



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFECTO DE LA INFECCIÓN CON  
*Mycobacterium tuberculosis* SOBRE LA EXPRESIÓN DEL  
RECEPTOR Glut 1 EN LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Y  
MONOCITOS CD14<sup>+</sup>.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**PAOLA SALINAS MAGAÑA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **ENRIQUE ORTEGA SOTO**

VOCAL: **RUTH EDITH MARTIN FUENTES**

SECRETARIO: **MARÍA ISABEL SADA OVALLE**

1er. SUPLENTE: **JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

2° SUPLENTE: **BEATRIZ RUÍZ VILLAFAN**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA INTEGRATIVA, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS", MÉXICO DISTRITO FEDERAL.

---

**DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE**

ASESOR DEL TEMA

---

**PAOLA SALINAS MAGAÑA**

SUSTENTANTE

## ÍNDICE GENERAL.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
INTRODUCCIÓN. ....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Epidemiología. ....	3
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	7
1.3 Respuesta inmune ante Tuberculosis. ....	10
1.4 Granuloma. ....	14
1.5 Inmunometabolismo.....	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	22
3. HIPÓTESIS. ....	22
4. OBJETIVO GENERAL.....	22
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1 Diseño experimental ....	23
6.2 Aislamiento de células mononucleares (CMN) de sangre periférica y diferenciación a macrófagos. ....	23
6.3 Estimulo. ....	24
6.4 Cultivo de poblaciones celulares con iMtb. ....	24
6.5 Inmunofenotipificación. ....	24
6.6 Medición de citocinas pro-inflamatorias. ....	26
6.7 Análisis estadístico.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Expresión de marcadores de superficie en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> . ....	27
7.2 Expresión de marcadores de células NKT. ....	30
7.3 Expresión de marcadores de superficie en monocitos CD14 <sup>+</sup> . ....	31
7.4 Expresión de marcadores de células NK. ....	34
7.5 Expresión de marcadores en monocitos pro-inflamatorios. ....	34

7.6 Expresión de marcadores de superficie en macrófagos maduros. ....	35
7.7 Concentración secretada de citocinas pro-inflamatorias en sobrenadante de cultivo.....	38
8. DISCUSIÓN. ....	40
9. CONCLUSIONES.....	47
10. PERSPECTIVAS.....	47
11. APÉNDICE.....	48
15. REFERENCIAS.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS.

ANOVA	Análisis de varianza
ADP	Adenosin Di-fosfato
Akt	Proteína cinasa B
AMPK	Proteín cinasa activada por AMP
ATP	Adenosin Tri-fosfato
CD	Grupo de diferenciación
CLRs	Receptores tipo lectina
CMNs	Células Mononucleares
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CpG	Regiones de ADN
DIM	fthiocerol dimicocerosatos
DCs	Células dendríticas
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido flavin- adenina reducido
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas
HBsAg	Antígeno de superficie de Hepatitis B
HCL	Ácido clorhídrico
HCV	Virus Hepatitis C
HIF1 $\alpha$	Factor inducible de hipoxia
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
iMtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> irradiada
LAM	Lipoarabinomana
LM	Lipomana
MA	Macrófagos alveolares
mAGP	Ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano
MC	Macrófagos
mDAP	Ácido <i>meso</i> -diaminopimelico
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente
$\mu$ g/mL	Microgramos por cada mililitro
$\mu$ L	Microlitro
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NADH	Nicotidamina adenina dinucleótido
NAM	Ácido N-acetil murámico
NAG	N-acetilglucosamina
NK	Natural Killer
NLSs	Receptores tipo NOD
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK1	Fosfoinositol dependiente de cinasa 1
Pi	Fosfato inorgánico
PI	Fosfatidil inositol
PI3K	Fosfatidil inositol 3-cinasa
PIMs	Manósidos de fosfatidilinositol
PRRs	Receptores que reconocen patrones moleculares
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
RPR	Examen de Reagina plasmática rápida para detectar sífilis
SD	Desviación estándar
SFB	Suero Fetal Bovino
SREBPI	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroI
T.A	Temperatura ambiente
TB	Tuberculosis
TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
TLRs	Receptores tipo Toll
TPL	Tuberculosis pulmonar latente
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

## **INTRODUCCIÓN.**

En marzo del año 1882, Robert Koch reportó el descubrimiento del agente etiológico causante de la tuberculosis (TB) *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Zuñiga, 2012). Mtb es un microorganismo de naturaleza lipídica, cuya pared celular está compuesta por ácidos micólicos, peptidoglicanos, arabinogalactinas, manósidos, lipomanas, entre otros (Gorocica, 2005).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que un tercio de la población está infectada con Mtb, cursando como una infección asintomática, tuberculosis pulmonar latente (TPL). De estos individuos asintomáticos solo del 5-10% desarrollarán la enfermedad de tuberculosis activa a lo largo de su vida (O´Gara, 2013). A pesar de los avances científicos aplicados al diagnóstico y tratamiento de la infección por Mtb, sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial (WHO, 2015).

Las células T CD4<sup>+</sup>, así como las citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son de suma relevancia para el control de la infección por Mtb, existe evidencia que el estado de diferenciación de los fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos) afecta la activación de una eficiente respuesta inmune innata. Los factores genéticos del hospedero y del patógeno, virulencia y tamaño del inóculo, se asocian con un incremento del riesgo para el desarrollo de tuberculosis activa (Cheng, 2013 & O´Gara, 2013).

Mtb ingresa a la vía aérea cuando respiramos pequeñas gotas de saliva que contienen al bacilo. Al llegar a las vías respiratorias inferiores el bacilo es censado por diversos receptores de superficie que son expresados por células del sistema inmune innato tales como los macrófagos alveolares (MA), las células dendríticas (DCs) y las células epiteliales. Existen receptores encargados de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos conocidos como receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs). Dentro de las principales familias de PRRs que se conocen podemos mencionar a los receptores tipo Toll (TLRs), el TLR2, TLR4, TLR9 implicados en la infección por Mtb (Castaño, 2014).

Posterior al reconocimiento del bacilo, las DCs migran a los nódulos linfáticos regionales en donde llevan a cabo la presentación antigénica y la activación de los linfocitos T. Esta activación del sistema inmune adaptativo dispara una serie de mecanismos inmunológicos encaminados a eliminar a la bacteria (secreción de citocinas, quimiocinas, estallido respiratorio, etc.). Durante este proceso de activación inmunológica, el estado metabólico de las células cambia drásticamente con la finalidad de cumplir con la alta demanda energética necesaria para la producción de diversas moléculas (Cooper, 2009).

El principal mecanismo metabólico por el cual las células del sistema inmune en reposo producen ATP es a través de la fosforilación oxidativa; sin embargo, durante la activación del sistema inmune las necesidades energéticas de las células se incrementan considerablemente por lo que se induce una reprogramación metabólica para poder aportar una mayor cantidad de moléculas de ATP. En esta situación las células emplearán la glucólisis aerobia como fuente de energía (Efecto Warburg) (Cheng, 2014).

El incremento en la actividad metabólica de las células del sistema inmune implica un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias y expresión de los receptores Glut, los cuales son transportadores de glucosa que se expresan en la membrana plasmática de diversas células (Maratou, 2007).

El inmunometabolismo es tema de interés actualmente, en el presente trabajo se estudió el cambio en la expresión de marcadores de superficie (Glut1, Tim3, HLA-DR, entre otros) y la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en células mononucleares (CMN) y macrófagos (MC) de sujetos sanos ante la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* gama irradiada (iMtb), a través de Citometría de Flujo y ELISA sándwich. Los resultados sugieren que hay una activación del sistema inmune para controlar los efectos de la estimulación con iMtb, con un comportamiento concentración dependiente de iMtb en el marcador Glut1 en linfocitos CD8<sup>+</sup>, monocitos y MC; el mismo comportamiento se observa en la concentración secretada por las citocinas pro-inflamatorias.

## **1. MARCO TEÓRICO.**

### *1.1 Epidemiología.*

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), el cual se transporta en el aire. El mayor riesgo de adquirir una infección por Mtb es principalmente determinado por factores exógenos. TB se transmite con mayor frecuencia de una persona con TB pulmonar a otras por los núcleos de gotitas (menores de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro) que son liberados al toser, estornudar y hablar. La probabilidad de contacto con una persona que tiene una forma infecciosa de TB, la intimidad y la duración de este contacto, el grado de contagio del caso y el medio ambiente compartido son determinantes para la transmisión. Alrededor de un tercio de la población mundial se estima que han sido expuestas a la bacteria de TB y están infectados (WHO, 2015).

En general, una proporción relativamente pequeña de personas infectadas por Mtb desarrollará la enfermedad. Sin embargo, la probabilidad de desarrollar TB es mucho mayor en personas con VIH, personas con sistemas inmunes debilitados por el uso prolongado de medicamentos como esteroides o inhibidores de TNF- $\alpha$ , pacientes con diabetes o con insuficiencia renal, entre otras morbilidades. La TB también es más común entre los hombres que entre las mujeres, y afecta principalmente a los adultos en los grupos de edad económicamente más productivos (Glaziou, 2015).

Mtb por lo general afecta a los pulmones (TB pulmonar), pero puede afectar a otros sitios (TB extrapulmonar). TB es una enfermedad predominante del pulmón, 70% de los casos es TB pulmonar; sin embargo, puede diseminarse a otros órganos, incluyendo nódulos linfáticos, hueso, y meninges, causando enfermedad extrapulmonar (Glaziou, 2015).

## Incidencia

TB sigue siendo un importante problema de salud global. Se ubica como la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas en todo el mundo, después del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Las últimas estimaciones indican 9.0 millones de nuevos casos de tuberculosis en 2013 y 1.5 millones de muertes por tuberculosis (WHO, 2015).

En 2012, había un estimado de 8.6 millones de casos de TB en el mundo, equivalente a 122 casos por cada 100, 000 habitantes. Como se muestra en la Figura 1, la mayoría de los casos estimados ocurrieron en la región del sureste de Asia, el Pacífico occidental (58%) y en África (27%); pequeñas proporciones de los casos ocurrieron en el este del Mediterráneo (8%), en Europa (4%) y en América (3%) (Rathmell, 2012).

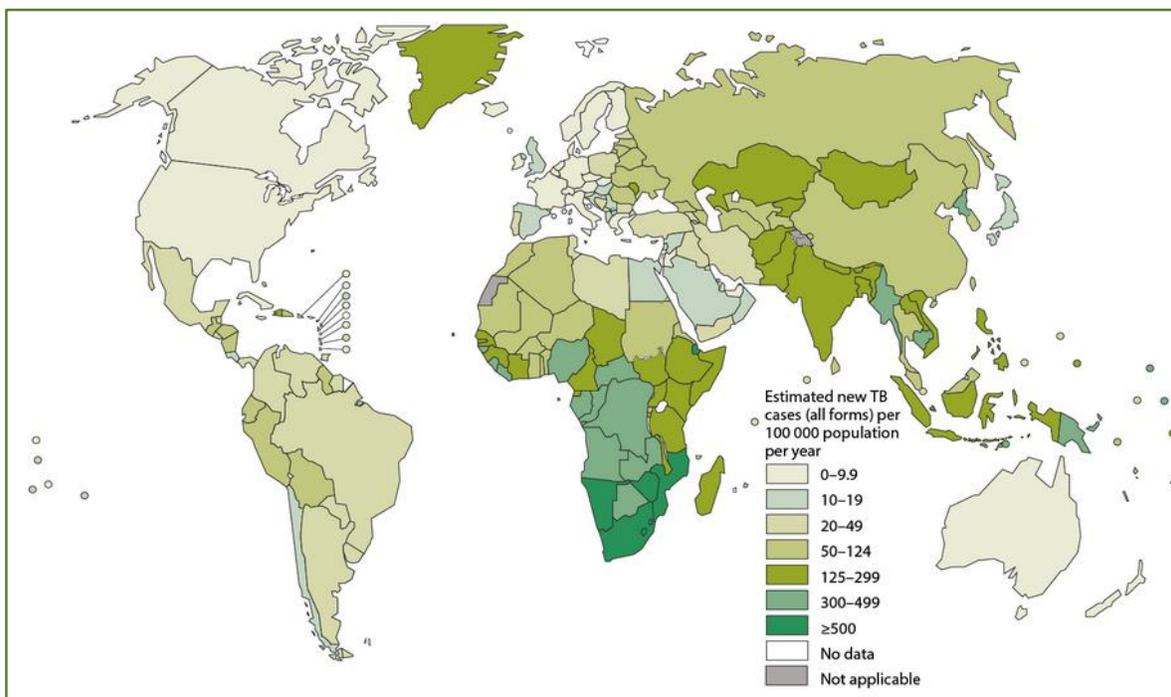


Figura 1. Tasa de incidencia de tuberculosis por cada 100, 000 habitantes, 2013 (WHO, 2015).

En México, el reporte de incidencia fue de 18 casos por 100,000 habitantes y 15,348 nuevos casos fueron diagnosticados durante 2010 (Zuñiga, 2012).

En la Figura 2, se observa el flujo de la infección por Mtb cuando se diagnostica TB pulmonar.

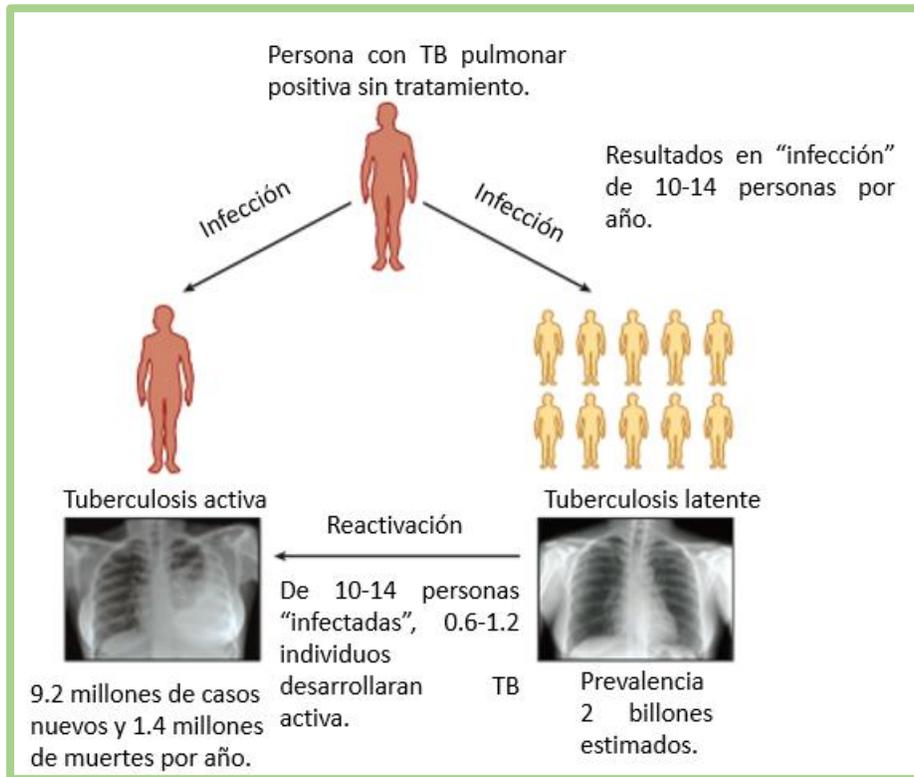


Figura 2. Epidemiología de la infección-activación y TB latente por Mtb (Modificado de O´Gara, 2013).

La presentación clínica clásica de TB no es específica y coincide con la de otras enfermedades como neumonía, cáncer de pulmón y sarcoidosis. En TB pulmonar, se observa la presencia de la micobacteria en el esputo por microscopía pero no distingue entre Mtb y micobacterias no tuberculosas. El diagnóstico requiere el aislamiento y confirmación de Mtb a través de cultivo, el cual tarda 6 semanas, sin embargo la OMS recientemente aprobó el uso de Xpert MTB/RIF basado en la PCR molecular para Mtb y la resistencia a rifampicina con el cual se obtienen resultados en horas (WHO, 2015).

Pacientes afectados con TB pulmonar donde el cultivo o microscopía de esputo no está disponible o tienen tuberculosis extrapulmonar, se requiere broncoscopia o biopsia.

El tratamiento para TB activa requiere el uso de múltiples fármacos y es prolongado, al menos seis meses, dividido en una fase intensiva inicial para matar a los bacilos que se replican activamente y continúa con una fase para asegurar que los bacilos persistentes también sean eliminados (Rathmell, 2012).

El antibiótico más eficaz de primera línea contra la tuberculosis es la rifampicina, que estuvo disponible desde la década de 1960. El tratamiento actualmente recomendado para los nuevos casos de tuberculosis sensible a los antibióticos es el régimen de seis meses de cuatro fármacos de primera línea: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. El tratamiento para la tuberculosis multirresistente (MDR-TB), que se define como la resistencia a la isoniazida y la rifampicina, es más largo, requiere de antibióticos más caros y más tóxicos como capreomicina y cicloserina. La reacción secundaria que más se presenta por el uso de estos antibióticos es la hepatotoxicidad (Glaziou, 2015).

### Mortalidad.

A nivel mundial, la mayoría de los casos de tuberculosis y las muertes ocurren entre los hombres; sin embargo, la carga de la enfermedad entre las mujeres también es alta (Rathmell, 2012).

Sin tratamiento, las tasas de mortalidad de tuberculosis son altas. A nivel mundial, la tasa de mortalidad por tuberculosis se ha reducido en un 45% desde 1990 y las tasas de incidencia de TB están disminuyendo en la mayor parte del mundo. Entre 2000 y 2013, unos 37 millones de vidas fueron salvadas a través del diagnóstico y el tratamiento eficaz.

El número de muertes promedio por TB por cada 100, 000 habitantes a nivel mundial es 13 (2012) y 17.6 cuando existe infección con VIH. El pronóstico actual indica que se alcanzará la meta internacional de un 50% de reducción de la mortalidad por TB en 2015 en comparación con una línea base de 1990, como se observa en la Figura 3 (Glaziou, 2015).

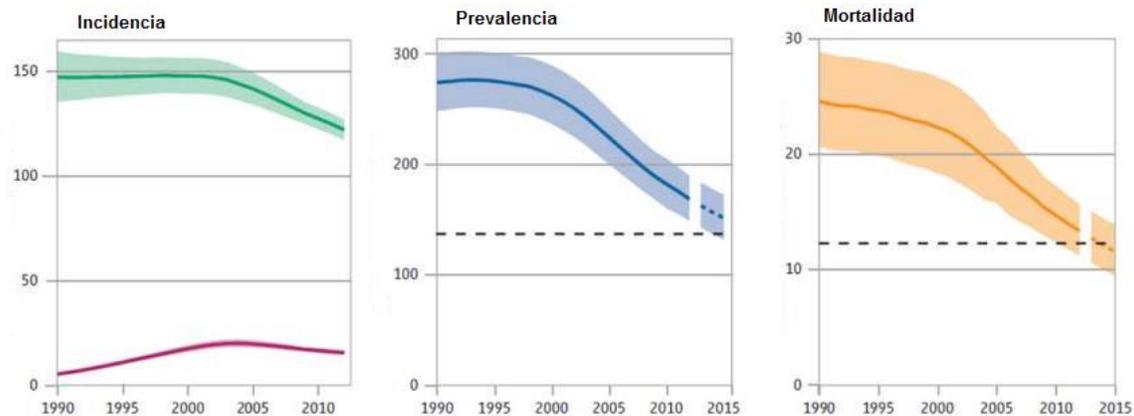


Figura 3. Tendencia global de incidencia y mortalidad por año, y prevalencia en la población. En el eje X se presentan los casos por cada 100 000 habitantes (WHO, 2015).

### 1.2 *Mycobacterium tuberculosis*.

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud, curvos, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen resistencia a la tinción con colorantes comunes (cristal violeta, eosina, safranina), pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%) en peso seco. Las micobacterias pertenecen al orden de los actinomicetales (bacterias con forma de hongos) y son consideradas formas de transición entre las eubacterias (bacterias verdaderas) y los hongos (Rodríguez, 1950).

Entre las características relevantes del bacilo de la TB se incluyen su lento crecimiento y la patogénesis intracelular. Esto contribuye a la naturaleza crónica de la enfermedad e impone largos regímenes de tratamiento y representa un problema mayor para los investigadores (Cole, 1998).

Los medios de cultivo sólidos pueden ser en base de agar (Middlebrook 7H10/7H11) o en base de huevos (Lowenstein-Jensen), siendo este último el más usado, en el cual Mtb tarda entre 3 a 5 semanas para el desarrollo de colonias. El agar Middlebrook está formado por enriquecimiento de ácido oleico, albúmina, glicerol, dextrosa y compuestos inorgánicos.

Mtb y la mayoría de las micobacterias, son aerobios estrictos, excepto *M. bovis* que es microaerófilo. El crecimiento es favorecido con una atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>, con un rango de temperatura entre 30-42°C, siendo la óptima a 37°C.

La envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* es una estructura compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática. La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos. Por tanto, tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune. Entre los principales componentes de esta envoltura se encuentran el ácido micólico y glicolípidos; estos glicolípidos junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria.

La pared micobacteriana posee un elevado contenido de lípidos (50-60%) que le confieren un carácter hidrofóbico. La complejidad de esta estructura le permite su crecimiento, resistencia a antibióticos y virulencia (Gorocica, 2005). Está constituida por un complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano (mAGP) rodeados por una cápsula de proteínas y polisacáridos. En la parte superior está compuesta por lípidos libres, algunos con ácidos grasos largos y cortos, intercaladas de alguna manera se encuentran las proteínas, los manósidos de fosfatidilinositol (PIMs), fthiocerol dimicocerosatos (DIM), lipomana (LM), y lipoarabinomana (LAM). Cuando se rompen las paredes celulares, por ejemplo, con diversos disolventes, los lípidos libres, proteínas, LAM, y PIM se solubilizan, y mAGP permanece como el residuo insoluble (Brennan, 2003 & Kieser, 2014). En la Figura 4, se puede observar los componentes principales de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la LAM, la LM y galactano, que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis (O´Gara, 2012).

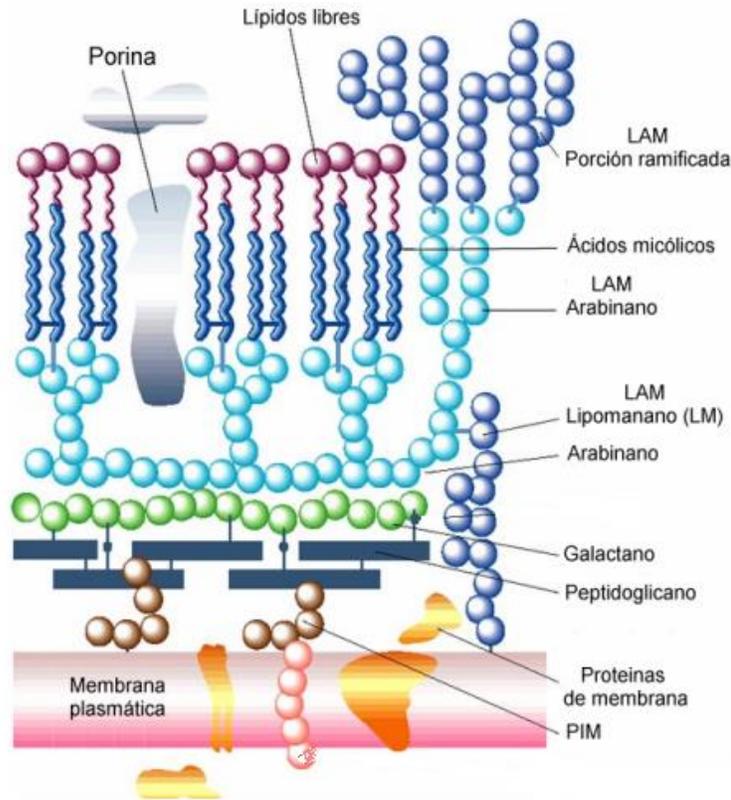


Figura 4. Pared celular de Mtb (Tomado de <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/77732/guna.pdf?sequence=1>).

Las capas de peptidoglucano rodeadas por la membrana plasmática se encuentran unidas a largos polímeros del disacárido N-acetilglucosamina-ácido N-acetilmurámico (NAG-NAM). El peptidoglucano tiene modificaciones, como glicosilación de residuos de NAM, amidación de D-Glu y ácido *meso*-diaminopimelico (mDAP). La amidación puede ser reconocida por el receptor innato NOD1 y la glicosilación de NAM es eficientemente reconocida por NOD2 e induce la producción de citocinas inflamatorias. La arabinana es ligada al ácido micólico que forman una capa gruesa de lípidos que contribuye a la impermeabilidad de la pared celular y virulencia (Kieser, 2014).

Otro grupo de lípidos son PIMs, LM y LAM. Los PIMs se componen de fosfatidilinositol (PI) y seis manosas. Los PIMs con dos manosas son los más comunes en Mtb. LAM de Mtb contiene una manosa corta con oligosacárido “caps” que permite que se una al receptor de manosa en macrófagos, también puede

unirse a los receptores Toll induciendo todo tipo de señalización para la activación del sistema inmune en el hospedero (Gorocica, 2005).

Desde el aislamiento en 1905, la cepa H37Rv de Mtb ha servido para una amplia investigación biomédica, ya que conserva la virulencia en modelos animales de TB, también es susceptible a fármacos y manipulación genética.

El genoma de la cepa H37Rv comprende 4, 411, 529 pares de bases, contiene alrededor de 4,000 genes y tiene un alto contenido de guanina + citosina que se refleja en el contenido de proteínas. Mtb difiere de otras bacterias por su capacidad en la producción de enzimas implicadas en la lipogénesis y la lipólisis (Cole, 1998).

### *1.3 Respuesta inmune ante Tuberculosis.*

La respuesta temprana del hospedero después de la inhalación de Mtb es caracterizada por la presencia de células fagocíticas como macrófagos alveolares (MA) residentes. Los bacilos son reclutados por los MA para su posterior eliminación por diferentes mecanismos bactericidas del macrófago, incluyendo la generación de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) e intermediarios reactivos de oxígeno (ROI). La eficacia de estos mecanismos depende de la capacidad microbicida del MA, las características patógenas de la cepa de Mtb y el microambiente del sitio de la infección (Zuñiga, 2012).

Cuando un patógeno entra a través de la piel o barreras mucosas es censado por el sistema inmune innato en el cual participan células entre las que destacan células de Langerhans (células dendríticas) o macrófagos en tejidos a través receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluyendo receptores Toll (TLRs), receptores tipo lectina-C (CLRs), receptores NOD (NLRs). La activación de PRRs provoca la inmediata fagocitosis del patógeno o la secreción de mediadores solubles como citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas para el reclutamiento de células efectoras al sitio de infección (Cheng, 2003).

Como se observa en la Figura 5, cuando Mtb llega a las vías respiratorias inferiores y al parénquima del pulmón, el bacilo es fagocitado por los MAs,

posteriormente es reclutado por neutrófilos y DCs. Los MC y neutrófilos constituyen la primer línea de defensa ya que producen péptidos antimicrobianos (O’Gara, 2013).

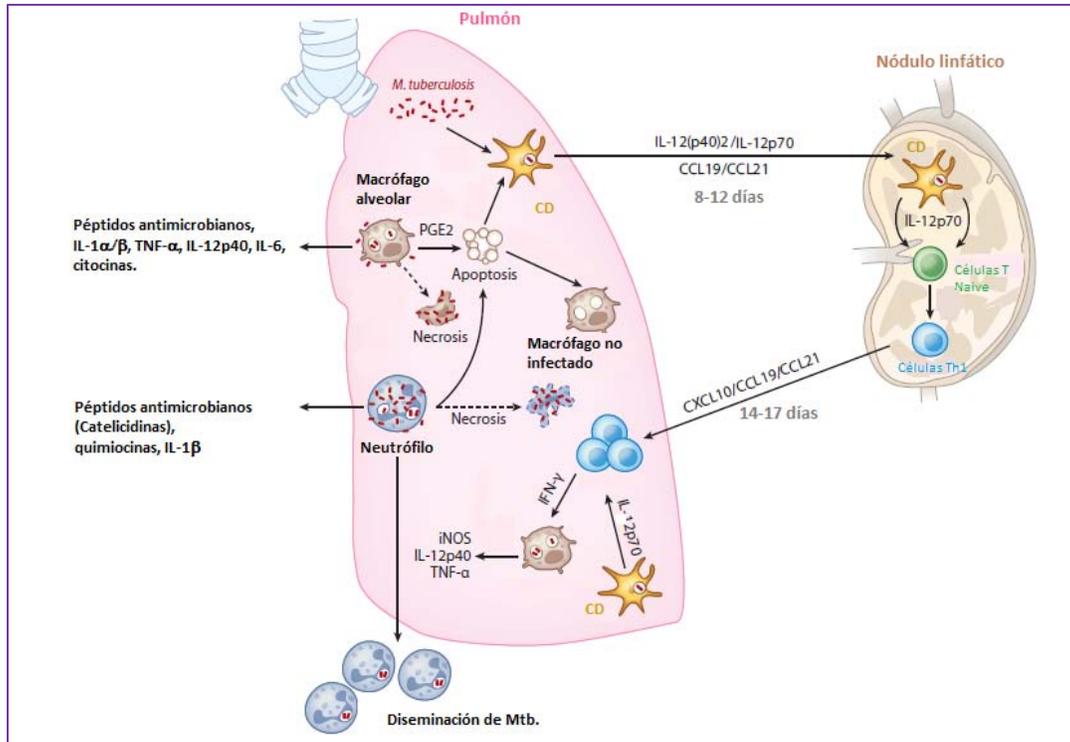


Figura 5. Respuesta inmune celular ante Mtb (Modificado de O’Gara, et. al 2013).

Tras la infección con Mtb los MAs residentes de pulmón, neutrófilos y DCs pueden infectarse, esto ocasiona la producción y secreción de péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas. El balance de mediadores lipídicos como prostaglandina E2 (pro-apoptótica) o lipoxina LXA4 (pro-necrótica), dentro de los MC infectados determinan las vías de inducción muerte. Las células apoptóticas son absorbidas por DCs pulmonares, después de 8-12 días migran a ganglios linfáticos por la influencia de quimiocinas IL-12 (p40) e IL-12p70, CCL19 y CCL21, para diferenciarse de células T naive a un fenotipo Th1. Las células Th1 migran a los pulmones dependientes de quimiocinas, después de 14-17 días después de la infección inicial, secretan IFN- $\gamma$ , que activa a los macrófagos los cuales secretaran citocinas (TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ ) y especies reactivas como iNOS para el control bacteriano (O’Gara, 2013 & Zuñiga, 2012).

Células T CD4<sup>+</sup> producen mediadores inmunes (IFN- $\gamma$ , IL-2 y linfotoxina- $\alpha$ ). Células CD8<sup>+</sup> y linfocitos T- $\gamma\delta$  liberan granzimas y perforinas que tienen un efecto directo en las células infectadas. Células T periféricas reconocen antígenos de Mtb (ESAT-6 y Mtb-39) que estimulan la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (O´Gara, 2013).

Siendo la tuberculosis una infección de tipo intracelular, la atracción de células T CD8<sup>+</sup> adquiere una enorme relevancia, ya que se encargan de destruir a todos aquellos macrófagos que albergan micobacterias (García, 2001).

La secreción de citocinas juega un importante rol en el reclutamiento de células T efectoras en el sitio de infección.

TNF- $\alpha$  es una citocina que media la respuesta inflamatoria, es producida por diversas células incluyendo MC, linfocitos, neutrófilos; contribuye al control de la infección por la producción de RNIs y ROIs.

IFN- $\gamma$  es una citocina pro-inflamatoria producida por células TCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, también, por activación de células NK en respuesta a IL-12 e IL-18 producidas por MAs y DCs, es esencial para la activación de fagocitos y la presentación de antígeno, además promueve proliferación celular, adhesión celular y apoptosis. En MC induce el estallido respiratorio contribuyendo a la producción de RNIs y ROIs (O´Gara, 2013).

Respecto al control del crecimiento de Mtb, esta fase es característica por la inhibición de la proliferación de Mtb con una eficiente interacción entre célula-célula y la formación del granuloma. Como resultado de la estimulación crónica de citocinas, los MCs se diferencian dentro de las células epiteloides y comienzan a fusionarse en células gigantes.

El control de la infección por Mtb comienza con el reconocimiento de componentes de la pared celular de la micobacteria como ácidos micólicos, peptidoglicanos, arabinogalactinas, PIMs, manósido-lipoarabinomananas (Man-LAM), lipomananas y manoglicoproteínas. El reconocimiento de patrones moleculares conservados se da a través de PRRs lo cual desencadena la activación de diversos mediadores de

la inmunidad innata involucrados en la fagocitosis de la micobacteria y vías de señalización relacionadas con la producción de IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Entre los receptores importantes se encuentran TLR-2, TLR-4 y TLR-9, receptor de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR), receptor tipo lectina, scavengers y receptores del complemento (Zuñiga, 2012). TLR-2 forma dímeros con TLR-1 o TLR-6 que reconocen lipoproteínas diacetiladas o triacetiladas, LAM, LM y PIM. El importante rol de TLR-4 en el desarrollo de una eficiente respuesta innata del hospedero ante Mtb fue demostrado en estudios funcionales en ratón. Un ratón C3H/HeJ deficiente de TLR-4 es más susceptible a desarrollar una infección letal de Mtb comparado con un ratón normal C3H/OuJ. La importancia de TLR-9 en el reconocimiento de motivos CpG no metilados ha sido demostrada en ratones deficientes de TLR-9. Estudios *in vitro* confirman que la estimulación a través de TLR-9 induce la producción de IL-12 por células dendríticas.

Los monocitos inflamatorios infiltrados durante la infección son significativamente reducidos en ratones deficientes de CCR2 infectados con Mtb. Durante la infección con TB en un ratón normal, los monocitos reclutados expresan CCR2 el cual tiene diferentes agonistas, entre ellos CCL2. Es aceptado que CCL2 es un activador central de macrófagos.

En la primo-infección el individuo afectado genera una importante respuesta de hipersensibilidad tardía tipo IV- granulomatosa debido a antígenos solubles de la micobacteria, como proteínas de choque térmico; esta respuesta de hipersensibilidad consigue eliminar la mayoría de las veces las células infectadas, cuando la carga antigénica es pequeña; sin embargo, en algunas ocasiones la respuesta inicial de defensa no es la adecuada, hay un exceso de respuesta de hipersensibilidad tardía o bien están presentes linfocitos T supresores de la respuesta de hipersensibilidad tardía y el hospedero desarrolla la enfermedad (García, 2001).

#### 1.4 Granuloma.

El granuloma es una estructura dinámica, desarrollada por el hospedero para contener la infección y eliminar a la bacteria. Sin embargo, la bacteria persiste en estado latente dentro del granuloma por varias décadas (Miranda, 2012). Las células del sistema inmune migran al sitio de infección por una serie de señales de los macrófagos infectados (Flynn, 2004).

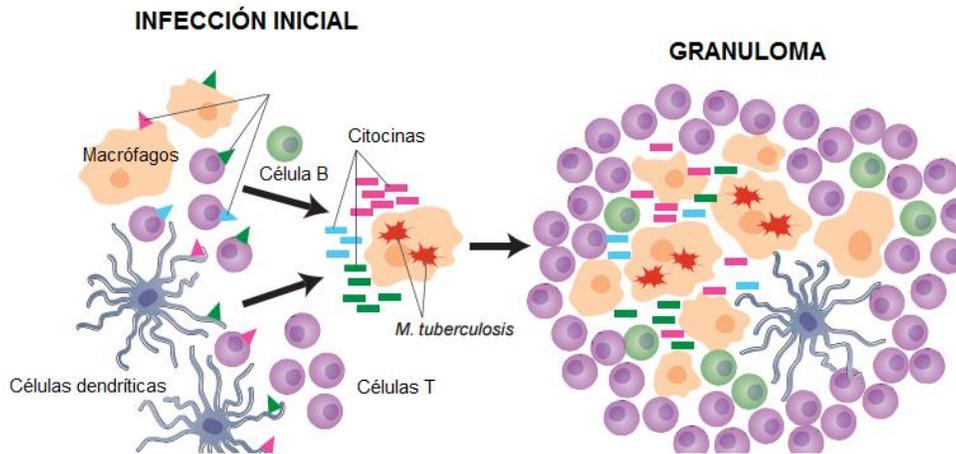


Figura 6. Formación del granuloma. Macrófagos, células dendríticas, células B y T expresan una variedad de receptores de citocinas que responden a citocinas expresadas por células infectadas en el granuloma (Modificado Flynn et. al. 2004).

El granuloma contiene mayoritariamente macrófagos, células epiteliales y células gigantes multinucleadas (células de Langhans), rodeados por linfocitos T. Las DCs también son de importancia porque presentan antígeno a células T en nódulos linfáticos. Estos eventos de señalización llevan a la formación del granuloma, la marca característica de la TB.

Varias citocinas están involucradas en la formación del granuloma. Varias son secretadas por células epiteliales del tracto respiratorio y otras por células del sistema inmune. Particularmente las quimiocinas de unión al receptor CCR2 (CCL2/MCP-1, CCL12 y CCL13) son importantes para el reclutamiento temprano de macrófagos (Miranda, 2012).

Entre las quimiocinas y citocinas involucradas en la formación del granuloma se encuentran:

- CXCL8 (IL-8) secretada por MC alveolares y células epiteliales de pulmón, reclutan neutrófilos.
- CCL2 (MCP-1) secretada por monocitos y MC alveolares para reclutar MC.
- CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b) y CCL5 (RANTES) secretadas por MC alveolares reclutan MC.
- CXCL9, CXCL10 (IP-10), CXCL11 secretadas por células bronco-epiteliales para el reclutamiento de células del sistema inmune.
- CCL19/CCL21 secretadas por células estromales de nódulos linfáticos que reclutan e inducen producción de IFN- $\gamma$  por células T y ayudan a la migración de CD de pulmón a nódulos linfáticos.
- CXCL13 secretada por CD y células estromales de nódulos linfáticos para reclutamiento de células B.
- IL-12/IL-23 secretada por CD y MC, producción e células T CD4<sup>+</sup> Th1.
- IFN- $\gamma$  producido por células T CD4<sup>+</sup> (Th1) y CD8<sup>+</sup>, NK contribuye a la activación de MC e inducción de síntesis de NO y destrucción de la bacteria.
- TNF- $\alpha$  producido por células T CD4<sup>+</sup> (Th1) y MCs, participación pro-inflamatoria, activación de MC e inducción de producción de citocinas.
- IL-1 secretada por MCs y DCs, perfil pro-inflamatorio, reclutamiento y activación de fagocitosis.
- IL-17 secretada por linfocitos T  $\gamma/\delta$  y células T CD4<sup>+</sup> (Th1), perfil pro-inflamatorio, reclutamiento de neutrófilos y activación de MCs.
- IL-10 secretada por linfocitos T reguladores, células B y AAM, perfil anti-inflamatorio, polarización de MCs hacia tipo AAM.
- TGF- $\beta$  producida por linfocitos T reguladores y AAM, perfil anti-inflamatorio.

Los macrófagos son las células principales que se encuentran en los granulomas; sin embargo, no todos son infectados por esta. Las células no infectadas ayudan a contener la infección y contribuyen a la secreción de citocinas. Los macrófagos migran al centro de la lesión donde son activados a través de IFN- $\gamma$  pueden

fusionar se para generar células gigantes multinucleadas Langhans (MGCs), pierden la actividad fagocítica y bactericida por lo que la bacteria permanece en forma latente. Se considera que los lípidos presentes en estas células sirven como fuente de nutrientes para la micobacteria (Miranda 2012 & Peyron 2008).

Los neutrófilos son activados por antígenos procedentes de Mtb, como LAM ayudan a eliminar a la bacteria e inician el proceso inflamatorio a través de la secreción de diversas citocinas (MCP-1, IL-8) para reclutar leucocitos, y organizar el granuloma a través de la secreción de citocinas CXCR3 (MIG, RANTES, MCP-1).

Las células dendríticas son de importancia porque presentan antígeno a células T en nódulos linfáticos. Estos eventos de señalización llevan a la formación de un granuloma, la marca característica de la TB. Esta estructura es desarrollada por el hospedero para contener la infección y eliminar a la bacteria. Sin embargo, la bacteria persiste en estado latente dentro del granuloma por varias décadas (Miranda, 2012).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se encuentran en la periferia en estrecho contacto con los macrófagos. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> juegan un papel importante en el control de la infección con Mtb. Existen datos que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> durante una infección activa secretan la quimiocina CXCL1 (linfotactina) que contribuye a la estabilidad del granuloma. Las células T Natural Killer (NKT) reconocen lípidos, como glicosil ceramidas presentados por CD1d. Los linfocitos B forman agregados y se asocian a monocitos, están implicados en la organización y desarrollo de lesiones granulomatosas en el pulmón (Miranda, 2012).

### *1.5 Inmunometabolismo.*

El estudio de la regulación del metabolismo celular retomó un gran interés en los últimos años para tener un mejor entendimiento de la activación del sistema inmune, ya que es fundamental conocer los requerimientos funcionales de la célula. Las células que se encuentran inactivas requieren ATP para sus funciones basales y para los procesos de quimiotaxis. Bajo una estimulación del sistema inmune, los linfocitos entran en el ciclo celular y comienzan a dividirse. En este estado los linfocitos requieren ATP y grandes cantidades de precursores biosintéticos para su crecimiento (Rathmell, 2012).

El metabolismo celular es un proceso complejo que es regulado por diferentes señales, su papel es mantener la homeostasis y el balance energético en un individuo. Para llevar a cabo su función las células del sistema inmune incrementan la utilización de glucosa para satisfacer las necesidades de energía y proveer de intermediarios para la síntesis de macromoléculas, requieren pasar de un estado basal a un estado activo (Cheng 2014 & Maratou 2007). El metabolismo de la glucosa es crítico para la activación de las células T y también tiene un papel importante en la homeostasis de la T naive, supervivencia y en la conversión a células efectoras (Jacobs, 2010).

En un estado de reposo basal, las células utilizan la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para generar ATP, este proceso se lleva a cabo en la mitocondria a través del ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo TCA) acompañado de consumo de oxígeno. Sin embargo, durante la activación del sistema inmune el metabolismo central sufre una reprogramación de OXPHOS a glucólisis aeróbica para generar ATP. Este cambio a glucólisis aeróbica se conoce como “efecto Warburg” (Cheng, 2014).

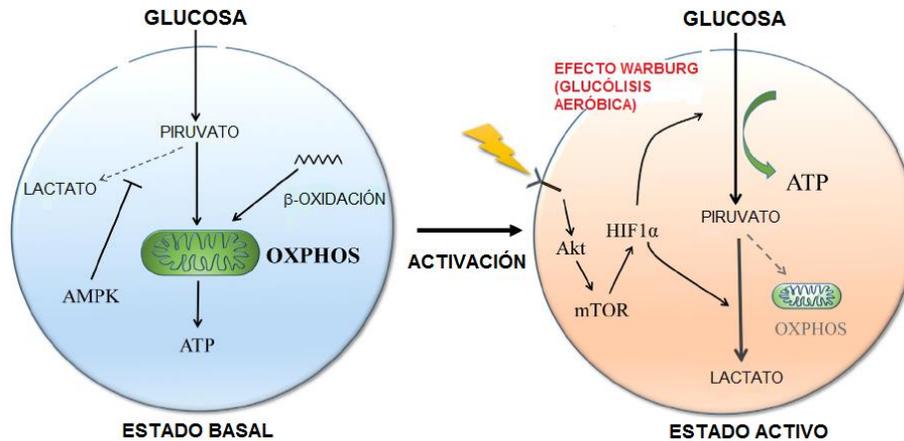


Figura 7. Cambio en la activación del metabolismo central (Modificado de S.-C. Cheng, 2014).

La fosforilación oxidativa puede iniciar desde la oxidación de la glucosa hasta la formación de piruvato y de ahí a Acetil-CoA, su subsecuente entrada al ciclo TCA en donde se forman grandes cantidades de coenzimas reducidas (ricas en electrones), NADH y FADH<sub>2</sub>. La fosforilación oxidativa consta de dos partes que están acopladas entre sí:

- Oxidativa, comprende una serie de reacciones de transferencia de electrones a partir de la oxidación de sustratos. Está integrada por una serie de reacciones de óxido-reducción (cadena transportadora de electrones) recibe a los electrones en forma de coenzimas reducidas. Los electrones son aceptados y transferidos secuencialmente por complejos de proteínas que están en la membrana interna mitocondrial, al final son aceptados por el oxígeno, que queda reducido a H<sub>2</sub>O.
- Fosforilante, en la cual el Pi (fosfato inorgánico) se esterifica al ADP por la ATPasa para formar ATP (Nelson, 2008).

En el ciclo del TCA el intermediario succinato y el metabolito NADH tienen un papel importante en la reacción redox para la producción de ATP (Cheng, 2014). El balance por una molécula de glucosa es de 36 ATPs.

La actividad de las células T, tienen mayores necesidades bioenergéticas y biosintéticas para llevar a cabo su expansión clonal y sus funciones. Conociendo estas necesidades la glucólisis aerobia se activa sobre la OXPHOS. El complejo

CD28/PI3K/Akt es el responsable del incremento de la actividad glucolítica en la activación de las células T. La señalización del receptor TCR y CD28 inician un incremento rápido del metabolismo y la transición a glucólisis aerobia (Thorens, 2010). En la activación de células T, se estimula la señalización de PI3K y Akt que activan a mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) que tiene un papel central en la proliferación celular. Esta vía de señalización promueve la expresión de Glut1 en la superficie de la célula, el transporte de glucosa y la glucólisis, además induce la expresión de SREBP1, un factor de transcripción que estimula la síntesis de lípidos (Cheng 2014 & Thorens 2010).

La AMPK (proteína cinasa activadora de AMP) funciona como un barómetro de los niveles de energía de la célula, inhibe a mTOR y estimula más el metabolismo catabólico que anabólico para oxidación de lípidos ( $\beta$ -oxidación). Cuando el nivel de ATP celular es bajo, AMPK es activada, es indispensable para la proliferación de células T y función de citocinas de células T CD8<sup>+</sup> *in vivo*. La glucólisis produce bajas cantidades de ATP por molécula de glucosa 2 ATPs (Cheng 2014 & Thorens 2010).

La glucólisis y el TCA pueden integrarse cuando el piruvato es convertido en Acetil-CoA, que entra al TCA (Pearce, 2013). Las células tienen la capacidad de metabolizar otros sustratos, como la glutamina por la vía de la glutaminólisis o ácidos grasos por  $\beta$ -oxidación.

La importancia de la glucosa para la activación del sistema inmune es relevante, ya que los linfocitos T no proliferan en un ambiente deficiente de glucosa, y en altos niveles de fuentes alternas de energía, como glutamina. Durante la activación se expresan transportadores de glucosa en las células del sistema inmune (Maratou, 2007).

El transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática es el paso limitante para su posterior utilización y depende en función de transportadores específicos de glucosa (Maratou, 2007). Los transportadores Gluts son proteínas de aproximadamente 500 aminoácidos, transmembranales alfa hélices (Brennan, 2003).

- GLUT1: es un transportador de glucosa basal. Cataliza el paso limitante del abastecimiento de las células del sistema nervioso central con glucosa, que es el combustible esencial de estas células.
- GLUT3 y GLUT4: son transportadores de glucosa dependientes de insulina. GLUT3 es expresado en linfocitos, monocitos/macrófagos y plaquetas. En estas células está presente en vesículas intracelulares que pueden translocarse y fusionarse con la membrana plasmática en la activación celular para incrementar la recaptura y metabolismo de la glucosa (Brennan, 2003).

En monocitos y linfocitos, su activación ocasiona el incremento de niveles de isoformas de Glut1 (Maratou, 2007).

Aún en reposo las células T requieren señales para mantener una tasa basal del metabolismo. La pérdida del receptor de IL-7 es esencial para mantener el metabolismo basal de la glucosa *in vivo*. El receptor de la célula T y la coestimulación de CD28 aumentan la demanda energética y el cambio a glucólisis aerobia (Rathmell, 2012). Un cultivo celular en presencia del receptor de IL-7, puede mantener la recaptura de la glucosa y los niveles de Gut1 permitiendo a las células T ocupar la glucólisis.

Los Macrófagos se dividen en dos tipos según su estado de activación:

- M1, activados clásicamente, los cuales se caracterizan por tener un fenotipo pro-inflamatorio.
- M2, activados de manera alterna, tienen un fenotipo anti-inflamatorio, promueven la remodelación del tejido.

Estas diferencias entre las características funcionales de M1 y M2 son asociadas con diferentes estados metabólicos. Los macrófagos M1 poseen alta actividad glucolítica, mientras los macrófagos M2 utilizan la fosforilación oxidativa como principal vía metabólica para satisfacer los requerimientos de energía para la reparación de tejidos.

Glut1 es altamente expresado en M1, por lo que macrófagos que sobreexpresan este receptor tienen un fenotipo más pro-inflamatorio aumentando la recaptura de glucosa y su metabolismo, la vía de las pentosas y el consumo de oxígeno. En contraste, los macrófagos M2 activados por IL-4 incrementan la  $\beta$ -oxidación (Cheng, 2014).

Estudios previos han demostrado que durante la fagocitosis los macrófagos incrementan la producción de lactato (glucólisis aerobia) y mejoran la activación de la vía de las pentosas (Hall, 2014).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La tuberculosis es la segunda causa de muerte a nivel mundial por una enfermedad infecciosa lo cual representa un problema de salud global. Existen estudios acerca de la respuesta inmune que se desencadena ante la infección por *Mycobacterium tuberculosis*; sin embargo, en la actualidad no existen estudios que analicen los cambios en el perfil de expresión de marcadores asociados al inmunometabolismo, como la expresión del receptor Glut1 en diferentes poblaciones celulares de sangre periférica expuestas a iMtb en modelos experimentales *in vitro*. El modelo que proponemos nos permitirá ampliar el campo de estudio ante la infección por Mtb, ya que aunque se trata de una patología curable aún hay muchos aspectos de la inmuno-patogénesis que es necesario comprender y que posteriormente puedan ser utilizados para diseñar nuevas estrategias de diagnóstico o tratamiento.

## **3. HIPÓTESIS.**

Al estimular las diferentes poblaciones celulares con iMtb, éstas reconocerán patrones moleculares asociados de Mtb, como lípidos y proteínas, activándose y aumentando el nivel de expresión del receptor Glut1 y la inducción de citocinas pro-inflamatorias.

## **4. OBJETIVO GENERAL.**

- ❖ Medir el cambio en la expresión de Glut1 y marcadores de activación celular en linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, monocitos pro-inflamatorios CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> y macrófagos maduros cultivados con *Mycobacterium tuberculosis* irradiada y cuantificar la secreción de citocinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes del cultivo celular.

## **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Evaluación de la expresión de marcadores de superficie: Glut1, HLA-DR, TIM3, V $\alpha$ 24, CD161, CX3CR1, CCR2 en CMN; así Glut1, CD80, CD86, CD68, HLA-DR, TIM3 Y GAL-9 en MC.
- Medición de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el sobrenadante del cultivo celular de CMN y MC.

## **6. METODOLOGÍA.**

### *6.1 Diseño experimental*

Observacional, prospectivo y transversal.

### *6.2 Aislamiento de células mononucleares (CMN) de sangre periférica y diferenciación a macrófagos.*

El concentrado leucocitario de sangre periférica de sujetos sanos se obtuvo del banco de sangre del INER, género masculino, n= 13, edad 19-62 años, peso 71-91 Kg, pruebas serológicas (HIV, HCV, HBsAg, RPR, Brucella y Chagas) negativas. A partir de 5 mL del concentrado leucocitario se realizó una mezcla con PSB pH 7.2-7.4 en una proporción 1:1, después ésta mezcla se agregó a un tubo que contenía Lymphoprep (1.077 g/mL) relación 10:3, enseguida se centrifugó a 800 xg durante 30 minutos a una temperatura de 18°C. Posteriormente se recuperaron las células las cuales se encontraban en la interfase entre plasma y ficoll, se realizaron 3 lavados con PBS 250 xg durante 10 minutos cada uno para eliminar el ficoll así como las plaquetas presentes. Al final del tercer lavado el botón celular se resuspendió en RPMI-1640 (BIOWEST) suplementado con 10 % de SFB (Hyclone), se evaluó la viabilidad así como el conteo celular a través de un contador digital TC20 (BIORAD). Después de sembrar las células mononucleares se agregó la iMtb a la concentración requerida. Para la diferenciación a macrófagos, se sembraron  $1.5 \times 10^6$  CMN por pozo en placas de 24 pozos en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB (Hyclone), se incubaron por dos horas para permitir que las células adherentes se pegaran a la placa, posteriormente se cambió el medio y adicionó 5 ng/mL de GM-CSF a cada pozo para estimular la diferenciación de monocitos a macrófagos, se mantuvieron en esta condición durante 7 días. El fenotipo se confirmó por la morfología que presentaban y la expresión de marcadores de superficie HLA-DR, CD68, CD80 y CD86 (BioLegend).

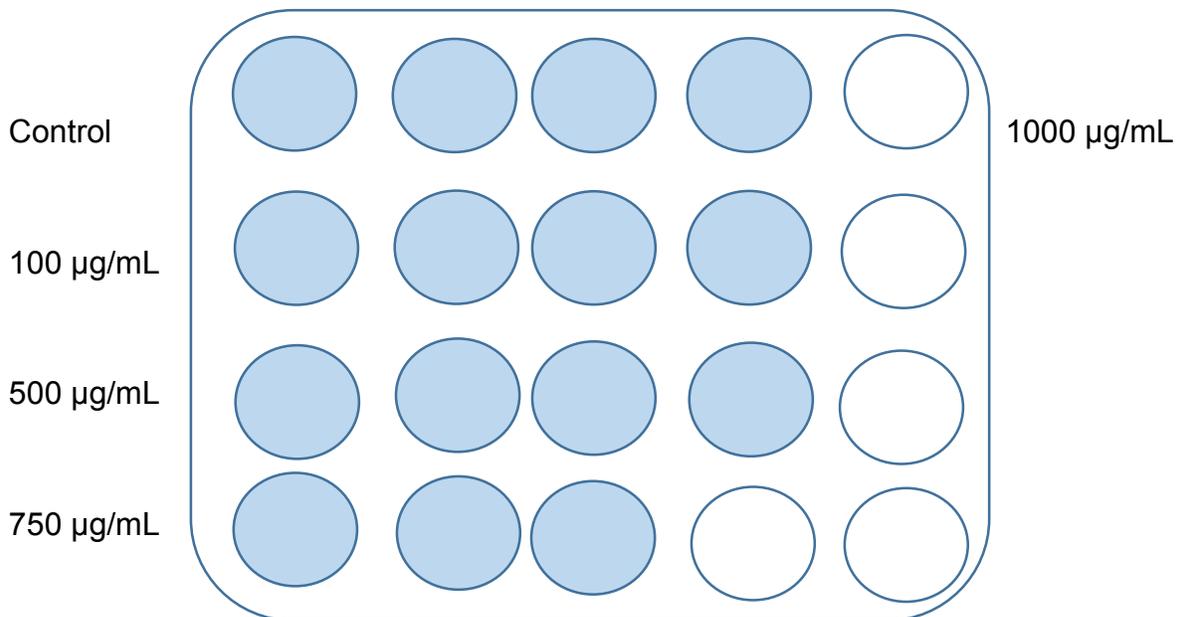
Al séptimo día se estimularon con las concentraciones crecientes de la micobacteria irradiada.

### 6.3 Estimulo.

*Mycobacterium tuberculosis* gamma-irradiada (iMtb) H37Rv (donada por Colorado State University, departamento de Microbiología), se resuspendió en buffer de fosfatos libre de pirógenos (PBS), ajustada a una concentración de 100 µg/mL.

### 6.4 Cultivo de poblaciones celulares con iMtb.

Se sembraron  $1 \times 10^6$  de células por pozo en una placa de 24 pozos. Se estimularon con concentraciones crecientes de iMtb: 100, 500, 750 y 1000 µg/mL. Se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>.



### 6.5 Inmunofenotipificación.

Se evaluaron marcadores de superficie en las diferentes poblaciones celulares a través de citometría de flujo, para ello, se recuperaron las células a través de centrifugación 1500 rpm durante 5 minutos. Se tiñeron con diferentes fluorocromos, se utilizaron los siguientes marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD14, Glut1, TIM3, HLA-DR, Vα24, CD161, CX3CR1, CCR2, CD16, CD57, CD68, CD80 y CD86 (BioLegend). Se incubaron 35 minutos a 4°C, después se realizó un lavado con buffer de tinción, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 µL de buffer de tinción. Los datos se obtuvieron en un citómetro de flujo FACSAria™IIu a través del software FACSDiva (BD Biosciences). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Flowjo v. 10.0.4.

Panel de Citometría de flujo para CMN.

Láser	Fluorocromo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
<b>488 nm</b>	FITC		Glut1	Glut1	Glut1	Glut1		Glut1			
	PE		TIM-3	Vα24		TIM-3	TIM-3				
	PerCP, PeCy5, PerCP-Cy5.5		HLA-DR	CD3	HLA-DR	HLA-DR				CD3	HLA-DR
	PE-Cy7		CD8	CD8	CX3CR1	CD16	CD8		CD16	CD8	
<b>633 nm</b>	APC		CD3	CD161	CCR2	CD3	CD3		CD3		
	APC-Cy7		CD4	CD4	CD14	CD14	CD4	CD14	CD14	CD4	CD14
<b>405 nm</b>	Pacific Blue, BV421			TIM-3	TIM-3	CD57					

Panel de Citometría de flujo para Macrófagos.

Láser	Fluorocromo	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<b>488 nm</b>	FITC		Glut1	CD68		CD68	
	PE				GAL-9		
	PerCP, PeCy5		CD80	HLA-DR	CD80		
	PE-Cy7						
<b>633 nm</b>	APC		CD86				
	APC-Cy7		CD14	CD14	CD14	CD14	CD14
<b>405 nm</b>	BV421			TIM-3			

### *6.6 Medición de citocinas pro-inflamatorias.*

Con los sobrenadantes de los cultivos se llevaron a cabo inmunoensayos con ELISA MAX™ Deluxe Sets (BioLegend) y se determinó la concentración de citocinas pro-inflamatorias (TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ). Dichos ensayos se realizaron sensibilizando las placas con los anticuerpos de captura  $\alpha$ -TNF-  $\alpha$ ,  $\alpha$ -IL-1 $\beta$ ,  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  (1:200) respectivamente, incubándolos toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo se añadieron 100  $\mu$ L de buffer de bloqueo durante 1 h a T.A con agitación constante 200 rpm. Posteriormente se realizó una solución stock de las citocinas recombinantes, a partir de la cual se realizó la curva estándar para cada citocina, se agregaron 100  $\mu$ L de cada estándar así como 100  $\mu$ L de cada sobrenadante en las diferentes condiciones que se tenían incubándose 2 h a T.A. Después se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpo de detección biotinilado y las placas se incubaron 1 h a T.A. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de enzima peroxidasa conjugada con avidina (1000x) incubando durante 30 minutos, para después añadir buffer de sustrato e incubar 20 minutos en oscuridad. Para detener la reacción se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Entre cada paso del procedimiento, después de cada incubación se realizaron 4 lavados con 300  $\mu$ L de PBS + Tween20 0.05% (buffer de lavado). La absorbancia de las placas se leyó en un espectrofotómetro para ELISA iMark™ Microplate Reader (BioRad) a 450 nm. A partir de las curvas estándar se extrapolaron los valores de las muestras para determinar su concentración.

### *6.7 Análisis estadístico.*

Los resultados fueron analizados por ANOVA no paramétrica con Kruskal Wallis usando el programa GraphPad Prism software versión 6.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 Expresión de marcadores de superficie en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Para conocer la activación del sistema inmune, así como el cambio en el metabolismo de las células ante la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* irradiada se evaluó la expresión de los diferentes marcadores de superficie en las poblaciones celulares a través del análisis de cuadrantes con los marcadores específicos para cada población. Para el caso de linfocitos T se tomó la población CD3<sup>+</sup>, luego CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> o CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, de estas células dobles positivas se analizaron los demás marcadores Figuras 8 y 9.

Se evaluó la expresión de Glut1 y HLA-DR, en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Respecto a Glut1, el transportador basal de glucosa, tanto en porcentaje de expresión como intensidad media de fluorescencia no se observó cambio significativo conforme aumentamos la concentración de iMtb, Figura 8. Sin embargo, se logró apreciar que hay una gran variación entre los donadores.

HLA-DR marcador de superficie de MHC II para la presentación de antígeno, se notó una tendencia creciente al ir aumentando la concentración de la bacteria.

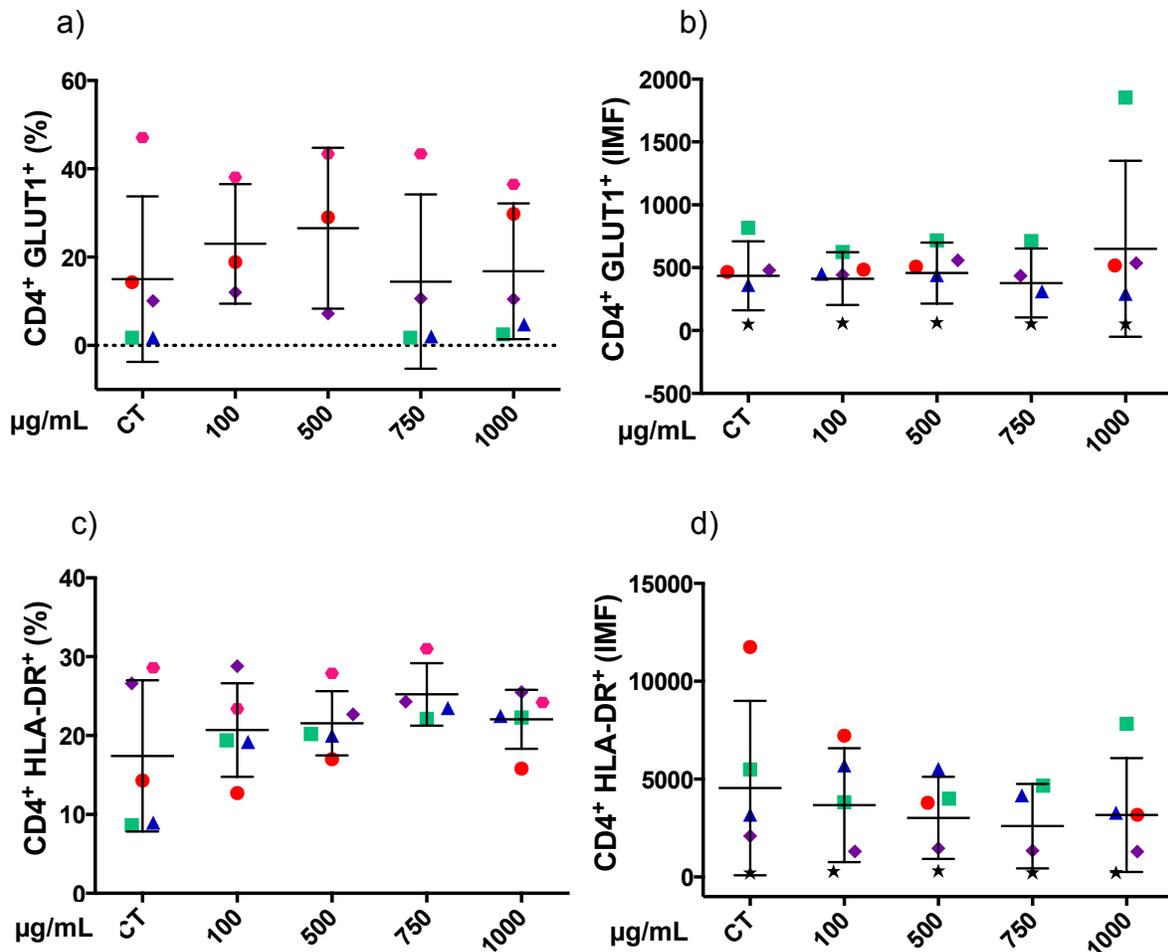


Figura 8. Expresión de marcadores de superficie en células T CD4<sup>+</sup> en presencia de concentraciones crecientes de iMtb, cada color representa un solo donador y la \* representa el límite basal negativo. a) Expresión de Glut1 (n=5) P=0.6769. b) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de Glut1 (n=4) P=0.8578. c) Expresión de HLA-DR (n=5) P=0.5958. d) IMF de HLA-DR (n=4) P=0.9342. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media ± DS.

Respecto a los marcadores de superficie en linfocitos T CD8<sup>+</sup>, Figura 9, Glut1 tuvo una tendencia a aumentar concentración dependiente de la iMtb y en el marcador HLA-DR no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de iMtb y se observó que en unos donadores tiende a decrecer y en otros se mantiene constante.

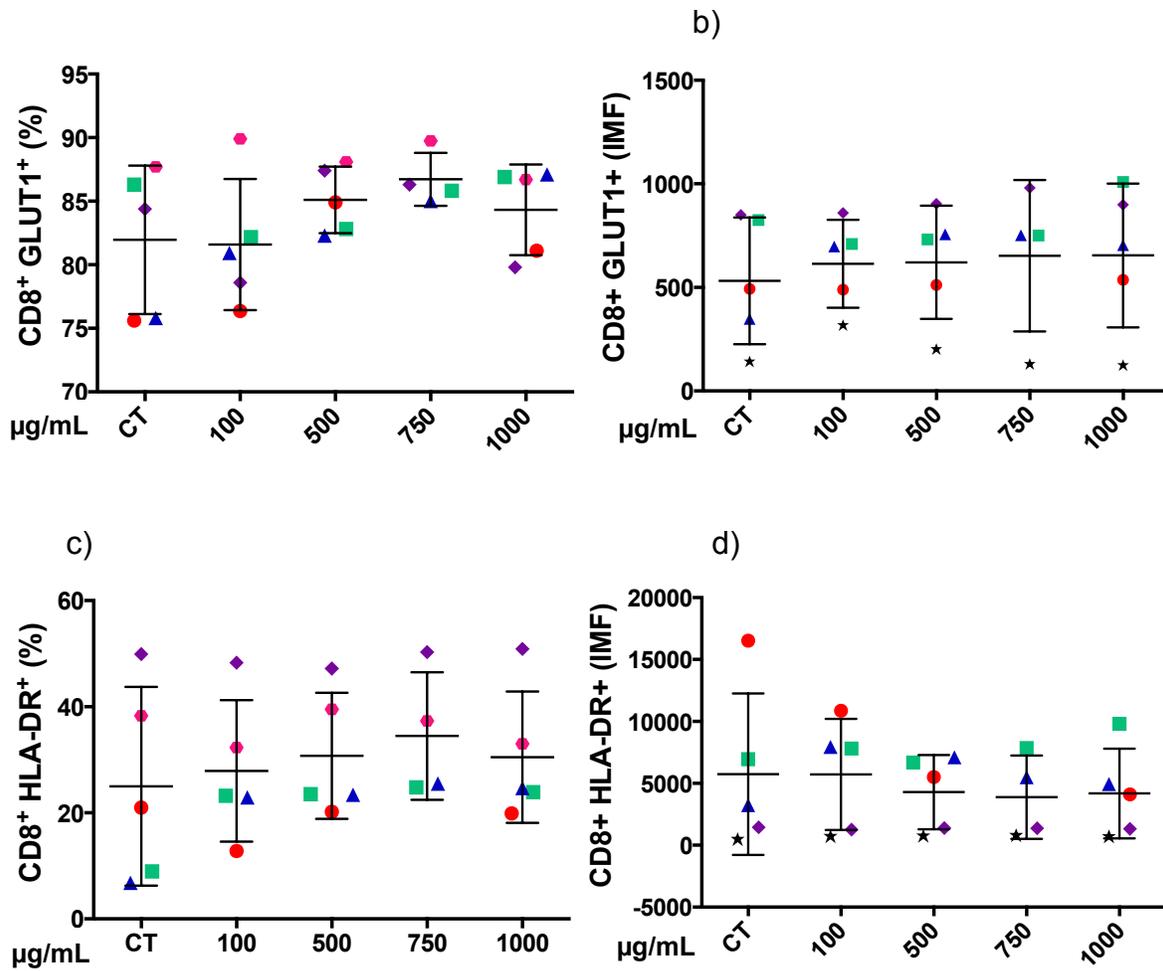


Figura 9. Expresión de marcadores de superficie en células T CD8<sup>+</sup> en presencia de concentraciones crecientes de iMtb, cada color representa un solo donador y la \* representa el límite basal negativo. a) Expresión de GLUT1 (n=5) P=0.4788. b) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de GLUT1 (n=4) P=0.6357. c) Expresión de HLA-DR (n=5) P=0.6366. d) IMF de HLA-DR (n=4) P=0.8972. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media ± DS.

La expresión de TIM-3 en linfocitos T CD3<sup>+</sup> no presentó cambio en las diferentes concentraciones de iMtb, Figura 10.

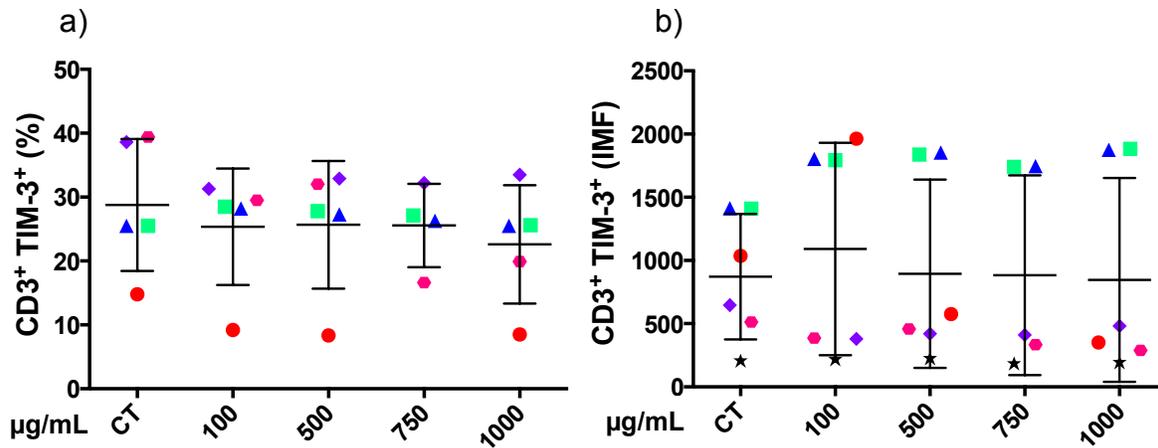


Figura 10. Expresión de marcadores de superficie en células T CD3<sup>+</sup> en presencia de concentraciones crecientes de iMtb, cada color representa un solo donador y la \* representa el límite basal negativo. a) Expresión de TIM-3 en linfocitos T CD3<sup>+</sup> (n=5) P=0.8724. b) IMF de TIM-3 en CD3<sup>+</sup> (n=5) P=0.9341. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media ± DS.

### 7.2 Expresión de marcadores de células NKT.

Las células NKT expresan TCR de cadena invariante V $\alpha$ 24, en la Figura 11 se observa la expresión en porcentaje e IMF, en la cual no hubo diferencias entre las concentraciones de la micobacteria; sin embargo, si hubo expresión de estas células por la presencia de iMtb. Respecto a CD161 es expresado en células T, no se observaron cambios entre las concentraciones, aunque el comportamiento entre donadores fue diferente.

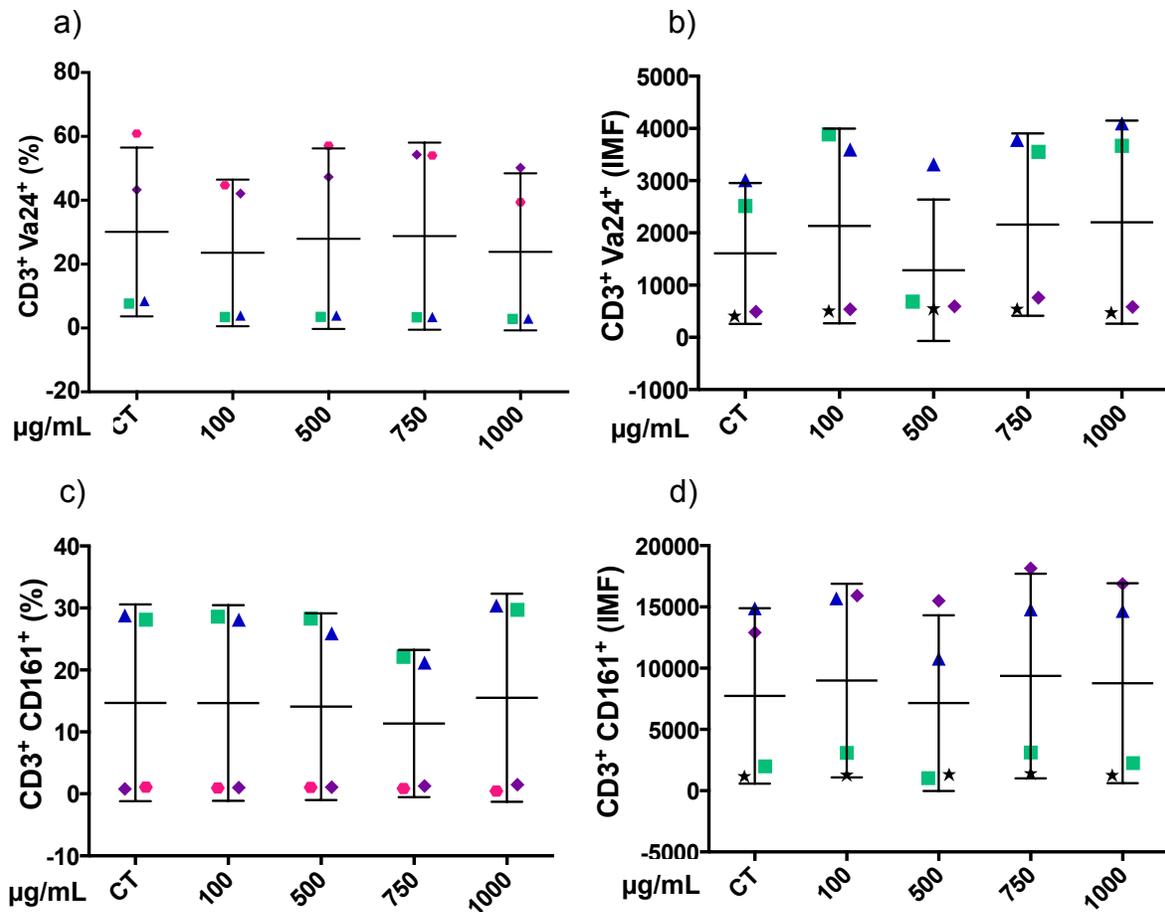
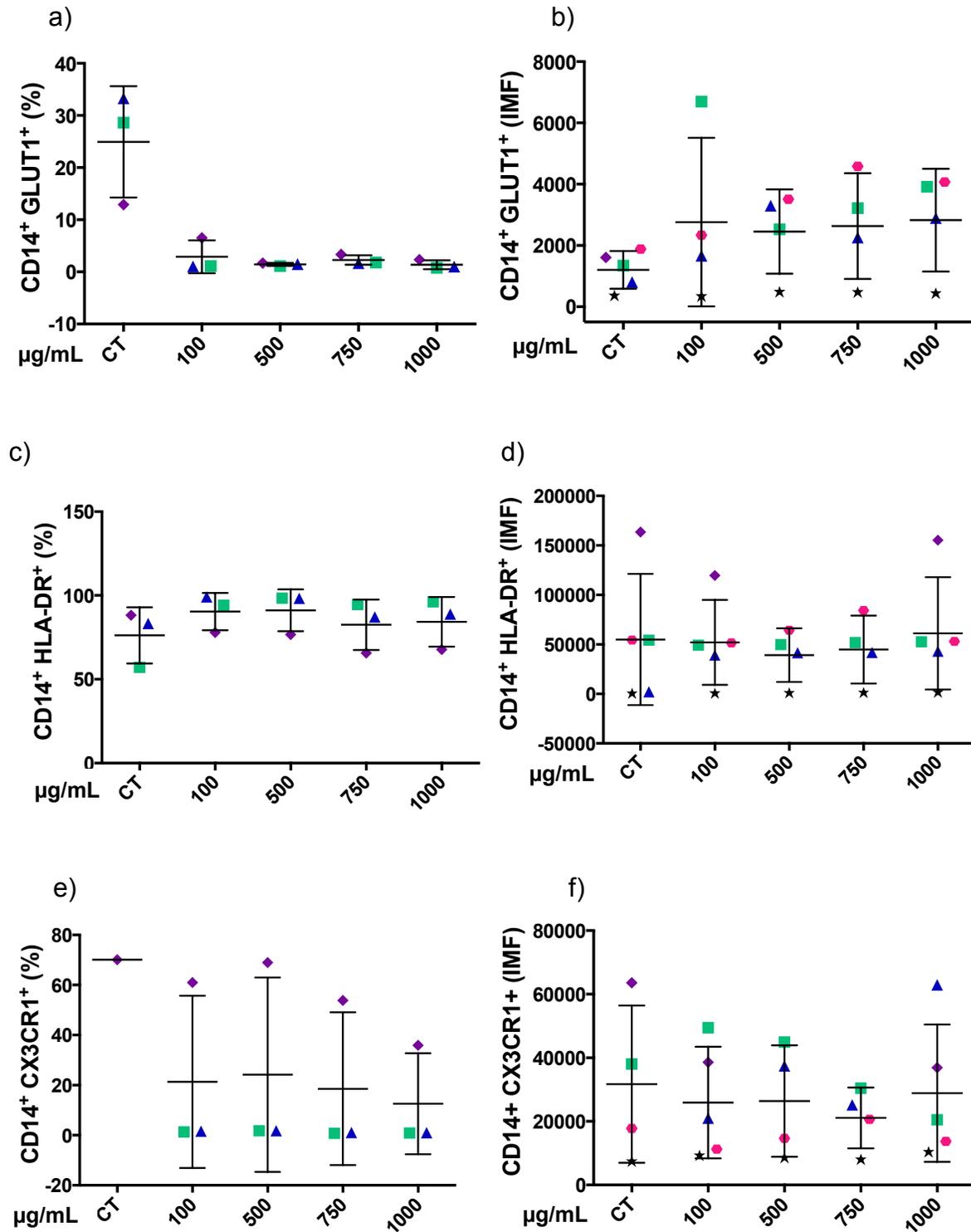


Figura 11. Expresión de marcadores de superficie en células T CD3+ de Células Mononucleares totales (CMN), en presencia de concentraciones crecientes de iMtb, cada color representa un solo donador y la \* representa el límite basal negativo. a) Expresión de Vα24 en CD3+ (n=4) P=0.7016. b) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de Vα24 en CD3+ (n=3) P=0.6371. c) Expresión de CD161 en CD3+ (n=4) 0.9399. d) IMF de CD161 en CD3+ (n=3) P=0.7998. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media ± DS.

### 7.3 Expresión de marcadores de superficie en monocitos CD14+.

En lo que respecta a los monocitos CD14+ (Figura 12) el análisis de la IMF de la expresión de Glut1 mostró diferencias significativas entre el control y las células estimuladas con iMtb y en porcentaje se mantuvo sin cambios. HLA-DR se mantuvo sin cambios. El análisis de CX3CR1 no tuvo una tendencia clara respecto a las diferentes concentraciones de iMtb. CCR2 tuvo una baja expresión en monocitos estimulados con iMtb en comparación con las células sin estimular. El porcentaje de células positivas para TIM-3 fue bajo en monocitos y no cambio ante

el aumento de concentración de iMtb; sin embargo, el análisis de la IMF mostró un incremento con las concentraciones más altas de la micobacteria.



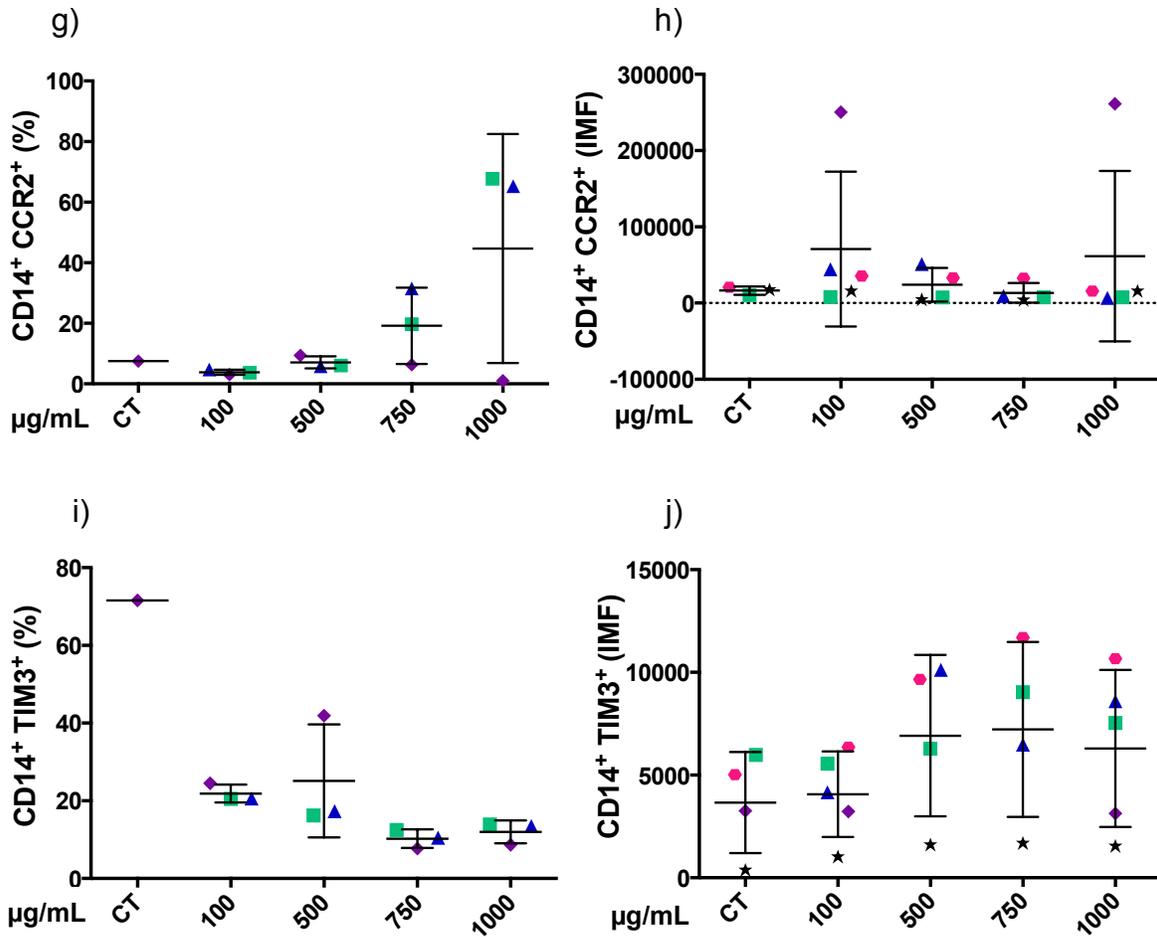


Figura 12. Expresión de marcadores de superficie en células CD14<sup>+</sup> en presencia de concentraciones crecientes de iMtB, cada color representa un solo donador y la \* representa el límite basal negativo. a) Expresión de Glut1 (n=3) P=0.0361. b) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de Glut1 (n=4) P=0.0511. c) Expresión de HLA-DR (n=3) P=0.6035. d) IMF de HLA-DR (n=4) P=0.8958. e) Expresión de CX3CR1 (n=3). f) IMF de CX3CR1 (n=4) P=0.9410. g) Expresión de CCR2 (n=3). h) IMF de CCR2 (n=4) P=0.7399. i) Expresión de TIM-3 (n=3). j) IMF de TIM-3 (n=4) P=0.1007. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media ± DS.

#### 7.4 Expresión de marcadores de células NK.

En la Figura 13, se apreció la expresión de células natural killer, la cual se mantuvo constante ante el estímulo de diferentes concentraciones de iMtb.

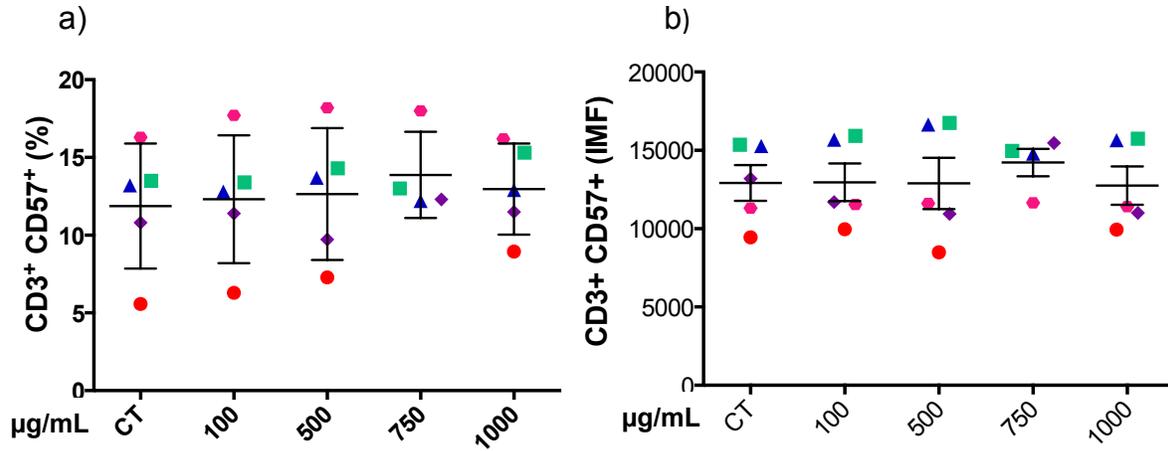


Figura 13. Expresión de marcadores de superficie en células CD3+ CD57+ en presencia de concentraciones crecientes de iMtb, cada color representa un solo donador. a) Expresión de NKs (n=5) P=0.9817. b) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de NKs (n=5) P=0.9453. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media ± DS.

#### 7.5 Expresión de marcadores en monocitos pro-inflamatorios.

Se evaluó la expresión de Glut1, HLA-DR y TIM-3 en monocitos pro-inflamatorios. En la Figura 14 se observó la IMF de dichos marcadores que no mostraron ninguna tendencia de incrementar o disminuir ante las concentraciones crecientes de iMtb, pero presentó dispersión entre los donadores.

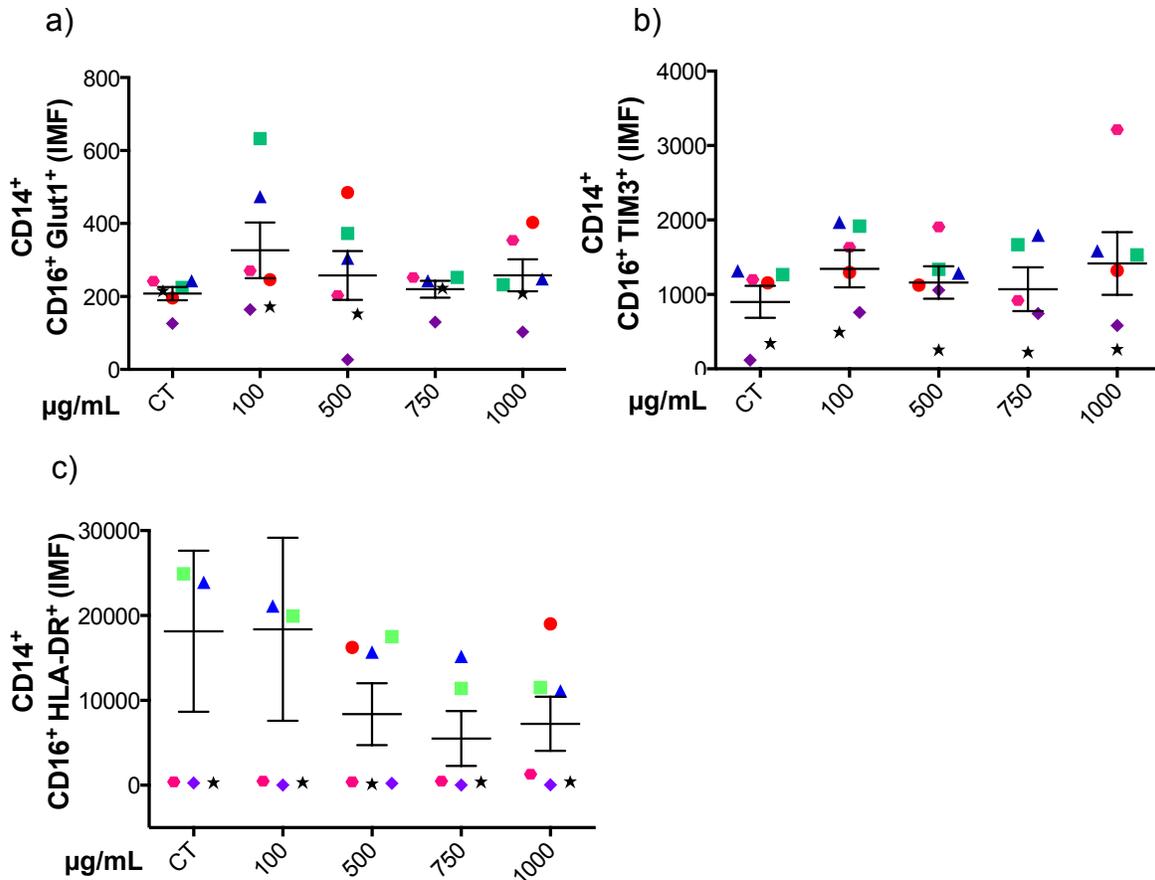
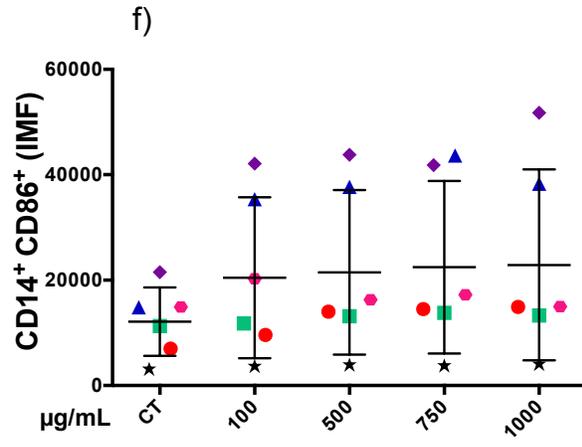
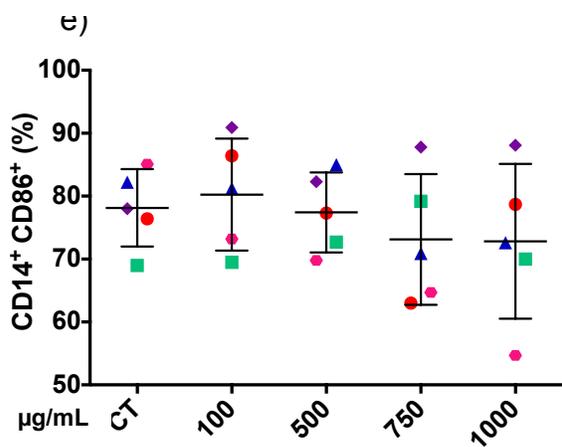
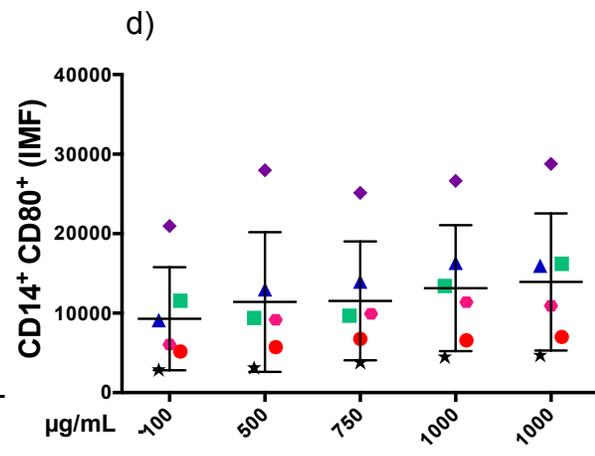
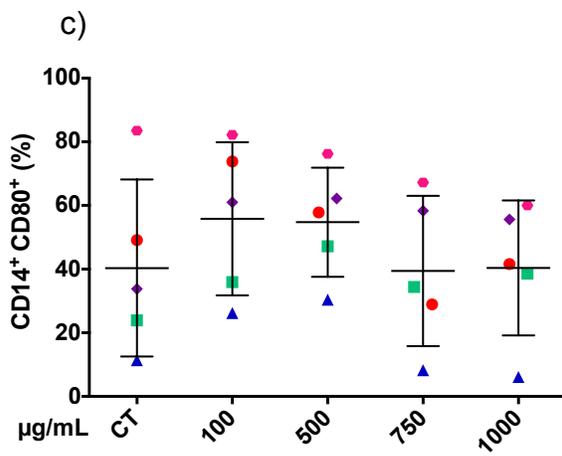
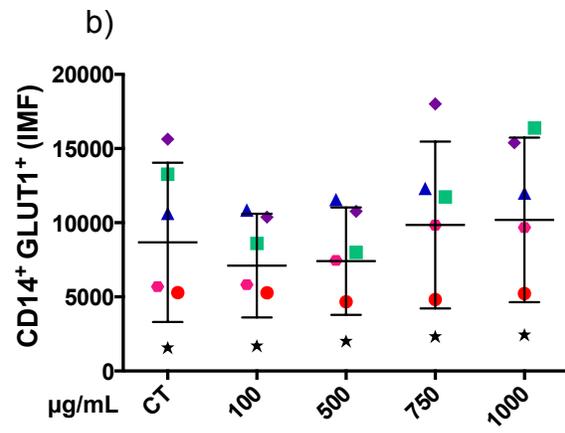
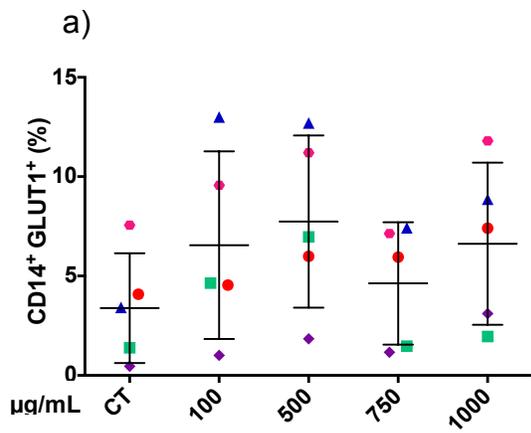
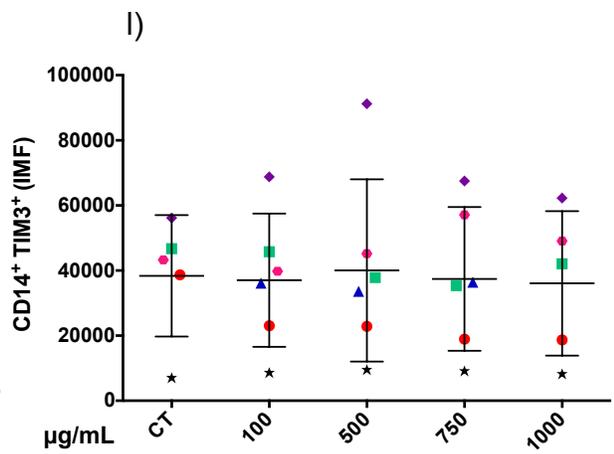
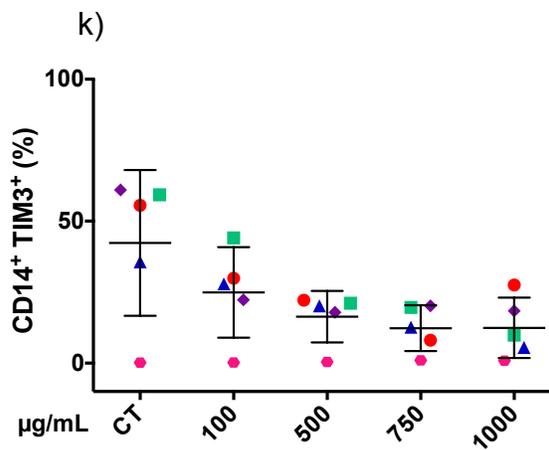
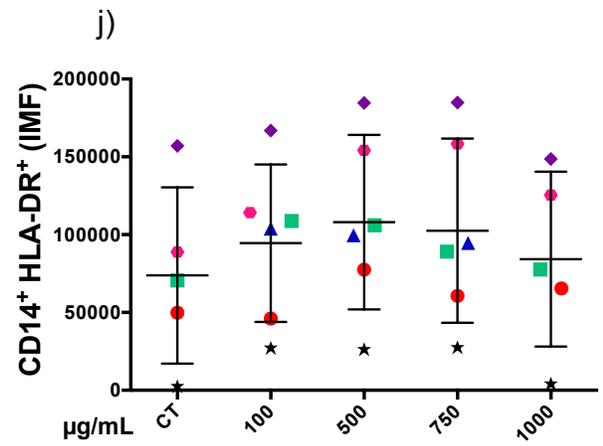
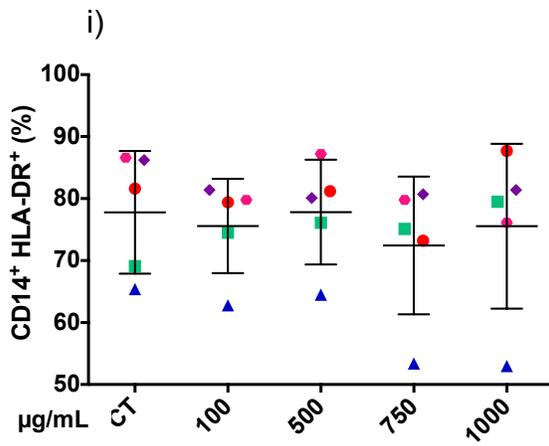
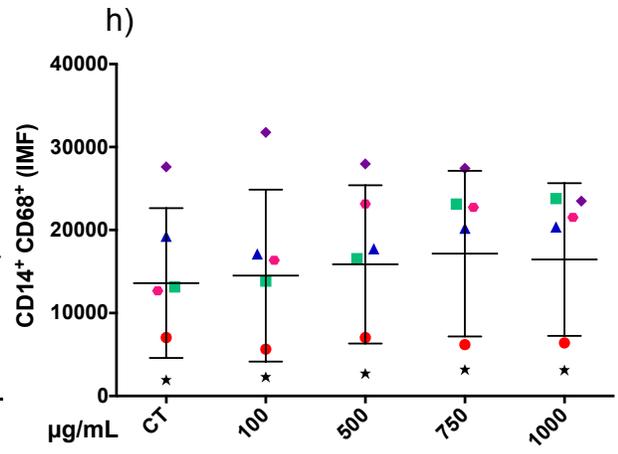
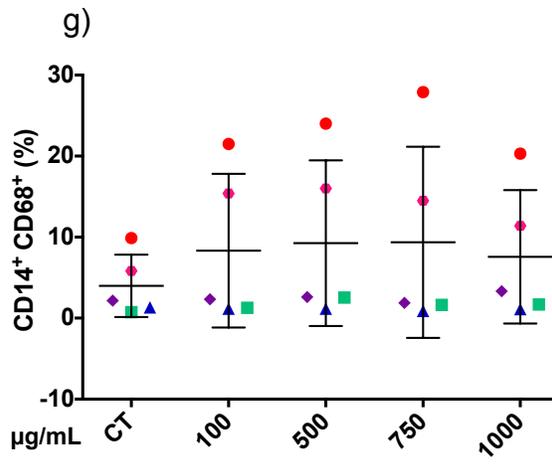


Figura 14. Expresión de marcadores de superficie en monocitos pro inflamatorios CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> en presencia de concentraciones crecientes de iMtb, cada color representa un solo donador y la \* representa el límite basal negativo. a) IMF de Glut1 en CMN (n=5) P=0.4153. b) IMF de TIM-3 en CMN (n=5) P=0.4857. c) IMF de HLA-DR en CMN (n=5) P=0.6769. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media ± DS.

### 7.6 Expresión de marcadores de superficie en macrófagos maduros.

Se evaluaron diferentes marcadores de superficie en macrófagos maduros para observar su activación y estado de maduración ante la presencia de iMtb. En la Figura 15, Glut1, tuvo una tendencia a ir aumentando conforme a las concentraciones de iMtb, CD80, tuvo una expresión constante sin cambio aparente en las concentraciones, CD86, CD68, HLA-DR no presentó cambios entre las diferentes concentraciones de iMtb, pero si entre los donadores. TIM-3 tuvo una tendencia a disminuir y galectina-9 permaneció constante.





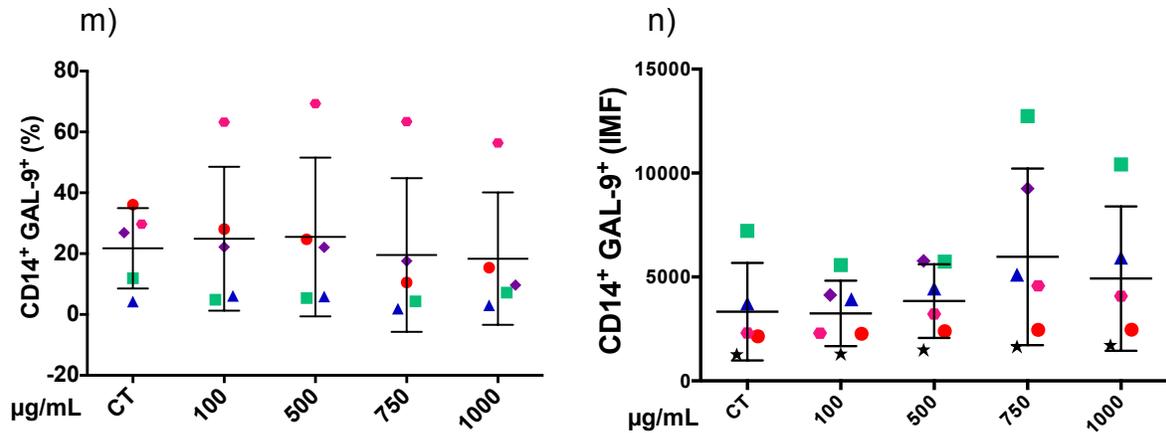


Figura 15. Expresión de marcadores de superficie en Macrófagos maduros, en presencia de concentraciones crecientes de iMtb, cada color representa un solo donador y la \* representa el límite basal negativo. a) Expresión de Glut1 (n=5) P=0.4623. b) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de Glut1 en (n=5) P=0.5618. c) Expresión de CD80 (n=5) P=0.6256. d) IMF de CD80 (n=5) P=0.5933. e) Expresión de CD86 (n=5) P=0.7640. f) IMF de CD86 (n=5) P=0.6178. g) Expresión de CD68 (n=5) P=0.8954. h) IMF de CD68 (n=5) P=0.8163. i) Expresión de HLA-DR (n=5) P=0.7497. j) IMF de HLA-DR (n=5) P=0.7844. k) Expresión de TIM-3 (n=5) P=0.1582. l) IMF de TIM-3 (n=5) P=0.9523. m) Expresión de GAL-9 (n=5) P=0.8664. n) IMF de GAL-9 (n=5) P=0.3363. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media ± DS.

### 7.7 Concentración secretada de citocinas pro-inflamatorias en sobrenadante de cultivo.

Se determinó la concentración de citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo de CMN y MC estimulados por 24 horas con concentraciones crecientes de la bacteria. IL-1 $\beta$ , en MC así como en CMN se presentó una tendencia ir aumentando de manera dependiente de la concentración. IFN- $\gamma$  solo se logró determinar en CMN y se observó que incrementa conforme al aumento de iMtb. TNF- $\alpha$ , también incrementó concentración-dependiente, presentó una diferencia significativa aumentando en función directa de la concentración del estímulo (iMtb).

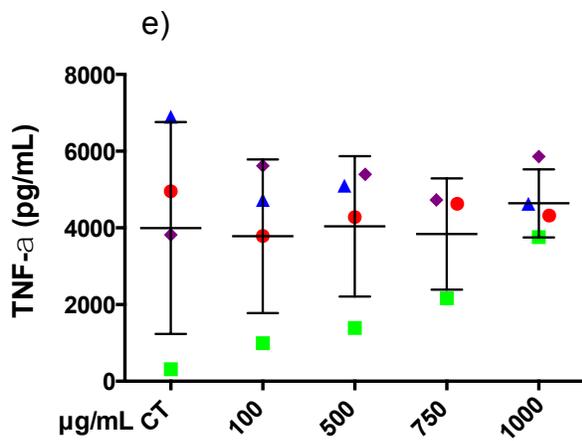
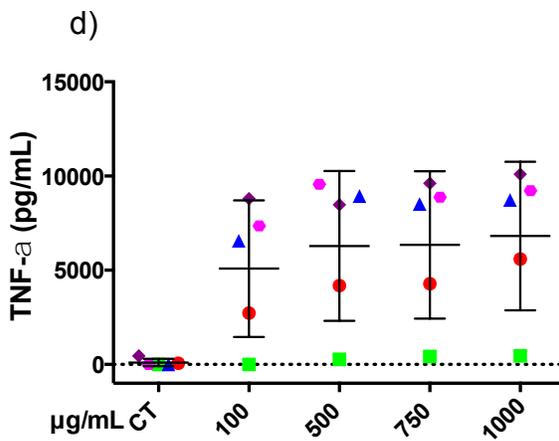
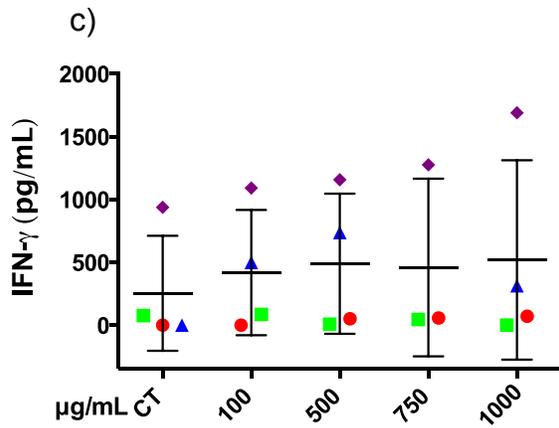
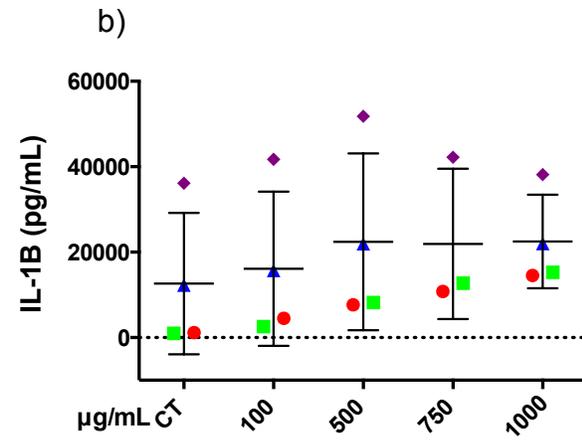
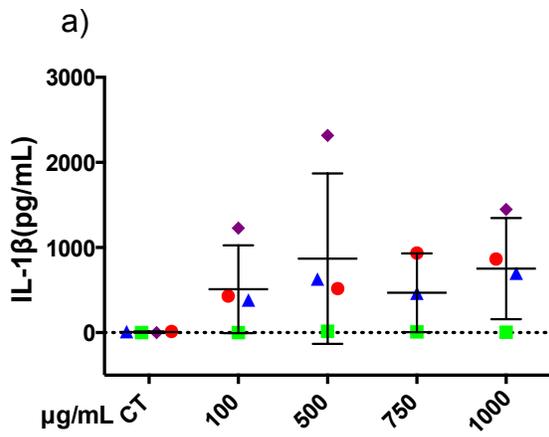


Figura 16. Secreción de citocinas pro-inflamatorias en CMN y macrófagos expuestos a concentraciones crecientes de iMtb. a) Secreción de IL-1 $\beta$  en MC (n=4) P=0.1735. b) Secreción de IL-1 $\beta$  en CMN (n=4) P=0.5801. c) Secreción de IFN- $\gamma$  en CMN (n=4) P=0.9082. d) Secreción de TNF- $\alpha$  en MC (n=5) P=0.0389. e) Secreción de TNF- $\alpha$  en CMN (n=5) P=0.9960. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, P<0.05, Media  $\pm$  DS.

## 8. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se estudiaron algunas características de la respuesta inmune en linfocitos T y monocitos ante la estimulación con la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* irradiada; la cual, al estar en cultivo con células mononucleares de sangre periférica indujo la activación celular como un mecanismo de defensa en contra. iMtb, cuenta con moléculas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos dentro de los cuales podemos identificar a los glicolípidos y lipoproteínas tales como LM, LAM y PIMs los cuales son reconocidos por células del sistema inmune innato. La respuesta inmune ante la infección por Mtb es un ejemplo clásico de la respuesta mediada por células dirigida contra una bacteria intracelular facultativa (Figuroa, 2001).

Los principales resultados obtenidos en este trabajo son: 1) cambios en el porcentaje de expresión de marcadores de superficie importantes al evaluar el estado metabólico de diferentes poblaciones celulares, aunque no fueron significativos toman relevancia fisiológicamente, 2) cambios en la densidad de expresión del receptor Glut1 al evaluarse en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y monocitos CD14<sup>+</sup>, 3) cambios en la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) secundario a la estimulación con iMtb.

El objetivo de analizar la expresión de receptores en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, monocitos pro-inflamatorios y macrófagos maduros, es que todas estas poblaciones tienen un papel importante en los mecanismo de control de la infección, ya sea para inducir la presentación y procesamiento de antígenos o durante la secreción de citocinas o quimiocinas pro-inflamatorias debido al cambio del estado metabólico de las células. El control de la infección a nivel pulmonar depende del desarrollo de una eficiente respuesta inmune innata y adaptativa. En varios modelos experimentales murinos se ha demostrado que las

células T CD4<sup>+</sup> son esenciales para el control de la infección aguda, mientras que las células T CD8<sup>+</sup> son esenciales para mantener y controlar la fase crónica de la tuberculosis pulmonar (Li, 2014 & Rocha, 2007). En este proyecto analizamos los cambios en el perfil de expresión del receptor para glucosa Glut1 en linfocitos T. Desarrollamos un modelo experimental *in vitro* en cual las CMN totales fueron expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes de la bacteria. Al analizar las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> identificamos que bajo estas condiciones experimentales no modificaron el nivel de expresión basal (IMF) del marcador Glut1 a las diferentes concentraciones. Una posible explicación para este fenómeno es que cada individuo analizado tiene características específicas y únicas en su sistema inmune que son el resultado de la exposición a diferentes patógenos, estado de salud/enfermedad, edad, peso, medio ambiente en el que se ha desarrollado, infecciones recurrentes, etc. Otra posibilidad es que utilizamos una bacteria muerta por lo que la respuesta inmune que se desarrolla es diferente de la obtenida con una bacteria que se encuentra en la etapa de crecimiento logarítmico. Un hallazgo relevante fue que al analizar el porcentaje de células T Glut1 positivas en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> pudimos identificar un perfil de expresión diferencial; esto es, las células T CD8<sup>+</sup> tienen una mayor expresión de Glut1 respecto a las células CD4<sup>+</sup>. La relevancia de este fenómeno radica en que las células T CD8<sup>+</sup> son las encargadas de eliminar a la bacteria utilizando los diversos mecanismos de citotoxicidad con que cuentan por lo que requieren una mayor aportación de energía para ser activadas y llevar a cabo su función en la inmunidad celular (Li, 2014). Glut1 es un marcador que nos indica indirectamente el estado metabólico de las células, por lo que se esperaba que estas células incrementaran la expresión del marcador conforme aumentara la concentración de iMtb (comportamiento concentración dependiente), sin embargo, no pudimos identificar este fenómeno. Uno de los problemas técnicos al cual nos enfrentamos fue la dificultad para resuspender la micobacteria irradiada lo cual tuvo como consecuencia incrementar la variabilidad en las concentraciones que fueron adicionadas a los cultivos celulares.

Otro marcador relevante que analizamos en este proyecto fue TIM-3 el cual es conocido como un receptor de tipo inhibitorio para los linfocitos T. TIM-3 se expresa en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y estudios previos han demostrado que tiene funciones de regular negativamente la respuesta inmune al inducir apoptosis en aquellos linfocitos T CD4<sup>+</sup> de tipo Th1 y juega un papel importante en la inmunopatogénesis de enfermedades autoinmunes y algunas infecciones virales (Sada, 2012). Los resultados que nosotros obtuvimos al analizar la expresión de este marcador mostraron un porcentaje menor de 40% en las células T; sin embargo, el análisis de la IMF mostró que la densidad de moléculas de TIM-3 fue alta sugiriendo que de alguna manera este receptor si participa en la respuesta inmune contra Mtb. Estudios previos han demostrado que la expresión incrementada de TIM-3 en células T puede estar relacionado con la baja producción de citocinas pro-inflamatorias en diversas infecciones virales, la expresión de dicho marcador puede favorecer el fenotipo de célula exhausta (Sada, 2012). Evaluamos también la expresión de HLA-DR como un marcador de superficie que es relevante en la maduración y activación de las células así como en la presentación antigénica. Los resultados mostraron un discreto incremento concentración dependiente en la expresión de HLA-DR en los linfocitos T reflejando que los linfocitos T incrementaron su nivel de activación.

Otra población de células linfoides que analizamos debido a su relevancia en la inmunopatogénesis de la tuberculosis pulmonar fueron las células NKTs, que entre las células del sistema inmune en sangre periférica están en una proporción de 1%. Las células NKTs tienen características de células innatas y median una respuesta efectora rápida para la identificación de células infectadas. La gran capacidad para producir IFN- $\gamma$  las convierte en una población altamente relevante para suprimir la replicación intracelular de la bacteria, reconocen lípidos presentados a través de la molécula CD1d (Sada, 2008). CD1 es una molécula que presenta antígenos de naturaleza lipídica y que es estructuralmente semejante a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I). La activación de las células NKT favorece la producción de grandes cantidades de IFN- $\gamma$  lo cual es fundamental para la activación de macrófagos. Se evaluó la

frecuencia de células NKT dentro del subconjunto de células CD3<sup>+</sup> con base a la expresión de los marcadores CD3<sup>+</sup> y de la fracción V $\alpha$ 24<sup>+</sup> del receptor de la célula T. En nuestro análisis no identificamos cambios en la frecuencia de estas células respecto al aumento en la concentración de iMtb.

En este estudio la activación de células NK no mostró cambio con las diferentes concentraciones de la micobacteria; sin embargo, el análisis de estas células es relevante por la actividad citotóxica temprana que median, ya que no requieren la presentación de antígeno para desencadenar su función. Entre los receptores que están presentes en las células NKs y que son relevantes para su función esta CD161, el cual funciona como un receptor estimulador o inhibidor de la actividad citotóxica y la secreción de citocinas, granzima, perforina y granulisina como mecanismo de defensa para erradicar a la bacteria. Finalmente, analizamos la población de monocitos CD14<sup>+</sup>, el cual, es el marcador de linaje de estas células mieloides y también es un receptor que reconoce ligandos bacterianos tales como el ácido lipoteicoico, lipoproteínas y LA presentes en la micobacteria; facilita la internalización de Mtb no opsonizada; sin embargo, por sí sola no es capaz de mediar la fagocitosis del bacilo por lo que requiere la cooperación de receptores como TLR2 y 4 (Guirado, 2013). En los monocitos CD14<sup>+</sup> se observó que los marcadores de relevancia Glut1 yTIM-3 tienden a incrementar su expresión de manera concentración-dependiente, sugiriendo que la actividad inmunometabólica se incrementa con la finalidad de inducir mecanismos que permitan eliminar a la bacteria. Glut1 presenta diferencia significativa P=0.0361, por que refiere que existe una diferencia general entre los grupos estudiados. Se ha demostrado que los pacientes con diagnóstico de TB pulmonar cursan con un incremento en el número circulante de monocitos pro-inflamatorios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) y que adicionalmente estas células tienen un fenotipo de célula inmadura (Castaño, 2014). Conforme a los resultados descritos anteriormente los monocitos pro-inflamatorios CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> tienden a incrementar la densidad del marcador Glut1 (IMF) y de TIM-3, siendo esto dependiente de la concentración de iMtb. Es factible que los cambios observados reflejen el mayor requerimiento de energía que es

secundario a la activación de los monocitos independientemente de que no se haya alcanzado la significancia estadística.

Las quimiocinas son moléculas importantes durante la infección por Mtb, ya que son esenciales para el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de infección, destacan los leucocitos. En este trabajo evaluamos el perfil de expresión de algunos receptores de quimiocinas que son relevantes para la adecuada formación del granuloma, CX3CR1 y CCR2. Los resultados mostraron, que no hubo diferencias significativas en la expresión de CX3CR1 y CCR2 cuando las células fueron expuestas a las diferentes concentraciones de iMtb. Por otra parte, el nivel de expresión del marcador de activación y maduración celular HLA-DR disminuyó conforme se incrementó la concentración de la bacteria, sugiriendo que estos cambios pudieran tener impacto en el nivel de activación de los monocitos así como en la presentación antigénica limitando de esta manera la eliminación de la bacteria.

Los macrófagos son células fagocíticas profesionales a los que se les ha considerado como el nicho intracelular para Mtb. Cuando son activados inducen diversos mecanismos encaminados a mediar la muerte directa de la bacteria (Sada, 2012). Dada la relevancia de la funcionalidad del macrófago en la inmunopatogénesis de la tuberculosis es que decidimos también evaluar algunos cambios fenotípicos en macrófagos diferenciados a partir de monocitos. El análisis de la expresión del receptor Glut1 incrementó de una manera concentración dependiente, sugiriendo que los macrófagos se activaron después de la exposición a la bacteria. Este resultado fue apoyado en la expresión de CD80, CD86 y CD68 las cuales incrementaron su nivel de expresión. Al analizar el fenotipo de los macrófagos pudimos identificar un incremento en la expresión de Glut1, sugiriendo que los macrófagos requieren un mayor aporte de energía para llevar a cabo sus diversas funciones tales como la expresión de PRRs y receptores fagocíticos que son importantes en el reconocimiento de patógenos y respuesta a patógenos para activar la respuesta inmune.

Se ha documentado que CD68 es un marcador de maduración de macrófagos; sin embargo, al analizar este marcador en modelo experimental *in vitro* que desarrollamos no observamos un incremento en su expresión durante el proceso de diferenciación celular. Otro de los marcadores que ha sido ampliamente utilizado como indicador de madurez en células mieloides es HLA-DR. Nuestros resultados mostraron que más del 80% de las células fueron positivas para este marcador. Estudios previos realizados por Sada y colaboradores con la cepa H37Rv de Mtb indicaron que la infección bacteriana de los macrófagos derivados de monocitos inhibe la expresión de C80, CD86 y HLA-DR. La disminución en la expresión de estas moléculas es uno de los mecanismos que utiliza la micobacteria para evadir la respuesta inmune. Una menor expresión de HLA-DR y de moléculas co-estimuladoras está asociada con una deficiente presentación de antígeno a las células T. Más recientemente se demostró que otras moléculas como TIM-3 y Gal9 también participan en la inmunidad contra Mtb, ya que la interacción TIM3-Gal9 induce la activación de macrófagos lo cual resulta en la muerte de la bacteria. Estas moléculas contribuyen al control de la replicación intracelular de Mtb al activar mecanismos antimicrobianos que dependen de la producción de IL-1 $\beta$ . Al analizar la expresión de TIM-3 y Gal9 en macrófagos infectados identificamos que TIM-3 disminuye mientras que la expresión de Gal9 se mantiene constante. Es posible que modificaciones en el perfil de expresión de estos marcadores limite la producción de IL-1 $\beta$  y con ello la capacidad del macrófago para eliminar a la bacteria.

En este estudio medimos la concentración de citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en los sobrenadantes de cultivo de los experimentos realizados en CMN y en MC después de la infección. Pudimos identificar que ha mayor concentración de la bacteria mayor producción de citocinas, tanto para CMNs como para MCs. Estos resultados nos permitieron inferir que las células T llevaron a cabo su función en contra de la bacteria, además sugieren que a pesar del daño celular que se presenta a consecuencia de la presencia de la bacteria, las citocinas liberadas ayudan a la activación y maduración de los otros tipos celulares como son los macrófagos para mejorar el control de la estimulación con iMtb. Entre las

citocinas que analizamos se encuentra IFN- $\gamma$ , el cual se ha reportado que participa en el control de la infección por Mtb, es producido por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células NK, mejora la presentación de antígeno en DCs y MC al promover la expresión de HLA-DR y promueve la muerte de patógenos intracelulares en el MC. Recientemente se tienen reportes que la producción de IL-12 es dependiente de IFN- $\gamma$  por macrófagos alveolares infectados con la micobacteria (Frucht, 2001 & Gideon 2013). En los resultados obtenidos respecto a IFN- $\gamma$  se observa un comportamiento concentración dependiente de la iMtb y esto es coherente ya que el contacto de la bacteria con las células fagocíticas desencadena una respuesta inflamatoria local donde las citocinas juegan un papel clave ya que es secretado por los linfocitos T activados. Solo se logró determinar en sobrenadante de los cultivos de células mononucleares y no en sobrenadantes de macrófagos, esto se pudo deber a que las muestras ya se encontraban afectadas, ya que se descongelaron y congelaron varias veces, esto se puede evitar haciendo alícuotas de volúmenes más pequeños. La secreción incrementada de IFN- $\gamma$  nos permite considerar que el fenotipo que adquirieron las células CD4<sup>+</sup> fue de tipo Th1, lo cual concuerda con la literatura previamente publicada. Otra citocina relevante en la inmunopatogénesis de la tuberculosis es la IL-1 $\beta$ , el incremento en la secreción de esta citocina se ha relacionado con un buen control de la infección por Mtb. Previamente se ha publicado que esta citocina participa en la expresión de iNOS, en la acidificación fagosomal y maduración de células mieloides (Guirado, 2013). Finalmente, también pudimos identificar que el TNF- $\alpha$ , presentó un comportamiento concentración dependiente que fue estadísticamente significativo P=0.0389. Esta citocina está implicada en la regulación de la respuesta inflamatoria, mantenimiento del granuloma e induce la producción de ROIs y RNIs por parte de los macrófagos infectados. En la literatura se describe que la expresión de quimiocinas por parte de los MC puede influir en la producción de TNF- $\alpha$  después de la infección con Mtb. (Rocha, 2008) En nuestros resultados respecto a la concentración de citocinas en MC demuestran que hay alta secreción de esta citocina que es benéfica para el control bacteriano.

El presente estudio tiene varias limitaciones, entre ellas se encuentra que se utilizaron muestras de sangre periférica de donadores sanos que acudieron al banco de sangre del Instituto y esto no necesariamente refleja ausencia de memoria inmunológica contra patógenos como Mtb. Otra situación relevante es que no se determinó si los donadores eran positivos para la prueba PPD, además que en México se aplica la vacuna BCG a temprana edad; sin embargo, esta solo brinda protección hasta los 12 años.

## **9. CONCLUSIONES.**

Con este trabajo establecimos un modelo experimental *in vitro* que nos permitió analizar la expresión de marcadores de superficie que nos indican el estado de activación, así como los cambios en el metabolismo de las principales células implicadas ante la infección con *iMtb*.

Logramos identificar un cambio en la expresión de Glut1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, aunque no es significativo, el cambio es aparente, lo que nos infiere que hay mayor requerimiento de energía de los linfocitos citotóxicos y monocitos.

Hay una activación del sistema inmune por contrarrestar el daño que causa la bacteria, aunque no se logró observar una diferencia significativa en los marcadores de activación del linaje linfoide y mieloide como son TIM-3, HLA-DR, CD80, CD86, CD68.

Existe un comportamiento concentración dependiente en la secreción de las citocinas pro-inflamatorias en la infección con *iMtb*.

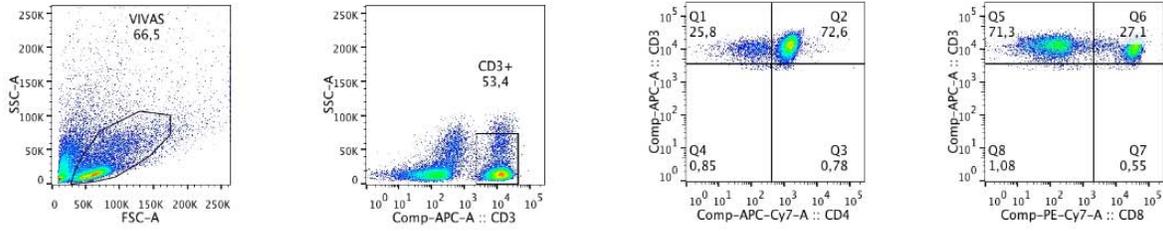
## **10. PERSPECTIVAS.**

Se planea emplear la micobacteria irradiada para obtener granulomas *in vitro* y poder llevar a cabo estudios de las células que lo conforman, citocinas que participan en su formación y el perfil metabólico que presentan.

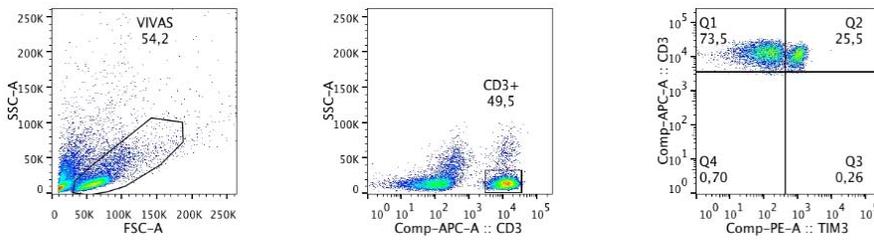
# 11. APÉNDICE.

Dot plots, ejemplo de la estrategia de análisis.

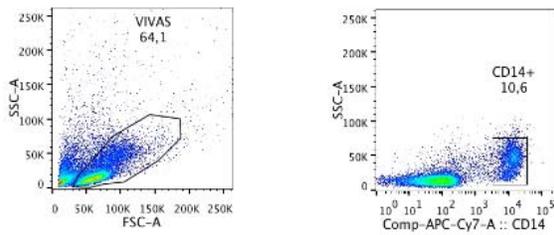
## CD3+CD4+/CD8+



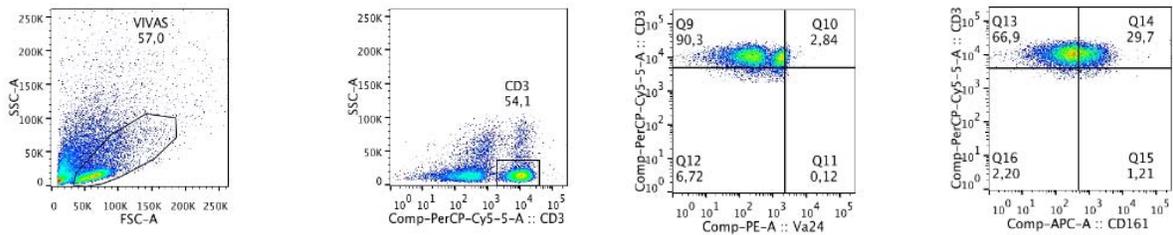
## CD3+TIM-3+



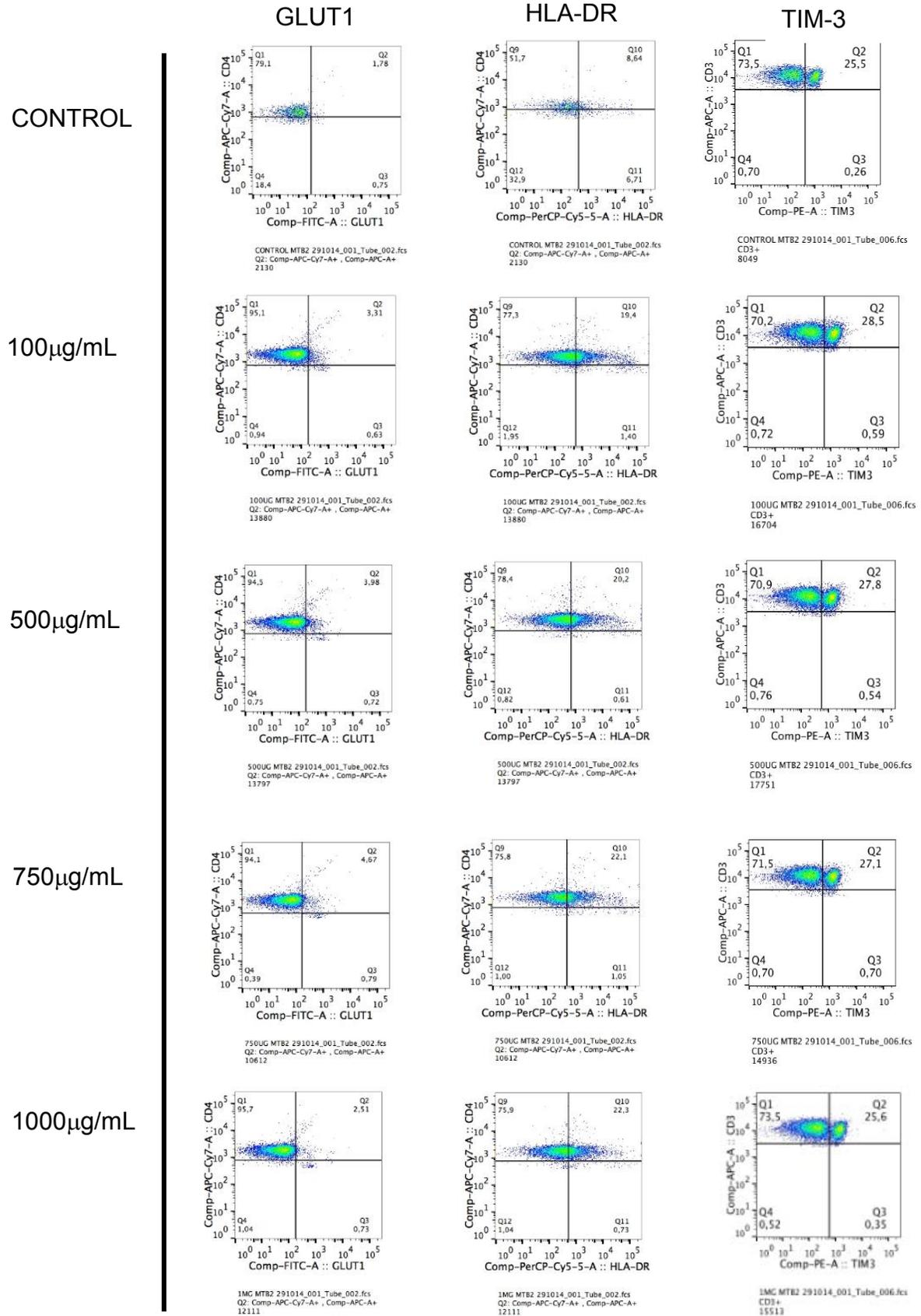
## CD14+



## CD3+V24+/CD161+



Experimento 2 CD4+

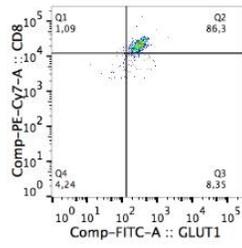


Experimento 2

CONTROL

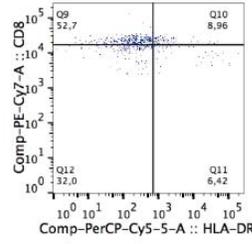
CD8<sup>+</sup>

GLUT1



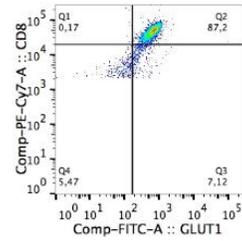
CONTROL MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
826

HLA-DR

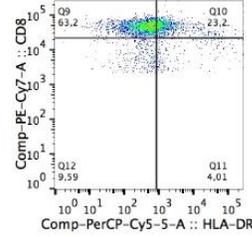


CONTROL MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
826

100µg/mL

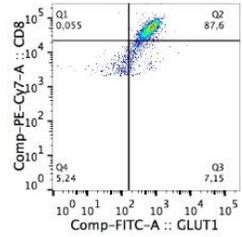


100UG MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
5410

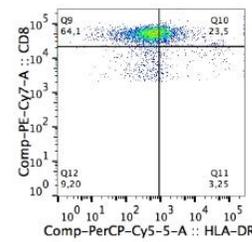


100UG MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
5410

500µg/mL

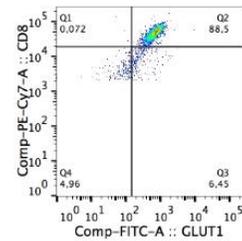


500UG MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
5500

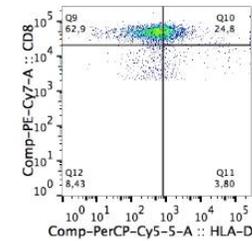


500UG MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
5500

750µg/mL

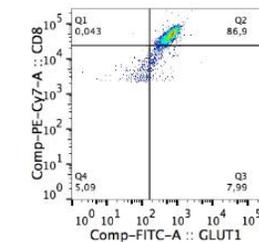


750UG MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
4153

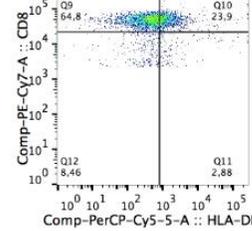


750UG MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
4153

1000µg/mL

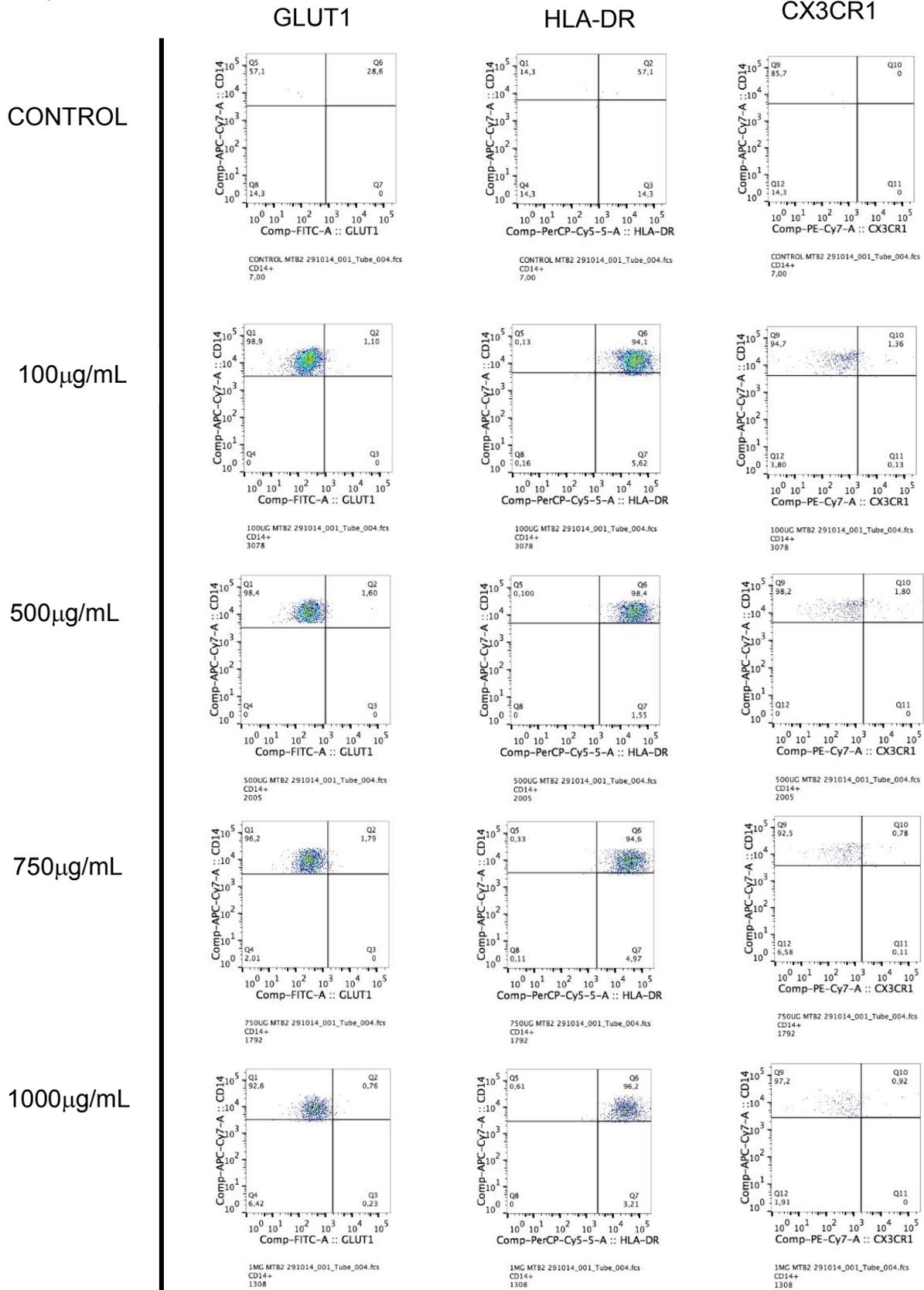


1MG MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
4621



1MG MTB2 291014\_001\_Tube\_002.fcs  
Q6: Comp-PE-Cy7-A+, Comp-APC-A+  
4621

Experimento 2 CD14+

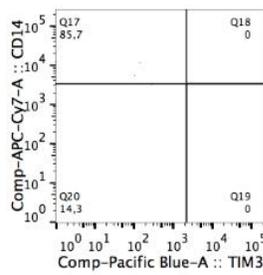
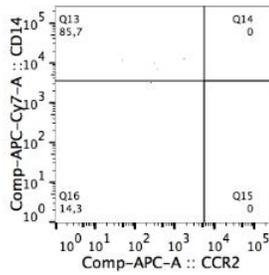


Experimento 2 CD14+

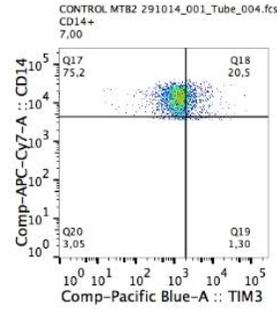
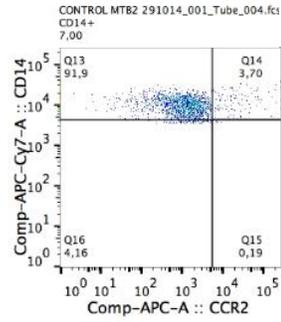
CCR2

TIM-3

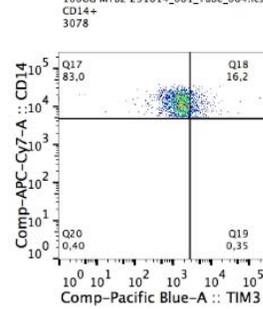
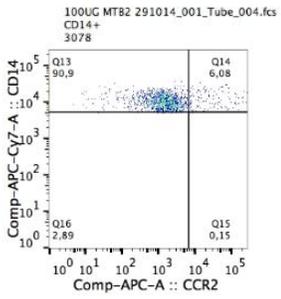
CONTROL



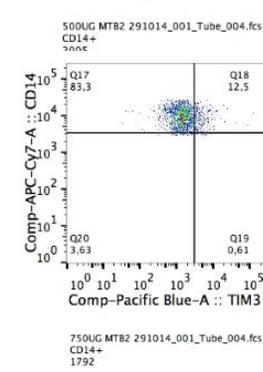
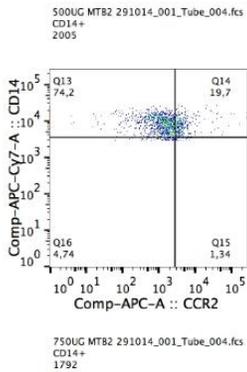
100µg/mL



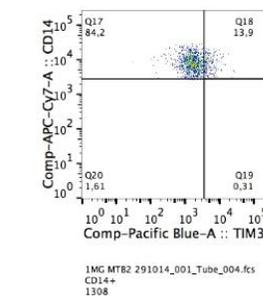
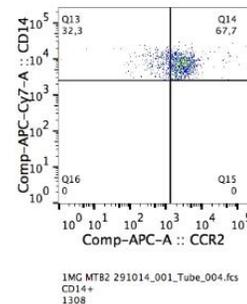
500µg/mL



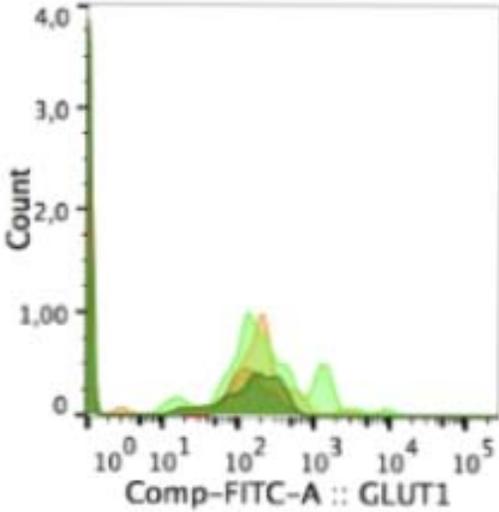
750µg/mL



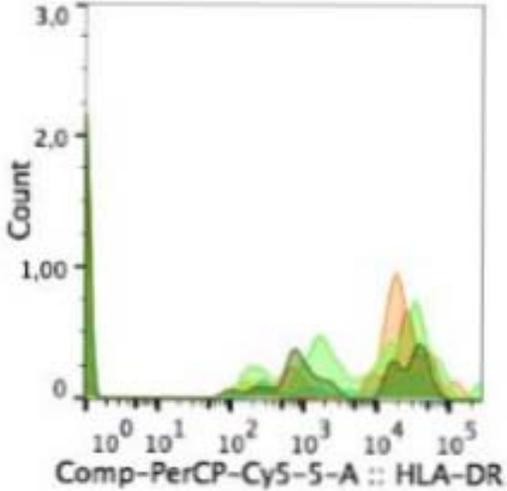
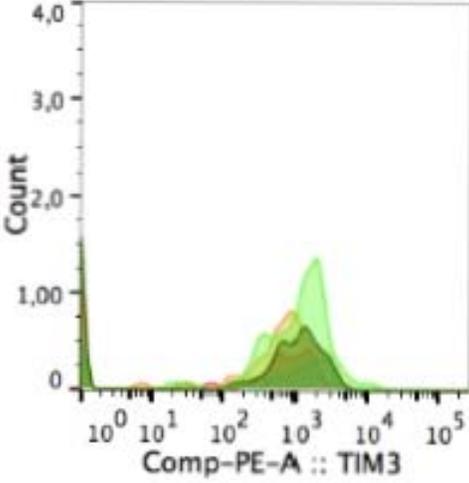
1000µg/mL



Experimento 2 CD14+CD16+



1000 µg/mL
100 µg/mL
500 µg/mL
750 µg/mL
Control



Experimento 1 MC CD14+

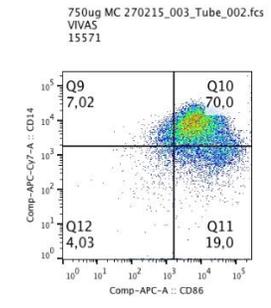
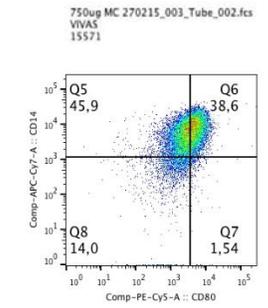
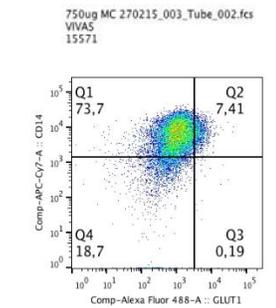
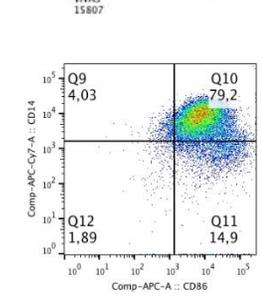
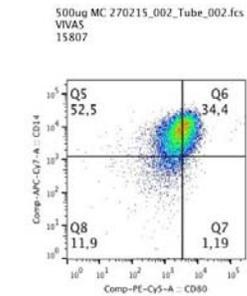
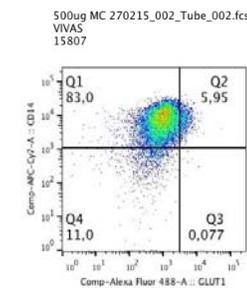
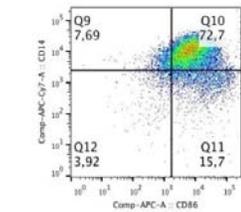
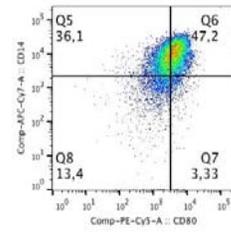
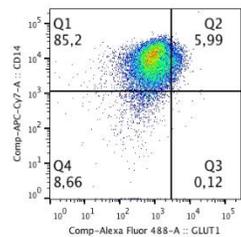
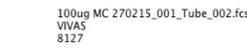
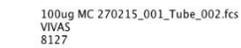
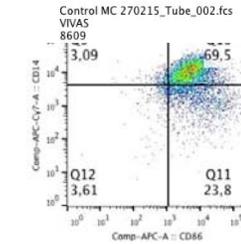
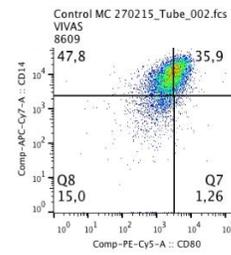
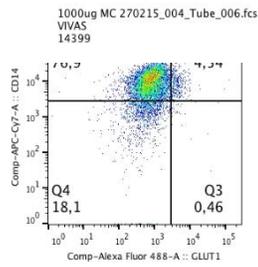
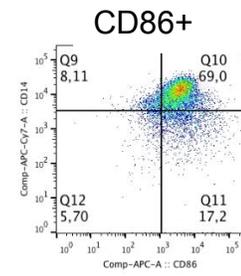
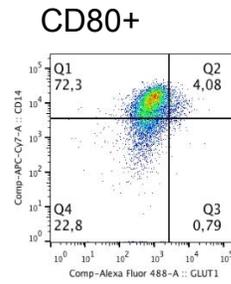
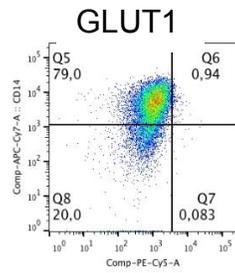
CONTROL

14.  
100µg/mL

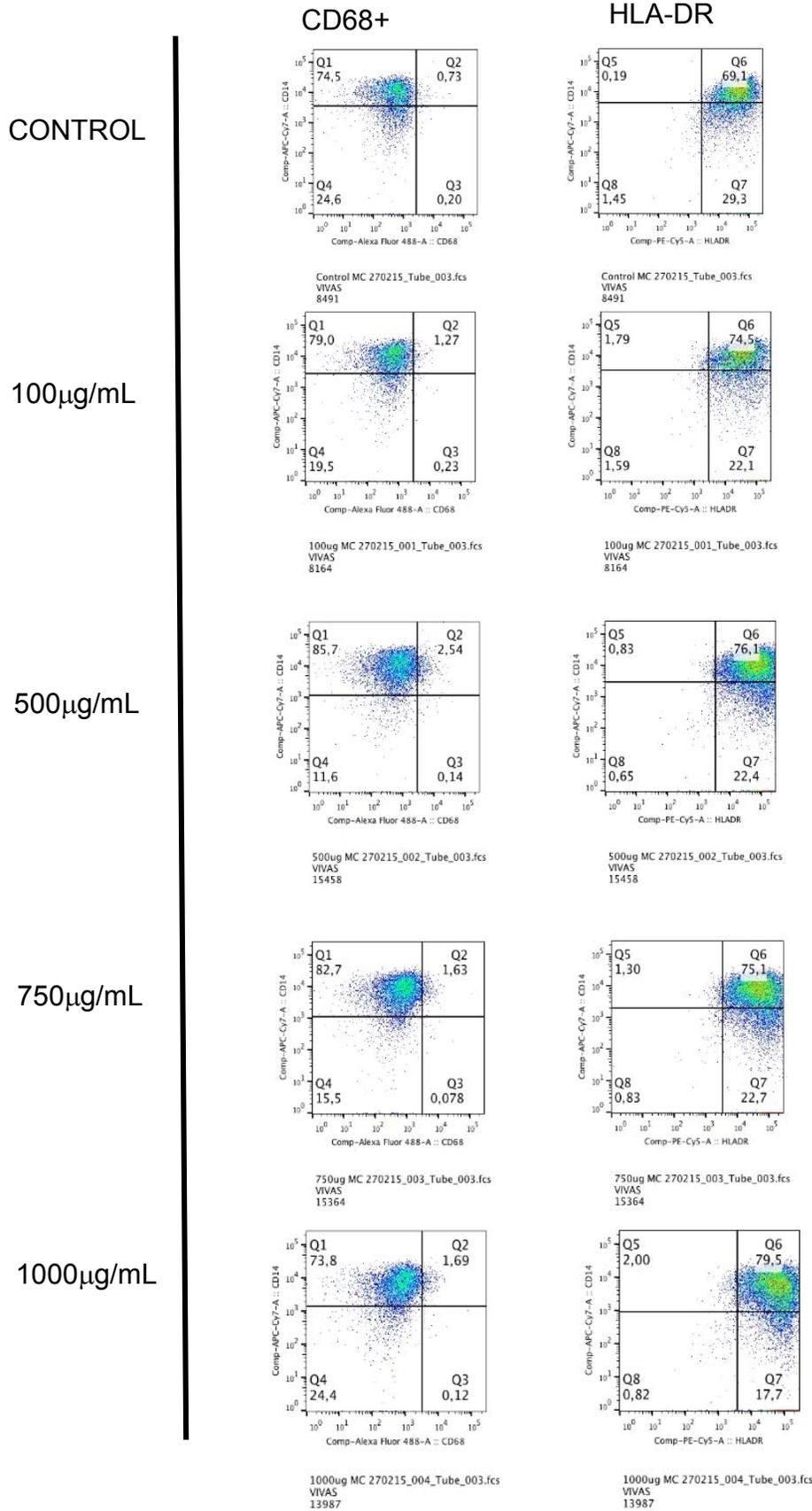
500µg/mL

750µg/mL

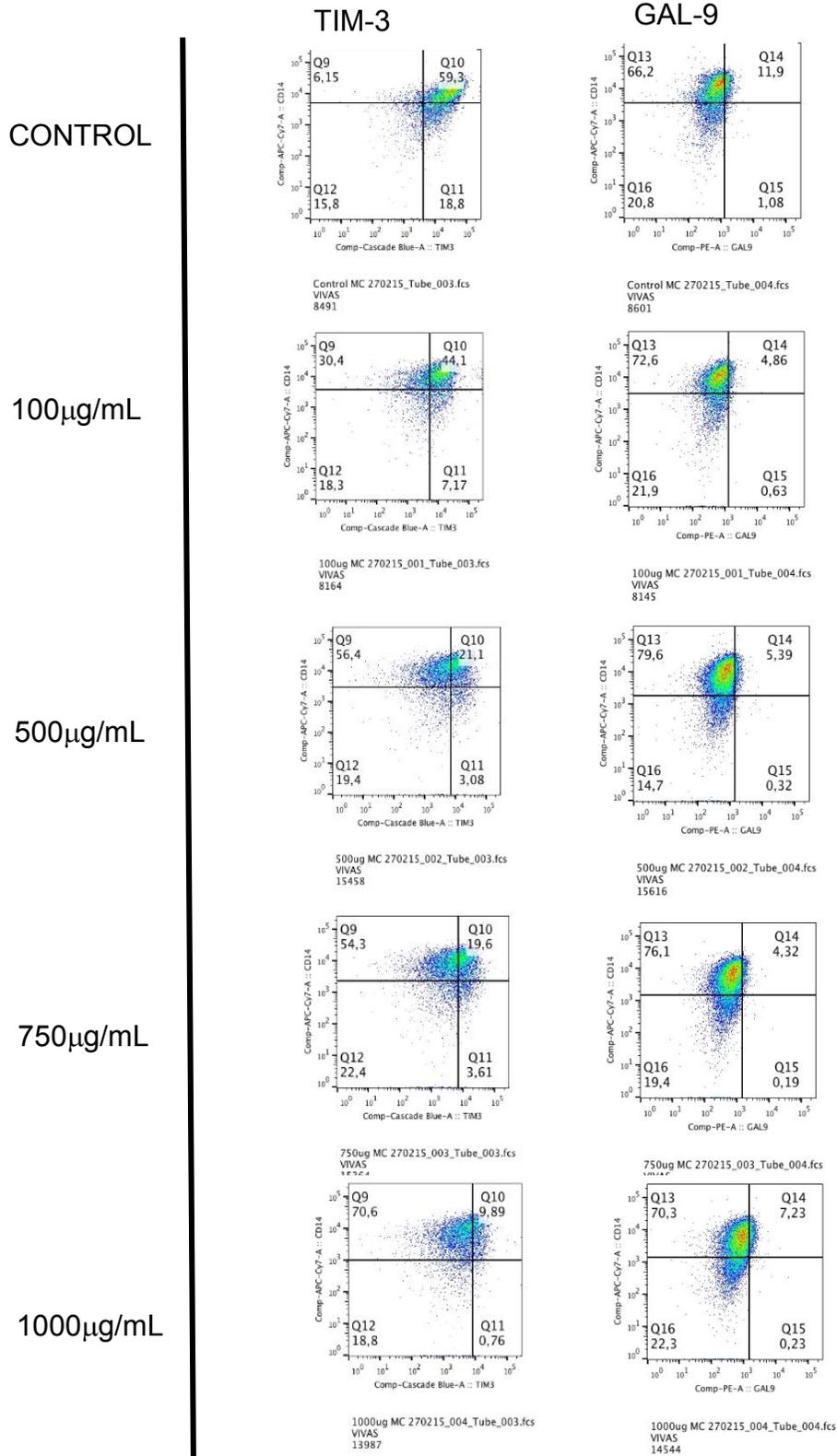
1000µg/mL



Experimento 1 MC CD14+



Experimento 1 MC CD14+



## 12. REFERENCIAS.

- ✓ Abebe, F. (2012). Is interferon-gamma the right marker for bacille Calmette-Guérin-induced immune protection? The missing link in our understanding of tuberculosis immunology. *Clinical & Experimental Immunology*, 169(3), 213–219. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04614.x>
- ✓ Antas, P. R. Z., Oliveira, E. B., Milagres, A. S., Franken, K. C., Ottenhoff, T. H. M., Klatser, P., Sampaio, E. P. (2002). Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(8), 1097–9. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762002000800005>
- ✓ Beham, A. W., Puellmann, K., Laird, R., Fuchs, T., Streich, R., Breysach, C., Kaminski, W. E. (2011). A TNF-Regulated Recombinatorial Macrophage Immune Receptor Implicated in Granuloma Formation in Tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 7(11), e1002375. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002375>
- ✓ Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., Martins, G. (2007). Biología molecular de los transportadores de glucosa: Clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología Y Terapéutica*, 26(2), 76–86.
- ✓ Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis, 9792, 91–97. [http://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00089-6](http://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6)
- ✓ Caccamo, N., Guggino, G., Meraviglia, S., Gelsomino, G., Di Carlo, P., Titone, L., Ottenhoff, T. H. M. (2009). Analysis of Mycobacterium tuberculosis-Specific CD8 T-Cells in Patients with Active Tuberculosis and in Individuals with Latent Infection. *PLoS ONE*, 4(5), e5528. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005528>
- ✓ Castaño, D., García, L. F., & Rojas, M. (2014). Differentiation of human mononuclear phagocytes increases their innate response to Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*, 94(3), 207–218. <http://doi.org/10.1016/j.tube.2014.01.001>
- ✓ Chávez-Galán, L., Sada-Ovalle, I., Baez-Saldaña, R., Chávez, R., & Lascurain, R. (2012). Monocytes from tuberculosis patients that exhibit cleaved caspase 9 and denaturalized cytochrome c are more susceptible to death mediated by Toll-like receptor 2. *Immunology*, 135(4), 299–311. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03543.x>
- ✓ Cheng, S.-C., Joosten, L. a. B., & Netea, M. G. (2014). The interplay between central metabolism and innate immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(6), 707–713. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.06.008>
- ✓ Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 393 (NOVEMBER), 537–544. <http://doi.org/10.1038/31159>
- ✓ Collins, H. L., & Kaufmann, S. H. E. (2001). The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology*, 103, 1–9. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01236.x>

- ✓ Cooper, A. M. (2009). Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 393–422. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703>
- ✓ Dorhoi, A., Reece, S. T., & Kaufmann, S. H. E. (2011). For better or for worse: The immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunological Reviews*, 240(1), 235–251. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00994.x>
- ✓ Ernst, J. D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 581–591. <http://doi.org/10.1038/nri3259>
- ✓ Fergusson, J. R., Smith, K. E., Fleming, V. M., Rajoriya, N., Evan, W., Simmons, R., Klenerman, P. (2014). NIH Public Access, 9(3), 1075–1088. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.045.CD161>
- ✓ Fergusson, J. R., Fleming, V. M., & Klenerman, P. (2011). CD161-Expressing Human T Cells. *Frontiers in Immunology*, 2(August), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00036>
- ✓ Flynn, J. L., Chan, J., & Lin, P. L. (2011). Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunology*, 4(3), 271–278. <http://doi.org/10.1038/mi.2011.14>
- ✓ Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O’Shea, J. J., & Koyasu, S. (2001). IFN- $\gamma$  production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends in Immunology*, 22(10), 556–560. [http://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02005-1](http://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02005-1)
- ✓ Gansert, J. L., Kiessler, V., Engele, M., Wittke, F., Rollinghoff, M., Krensky, a. M., Stenger, S. (2003). Human NKT Cells Express Granulysin and Exhibit Antimycobacterial Activity. *The Journal of Immunology*, 170(6), 3154–3161. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3154>
- ✓ García, S. (2001). Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión en la literatura. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 14, 114–125.
- ✓ Gideon, H. P., & Flynn, J. L. (2011). Latent tuberculosis: What the host “sees”? *Immunologic Research*, 50(2-3), 202–212. <http://doi.org/10.1007/s12026-011-8229-7>
- ✓ Glaziou, P., Sismanidis, C., Floyd, K., & Raviglione, M. (2015). Global epidemiology of tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5, 1-17. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a017798>
- ✓ Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M. D. C., Garfias, Y., Sada, I., & Lascurain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18 (2), 142–53.
- ✓ Guirado, E., Schlesinger, L. S., & Kaplan, G. (2013). Macrophages in tuberculosis : friend or foe, 563–583. <http://doi.org/10.1007/s00281-013-0388-2>

- ✓ Gupta, A., Kaul, A., Tsolaki, A. G., Kishore, U., & Bhakta, S. (2012). Mycobacterium tuberculosis: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*, 217(3), 363–374. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.008>
- ✓ Jacobs, S. R., Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2010). IL-7 is essential for homeostatic control of T cell metabolism in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184, 3461–3469. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0902593>
- ✓ Hall, C. J., Sanderson, L. E., Crosier, K. E., & Crosier, P. S. (2014). Mitochondrial metabolism, reactive oxygen species, and macrophage function-fishing for insights. *Journal of Molecular Medicine*, 92(11), 1119–1128. <http://doi.org/10.1007/s00109-014-1186-6>
- ✓ Hamilton, J. a. (2002). GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends in Immunology*, 23(8), 403–408. [http://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02260-3](http://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02260-3)
- ✓ Han, G., Chen, G., Shen, B., & Li, Y. (2013). Tim-3: An Activation Marker and Activation Limiter of Innate Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 4(December), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00449>
- ✓ Hmama, Z., Gabathuler, R., Jefferies, W. a, de Jong, G., & Reiner, N. E. (1998). Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium tuberculosis is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161, 4882–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794422>
- ✓ Horsburgh, C. R., Rubin, E. J., & Ph, D. (2011). Latent Tuberculosis Infection in the United States. *Public Health*, 364, 1441–1448. <http://doi.org/10.1056/NEJMcp1005750>
- ✓ Kieser, K. J., & Rubin, E. J. (2014). How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature Reviews Microbiology*, 12(8), 550–562. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3299>
- ✓ Li, L., Yang, B., Zhang, X., Lao, S., & Changyou Wu. (2014). Mycobacterium tuberculosis-specific polyfunctional cytotoxic CD8+ T cells express CD69. *Tuberculosis*, 94(3), 219–225. <http://doi.org/10.1016/j.tube.2013.12.007>
- ✓ Lin, M. Y., & Ottenhoff, T. H. M. (2008). Host-pathogen interactions in latent Mycobacterium tuberculosis infection: identification of new targets for tuberculosis intervention. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 8, 15–29. <http://doi.org/10.2174/187153008783928398>
- ✓ Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S. Q., Annunziato, F. (2010). CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *European Journal of Immunology*, 40(8), 2174–2181. <http://doi.org/10.1002/eji.200940257>
- ✓ Maher, D., & Raviglione, M. (2005). Global Epidemiology of Tuberculosis. *Lancet*, 26(9514), 167–182. <http://doi.org/10.1016/j.ccm.2005.02.009>

- ✓ Maratou, E., Dimitriadis, G., Kollias, a., Boutati, E., Lambadiari, V., Mitrou, P., & Raptis, S. a. (2007). Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *European Journal of Clinical Investigation*, 37(4), 282–290. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x>
- ✓ Minton, K. (2014). Immunometabolism: A beige immune response. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 433–433. <http://doi.org/10.1038/nri3706>
- ✓ Miranda, M. S., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., & Altare, F. (2012). The Tuberculous Granuloma : An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria ?, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/139127>
- ✓ Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). Lehninger principles of biochemistry, Macmillan.
- ✓ North, R. J., & Jung, Y.-J. (2004). Immunity to Tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 599–623. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104635>
- ✓ O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., & Berry, M. P. R. (2013). *The immune response in tuberculosis. Annual review of immunology* (Vol. 31). <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>
- ✓ Of, M., Flynn, U. J. L., & Chan, J. (2001). Mmunology of. *New York*, 93–129.
- ✓ Padhi, A., Sengupta, M., Sengupta, S., Roehm, K. H., & Sonawane, A. (2014). Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: Current status and future prospects. *Tuberculosis*, 94(4), 363–373. <http://doi.org/10.1016/j.tube.2014.03.011>
- ✓ Pai, M., Denkinge, C. M., Kik, S. V., Rangaka, M. X., Zwerling, a., Oxlade, O., Banaei, N. (2014). Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(1), 3–20. <http://doi.org/10.1128/CMR.00034-13>
- ✓ Pai, M., Riley, L. W., & Colford, J. M. (2004). Interferon-?? assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infectious Diseases*, 4(12), 761–766. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01206-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01206-X)
- ✓ Pearce, E., & Pearce, E. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38(4), 633–643. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
- ✓ Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., Altare, F. (2008). Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for M. tuberculosis Persistence. *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000204. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000204>
- ✓ Philips, J. a., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 353–384. <http://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458>
- ✓ Pollizzi, K. N., & Powell, J. D. (2014). Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 435–446. <http://doi.org/10.1038/nri3701>

- ✓ Qiu, Y., Chen, J., Liao, H., Zhang, Y., Wang, H., Li, S., Chen, Z. W. (2012). Tim-3-Expressing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells in Human Tuberculosis (TB) Exhibit Polarized Effector Memory Phenotypes and Stronger Anti-TB Effector Functions. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1002984. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002984>
- ✓ Rajavelu, P., & Das, S. D. (2008). Expression of co-stimulatory molecules B7.1 & B7.2 on macrophages infected with various strains of Mycobacterium tuberculosis & its influence on T-cell apoptosis. *Indian Journal of Medical Research*, 127(April), 388–394.
- ✓ Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), 352–366. <http://doi.org/10.1038/nri3211>
- ✓ Rathmell, J. C. (2012). Metabolism and autophagy in the immune system: immunometabolism comes of age. *Immunological Reviews*, 5–13. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01158.x>
- ✓ Rezwani, M., Lanéelle, M.-A., Sander, P., & Daffé, M. (2007). Breaking down the wall: Fractionation of mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 32–39. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.016>
- ✓ Rodríguez, G., Bacelli, G., Mycobacterias, I. Las, Koch, R., Control, D., & En, N. (1950). Género. *Tuberculosis*, 1–10.
- ✓ Rodríguez, M. E., Loyd, C. M., Ding, X., Karim, A. F., McDonald, D. J., Canaday, D. H., & Rojas, R. E. (2013). Mycobacterial Phosphatidylinositol Mannoside 6 (PIM6) Up-Regulates TCR-Triggered HIV-1 Replication in CD4<sup>+</sup> T Cells. *PLoS ONE*, 8(11), e80938. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0080938>
- ✓ Ryan, R. C., O'Sullivan, M. P., & Keane, J. (2011). Mycobacterium tuberculosis infection induces non-apoptotic cell death of human dendritic cells. *BMC Microbiology*, 11(1), 237. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-11-237>
- ✓ Sada-Ovalle, I., Chiba, A., Gonzales, A., Brenner, M. B., & Behar, S. M. (2008). Innate Invariant NKT Cells Recognize Mycobacterium tuberculosis-Infected Macrophages, Produce Interferon- $\gamma$ , and Kill Intracellular Bacteria. *PLoS Pathogens*, 4(12), e1000239. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000239>
- ✓ Sada-Ovalle, I., Chavez-Galan, L., Torre-Bouscoulet, L., Nava-Gamino, L., Barrera, L., Jayaraman, P., Behar, S. M. (2012). The Tim3-Galectin 9 Pathway Induces Antibacterial Activity in Human Macrophages Infected with Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 189(12), 5896–5902. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1200990>
- ✓ Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Glucose and Lipid Metabolism, 414(December), 799–806.
- ✓ Semenza, G. L. (2013). Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease, 537–547.
- ✓ Singh, S., Saraav, I., & Sharma, S. (2014). Immunogenic potential of latency associated antigens against Mycobacterium tuberculosis. *Vaccine*, 32(6), 712–716. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.065>

- ✓ Smith, I. (2003). Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 463–96. <http://doi.org/10.1128/CMR.16.3.463>
- ✓ Sulis, G., Roggi, A., Matteelli, A., & Raviglione, M. C. (2014). Tuberculosis: Epidemiology and Control. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1), 2014070. <http://doi.org/10.4084/mjhid.2014.070>
- ✓ Thorens, B., & Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 298(2), E141–E145. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>
- ✓ Ting, L. M., Kim, a C., Cattamanchi, a, & Ernst, J. D. (1999). Mycobacterium tuberculosis inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(7), 3898–3906. [http://doi.org/ji\\_v163n7p3898](http://doi.org/ji_v163n7p3898) [pii]
- ✓ Torres, M., Garcia-Garcia, L., Cruz-Hervert, P., Guio, H., Carranza, C., Ferreyra-Reyes, L., Wilkinson, R. J. (2015). Effect of isoniazid on antigen-specific interferon-secretion in latent tuberculosis. *European Respiratory Journal*, 45(2), 473–482. <http://doi.org/10.1183/09031936.00123314>
- ✓ Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., & van der Meer, J. W. M. (2002). Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 294–309. <http://doi.org/10.1128/CMR.15.2.294>
- ✓ Van Zandt, K. E., Sow, F. B., Florence, W. C., Zwilling, B. S., Satoskar, a. R., Schlesinger, L. S., & Lafuse, W. P. (2008). The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(3), 689–700. <http://doi.org/10.1189/jlb.1107781>
- ✓ Verbist, K. C., Wang, R., & Green, D. R. (2012). T cell metabolism and the immune response. *Seminars in Immunology*, 24(6), 399–404. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2012.12.006>
- ✓ Wang, F., Hou, H., Wu, S., Tang, Q., Huang, M., Yin, B., Sun, Z. (2015). Tim-3 pathway affects NK cell impairment in patients with active tuberculosis. *Cytokine*. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.012>
- ✓ Who. (2014). Global tuberculosis report 2014 (WHO), 171. <http://doi.org/WHO/HTM/TB/2014.08>
- ✓ Zuñiga, J., Torres-García, D., Santos-Mendoza, T., Rodríguez-Reyna, T. S., Granados, J., & Yunis, E. J. (2012). Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–18. <http://doi.org/10.1155/2012/193923>