto, se trabajó con *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC: 25177) previamente teñida con diacetato de fluoresceína (DAF). La cepa avirulenta H37Ra de *M. tuberculosis* de uso común se derivó de la cepa virulenta H37 en 1935 con probables mutaciones puntuales o pequeñas deleciones/reordenamientos en genes cruciales para la virulencia. El genoma de H37Ra es muy similar al de H37Rv (virulenta) con respecto al contenido y orden de los genes, pero es 8,445 pares de bases más grande como resultado de 53 inserciones y 21 deleciones en H37Ra en relación con H37Rv.

5.5 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

A partir de la muestra de sangre, se hizo una dilución 1:2, añadiendo por cada 20 ml de sangre periférica, 20 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con L-glutamina (Lonza, Suiza) en un tubo de polipropileno de 50 ml (Falcon). Posteriormente se procedió a la separación de las PBMC por gradiente de densidad adicionando 10 ml de solución separadora de linfocitos Lymphoprep® (densidad 1.077 ± 0.001 g/ml a 20°C) a la muestra de sangre diluida y se centrifugó a 1,200 rpm durante 45 minutos a 24°C. Concluido el tiempo de centrifugación, se recuperaron las PBMC y se colocaron en un tubo nuevo de 50 ml. Las PBMC fueron lavadas dos veces con medio RPMI (Lonza, Suiza) hasta tener un volumen total de 50 ml y se centrifugó a 1,200 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Al finalizar este último paso, se procedió a llevar a cabo la lisis de eritrocitos, añadiendo 4 ml de solución de lisis de eritrocitos (NaHCO₃, NH₄Cl, EDTA a una concentración 18.6 mM, 155 mM y 74 mM respectivamente) se mezclaron en el vórtex y se incubó durante 5 minutos en hielo. Posteriormente se agregó RPMI hasta tener un volumen total de 50 ml y se centrifugó a 1,200 rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se re-suspendió en 20 ml de RPMI suplementado con L-glutamina (Lonza, Suiza).

5.6 Viabilidad y total de células recuperadas

Las PBMC se contaron y se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión con azul de tripano en una cámara de Neubauer; haciendo una dilución 1:2 de la muestra al mezclar 10 μ l de la suspensión celular con 10 μ l de azul de tripano.

5.7 Purificación de monocitos por selección positiva

A partir de las PBMC, se hizo la purificación de MN por selección positiva utilizando el sistema MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Renania del Norte).

Una vez determinada la cantidad de PBMC, se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos a 24°C y posteriormente se eliminó el sobrenadante y las PBMC se resuspendieron en solución amortiguador de Miltenyi (Albumina sérica bovino 0.5%, EDTA 2 mM en PBS 0.01 M a pH 7.2) a partir de la relación de 80 μ l por cada 10^7 células totales, y se agregaron 10 μ l de anticuerpo anti-CD14 humano (conjugado a una perla magnética de 50 nm con anticuerpos altamente específicos contra el antígeno de CD14) por cada 10^7 de células totales, se mezcló y se incubaron durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron con amortiguador de Miltenyi con 2 ml por cada 10^7 células y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y finalmente los PBMC se resuspendieron en 500 μ l de amortiguador por cada 10^8 células totales. Se seleccionó la columna MACS (chica o grande) de acuerdo el número de células totales que se obtuvieron. La columna se colocó en el soporte magnético junto con un prefiltro de 30 μ m (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Renania del Norte) de pre-separación para agregados celulares. Se pre-humedeció el pre-filtro y la columna con amortiguador de Miltenyi y después se adicionó en el prefiltro la suspensión de las células y se dejó fluir a través de la columna. Se colectó la fracción negativa (CD14 negativas).

Después se realizaron 5 lavados agregando 500 μ l de amortiguador de Miltenyi y una vez terminados estos lavados, se removió la columna del magneto.

La columna se colocó en un tubo e inmediatamente se agregó 1 ml de amortiguador de Miltenyi para eluir los monocitos, obteniendo así la fracción CD14 positiva. Esta fracción, se centrifugó a 1,200 rpm durante 15 minutos a 4°C y se resuspendieron en 2 ml de RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM y 10% de una mezcla de suero humano (Valley Biomedical, INC, Winchester, Virginia). Adicionalmente se determinó la concentración y viabilidad de los MN purificados por el método de exclusión de azul de tripano y se ajustó a 1×10^6 cel/ml.

5.7.1 Determinación de la pureza de monocitos por citometría de flujo

Para conocer la pureza de los MN purificados, se realizó una tinción de superficie con el anticuerpo anti-CD14 humano (molécula presente solo en los monocitos) acoplado a ficoeritrina (PE), se tomaron 200 μ l de los MN purificados y se dividieron en dos tubos, en el primero se añadieron 3 μ l de anticuerpo (ac) anti-CD14PE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey), mientras que al segundo tubo no se le agregó él ac. Se incubaron ambos 15 minutos a 4°C protegidos de la luz. Posteriormente, se les agregaron 2 ml de solución de lavado para citometría (PBS, BSA al 2% y NaN₃ al 0.1%) y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron con 200 μ l de paraformaldehído al 1%. Se adquirieron 10,000 eventos en el citómetro de flujo FACSAria Fusion (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey) y se analizaron con el software BD FACS Aria.

En el software se llevó a cabo una estrategia de “gating” en una hoja global de análisis que se utilizó en todos los experimentos en donde se establecieron regiones y cuadrantes para poder observar la fluorescencia de los monocitos.

5.7.2 Caracterización de monocitos por su morfología

Adicionalmente, a partir de los MN purificados se preparó un frotis. Para esto, se colocaron 200 μ l (200,000 MN) en las copas para "cytospin" y se centrifugaron a 800 rpm durante 2 minutos a una velocidad media en la citocentrífuga CYTORPO™ (Radnor, Pensilvania). Posteriormente, las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con la mezcla etanol/acetona y se dejaron secar. En los frotis se hizo la tinción de Wrigth adicionando el colorante de Wrigth hasta cubrir todo el frotis y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 1 ml de agua hasta notar un cambio de color a verde metálico y se dejó incubando durante 5 minutos.

Finalmente, se enjuagó con agua corriente, se dejó secar a temperatura ambiente y se hizo el montaje del frotis con solución de montaje (Merck KGaA™, Kenilworth, Nueva Jersey) para preservar las laminillas. Se analizaron al microscopio óptico con un objetivo de 100X, esto con el fin de ver la morfología de los monocitos y corroborar los porcentajes de pureza.

5.8 Obtención de macrófagos derivados de monocitos

La población de MN purificados se resuspendió en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de una mezcla de suero humano sin descomplementar (Valley Biomedical INC, Winchester, Virginia) para tener la concentración final 1×10^6 células/ml. Posteriormente, se adicionaron 1×10^6 MN en cada uno de los 24 pozos de las placas de baja adherencia (Merck, Kenilworth, Nueva Jersey) y se incubaron durante 7 días a 37°C y 5% de CO₂. Durante este periodo se hizo la revisión diaria de las células para poder observar los cambios morfológicos de los MN a MDM y el medio de cultivo se reemplazó dos veces durante este periodo.

5.9 Ensayos de infección de macrófagos derivados de monocitos con *Mycobacterium tuberculosis*

Para estos ensayos de infección, el medio de los MDM fue reemplazado por medio infectante fresco (Medio RPMI suplementado con 10% de suero humano sin descomplementar). Por otra parte, se disgregaron las *M. tuberculosis* H37Ra (teñidas con DAF), pasando la suspensión de micobacterias 10 veces por una jeringa de 1 ml de 29 G x 13 mm. Posteriormente, se centrifugó a 1,000 rpm durante 1 minuto. Se recuperó el sobrenadante donde se encuentra la micobacteria disgregada y se calculó la cantidad de micobacteria que se debía añadir a cada pozo para tener una multiplicidad de infección (MOI) de 5. Se añadió el volumen de la micobacteria a cada pozo dejando 5×10^6 de los MDM como controles negativos. Los MDM se incubaron durante una hora a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de solución de tripsina al 0.05%-EDTA (1x) (Gibco Waltham, Massachusetts) fría para recuperar las células; conforme se fue realizando este paso, se fueron observando en el microscopio para tener la certeza de que no se quedaban MDM adheridos a la placa. Los MDM, se centrifugaron a 1,200 rpm durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 10 ml de solución de lavado para citometría.

5.10 Separación de poblaciones de macrófagos derivados de monocitos y análisis de pureza

Los MDM infectados con *M. tuberculosis*-DAF se adquirieron en el citómetro de flujo FACSAria Fusion (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey) y se separaron las poblaciones de MDM infectados y MDM no infectados utilizando la herramienta de "Sorting".

La estrategia de análisis y selección de las poblaciones fue la siguiente: de la población de los MDM no infectados se hizo el primer dot plot de tamaño (FSC-A) vs. granularidad del área (SSC-A) y se seleccionó la población de MDM.

A partir de esta población de MDM, se hizo una gráfica de *FSC-A* (área) vs. *FSC-H* (altura) para seleccionar las células individuales, después se realizó el histograma de fluorescencia de *Alexa Fluor 488-A (FITC)* vs. *SSC-A* y se estableció la discriminación de la fluorescencia asociada a MDM infectados.

Posteriormente, con la población de MDM infectados, se seleccionó la región de la fluorescencia asociada a *M. tuberculosis (M. tuberculosis-DAF)*. Una vez establecidas todas las poblaciones de interés, MDM infectados y MDM no infectadas, se procedió a separar las poblaciones mediante “sorting”. Las poblaciones separadas se mantuvieron en hielo con la finalidad de preservar su viabilidad y la pureza de ambas poblaciones se determinó una vez concluido el procedimiento de sorting. Para ello se adquirieron 100,000 células en el citómetro, y se observaron las poblaciones de MDM infectados y MDM no infectados en el dot plot correspondiente a la fluorescencia de *Alexa Fluor 488-A (FITC)* vs. *SSC-A*.

5.10.1 Determinación de la pureza por análisis microscópico de las poblaciones separadas

Adicionalmente, se prepararon los frotis de los MDM infectados antes de la separación por sorting y de las poblaciones separadas (MDM infectados y MDM no infectados). Para esto se colocaron 200 µl de cada muestra (120,000 células/frotis), se centrifugaron a 800 rpm durante 2 min en una citocentrífuga CYTOPRO™ (Radnor, Pensilvania) y posteriormente los frotis se fijaron con metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se utilizó un kit de tinción de micobacterias *TB Stain kit™* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey) para la tinción de Kinyoun siguiendo las indicaciones del fabricante. Primero, se adicionó carbolfuchsina hasta cubrir la muestra y se dejó incubando durante 4 minutos a temperatura ambiente y se lavó con agua.

Seguido se agregó la solución decolorante (alcohol-ácido) durante 5 segundos y se lavó con agua. Por último, se agregó el azul de metilo en toda la muestra, para hacer la tinción de contraste durante 1 minuto y finalmente se lavó con agua y se dejó secar.

Todas las preparaciones ya teñidas se montaron con solución de montaje (Merck KGaA™) y se colocó un cubreobjetos para preservar las laminillas. Se observaron al microscopio con aceite de inmersión y objetivo 100X con la finalidad de observar que las dos poblaciones separadas (MDM infectados y MDM no infectados) estuvieran acordes con los datos de pureza registrados en el análisis por citometría de flujo.

5.11 Extracción de RNA total

A partir de las poblaciones separadas (MDM infectados y MDM no infectados) se realizó la extracción de RNA. La purificación del RNA total se realizó por columna utilizando *RNeasy* mini kit (QIAGEN, Venlo, Países Bajos), siguiendo las indicaciones del fabricante. Ambas poblaciones, se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos a 4°C y posteriormente se eliminó el sobrenadante.

Las células se lisaron con 350 µl del amortiguador RLT (tampón de lisis celular) se homogenizó con ayuda de un vórtex y se agregaron 350 µl de etanol al 70%. Se transfirieron los 700 µl de la muestra a la columna y se centrifugo a 12,000 rpm durante 20 segundos a temperatura ambiente en una microcentrífuga (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Después se adicionaron 700 µl de amortiguador RW1 en la columna y se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 segundos a temperatura ambiente. Para eliminar el DNA que posiblemente estaba contaminando en el RNA, se agregaron 80 µl de DNAsa I directamente sobre la membrana de la columna y se incubo durante 15 min a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, se adicionaron 350 μ l de amortiguador RW1 a la columna y seguido se centrifugo a 12,000 rpm durante 20 segundos a temperatura ambiente desechando el residuo del tubo colector. Posteriormente, se adicionaron 500 μ l de amortiguador RPE en la columna y se centrifugo a 12,000 rpm durante 20 segundos a temperatura ambiente y este paso se repitió solo que al final se centrifugó durante 2 min con el fin de eliminar el exceso de buffer RPE. La columna se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se adicionaron 20 μ l de agua libre de RNAsa directamente en la columna para eluir el RNA y se dejó incubando durante 1 min, seguido de una centrifugación a 8,000 rpm. Este paso se repitió una vez más para tener un volumen final de 40 μ l.

5.12 Análisis de pureza e integridad de RNA total purificado

Para hacer el análisis de expresión de genes, se requiere de RNA con integridad aceptable (RIN 7 o mayor), por lo tanto, se procedió a determinar la concentración, pureza e integridad de las muestras provenientes de las poblaciones separadas (MDM infectados y MDM no infectados). Para cuantificar y evaluar la pureza del RNA se utilizó un espectrofotómetro de UV visible de espectro completo, NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Inicialmente se limpió la superficie del equipo donde se coloca la muestra con agua destilada, posteriormente se pipeteo 1 μ l de agua y se hizo la lectura como el blanco del equipo, y una vez que el valor fue 0, se pipeteo 1 μ l del RNA purificado haciendo la medición a 260 nm/280 nm utilizando el software del equipo.

Al terminar el proceso de cuantificación, se limpió la superficie y se prosiguió al análisis de la segunda muestra. De este análisis se tuvo la información de la concentración en ng/ μ l y la pureza de las muestras.

Para evaluar la integridad del RNA, las muestras se analizaron en el Bioanalyzer 2000 (Agilent, Santa Clara, California) cuyo análisis se basa en una electroforesis automatizada de alta resolución de muestras de DNA, RNA y proteínas en un chip de microfluidos específico.

Los datos se obtienen a partir de un electroferograma donde se analizan las fracciones correspondientes a los RNA ribosómico 18S y 28S para cada muestra. El equipo proporciona un número de integridad de RNA (*RNA Integrity Number, RIN*) en un rango del 1 a 10, donde un valor de 10 significa que la muestra de RNA está íntegra, mientras que a valores bajos indican que la muestra de RNA está degradada.

5.13 Síntesis del *cDNA*

Se usó el kit *RT² First Strand* (QIAGENTM, Venlo, Países Bajos) para la síntesis del *cDNA* siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero, se preparó la mezcla para eliminar el DNA genómico. En un tubo se adicionó el RNA, 2 µl de amortiguador GE y agua libre de RNasa para completar un volumen final de 10 µl. Posteriormente se incubó durante 5 min a 42°C y posteriormente se colocó 1 minuto en hielo. Por otra parte, se preparó la mezcla para la transcripción reversa para un volumen final de 10 µl (4 µl de amortiguador BC3 al 5X, 1 µl de Control P2, 2 µl de RE3 mezcla de transcripción reversa y 3 µl de agua libre de RNAsas). A cada tubo se agregaron 10 µl de la mezcla para eliminar DNA genómico y 10 µl de la mezcla para la transcripción reversa. Se mezcló suavemente con la pipeta y se incubó durante 15 minutos a 42°C y después 5 minutos a 95°C. Finalmente, se adicionaron 91 µl de agua libre de RNasa, se mezcló y se almacenó a -20°C.

5.14 Análisis de la expresión de genes relacionados con la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

El análisis de expresión de genes se llevó a cabo utilizando el kit *RT² Profiler PCR Array* (QIAGENTM, Venlo, Países Bajos), para fagocitosis en un arreglo que permitió analizar 84 genes (anexo 1) de las diferentes etapas de la fagocitosis (anexo 2). Este método se basa en la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos y sondas para diferentes genes mediante la técnica de reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Se analizó la muestra de MDM no infectados en una placa y en otra los MDM infectados.

En un tubo de 5 ml, se adicionaron 102 µl de *cDNA* de cada una de las muestras, 1,350 µl de *2x RT² SYBR Green Master Mix* y 1,248 µl de agua libre de RNasa, se mezcló y se centrifugó. Posteriormente, se adicionaron 25 µl/pozo en la placa. La placa se selló con el adhesivo óptico y se centrifugo durante 1 min a 100 g a 25°C para remover las burbujas.

Por último, se colocó en el equipo *Step OneTM Plus* (Applied Biosystems, Bedford, Massachusetts) para llevar a cabo la amplificación. Esta se llevó bajo el siguiente protocolo: 1 ciclo a 95°C durante 10 min y 40 ciclos, 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 minuto. Los datos fueron colectados a través del software del equipo *Step OneTM Plus*, donde se obtuvieron los valores del umbral de ciclos (Ct) para cada uno de los genes.

5.15 Procesamiento de datos

En el análisis de expresión, los genes con valores de Ct por debajo del límite de detección (Ct > 35) en más del 60% de las muestras, se consideraron no expresados en todo el conjunto y se descartaron del análisis. A continuación, los valores de Ct se normalizaron restando la media geométrica de los 5 genes de control incluidos en la matriz (es decir, *ACTB*, *B2M*, *HPRT1*, *GAPDH*, *RPLP0*) y las diferencias de expresión génica se determinaron mediante una prueba t de dos colas.

Mientras que en el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes se realizó utilizando la interfaz R de la herramienta Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), para determinar los procesos biológicos que están sobre representados dentro de la lista de genes expresados diferencialmente. La base de datos de la Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (KEGG) (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), disponible en Enrichr, fue consultada para este propósito. Se seleccionaron procesos significativamente enriquecidos con un valor $p < 0.05$.

5.16 Análisis estadístico

Los datos referentes a la población de estudio se reportan en porcentajes, mediana con rangos, mientras que la pureza de la población de MN, pureza de las poblaciones separadas (MDM infectados y MDM no infectados), número de células separadas por sorting, el porcentaje (%) de infección, la concentración de RNA (ng/ μ l) y el número RIN se reportan en sus respectivas tablas con la media y la desviación estándar (DE).

6. Resultados

6.1 Características de los donadores de quienes se obtuvieron las poblaciones de monocitos para el estudio

Se estudiaron las células donadas por 3 mujeres y 2 hombres (voluntarios sanos), a quienes se les hicieron análisis de laboratorio en el INER, biometría hemática y química sanguínea. Los resultados obtenidos de los exámenes de laboratorio se encuentran resumidos en la tabla 1. Los parámetros evaluados para los 5 voluntarios se encuentran dentro del rango de referencia, los cuales son: 74-106 mg/dl para glucosa, 11.5-17 gr/dl en hemoglobina, 0.7-1.2 mg/dl en creatinina sérica y 0.2-1.0 $10^3/\text{mm}^3$ en monocitos, además de que todos cuentan con un cuadro de inmunización completa.

Tabla 1. Características de los individuos donadores de quienes se obtuvieron las poblaciones de monocitos para el estudio

<i>Variable</i>	<i>Características</i>
<i>N</i>	5
<i>Sexo</i>	
Femenino (%)	3 (60)
Masculino (%)	2 (40)
<i>Edad (años)</i>	30.8 (23-55)
<i>Datos clínicos</i>	
Glucosa (mg/dl)	94.8 (90.0-106.0)
Hemoglobina (gr/dl)	15.46 (14.1-15.7)
Creatinina sérica (mg/dl)	0.76 (0.61-0.89)
Monocitos ($10^3/\text{mm}^3$)	0.4 (0.3-0.5)

Mediana (rangos).

6.2 Pureza de la población de monocitos

6.2.1 Por citometría de flujo

Se evaluó la pureza de los MN mediante citometría de flujo para verificar que la separación fue correcta. En la figura 9, se muestran seis gráficos, los cuales resumen la estrategia para determinar la pureza de los MN. En el primer gráfico se observó el tamaño y la granularidad de las células antes de su purificación para seleccionar la población de MN (*SSC-A vs. FSC-A*); en el segundo gráfico se seleccionaron los MN individuales a partir del dot plot del tamaño (*SSC-H vs. SSC*), en el tercer gráfico, se verificó que solo la población de MN estaba seleccionada (*SSC-A vs. FSC-A*), en el cuarto gráfico se puede observar la autofluorescencia de los MN (*SSC-A vs. CD14 PE-A*) y se delimitó la zona de la fluorescencia para MN-CD14 negativos (zona roja) y MN-CD14 positivos (zona verde), en el quinto gráfico se pueden observar los MN-CD14 positivos (*SSC-A vs. CD14 PE-A*) y por último en el sexto gráfico, se pueden observar los histogramas tanto para MN-CD14 negativos como positivos (*Count vs. CD14 PE-A*).

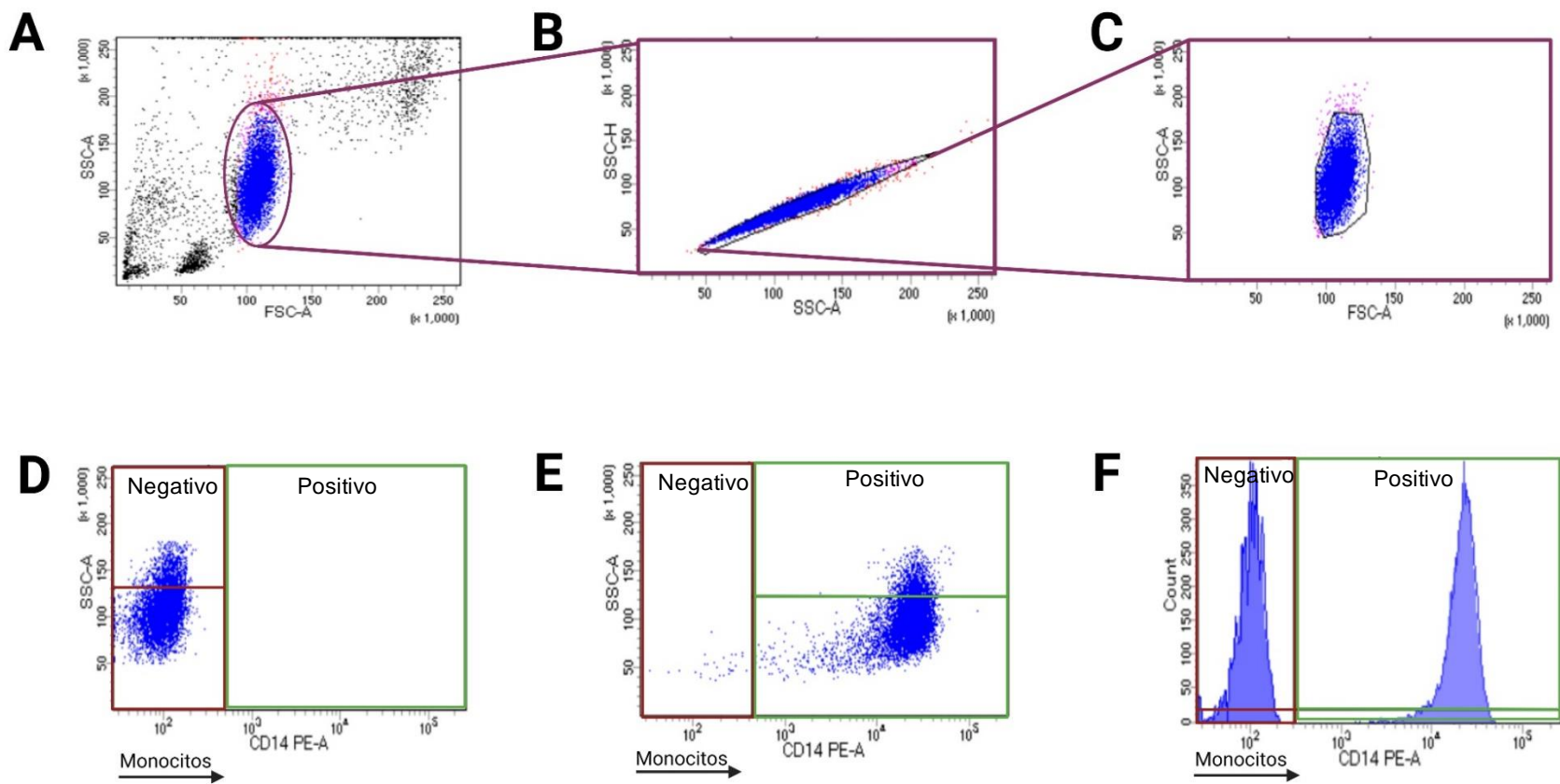


Figura 9. Estrategia para determinar la pureza de MN

A) Población celular antes de la purificación, B) MN individuales, C) población de MN, D) autofluorescencia de MN-CD14 negativos, E) fluorescencia de MN-CD14 positivos e F) histograma de MN-CD14 negativos y positivos.

Los porcentajes de pureza de la población de MN, se pueden observar en la tabla 2, teniendo un promedio en porcentajes de pureza de 96.74% y un promedio de 3.22% de linfocitos.

Tabla 2. Pureza de la población MN

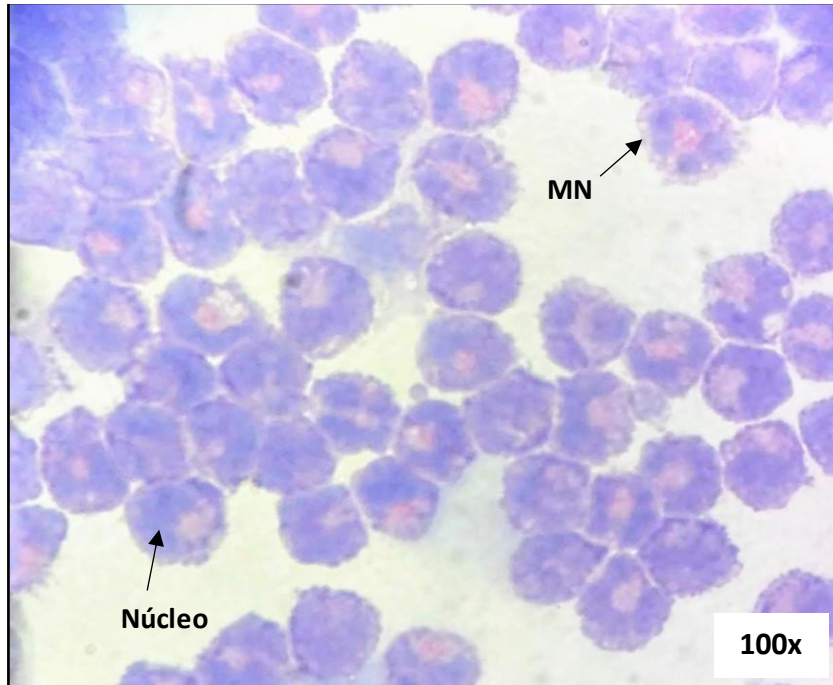
Variable	Pureza	
	Monocitos (%)	Linfocitos (%)
Experimento		
1	97.4	2.6
2	99.2	0.8
3	98.6	1.4
4	91.0	9.0
5	97.5	2.5
Media ± DE	96.74 ± 3.30	3.22 ± 3.29

6.2.2 Por tinción celular

Los frotis con MN purificados fueron teñidos con *Wright* y se analizaron en el microscopio óptico con un objetivo de 100x lo que nos permitió caracterizar las poblaciones celulares por su morfología. En la figura 10, se puede observar una población enriquecida de MN, sin embargo, también se observaron linfocitos.

Adicionalmente, se puede observar la morfología celular, que en el caso de los MN se aprecia una circunferencia definida y el núcleo de forma arriñonada que abarca gran espacio en la célula; en el caso de los linfocitos, su tamaño es relativamente mucho más pequeño en comparación a los MN, con un núcleo redondo que corresponde a más del 90% del tamaño de la célula, haciendo notar solo un círculo de color morado.

A



B

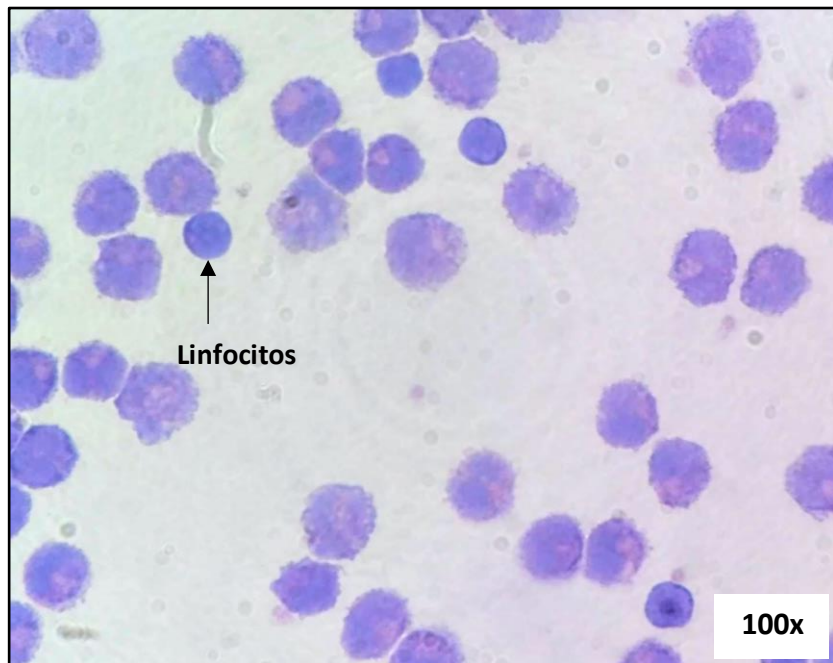


Figura 10. Población de los MN purificados

A) Población enriquecida de MN, **B)** presencia de linfocitos en la población de MN.

6.3 Macrófagos derivados de monocitos

Los MDM se observaron con los frotis teñidos con Kinyoun en el microscopio con un objetivo de 100 X, donde fue evidente el cambio morfológico de las células como se puede notar en la figura 11, estas células son de mayor tamaño mostrando un núcleo con morfología redonda y no arriñonada a diferencia de los MN.

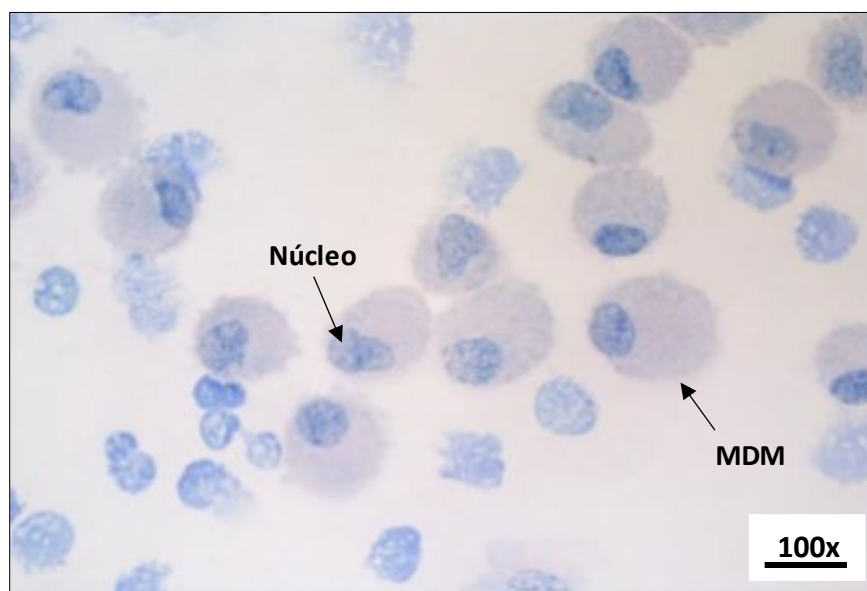


Figura 11. Población de MDM

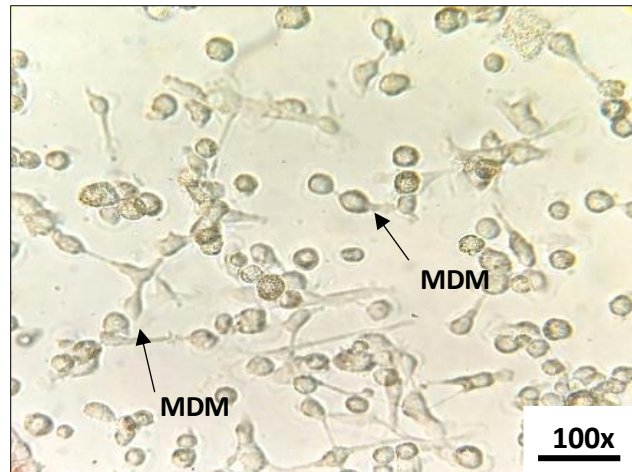
Población enriquecida de MDM cultivados durante 7 días.

6.4 Infección con *Mycobacterium tuberculosis*

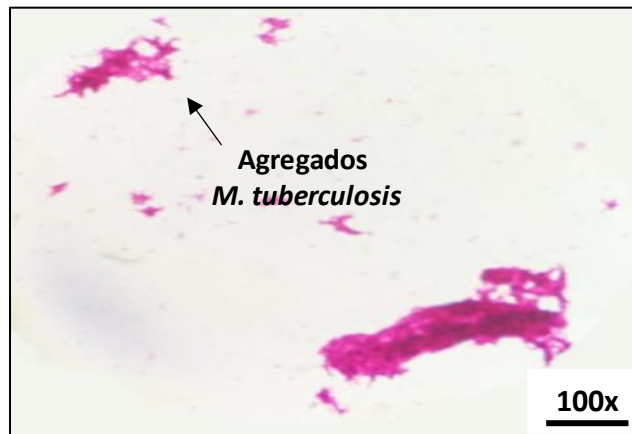
Para estudiar el efecto que causa la fagocitosis de *M. tuberculosis*-DAF en la respuesta de los MDM se hicieron los ensayos de infección. En este procedimiento, fue importante revisar las células antes de la infección para observar la diferenciación celular de MN a MDM. Como se muestra en la figura 12 A, existen monocitos diferenciados a macrófagos con sus prolongaciones características, además es evidente el cambio en cuanto al tamaño y su forma circular.

Para el procedimiento de infección, se disgregó a la micobacteria con la finalidad de promover la fagocitosis de micobacterias individuales debido a que *M. tuberculosis-DAF* tiende a formar agregados. Como se puede observar en la figura 12 B, las micobacterias se encontraban en agregados micobacterianos de gran tamaño que al compararlas en la figura 12 C, ya las micobacterias se muestran disgregadas y se pueden observar a las micobacterias individuales.

A



B



C



Figura 12. Morfología de MDM y *M. tuberculosis*

A) Monocitos diferenciados a macrófagos en placas de cultivo de baja adherencia, **B)** *M. tuberculosis*-DAF en la formación de agregados de micobacterias, **C)** *M. tuberculosis*-DAF disgregada antes de la infección a MDM.

6.5 Estrategia de separación de las poblaciones de macrófagos derivados de monocitos infectados y no infectadas por el método de sorting

Se evaluó la pureza de los MDM mediante citometría de flujo. En la figura 13, se muestran cuatro gráficos, los cuales resumen la estrategia para determinar la pureza de los MDM tanto infectados como no infectados. En el primer gráfico se observó el tamaño y la granularidad de las células antes de su purificación para seleccionar la población de MDM (SSC-A vs. FSC-A); en el segundo gráfico se seleccionó el área de los MDM tanto infectados como no infectados a partir del dot plot de la fluorescencia de *M. tuberculosis*-DAF (Alexa fluor 488 vs. SSC) además, se puede observar su histograma correspondiente donde se nota la fluorescencia de las dos poblaciones, en el tercer gráfico, se verificó solo la población de MDM no infectados (Alexa fluor 488 vs. SSC) y su correspondiente histograma y, por último, en el cuarto gráfico se verificó solo a la población de MDM no infectados (Alexa fluor 488 vs. SSC) y su histograma correspondiente.

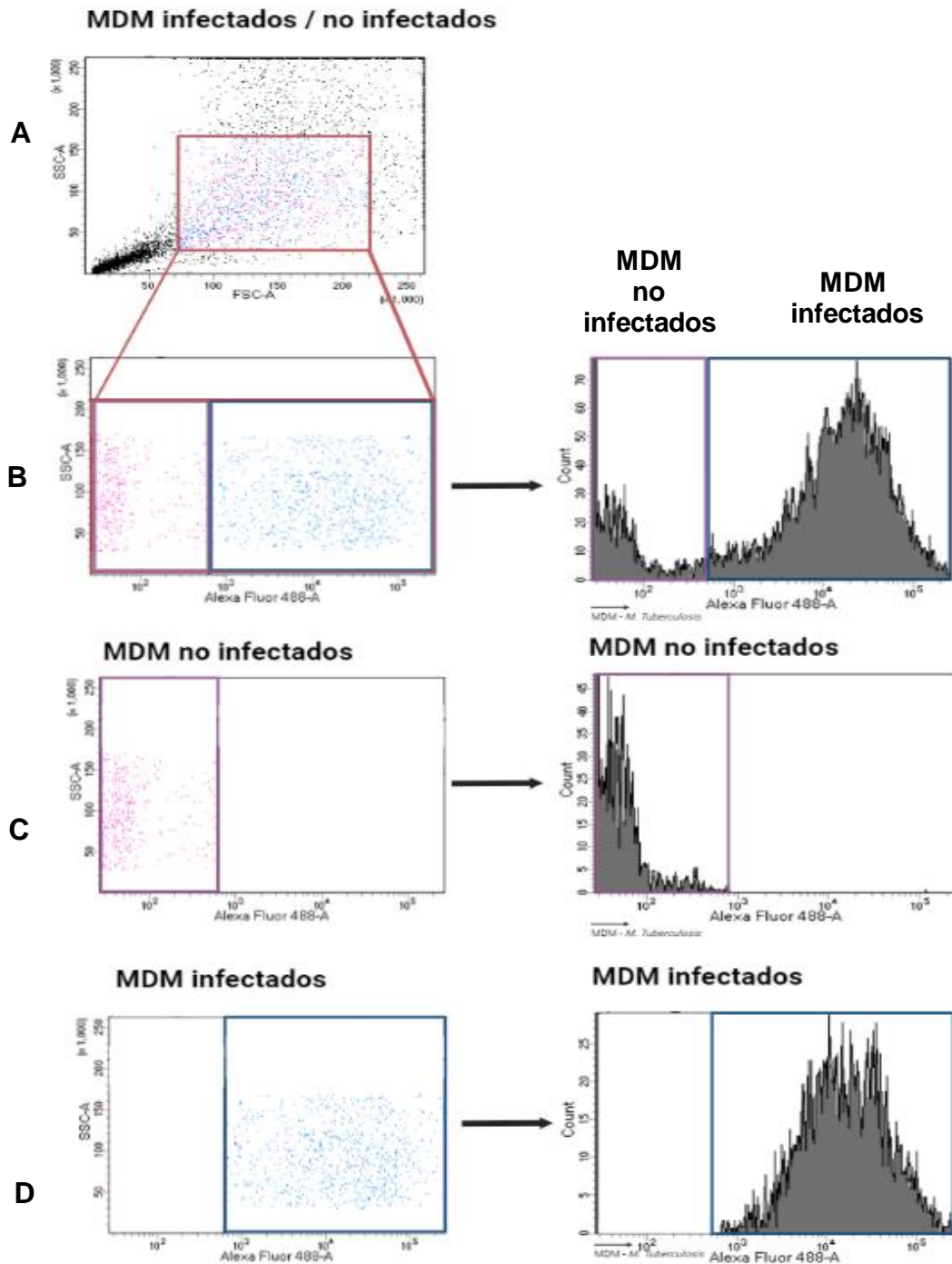


Figura 13. Estrategia de análisis de fagocitosis de *M. tuberculosis*-DAF por citometría de flujo

A) Selección de la población de MDM infectados y no infectados, **B)** selección regiones tanto MDM infectados y no infectados de acuerdo con la intensidad de fluorescencia (*Alexa Fluor 488*) relacionada con *M. tuberculosis*-DAF y su histograma correspondiente, **C)** pureza de la población de MDM no infectados en donde se puede observar que no existe intensidad de fluorescencia de acuerdo a su histograma, **D)** pureza de la población de MDM infectados en donde se puede observar que hay presencia de fluorescencia de acuerdo a su histograma.

6.6 Pureza de la población de macrófagos derivados de monocitos

En este paso fue importante conocer la pureza de las poblaciones separadas de macrófagos infectados y no infectados, ya que a partir de las poblaciones se haría el análisis de los genes implicados en la fagocitosis de *M. tuberculosis*. La pureza de las poblaciones separadas se analizó en el citómetro de flujo y de cada una de ellas se preparó un frotis para posteriormente hacer la tinción de Kinyoun, los resultados se resumen en la tabla 3, donde puede observarse que la población de MDM infectados tuvo una media de pureza del 89.6 % y los MDM no infectados de 95.1%.

Tabla 3. Pureza de las poblaciones separadas (MDM infectados y MDM no infectados)

Variable	Pureza (%)	
	MDM infectados	MDM no infectados
Experimento		
1	98.5	98.7
2	85.6	89.5
3	87.8	99.9
4	95.4	99.9
5	80.9	87.5
Media ± DE	89.6 ± 7.2	95.1 ± 6.1

De igual forma se conoció el porcentaje de infección en cada experimento los cuales se encuentran en la tabla 4 donde se puede observar el promedio de 46.7% de infección.

Tabla 4. Porcentaje de infección de los MDM logrado en cada experimento

Variable	Infección (%)	
	MDM infectados	MDM no infectados
Experimento		
1	62.6	37.4
2	61.0	39.0
3	44.2	55.8
4	42.1	57.8
5	23.8	76.3
Media ± DE	46.7 ± 15.9	53.3 ± 15.9

Se analizaron las poblaciones separadas (MDM infectados y MDM no infectados) mediante un frotis con tinción de Kinyoun, las cuales se analizaron al microscopio. En la figura 14, se muestran la imagen de los MDM infectados antes de la separación por *sorting* donde se pueden observar MDM que tienen internalizados agregados de micobacterias y MDM sin micobacterias. De igual forma en la figura 15 A y 15 B, se observan las dos poblaciones separadas.

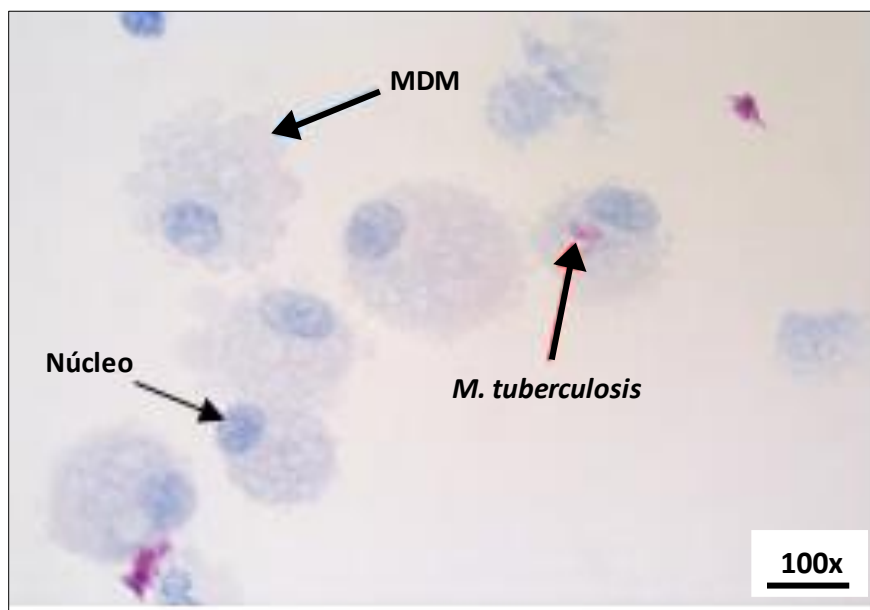


Figura 14. MDM en el proceso de infección
MDM infectados con *M. tuberculosis* antes del método de *sorting*.

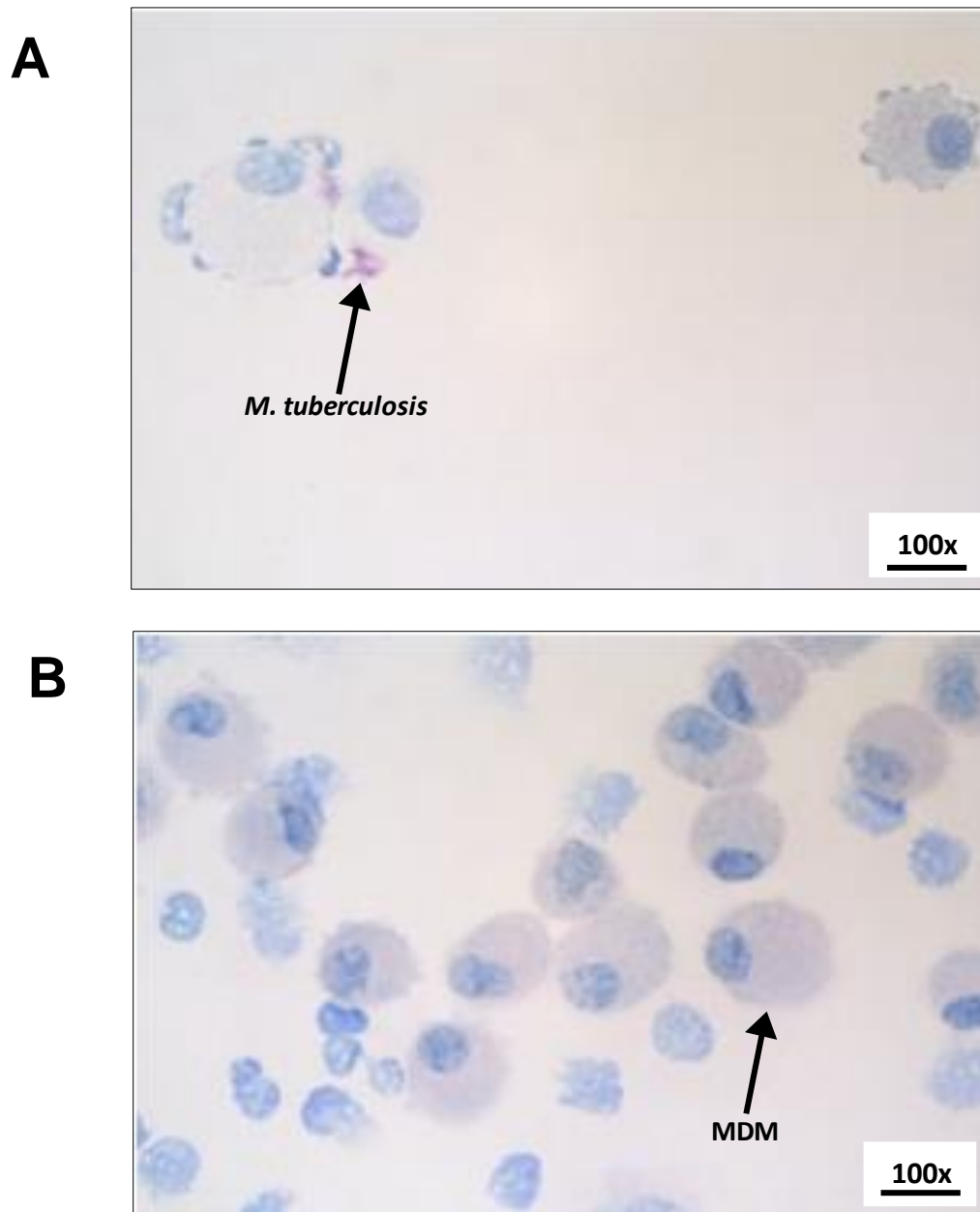


Figura 15. MDM después del proceso de infección

A) MDM infectados después del método por *sorting*, **B)** MDM no infectados después del método por *sorting*.

6.7 Concentración de RNA

Las poblaciones celulares se utilizaron para hacer la extracción de RNA y se determinó la concentración para cada experimento que fue dependiendo del número de MDM separados. Como se puede observar en la tabla 5, la media del número de células de MDM infectados fue de 195,780 y de MDM no infectados fue de 199,398 MDM. Mientras que en la tabla 6, se muestra la concentración de RNA de cada una de las poblaciones con una media de 37.9 ng/μl en el caso de MDM infectados y 28.1 ng/μl para MDM no infectados.

Tabla 5. Número de MDM separadas por el método de *sorting*

Variable	Número de células separadas	
	MDM infectados	MDM no infectados
Experimento		
1	215,879	126,952
2	166,370	106,252
3	98,707	89,749
4	194,904	280,938
5	303,137	393,102
Media ± DE	195,74,529 ± 74,529	199,398 ± 132,398

Tabla 6. Concentración de RNA

Variable	RNA (ng/ μl)	
	MDM infectados	MDM no infectados
Experimento		
1	97.0	55.5
2	11.5	10.4
3	35.8	23.1
4	16.1	20.7
5	28.9	30.6
Media ± DE	37.9 ± 34.5	28.1 ± 16.96

6.8 Integridad de RNA

Se evaluó la integridad del RNA ya que es un requerimiento para el análisis de expresión génica, y se recomienda que se obtenga un RIN (*RNA integrity number*) mayor o igual a 7; en este contexto todas las muestras cumplen con lo requerido como puede observarse en la tabla 7, mostrando una media de 8.5 MDM no infectados y 8.8 para MDM infectados.

Tabla 7. Valor de RIN de las muestras de RNA

Variable	RIN	
	MDM infectados	MDM no infectados
Experimento		
1	9.1	9.2
2	9.3	8.8
3	8.2	8.0
4	8.0	7.6
5	9.0	8.6
Media ± DE	8.8 ± 0.6	8.5 ± 0.6

En la figura 16, se muestra un electroferograma representativo de una muestra de MDM no infectados con un RIN de 9.2 una banda adicional bien definida lo cual indica que la muestra no se encuentra degradada.

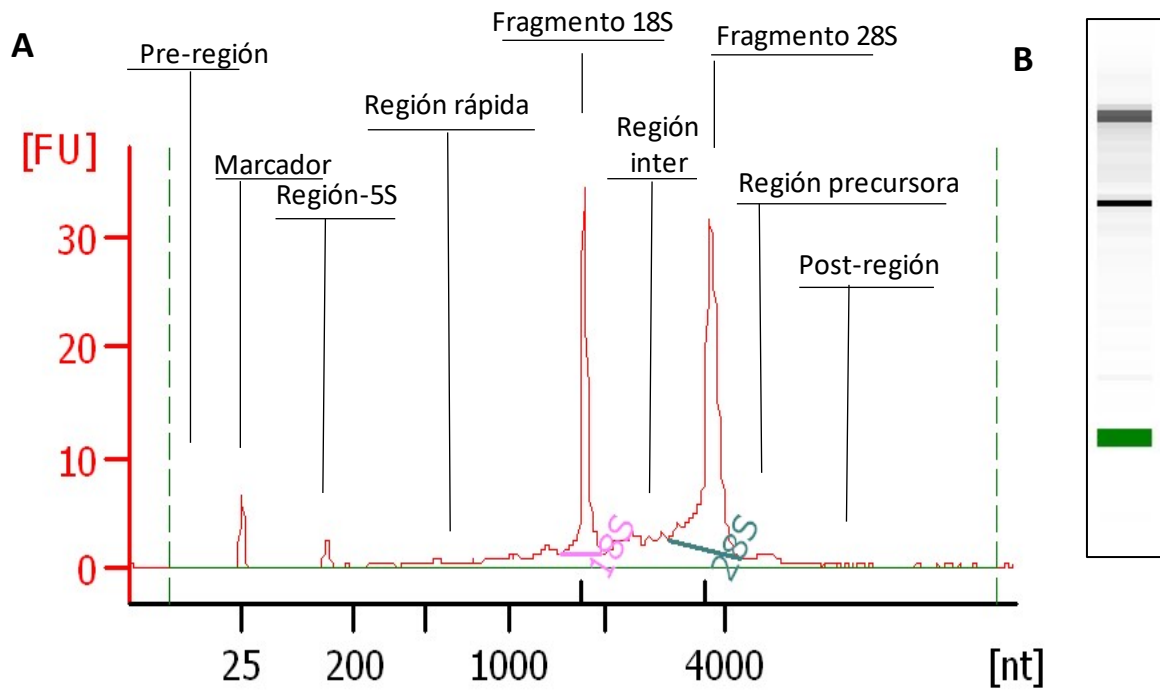


Figura 16. Integridad del RNA

A) Imagen representativa de las muestras MDM no infectados donde se puede observar las regiones tanto 18S como 28S con picos bien definidos lo cual nos indica que la muestra no presenta una degradación, **B)** Gel representativo de la muestra donde se puede observar solo una banda que representa un RIN DE 9.2.

6.9 Análisis de la expresión génica

Se identificaron 14 genes que presentan cambios en su expresión entre las muestras infectadas por *M. tuberculosis* y las muestras control: de estos 6 están regulados a la baja (*SFTPD*, *PRKCE*, *FYN*, *DOCK1*, *CR3*, *CR1*) y 8 regulados al alza (*COLEC12*, *FCGR1A*, *SICLEC1RAPGEP3*, *IL1RL1*, *CSF2*, *TNFSF11*, *AXL*), en la tabla 8, se pueden observar los procesos biológicos principales para cada gen.

Tabla 8. Procesos biológicos principales de los genes con cambios en su expresión

Genes regulados a la baja	
Proceso biológico	Genes
Vía de señalización del receptor Fc-gamma involucrada en la fagocitosis	<i>DOCK1, FYN, PRKCE</i>
Vía de señalización del receptor de superficie celular que activa la respuesta inmunitaria	<i>FYN, DOCK1, PRKCE, CR1</i>
Regulación de la activación de células T	<i>FYN, SFTPD, CR1</i>
Regulación de la respuesta inmune	<i>FYN, DOCK1, PRKCE, SFTPD, CR1</i>
Genes regulados al alza	
Proceso biológico	Genes
Respuesta celular al estímulo de citoquinas	<i>FCGR1A, IL1RL1, CSF2, AXL, TNFSF11</i>
Regulación positiva de la fosforilación	<i>FCGR1A, CSF2, AXL, TNGSF11, RAPGEF3</i>
Regulación de la respuesta inmune	<i>FCGR1A, IL1RL1, AXL, COLEC12, RAPGEF3</i>

Como se puede observar en la figura 17, el mapa del perfil de expresión génica (mapa de calor) nos indica los cambios en cuanto la expresión de los genes.

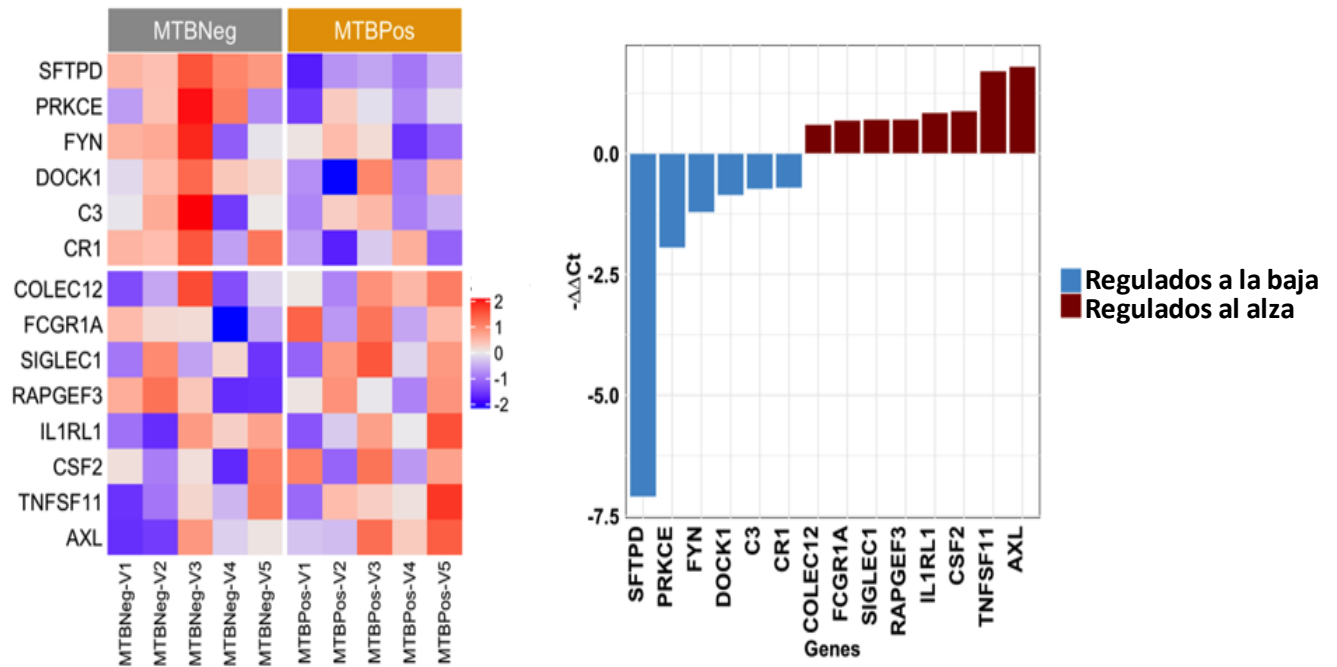


Figura 17. Genes con un cambio en la expresión

A) En el campo de calor se puede observar de una forma más extensa el cambio en cuanto a la expresión de los genes que se obtuvo en los MDM infectados vs los MDM no infectados, **B)** Grafica de los genes que mostraron expresión diferencial.

Para obtener más conocimiento sobre las funciones celulares y moleculares de los genes con expresión diferencial, se realizó un análisis de enriquecimiento del conjunto de genes a través de una base de genes. En particular, los procesos involucrados en la respuesta inmune del patógeno, incluida la respuesta a la TB y la fagocitosis, están significativamente enriquecidos en genes regulados a la baja. En contraste, entre los términos enriquecidos en genes regulados al alza se encuentran interacciones citocinas-receptor, actividad fagosómica y linaje celular hematopoyético.

7. Discusión

Respecto del modelo de infección de MDM los resultados mostraron que a pesar de ser consideradas células fagocíticas profesionales, no existe un 100% de infección aun estando en presencia de una gran cantidad de micobacterias (MOI=5). Probablemente esto se debe a que la población de MDM es heterogénea y existen diferentes fenotipos de MDM (M1 o M2) con funciones diferentes entre ellos y diferente capacidad de fagocitosis (49). De igual forma es importante resaltar que en el modelo que se estudian poblaciones celulares definidas, y que, en muchas ocasiones al estudiar la expresión génica en diferentes enfermedades, no necesariamente en TB, se analizan todas las células, por ejemplo, en un lavado bronco-alveolar (50), normalmente se hace la extracción del RNA de toda la muestra. Sin embargo, en la actualidad este método de estudio donde existen poblaciones definidas se está comenzando a utilizar para tener un enfoque más claro. Actualmente, se están estudiando bajo métodos de investigación innovadores la relevancia de células importantes en la TB latente como son las células T CD4+ (51), sin embargo esta técnica en la cual utiliza anticuerpos magnetizados (*EasySep*) para tener de igual forma una población definida de células T CD4+ de lavados bronco-alveolares de pacientes con infección de TB latente y matrices *Affymetrix GeneChip* para estudiar la expresión génica, necesitan un incremento en los recursos económicos destinados al estudio (52).

Durante la infección por *M. tuberculosis*, la micobacteria utiliza diversas estrategias para eludir o evadir la inmunidad innata del hospedero. Por el contrario, el hospedero tiene múltiples cascadas de señalización para iniciar una gran variedad de funciones de defensa respecto a la inmunidad innata (53).

En estudios se ha identificado que LAM de *M. tuberculosis*, actúa como modulador del sistema inmunitario del hospedero y que los patógenos tienen efectos sobre la maduración de las CD y las respuestas de las citocinas del hospedero según la concentración de LAM (54), además, se ha estudiado que los polimorfismos genéticos en los TLR derivados del hospedero se asociaron con la susceptibilidad a la TB (55, 56).

Genes involucrados en el reconocimiento de *M. tuberculosis*

Se sabe que un paso importante para dar inicio al proceso de fagocitosis es el reconocimiento, opsonización e internalización de la micobacteria, donde los genes que participan en este proceso incluyen: *COLEC-12*, el receptor *Fc (FcGR1A)*, *CR1*, *DOCK1*, *PRKCE* y *SFTPD*. Dentro de estos genes, los que tienen una expresión aumentada son *COLEC-12* y el receptor *Fc (FcGR1A)*. Dichos genes, tienen varias funciones asociadas con la defensa del hospedero ya que promueven la unión y fagocitosis de bacterias y levaduras, iniciando la fagocitosis, sin embargo, son dependientes de opsoninas, es decir, necesitan de un recubrimiento previo del patógeno para poder llevar a cabo el proceso de fagocitosis por lo que tener un ambiente donde puedan existir dichas opsoninas, hace que estas vías se vean favorecidas (57).

El proceso de fagocitosis por el receptor *Fc (FCGR1A)* está mediado por IgG, por lo cual se podría considerar una exposición previa a *M. tuberculosis* para que esta pudiera ser fagocitada a través de estos receptores. En los neutrófilos de pacientes con TB pulmonar la infección con *M. tuberculosis* causa el aumento del *FCGR1A* en comparación con personas sanas, implicando que hay un reconocimiento y generación de una respuesta inmune rápida por este tipo de células, además, podemos observar que la respuesta del hospedero al incrementar genes como *COLEC-12* y *Fc*, ayudan en la defensa de este para poder fagocitar a *M. tuberculosis* (57).

COLEC-12 es una lectina de tipo C y se expresa principalmente no solo en las células endoteliales, sino también en algunos fagocitos (58, 59). Datos recientes han demostrado que algunos de los receptores depuradores específicos de macrófagos, por ejemplo, CD163 y el receptor MR, CD206, se pueden encontrar como proteínas solubles durante la inflamación y por activación de macrófagos (60, 61) esto debido a al contacto de los macrófagos con bacterias y hongos, promoviendo la fagocitosis de patógenos como *S. aureus* (62), *C. albicans* y *A. fumigatus* (63). Estas observaciones implican que pueden generarse los receptores solubles en determinadas condiciones, además, se ha demostrado previamente la generación de *COLEC-12* soluble a partir de la unión a células (64) la cual conserva la capacidad de reconocer ciertos patógenos fúngicos como *A. fumigatus*, *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor circinelloides* (65).

Por lo que la forma de *COLEC-12* soluble, podría ayudar a la fagocitosis de la micobacteria o trabajar sinérgicamente con C3 en una deposición inicial para comenzar la activación de la vía alternativa del complemento (66). Sin embargo, existen genes desregulados en los receptores de complemento como *CR1* y *C3* lo que nos puede indicar que el proceso para iniciar la fagocitosis a través del sistema de complemento no se llevan a cabo con eficiencia y esto puede ayudar a que la micobacteria sea internalizada a través de estos receptores para poder vivir dentro de la célula y pueda utilizar esto como un mecanismo de evasión del sistema inmune, es decir, puede estar aprovechando la vía más fácil que tiene el hospedero para poder ingresar a los macrófagos ya que, *M. tuberculosis* puede evitar la mayoría de los efectos antibacterianos que están mediados por anticuerpos al vivir y crecer dentro de los macrófagos (67, 68). Además, existe una desregulación de los genes *DOCK1* y *PRKCE*, los cuales están implicados en la respuesta que se da después de ser opsonizada la micobacteria a través de los receptores Fc por IgG con el fin de fagocitarla, es decir, la micobacteria pudiera detener dicho proceso una vez que se opsoniza con el fin de poder persistir en el huésped (69).

Dentro de los genes desregulados existen más vías de reconocimiento que están alteradas como el gen *SFTPD*. En algunos estudios se ha observado que la disminución en la capacidad de unión de *SFTPD* a *M. tuberculosis* puede aumentar la susceptibilidad a la TB (70). Además, *SFTPD* media la interacción de *M. tuberculosis* con los macrófagos a partir de TLR2 y a pesar de que una interacción continua con la vía de TLR2 puede ser ventajosa para *M. tuberculosis*, ya que se ha estudiado que puede inhibir la expresión del complejo MHC-II y la presentación de antígenos a las células T CD8, esta desregulación del gen *SFTPD* le impide al hospedero iniciar una respuesta inflamatoria a través de NF-κB lo que podría provocar una reacción exacerbada por las citocinas inflamatorias como un daño tisular que puede finalizar con la micobacteria (71), además, se han identificado en estudios mutaciones en el gen *SFTPC* que se asociaron con enfermedades pulmonares intersticiales (72) y se han identificaron múltiples variantes genéticas en los genes *SFTP* en la TB (73), por lo que se podría estudiar más a fondo dichas variantes para saber si existe una correlación con la desregulación de dicho gen.

Genes implicados en la producción de citocinas inflamatorias

No obstante, aunque la micobacteria llegara a estar internalizada, existen genes como *SIGLEC1* y *IL1RL1* que están regulados al alza, los cuales son genes implicados en la producción de citocinas proinflamatorias (74).

Es importante recordar que la principal respuesta inmunitaria protectora contra las bacterias intracelulares es el reclutamiento y la activación de los fagocitos ocasionando una respuesta inflamatoria a través de la producción de citocinas como TNF-α, IL-1 e IL-6 (75) las cuales son responsables de muchas de las manifestaciones clínicas de la infección, como la fiebre, inflamación y la síntesis de proteínas de fase aguda, en el hígado, lo cual podría estar relacionado con un aumento de las funciones metabólicas de las células inmunitarias, una afección de las funciones metabólicas de los microbios y cambios en el comportamiento del hospedero lo que reducen el riesgo de empeorar las infecciones y la lesión (76).

Sin embargo, también se ha demostrado que en el caso particular de *SIGLEC1*, participa en la presentación de antígenos y en la inducción de respuestas inmunitarias adaptativas (77, 78). Además, se ha demostrado que *SIGLEC1* desempeña un papel importante en la captura e internalización de patógenos mediante la unión a residuos de ácido siálico expresados en la superficie de algunos patógenos importantes como el VIH (79) y el virus del síndrome respiratorio (80). Este aumento en la expresión de dichos genes nos puede indicar que el sistema inmunitario del hospedero está respondiendo frente a la infección por *M. tuberculosis* tratando de fagocitarla, además, esta producción de citocinas estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos en la respuesta inmunitaria, es decir, ayuda a que otras células, comiencen de igual forma a defender al hospedero.

Algo similar pasa con el gen *GM-CSF* que se encuentra sobre expresado, este favorece el desarrollo de macrófagos y granulocitos en su activación y diferenciación, sin embargo, se ha estudiado como un mediador importante en modelos inflamatorios pulmonares y la expresión de TLR4 (81). Es decir, dicho gen no solo tiene la capacidad de aumentar la respuesta inmunitaria del hospedero, sino que también puede alterar el equilibrio de citocinas Th1/Th2 (82). Sin embargo, sería importante estudiar cuál es su papel principal dentro de la infección ya que puede ser una acción inflamatoria dentro del hospedero y a qué tipo de fenotipo puede contribuir en macrófagos. Actualmente, se ha observado que los monocitos que se diferencian mediante *GM-CSF* resultan en la población de macrófagos denominadas M1 y M2 (83).

Estas respuestas donde vemos una alta producción de citocinas inflamatorias, pueden generar importantes lesiones tisulares y enfermedades por lo que es de gran interés como entran en juego diversos mecanismos que tienen como objetivo frenar la inflamación, como es el caso del gen *TNFSF11* que está relacionado con la producción de IL-10, la cual inhibe la producción de varias citocinas inflamatorias como IL-1, TNF- α e IL-12 dando paso a la retroalimentación negativa y dos formas de activación de macrófagos la clásica y la alternativa donde hay mayor producción de IL-10 o como en el caso del gen *AXL* el cual además de mejorar la capacidad fagocítica, puede desencadenar una respuesta antiinflamatorias (84).

Se investigó que interacciones biológicas y celulares estaban siendo afectadas por la infección de *M. tuberculosis*, por lo que se construyó una red de interacción con los genes que presentaron una expresión diferencial (DEG) y, además, genes suplementarios que podrían formar relaciones con ellos, proporcionándonos un conocimiento más completo de los procesos que se veían modificados.

La red obtenida incorpora 34 nodos asociados a genes (14 correspondientes a DEG y 20 a genes suplementarios), y 69 interacciones o enlaces. Analizando la importancia de los genes en toda la red, se aplicó una medida de centralidad, donde los genes con la puntuación de centralidad más alta resultaron ser *C3* y *FYN* para el conjunto regulado a la baja, y *SFTPD*, *IL1RL1* y *SIGLEC1* para los genes regulados al alza.

Este modelo de red abarca una configuración de diferentes interacciones según la función, es decir, incluye el 41% de las interacciones de co-expresión, el 43% de la interacción física, el 9% de las interacciones de co-localización y el 16% de las interacciones de dominio proteico compartido como se puede observar en la figura 18.

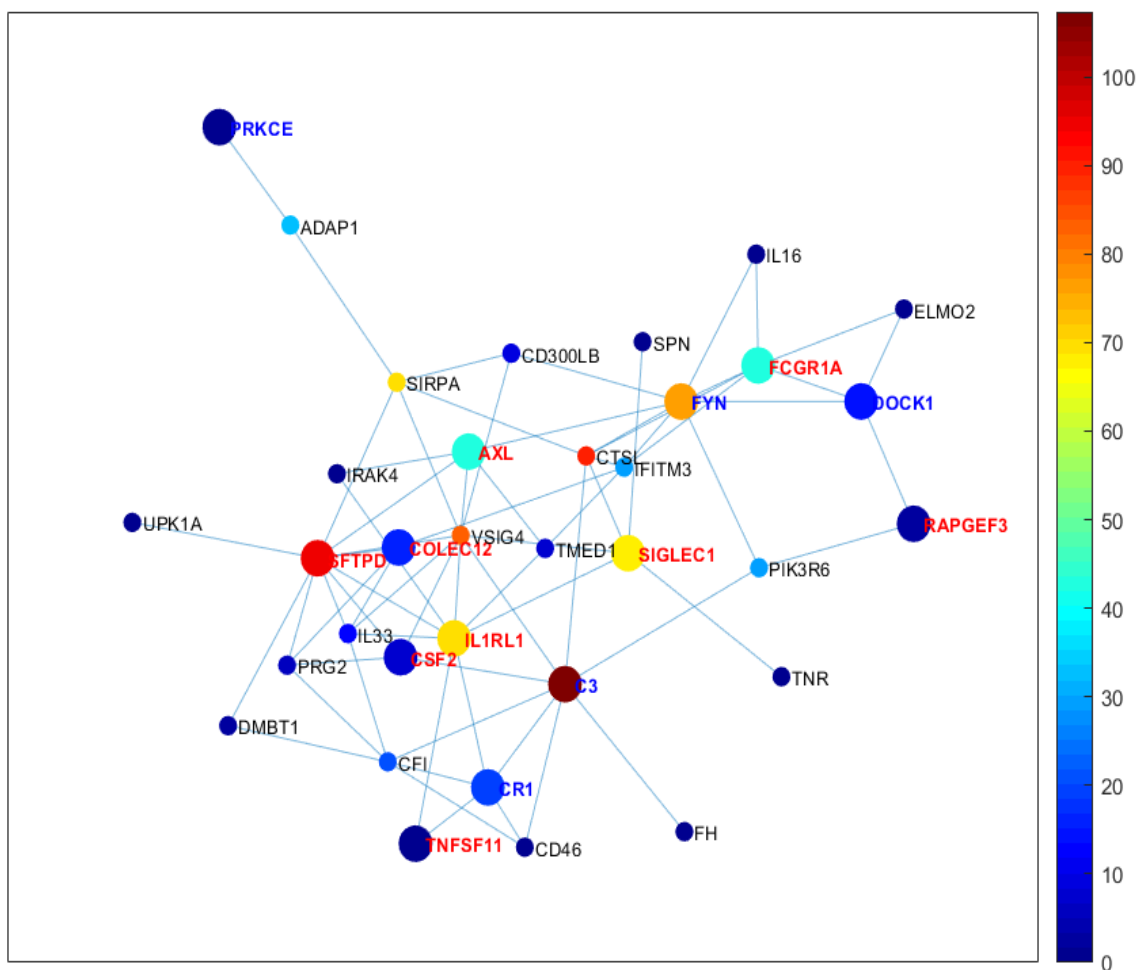


Figura 18. Construcción de red de interacción gen-gen

Los nodos asociados a los genes obtenidos por el análisis de DEG están representados por grandes círculos. Los círculos pequeños corresponden a nodos suplementarios.

8. Conclusiones

- Se purificaron monocitos con gran eficiencia, logrando porcentajes de pureza elevados y se obtuvieron macrófagos derivados de monocitos.
 - Se separaron las poblaciones de MDM infectados y no infectados con *M. tuberculosis* por citometría de flujo con porcentajes de pureza elevados, además se utilizó una técnica eficiente y con costos no elevados, obteniendo un método novedoso que proporcionó material genético suficiente para un estudio genético.
 - Se evaluó el porcentaje de fagocitosis de *M. tuberculosis* por citometría de flujo demostrando que no todas las células pueden fagocitar a la micobacteria.
 - El estudio de la fagocitosis de *M. tuberculosis* por los macrófagos (MDM), nos permitió identificar los genes modificados por la presencia de *M. tuberculosis*, y pone en evidencia el aumento de 8 genes relacionados a la fagocitosis, reconocimiento, maduración fagosomal y traducción de señales. Sin embargo, al mismo tiempo hay disminución en la expresión de 6 genes en la traducción de señales.
- Esto puede reflejar la interacción y competencia entre la respuesta del macrófago para tratar de eliminar a la micobacteria y, por otra parte, la micobacteria trata de resistir y sobrevivir en un ambiente poco favorable dentro del macrófago.

9. Referencias

1. World Health Organization. (n.d.). *Tuberculosis*. World Health Organization. Retrieved April 4, 2023, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.
2. World Health Organization. (n.d.). *Global tuberculosis report 2022*. World Health Organization. Retrieved October 8, 2022, from <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>.
3. Centers for Disease Control and Prevention. (2020, February 13). *Treatment regimens for latent TB infection*. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved May 5, 2023, from <https://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/ltbi.htm>.
4. Cao, B., & Williams, S. (2010). Chemical Approaches for the study of the mycobacterial glycolipids phosphatidylinositol mannosides, Lipomannan and lipoarabinomannan. *Natural Product Reports*, 27(6), 919. <https://doi.org/10.1039/c000604a>.
5. Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs, W. R., Guerin, M. E., & Prados-Rosales, R. (2019). The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: A cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*, 476(14), 1995–2016. <https://doi.org/10.1042/bcj20190324>.
6. Chatterjee, D., & Khoo, K.-H. (1998). Mycobacterial Lipoarabinomannan: An extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*, 8(2), 113–120. <https://doi.org/10.1093/glycob/8.2.113>.
7. Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, L. T., Vollmer, W., Keep, N. H., & Bhakta, S. (2019). Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 548–575. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz016>.
8. Marrakchi, H., Lanéelle, M.-A., & Daffé, M. (2014). Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & Biology*, 21(1), 67–85. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>.

9. Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs, W. R., Guerin, M. E., & Prados-Rosales, R. (2019). The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: A cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*, 476(14), 1995–2016. <https://doi.org/10.1042/bcj20190324>.
10. Norris, B. A., & Ernst, J. D. (2018). Mononuclear cell dynamics in *M. tuberculosis* infection provide opportunities for therapeutic intervention. *PLOS Pathogens*, 14(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007154>.
11. Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>.
12. Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2009). Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrg2703>.
13. Flajnik, M. F. (2018). A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(7), 438–453. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0003-9>.
14. Williams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity*, 49(4), 595–613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>.
15. Turk, J. L. (1994). Almroth Wright - phagocytosis and opsonization. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 87(10), 576–577. <https://doi.org/10.1177/014107689408701002>.
16. Hume, D. A., Irvine, K. M., & Pridans, C. (2019). The mononuclear phagocyte system: The relationship between monocytes and macrophages. *Trends in Immunology*, 40(2), 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.11.007>.
17. Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., & Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 731–744. <https://doi.org/10.1038/nri3920>.

18. Lerner, T. R., Borel, S., & Gutierrez, M. G. (2015). The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular Microbiology*, 17(9), 1277–1285. <https://doi.org/10.1111/cmi.12480>.
19. Pisu, D. (2021). Single cell analysis of *M. tuberculosis* phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *Journal of Experimental Medicine*, 218(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20210615>.
20. Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our current understanding of a universal biological process. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>.
21. Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>.
22. Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2013). Antibody - FC Receptor Interactions in antimicrobial functions. *Current Immunology Reviews*, 9(1), 44–55. <https://doi.org/10.2174/1573395511309010006>.
23. Levin, R., Grinstein, S. & Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: Formation, maturation, and resolution. *Immunological Reviews*, 273(1), 156–179. <https://doi.org/10.1111/imr.12439>.
24. Upadhyay, S., Mittal, E. & Philips, J.A. (2018). Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathogens and Disease*, 76(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty037>.
25. Marshansky, V. & Futai, M. (2008). The V-type h⁺-atpase in vesicular trafficking: Targeting, regulation and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(4), 415–426. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.015>.
26. Minakami, R. & Sumimoto, H. (2006). Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family. *International Journal of Hematology*, 84(3), 193–198. <https://doi.org/10.1532/ijh97.06133>.
27. Kinchen, J.M., & Ravichandran, K.S. (2008). Phagosome maturation: Going through the acid test. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10), 781–795. <https://doi.org/10.1038/nrm2515>.

28. Thacker, V.V. (2020). A lung-on-chip model of early *Mycobacterium tuberculosis* infection reveals an essential role for alveolar epithelial cells in controlling bacterial growth,” *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/elife.59961>.
29. Mishra, B.B. (2017). Nitric oxide prevents a pathogen-permissive granulocytic inflammation during tuberculosis. *Nature Microbiology*, 2(7). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.72>.
30. Upadhyay, S., Mittal, E., & Philips, J.A. (2018). Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathogens and Disease*, 76(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty037>.
31. Hinchey, J. (2007). Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2279–2288. <https://doi.org/10.1172/jci31947>.
32. Wang, J., Ge, P., Lei, Z., Lu, Z., Qiang, L., Chai, Q., Zhang, Y., Zhao, D., Li, B., Su, J., Peng, R., Pang, Y., Shi, Y., Zhang, Y., Gao, G. F., Qiu, X. B., & Liu, C. H. (2021). *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase G acts as an unusual ubiquitinating enzyme to impair host immunity. *EMBO Reports*, 22(6). <https://doi.org/10.15252/embr.202052175>.
33. Quigley, J., Hughitt, V. K., Velikovsky, C. A., Mariuzza, R. A., El-Sayed, N. M., & Briken, V. (2017). The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00148-17>.
34. Huang, L., Nazarova, E. V., Tan, S., Liu, Y., & Russell, D. G. (2018). Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *Journal of Experimental Medicine*, 215(4), 1135–1152. <https://doi.org/10.1084/jem.20172020>.
35. Kinsella, R. L., Zhu, D. X., Harrison, G. A., Mayer Bridwell, A. E., Prusa, J., Chavez, S. M., & Stallings, C. L. (2021). Perspectives and advances in the understanding of tuberculosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 16(1), 377–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042120-032916>.

36. Arend, S. M., van Meijgaarden, K. E., de Boer, K., de Palou, E. C., van Soolingen, D., Ottenhoff, T. H. M., & van Dissel, J. T. (2002). Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to esat-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(12), 1797–1807. <https://doi.org/10.1086/345760>.
37. Sonnenberg, P., Glynn, J. R., Fielding, K., Murray, J., Godfrey-Faussett, P., & Shearer, S. (2005). How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African Gold Miners. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(2), 150–158. <https://doi.org/10.1086/426827>.
38. Lerner, T. R., Queval, C. J., Fearn, A., Repnik, U., Griffiths, G., & Gutierrez, M. G. (2018). Phthiocerol dimycocerosates promote access to the cytosol and intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* in lymphatic endothelial cells. *BMC Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0471-6>.
39. Augenstreich, J., & Briken, V. (2020). Host cell targets of released lipid and secreted protein effectors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.595029>.
40. Portal-Celhay, C., Tufariello, J. A. M., Srivastava, S., Zahra, A., Klevorn, T., Grace, P. S., Mehra, A., Park, H. S., Ernst, J. D., Jacobs, W. R., & Philips, J. A. (2016). *Mycobacterium tuberculosis* esxH inhibits ESCRT-dependent CD4⁺ T-cell activation. *Nature Microbiology*, 2(2). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.232>.
41. Alam, A., Imam, N., Ahmed, M. M., Tazyeen, S., Tamkeen, N., Farooqui, A., Malik, M. Z., & Ishrat, R. (2019). Identification and classification of differentially expressed genes and network meta-analysis reveals potential molecular signatures associated with tuberculosis. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00932>.

42. Bourigault, M. L., Segueni, N., Rose, S., Court, N., Vacher, R., Vasseur, V., Erard, F., Le Bert, M., Garcia, I., Iwakura, Y., Jacobs, M., Ryffel, B., & Quesniaux, V. F. (2013). Relative contribution of IL-1 α , IL-1 β and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis bcg*. *Immunity, Inflammation and Disease*, 1(1), 47–62. <https://doi.org/10.1002/iid3.9>.
43. van der Windt, G. J. W., Florquin, S., de Vos, A. F., van't Veer, C., Queiroz, K. C. S., Liang, J., Jiang, D., Noble, P. W., & van der Poll, T. (2010). CD44 deficiency is associated with increased bacterial clearance but enhanced lung inflammation during gram-negative pneumonia. *The American Journal of Pathology*, 177(5), 2483–2494. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100562>.
44. Sagi, Z., & Hieronymus, T. (2018). The impact of the epithelial–mesenchymal transition regulator hepatocyte growth factor receptor/met on skin immunity by modulating Langerhans cell migration. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00517>.
45. Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B. E., Ballester, I., Stevens, C., Korzenik, J. R., Rioux, J. D., Daly, M. J., Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2010). LRRK2 is involved in the IFN- γ response and host response to pathogens. *The Journal of Immunology*, 185(9), 5577–5585. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000548>.
46. Jeon, Y. J., Yoo, H. M., & Chung, C. H. (2010). ISG15 and immune diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(5), 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.02.006>.
47. Power, D., Santoso, N., Dieringer, M., Yu, J., Huang, H., Simpson, S., Seth, I., Miao, H., & Zhu, J. (2015). IFI44 suppresses HIV-1 LTR promoter activity and facilitates its latency. *Virology*, 481, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.046>.
48. Ward, P. A. (2010). Acute and chronic inflammation. *Fundamentals of Inflammation*, 1–16. <https://doi.org/10.1017/cbo9781139195737.002>.

49. Verreck, F. (2005) "Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation," *Journal of Leukocyte Biology*, 79(2), 285–293. <https://doi.org/10.1189/jlb.0105015>.
50. Dubnau, E., & Smith, I. (2003). Mycobacterium tuberculosis gene expression in macrophages. *Microbes and Infection*, 5(7), 629–637. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00090-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00090-x).
51. Matern, W. M., Rifat, D., Bader, J. S., & Karakousis, P. C. (2018). Gene enrichment analysis reveals major regulators of mycobacterium tuberculosis gene expression in two models of antibiotic tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00610>.
52. Advani, J., Verma, R., Chatterjee, O., Pachouri, P. K., Upadhyay, P., Singh, R., Yadav, J., Naaz, F., Ravikumar, R., Buggi, S., Suar, M., Gupta, U. D., Pandey, A., Chauhan, D. S., Tripathy, S. P., Gowda, H., & Prasad, T. S. (2019). Whole genome sequencing of mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India reveals genetic heterogeneity and region-specific variations that might affect drug susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00309>.
53. Ferguson, J., Martin, J., Azad, A., McCarthy, T., Kang, P., & Voelker, D., (2006) Surfactant Protein D Increases Fusion of Mycobacterium Tuberculosis-Containing Phagosomes With Lysosomes in Human Macrophages. *Infection and Immunity*, 74(12), 7005–7009. <https://doi.org/10.1128/IAI.01402-06>.
54. Zhou, K.-L., Li, X., Zhang, X.-L., & Pan, Q. (2019). Mycobacterial mannose-capped lipoarabinomannan: A modulator bridging innate and adaptive immunity. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 1168–1177. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1649097>.

55. Wang, Y., Zhang, M.-M., Huang, W.-W., Wu, S.-Q., Wang, M.-G., Tang, X.-Y., Sandford, A. J., & He, J.-Q. (2018). Polymorphisms in toll-like receptor 10 and tuberculosis susceptibility: Evidence from three independent series. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00309>.
56. Zhang, J., Zhao, Z., Zhong, H., Wu, L., Zhou, W., Peng, W., Hu, X., Song, J., Liu, T., Wu, Q., Bai, H., Zhou, Y., Chen, X., Chen, J., Lu, X., & Ying, B. (2018). Importance of common TLR2 genetic variants on clinical phenotypes and risk in tuberculosis disease in a western Chinese population. *Infection, Genetics and Evolution*, *60*, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.031>.
57. Janeway, C., Travers, P., & Walport, M., (2001), *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th ed). Garland Science; The complement system and innate immunity.
58. Nakamura, K., Funakoshi, H., Miyamoto, K., Tokunaga, F., & Nakamura, T. (2001). Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *280*(4), 1028–1035. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4210>.
59. Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., & Wakamiya, N. (2001). The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(47), 44222–44228. <https://doi.org/10.1074/jbc.m103942200>.
60. Møller, H. J. (2011). Soluble CD163. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *72*(1), 1–13. <https://doi.org/10.3109/00365513.2011.626868>.
61. Etzerodt, A., & Moestrup, S. K. (2013). CD163 and inflammation: Biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(17), 2352–2363. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4834>.

62. Kneidl, J., Löffler, B., Erat, M. C., Kalinka, J., Peters, G., Roth, J., & Barczyk, K. (2012). Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. *Cellular Microbiology*, 14(6), 914–936. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01766.x>.
63. Gazi, U., Rosas, M., Singh, S., Heinsbroek, S., Haq, I., Johnson, S., Brown, G. D., Williams, D. L., Taylor, P. R., & Martinez-Pomares, L. (2011). Fungal recognition enhances mannose receptor shedding through dectin-1 engagement. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 7822–7829. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.185025>.
64. Ma, Y. J., Hein, E., Munthe-Fog, L., Skjoedt, M.-O., Bayarri-Olmos, R., Romani, L., & Garred, P. (2015). Soluble collectin-12 (CL-12) is a pattern recognition molecule initiating complement activation via the alternative pathway. *The Journal of Immunology*, 195(7), 3365–3373. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500493>.
65. Zhang, S., Wu, Q., Lei, H., Zheng, H., Zhou, F., Sun, Z., Zhao, J., Yu, X., & Zhang, S. (2019). Mannosylated structures of mycobacterial lipoarabinomannans facilitate the maturation and activation of dendritic cells. *Cellular Immunology*, 335, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.11.007>.
66. Zhang, J. (2020) Soluble collectin-12 mediates C3-independent docking of properdin that activates the alternative pathway of complement, *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/elife.60908>.
67. Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(12), 963–975. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>.
68. Korb, V., Chuturgoon, A., & Moodley, D. (2016). Mycobacterium tuberculosis: Manipulator of protective immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 131. <https://doi.org/10.3390/ijms17030131>.

69. Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.-C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., Walk, S. F., Nemergut, M. E., Macara, I. G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M. O., & Ravichandran, K. S. (2001). CED-12/Elmo, a novel member of the CRKII/dock180/RAC pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*, 107(1), 27–41. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00520-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00520-7).
70. Moliva, J. I., Duncan, M. A., Olmo-Fontánez, A., Akhter, A., Arnett, E., Scordo, J. M., Ault, R., Sasindran, S. J., Azad, A. K., Montoya, M. J., Reinhold-Larsson, N., Rajaram, M. V., Merrit, R. E., Lafuse, W. P., Zhang, L., Wang, S.-H., Beamer, G., Wang, Y., Proud, K., ... Torrelles, J. B. (2019). The lung mucosa environment in the elderly increases host susceptibility to mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(3), 514–523. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz138>.
71. Lin, Z., Thorenoor, N., Wu, R., DiAngelo, S. L., Ye, M., Thomas, N. J., Liao, X., Lin, T. R., Warren, S., & Floros, J. (2018). Genetic association of pulmonary surfactant protein genes, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC, and SFTPD with cystic fibrosis. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02256>.
72. Zhao, J., Jiao, L., Guo, M., Zheng, L., Wang, X., Gao, S., Ying, B., & Ming, L. (2020). SFTPC genetic polymorphisms are associated with tuberculosis susceptibility and clinical phenotype in a Western Chinese Han population. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 20(5), 100. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9230>.
73. Lin, Z., Thorenoor, N., Wu, R., DiAngelo, S., Ye, M., Thomas, N., Liao, X., Lin, T., Warren, S., & Floros, J. Genetic association of pulmonary surfactant protein Genes, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC, and SFTPD with cystic fibrosis (2018). *Frontiers in Immunology*. 9. 2256 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02256>.

74. Zheng, Q., Hou, J., Zhou, Y., Yang, Y., Xie, B., & Cao, X. (2015). SIGLEC1 suppresses antiviral innate immune response by inducing TBK1 degradation via the ubiquitin ligase TRIM27. *Cell Research*, 25(10), 1121–1136. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.108>.
75. Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, 202(1), 8–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>.
76. Brighenti, S., & Lerm, M. (2012). How mycobacterium tuberculosis manipulates innate and adaptive immunity – new views of an old topic. *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*. <https://doi.org/10.5772/29651>.
77. Crocker, P. R., Paulson, J. C., & Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 7(4), 255–266. <https://doi.org/10.1038/nri2056>.
78. Delputte, P. L., Van Gorp, H., Favoreel, H. W., Hoebeke, I., Delrue, I., Dewerchin, H., Verdonck, F., Verhasselt, B., Cox, E., & Nauwynck, H. J. (2011). Porcine sialoadhesin (CD169/SIGLEC-1) is an endocytic receptor that allows targeted delivery of toxins and antigens to macrophages. *PLoS ONE*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016827>.
79. Yu, X. *et al.* (2014) “Glycosphingolipid-functionalized nanoparticles recapitulate CD169-dependent HIV-1 uptake and trafficking in dendritic cells,” *Nature Communications*, 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms5136>.
80. Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H., & van der Meer, J. W. (2002). Innate immunity to mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 294–309. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.294-309.2002>.
81. Mylonas, K. J., Anderson, J., Sheldrake, T. A., Hesketh, E. E., Richards, J. A., Ferenbach, D. A., Kluth, D. C., Savill, J., & Hughes, J. (2019). Granulocyte macrophage-colony stimulating factor: A key modulator of renal mononuclear phagocyte plasticity. *Immunobiology*, 224(1), 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.10.007>.

- 82.** Fleetwood, A. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: Implications for CSF blockade in inflammation, *The Journal of Immunology*, 178(8), 5245–5252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5245>.
- 83.** Verreck, F. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but il-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13), 4560–4565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400983101>.
- 84.** Al-Rasheed, A. (2004). Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: Late onset. *Journal of Periodontal Research*, 39(3), 1494–1498. [10.1111/j.1600-0765.2004.00724.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00724.x).

Anexo 1. Genes de fagocitosis incluidos en el *RT² Profiler PCR Array*

Símbolo	GenBank	Descripción
ADIPOQ	NM_004797	<i>Adiponectin, C1Q and collagen domain containing</i>
AGER	NM_00136	<i>Advanced glycosylation end product-specific receptor</i>
ANXA1	NM_000700	<i>Annexin A1</i>
AXL	NM_001699	<i>AXL receptor tyrosine kinase</i>
C3	NM_000064	<i>Complement component 3</i>
CALR	NM_004343	<i>Calreticulin</i>
CD14	NM_000591	<i>CD14 molecule</i>
CD36	NM_000072	<i>CD36 molecule (thrombospondin receptor)</i>
CD44	NM_000610	<i>CD44 molecule (Indian blood group)</i>
CD47	NM_001777	<i>CD47 molecule</i>
CEACAM3	NM_001815	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3</i>
CLEC7A	NM_022570	<i>C-type lectin domain family 7, member A</i>
CLIC4	NM_013943	<i>Chloride intracellular channel 4</i>
CNN2	NM_004368	<i>Calponin 2</i>
COLEC12	NM_130386	<i>Collectin sub-family member 12</i>
CR1	NM_000573	<i>Complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)</i>
CRK	NM_016823	<i>V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)</i>
CRP	NM_000567	<i>C-reactive protein, pentraxin-related</i>
CSF1	NM_000757	<i>Colony stimulating factor 1 (macrophage)</i>
CSF2	NM_000758	<i>Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>
CSK	NM_004383	<i>C-src tyrosine kinase</i>
CYP2S1	NM_030622	<i>Cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1</i>
DOCK1	NM_001380	<i>Dedicator of cytokinesis 1</i>
DOCK2	NM_004946	<i>Dedicator of cytokinesis 2</i>
ELMO1	NM_130442	<i>Engulfment and cell motility 1</i>
FAS	NM_000043	<i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6)</i>
FCER1G	NM_004106	<i>Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide</i>
FCGR1A	NM_000566	<i>Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)</i>
FCGR2A	NM_021642	<i>Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)</i>

Símbolo	GenBank	Descripción
FCGR2B	NM_004001	<i>Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)</i>
FYN	NM_002037	<i>FYN oncogene related to SRC, FGR, YES</i>
GULP1	NM_016315	<i>GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1</i>
IFNG	NM_000619	<i>Interferon, gamma</i>
IL1RL1	NM_016232	<i>Interleukin 1 receptor-like 1</i>
ITGAM	NM_000632	<i>Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)</i>
ITGAV	NM_002210	<i>Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)</i>
ITGB2	NM_000211	<i>Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)</i>
LYN	NM_002350	<i>V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog</i>
MAPK14	NM_001315	<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>
MARCO	NM_006770	<i>Macrophage receptor with collagenous structure</i>
MBL2	NM_000242	<i>Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble</i>
MCOLN3	NM_018298	<i>Mucolipin 3</i>
MERTK	NM_006343	<i>C-mer proto-oncogene tyrosine kinase</i>
MFGE8	NM_005928	<i>Milk fat globule-EGF factor 8 protein</i>
MIF	NM_002415	<i>Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)</i>
MSN	NM_002444	<i>Moesin</i>
MYD88	NM_002468	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NOD1	NM_006092	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1</i>
PECAM1	NM_000442	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PIP5K1A	NM_003557	<i>Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha</i>
PLA2G4A	NM_024420	<i>Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)</i>
PLA2G5	NM_000929	<i>Phospholipase A2, group V</i>
PLD1	NM_002662	<i>Phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific</i>
PLD2	NM_002663	<i>Phospholipase D2</i>
PRKCE	NM_005400	<i>Protein kinase C, epsilon</i>
PROS1	NM_000313	<i>Protein S (alpha)</i>
PTEN	NM_000314	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAB5A	NM_004162	<i>RAB5A, member RAS oncogene family</i>
RAB7A	NM_004637	<i>RAB7A, member RAS oncogene family</i>

Símbolo	GenBank	Descripción
RAC1	NM_006908	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)</i>
RAC2	NM_002872	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)</i>
RALA	NM_005402	<i>V-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)</i>
RALB	NM_002881	<i>V-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)</i>
RAPGEF3	NM_006105	<i>Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3</i>
RHOA	NM_001664	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
SCARB1	NM_005505	<i>Scavenger receptor class B, member 1</i>
SERPINE1	NM_000602	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i>
SFTPD	NM_003019	<i>Surfactant protein D</i>
SIGLEC1	NM_023068	<i>Sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin</i>
SIGLEC11	NM_052884	<i>Sialic acid binding Ig-like lectin 11</i>
SIRPB1	NM_006065	<i>Signal-regulatory protein beta 1</i>
STAB2	NM_017564	<i>Stabilin 2</i>
STX18	NM_016930	<i>Syntaxin 18</i>
SYK	NM_003177	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TGM2	NM_004613	<i>Transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)</i>
TICAM1	NM_182919	<i>Toll-like receptor adaptor molecule 1</i>
TLR3	NM_003265	<i>Toll-like receptor 3</i>
TLR9	NM_017442	<i>Toll-like receptor 9</i>
TNF	NM_000594	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFSF11	NM_003701	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11</i>
VAMP7	NM_005638	<i>Vesicle-associated membrane protein 7</i>
VAV1	NM_005428	<i>Vav 1 guanine nucleotide exchange factor</i>
WAS	NM_000377	<i>Wiskott-Aldrich syndrome (eczema-thrombocytopenia)</i>
WNT5A	NM_003392	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 5A</i>
ACTB	NM_001101	<i>Actin, beta</i>
B2M	NM_004048	<i>Beta-2-microglobulin</i>

Símbolo	GenBank	Descripción
<i>GAPDH</i>	NM_002046	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>HPRT1</i>	NM_000194	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
<i>RPLP0</i>	NM_001002	<i>Ribosomal protein, large, P0</i>
<i>HGDC</i>	SA_00105	<i>Human Genomic DNA Contamination</i>
<i>RTC</i>	SA_00104	<i>Reverse Transcription Control</i>
<i>PPC</i>	SA_00103	<i>Positive PCR Control</i>

Anexo 2. Clasificación de genes en la etapa de fagocitosis

Etapa	Genes
Receptores involucrados en la fagocitosis.	<i>AGER, CD14, CD36, CLEC7A (DECTIN1), COLEC12, CR1, CRP, FAS, FCER1G, FCGR1A, FCGR2A, FCGR2B, IL1RL1 (ST2), ITGAM, ITGAV, ITGB2, MARCO, MFGE8, MYD88, PECAM1, TICAM1 (TRIF), TLR3, TLR9.</i>
Reconocimiento y absorción de partículas.	<i>ANXA1, C3, CD44, CD47, CEACAM3, CSF1 (MC-SF), CSF2 (GM-CSF), ELMO1, GULP1, IFNG, MBL2, MCOLN3, MIF, SCARB1, SIGLEC1, SIGLEC11, SIRPB1, TGM2, TNF, WNT5A.</i>
Maduración del fagosoma	<i>CNN2, PLD1, RAB5A, RAB7A, STX18, VAMP7, WAS.</i>
Procesamiento del fagosoma	<i>CALR, CRK, CYP2S1, NOD1 (CARD4), PLA2G4A, PLA2G5, PLD2, SERPINE1 (PAI-1), SFTPD, STAB2, TNFSF11 (RANKL).</i>
Transducción de señales	<i>ADIPOQ(ACRP30), AXL, CLIC4, CSK, DOCK1, DOCK2, FYN, LYN, MAPK14 (p38ALPHA), MERTK, MSN, PIP5K1A, PRKCE, PROS1, PTEN, RAC1, RAC2, RALA, RALB, RAPGEF3, RHOA, SYK, VAV1.</i>