



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
INMUNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DE MACRÓFAGOS CD3+ TCR $\alpha\beta$ + / TCR $\alpha\beta$ - Y SU
FUNCIÓN COMO MACRÓFAGOS PRO-INFLAMATORIOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ADRIANA RODRÍGUEZ CRUZ

DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
FACULTAD DE MEDICINA

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
DR. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad Universitaria, CD.MX. 6 de marzo 2020



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.

El proyecto de tesis fue realizado en el laboratorio de Inmunología Integrativa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" y en el laboratorio 6 de la Facultad de Medicina de la UNAM.

El Comité académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas designó el siguiente jurado para el examen de grado:

Presidente: Dr. Rogelio Hernández Pando

Secretario: Dr. Enrique Ortega Soto

Vocal: Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

Vocal: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón

Vocal: Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

AGRADECIMIENTOS

A mi alma Mater la UNAM, pues me ha abierto las puertas del mundo.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB).

Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP), por los estímulos recibidos con los que logré presentar este trabajo en diversos congresos internacionales (España 2017, Cancún y Portugal 2018) y una estancia de verano en la Université de Genève (Suiza).

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas".

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca número 594892 y por su apoyo de beca mixta para la estancia en la Universidad de McGill, Canadá.

A mi Comité Tutor conformado por el Dr. Enrique Ortega Soto y el Dr. Raúl Mancilla Jiménez. Principalmente por su apoyo académico y sobre todo al Dr. Ortega por la calidad humana que conjunta en su profesión como excelente docente.

A los miembros del jurado de mi examen de grado: Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo, Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, Dr. Rogelio Hernández Pando, Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva y el Dr. Enrique Ortega Soto. Sus comentarios fueron cruciales para la mejora de este trabajo.

A todas y cada una de las personas en la ciencia y academia con las que colaboré sin importar el grado académico. Todas sus aportaciones permitieron que esta investigación concluyera con éxito.

A los gametos que me dieron origen y la capacidad de desarrollar mi encéfalo para poder dedicarlo a la ciencia.

"A todas las cosas que nos unen y hacen que la vida merezca la pena de ser vivida - la comodidad, la familia, la amistad - a pesar de que medran en lo único de lo que siempre andamos cortos: el tiempo". *Carl Honoré*

A las futuras generaciones de científicxs con la esperanza de que el conocimiento derrote estigmas y prejuicios porque "It's harder to crack a prejudice than an atom" *Albert Einstein* y además "Nothing in life is to be feared it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less." *Marie Curie*

Pour mon chum Aldom Froid je me sente vraiment reconnaissant pour toutes et chaque fois que tu me rappelle: "Je suis venu te dire, Que tu peux changer, J'ai vu un avenir de femmes libérées" *Hubert Lenoir*

A mi médico el Dr. Raúl Iván Escamilla Orozco, sin su apoyo bioquímico no podría realizar este trabajo.

Al instructor de Felisa Trinidad y Nayla, y a estas peludas quienes cumplen su rol de servicio cruzando fronteras en un nivel internacional.

Tabla de contenido

I. Resumen	6
1. Los monocitos	16
2. Plasticidad celular de los macrófagos	17
3. Receptores tipo TCR fuera del linaje linfoide	19
4. Poblaciones celulares importantes en la infección por <i>M. tuberculosis</i>	21
5. Producción de citocinas en la infección por tuberculosis	30
5.1 <i>TNF</i> y miembros de la familia de linfotoxina	30
5.1.1 Actividades del <i>TNF</i> durante infección por micobacterias	30
5.1.2 <i>TNF</i> y linfotoxinas	31
5.1.3 Los receptores de <i>TNF</i> (<i>TNFRs</i>)	34
5.1.4 Señalización celular inducida por <i>TNFRs</i>	35
5.1.5 Retro-señalización por <i>tmTNF</i>	38
5.1.6 El <i>tmTNF</i> es suficiente para la resistencia ante infección por <i>BCG</i>	39
5.2 Citocinas pro-inflamatorias implicadas en la respuesta tipo <i>Th1</i> y en la activación de macrófagos	40
5.2.1 <i>IFNγ</i>	40
5.2.2 <i>IL-1β</i>	41
5.2.3 <i>IL-6</i>	41
5.2.4 <i>IL-8</i>	41
5.2.5 <i>IL-9</i>	42
5.2.6 <i>IP-10</i>	42
5.2.7 <i>IL-12</i> (<i>p70</i>)	42
5.2.8 <i>IL-2</i>	43
5.2.9 <i>IL-7</i>	43
5.2.10 <i>MIP-1α</i>	44
5.2.11 <i>MIP-1β</i>	44
5.2.12 <i>IL-17A</i>	44
5.3 Quimiocinas dependientes e independientes de <i>TNF</i> durante infecciones por <i>M. tuberculosis</i>	45
5.3.1 <i>Eotaxina - CCL11</i>	45
5.3.2 <i>MCP-1 (MCAF) - CCL2</i>	45
5.3.3 <i>RANTES - CCL5</i>	45
5.4 Citocinas anti-inflamatorias y su rol en la infección por tuberculosis	46
5.4.1 <i>TGFβ</i>	46
5.4.2 <i>IL-10</i>	46
5.4.3 <i>IL-1ra</i>	47
5.4.4 <i>IL-4</i>	47
5.5 Factores de crecimiento	49
5.5.1 <i>GM-CSF</i>	49
5.5.2 <i>G-CSF</i>	49
5.5.3 Factores de crecimiento involucrados en la reparación de tejido	50
6. Moléculas de reconocimiento en macrófagos relevantes para este estudio	52
6.1 <i>sCD14</i>	52
6.2 <i>SOCS3</i>	53
6.3 <i>CD1</i> moléculas de reconocimiento de antígenos lipídicos <i>CD1</i>	56
7. El Complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	58
7.1 <i>Mycobacterium bovis</i> y <i>BCG</i>	60
7.2 Bases moleculares de la virulencia entre <i>H37Ra</i> y <i>H37Rv</i>	62
II. Antecedentes directos	65
III. Justificación	68

IV. Planteamiento del problema	68
V. Hipótesis	69
VI. Objetivos	69
1. Objetivo general	69
2. Objetivos particulares	69
VI. Métodos	70
1. Enriquecimiento de monocitos y obtención de macrófagos derivados de monocitos (MDM) 70	
2. Microscopía confocal de macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻	70
3. Separación de subpoblaciones de macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ por citometría de flujo	71
4. Extracción de RNA y retro-transcripción	72
5. Integridad del RNA	72
6. PCR en tiempo real	73
7. Estímulos de macrófagos post-sort	73
8. Análisis de citocinas y quimiocinas por Múltiplex	74
9. Violin plots y Heat-map	74
10. Análisis de Componentes principales (PCA)	75
11. Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75
12. Ensayo de Unidades Formadoras de Colonia (CFU's)	75
13. Infección de subpoblaciones de macrófagos CD3 ⁻ , CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepas H37Ra y H37Rv	76
14. Caracterización fenotípica de macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ por citometría de flujo multiparamétrica en homeostasis y ante la infección con dos cepas de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv	77
15. Medición de las citocinas secretadas en el sobrenadante mediante ELISA	77
16. Análisis estadístico	78
VII. Resultados	78
1. Eficiente obtención de macrófagos derivados de monocitos (MDM)	78
2. Reproducibilidad en la obtención de las subpoblaciones CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ a partir de MDM de origen humano	80
3. Macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ se caracterizan por la expresión de la forma transmembranal del TNF (tmTNF)	86
4. La vía CD3/tmTNF es eficiente para activar macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ , sin embargo, difieren en el perfil de citocinas secretadas	87
5. El perfil de citocinas secretado por la vía CD3/tmTNF en macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ es principalmente pro-inflamatorio	95
6. SOCS3 es expresado en mayor cantidad por macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ que por CD3 ⁺ TCRαβ ⁻	99
7. Bajo infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv se mantiene la frecuencia de macrófagos CD3 ⁺	100
8. Caracterización de macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ en homeostasis y ante la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	103
8.1 Moléculas presentadoras de antígenos lipídicos caracterizan a los macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y disminuyen su expresión ante la infección con H37Rv	103
8.2 Para el reclutamiento celular, el receptor CCR4 incrementa su expresión en macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ ante la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	109
8.3 La infección por <i>M. tuberculosis</i> H37-Rv disminuye la expresión de CD16 en los macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	114
9. El tmTNF se expresa en los macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y no se modifica ante la infección con <i>M. tuberculosis</i> H37Ra ni H37Rv	115

10. Los receptores de TNF se expresan diferencialmente en las subpoblaciones de macrófagos humanos CD3 ⁺ y se ven modificados ante la infección por las cepas de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv	117
11. En resumen ¿qué sucede ante la infección por <i>M. tuberculosis</i> en estas subpoblaciones de macrófagos?	120
12. El TNF es la única citocina que se incrementa en los MDM por la infección de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i>	121
VIII Discusión	122
IX Conclusiones	138
X Referencias	141
XI Apéndices	153

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de la progresión de la infección por tuberculosis.	22
Figura 2. Arquitectura característica del granuloma.	25
Figura 3. Resumen de la respuesta inmunológica durante la infección por <i>M. tuberculosis</i>.	29
Figura 4. Interacciones entre ligandos solubles y anclados a membrana con receptores de TNF y LT.	33
Figura 5. Modelo de transducción de señales ante el estímulo de los TNFRs.	37
Figura 6. Papel de las citocinas durante la iniciación y etapas crónicas de la infección por <i>M. tuberculosis</i>.	48
Figura 7. Rol de SOCS3 en la activación de macrófagos M1 a través de STAT.	55
Figura 8. Filogeografía Global del MTBC.	60
Figura 9. La forma tmTNF es suficiente para la presencia células CD3⁺CD11b⁺TCR⁺ al sitio de la infección.	67
Figura 10. Pureza de monocitos CD14⁺.	79
Figura 11. Pureza de monocitos CD14⁺ y obtención de macrófagos.	80
Figura 12. Reproducibilidad en la obtención de las subpoblaciones CD3⁺TCRαβ⁻ y CD3⁺TCRαβ⁺ a partir de monocitos de origen humano.	81
Figura 13. Inmunofluorescencia de las subpoblaciones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁻ y CD3⁺TCRαβ⁺.	82
Figura 14. Integridad del RNA de los MDM.	83
Figura 15. Integridad del RNA de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻.	84
Figura 16. Integridad del RNA de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺.	85
Figura 17. Las subpoblaciones CD3⁺TCRαβ⁻ y CD3⁺TCRαβ⁺ expresan a nivel de mRNA CD3ε y TCRβ.	86
Figura 18. Los macrófagos humanos CD3⁺TCRαβ⁺ expresan en mayor porcentaje el tmTNF.	87
Figura 19. Sort de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻.	88
Figura 20. Niveles de producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por las subpoblaciones de interés ante 6 estímulos.	90

Figura 21. Niveles de producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por subpoblación de interés ante 6 estímulos.	91
Figura 22. Niveles de producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en orden de tratamiento por las subpoblaciones de interés.....	92
Figura 23. Análisis de heatmap <i>clusters</i> organizados por jerarquía generados por dendrograma para evaluar los niveles de producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por las subpoblaciones de interés ante 6 estímulos.....	93
Figura 24. Análisis de Componentes Principales (PCA).	95
Figura 25. Los macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ secretan citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8, IL-1β e IP-10).....	96
Figura 26. Los macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ secretan citocinas pro-inflamatorias (IFNγ, TNF, MIP-1β).	98
Figura 27. Producción de citocinas anti-inflamatorias (IL1-RA, IL-4 e IL-10) bajo diferentes estímulos en MDM, CD3 ⁻ , CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻	99
Figura 28. Expresión de SOCS3 por qPCR bajo diferentes estímulos en MDM, CD3 ⁻ , CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁻	100
Figura 29. El porcentaje de macrófagos CD3 ⁺ se mantiene de manera independiente ante la infección con H37Ra y H37Rv.....	101
Figura 30. Las frecuencias de subpoblaciones de macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ y CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ se mantiene ante la infección con H37Ra y H37Rv.....	102
Figura 31. CD1c disminuye su expresión en los macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ ante la infección por H37Rv en mayor porcentaje CD1c.....	104
Figura 32. La expresión de CD1d en CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ disminuye su expresión ante la infección por H37Ra con respecto a CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	105
Figura 33. La expresión de CD1b en CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ disminuye su expresión ante la infección por H37Ra con respecto a CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	106
Figura 34. La expresión de CD1a no se ve modificada en las subpoblaciones de interés ante la infección por <i>M. tuberculosis</i>	108
Figura 35. CCR4 incrementa su expresión ante la infección por H37Ra en macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	110
Figura 36. En la subpoblación de macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ el CCR7 presenta una tendencia a disminuir el porcentaje de expresión con la cepa H37Rv mientras que aumenta con H37Ra.	111
Figura 37. El CXCR1 presenta una tendencia a disminuir el porcentaje de expresión con la cepa H37Rv mientras que aumenta con H37Ra en la subpoblación de macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	112
Figura 38. CCR2 no modifica su expresión en las subpoblaciones de macrófagos ante la infección por <i>M. tuberculosis</i>	113
Figura 39. La infección con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv disminuye la expresión de CD16 en los macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	115
Figura 40. La expresión del tmTNF no se modifica ante la infección con <i>M. tuberculosis</i>	116
Figura 41. Los macrófagos CD3 ⁺ TCRαβ ⁻ incrementan la expresión del TNFR1 ante la infección con H37Ra.	118

Figura 42. Los macrófagos CD3⁺TCR$\alpha\beta$⁺ incrementan la expresión del TNFR2, con respecto a los macrófagos convencionales ante la infección con H37Rv.	119
Figura 43. El TNF es la única citocina que se incrementa ante la infección de los MDM por la infección por H37Rv.	121
Figura 44. Resumen gráfico de la modulación de moléculas presentes en macrófagos CD3⁺ y su posible rol en la respuesta inmunológica ante la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.	137
Figura 45. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés en el control negativo (sin estímulo).	154
Figura 46. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés ante el estímulo de CD3.	155
Figura 47. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés ante el estímulo de tmTNF.	156
Figura 48. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés ante el estímulo tanto de CD3 como tmTNF.	157
Figura 49. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés utilizando un control de isotipo (IC).	158
Figura 50. Dispersión de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés en el control positivo (IFNγ y LPS).	159

Índice de Tablas

Tabla 1. Antígenos lipídicos restringidos a CD1	58
Tabla 2. Múltiplex	74
Tabla 3. Síntesis de resultados de caracterización de sub-poblaciones de macrófagos ante la infección por <i>M. Tuberculosis</i>.	120
Tabla 4. Anticuerpos para FACS	153

I. Resumen

Usualmente el TCR, receptor inmune variable, se consideraba restringido para células de origen linfoide. Sin embargo, trabajos previos han descrito la presencia de este receptor fuera del linaje linfoide. En estos trabajos se describe la presencia de las poblaciones mieloides TCR⁺, pero la caracterización fenotípica y funcional de estas células mieloides portadoras de TCR no es estudiada. En este proyecto se completa la caracterización fenotípica y se caracteriza funcionalmente a las subpoblaciones de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺/TCRαβ⁻ por su función inflamatoria en homeostasis y ante la infección por dos cepas de *M. tuberculosis* una virulenta y otra avirulenta.

La valoración de la activación celular de estas subpoblaciones se enfocó en la producción de citocinas y en determinar si estas subpoblaciones de macrófagos presentan un perfil anti- o pro-inflamatorio, en respuesta al estímulo de CD3 y tmTNF de manera independiente o en conjunto. Los resultados muestran que ambas subpoblaciones de interés son funcionales y pueden activar una producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento a partir de estos estímulos. Sin embargo, aunque ambas subpoblaciones secretan citocinas pro-inflamatorias, son diferentes porque: primero, secretan citocinas distintas y en segundo, son inducidas ante estímulos distintos. En resumen nuestros resultados sugieren que el estímulo, tanto CD3 como tmTNF, induce una respuesta efectora principalmente pro-inflamatoria en las subpoblaciones de interés. De manera interesante, las subpoblaciones se agrupan sin importar el estímulo otorgado.

En el modelo de infección *in vitro*, las principales modificaciones fenotípicas en las subpoblaciones de macrófagos de interés ocurren en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ ante la infección con la cepa avirulenta (H37Ra). Mientras que las principales diferencias entre cepas ocurren en las moléculas de presentación de antígenos lipídicos y de moléculas con funciones efectoras como receptores fagocíticos, ambas disminuyen ante la cepa virulenta (H37Rv).

De manera interesante, el papel que juegan tanto el tmTNF como el TNF, a través de la activación de los receptores para TNF (TNFRs). Se encuentran modificados entre subpoblaciones de macrófagos CD3⁺ y ante la infección por H37Ra o H37Rv. El TNFR1 incrementa en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁻ ante la infección con H37Ra. Mientras que y el TNFR2 aumenta en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺, pero ante la infección con H37Rv.

La contribución del presente trabajo describe fenotípica y funcionalmente a dos subpoblaciones de macrófagos humanos que presentan la molécula CD3⁺. Aún no es claro a qué nivel el estímulo de CD3 se encuentra activando a estas células. Sin embargo, nuestros datos apoyan el hecho de que esta molécula es funcional en los macrófagos CD3⁺. Las implicaciones en la regulación y el papel del tmTNF, el TNF, así como sus receptores y sus interacciones en las subpoblaciones CD3⁺; ameritan una exploración profunda para entender la significancia biológica durante la respuesta inmunitaria.

II. Abreviaturas

Las abreviaturas de la presente tesis serán desglosadas en orden alfabético y al igual que en el cuerpo del trabajo, es decir, por sus siglas en inglés en la mayoría de los casos.

A: adenin

ADC: Albumin -Dextrose-Catalase

ADAM17: ADAM metallopeptidase domain 17, also TACE

APCs: Antigen Presenting Cells

AP-1: Activator Protein 1

Ara-LAM: Arabinosylated lipoarabinomannan

BAL: Bronchoalveolar Lavage

BALB/c: Bagg and Albino

BCG: Bacilo Calmette Guérin

C57BL/6: C57 black 6

cAMP: 3',5'-cyclic Adenosine Monophosphate

cDNA: complementary DNA

CD2: Cluster of differentiation 2

CD4: Cluster of differentiation 4 / T helper lymphocyte

CD8: Cluster of differentiation 8 / Cytotoxic/Cytolytic T lymphocyte

CD11b: Cluster of differentiation 11b / α M β 2-integrin

CD14: Cluster of differentiation 14

CD16: Cluster of differentiation 16 or Fc γ III

CD120a: Cluster of differentiation 102a, TNFR1

CD120b: Cluster of differentiation 102b, TNFR2

CD206: Cluster of differentiation 206, Manose Receptor

CD258: Cluster of differentiation 258, LIGHT Receptor

CDR3: Complementarity- determining Region 3

CFP-10: ESAT-6 like protein esxB

CFU's: Colony Forming Units

c-IAP1: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1

c-IAP2: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2

c-Jun: protein encoded by the JUN gene

CK1: Casein Kinase 1

CTL: Cytotoxic/cytolytic T lymphocytes

CTLA8 : Cytotoxic T lymphocyte Associated Antigen 8

DCs: Dendritic Cells

DIM: dimycocerosatos de pticocerosol (DIM y PDIM)

DISC: Death Inducing Signaling Complex

DNA: Deoxyribonucleic acid

ECM: Extracellular Matrix

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ESAT-6: Mycobacterial 6-kDa early secreted antigenic target

EsxB: ESAT-6 System Exporters B or CFP-10

ESX-1: ESAT-6 System Exporters

FACS: Fluorescent Activated Cell Sorting

FADD: Fas Associated Death Domain

FGF: Fibroblast Growth Factor

G-CSF: Granulocyte - Colony Stimulating Factor

GlpD2: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2

G-CSF: Granulocyte - Colony Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HSP: Heat Shock Protein

HSP-60: Heat Shock Protein 60

HVEM: Herpes Virus Entry Mediator

IAP-1: Inhibitor of Apoptosis Protein 1

ICAM: Intracellular Adhesion Molecule

ICE: IL-1 β converting enzyme

icTNFR2: intracellular TNFR2

IFN γ : Interferon γ

IgE: Immunoglobulin E

IKK: Kinase complex

IKK α : Inhibitor of kappa α Kinase

IKK β : Inhibitor of kappa β Kinase

IL-1 β : Interleukin 1 β

IL-1ra: Interleukin 1 receptor antagonist

IL-2: Interleukin 2

IL-3: Interleukin 3

IL-4: Interleukin 4

IL-6: Interleukin 6

IL-7: Interleukin 7

IL-8: Interleukin 8

IL-9: Interleukin 9

IL-12: Interleukin 12

IL-10: Interleukin 10

IL-12 (p70): Interleukin 12

IL-13: Interleukin 13

IL-17A: Interleukin 17 A

IL-27: Interleukin 27

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase

IP-10: IFN inducible protein / CXCL10

JAK: Janus Kinase

KIR: Kinase Inhibitory Region

LAM: lipoarabino-mannan

LAT: Linker for Activation of T cells

Lck: Lymphocyte-specific Protein Tyrosine Kinase

LIGHT: Homologous to Lymphotoxin

LOSs: Lipooligosaccharides

LPS: Lipopolysaccharide / endotoxin

LpdA: *M. tuberculosis* H37Rv strain gene important for virulence

LT: lymphotoxin

Lys6: lysine 6

MACS: Magnetic Activated Cell Sorting

Man-LAM: Mannosylated LAM

MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase

MCP-1/MCAF/CCL2: Monocyte Chemoattractant Protein-1 / Monocyte Chemotactic and Activating Factor

MDM: Monocyte Derived Macrophages

MHC-I: Major Histocompatibility Complex class I

MHC-II: Major Histocompatibility Complex class II

MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein 1 α

MIP-1 β : Macrophage Inflammatory Protein 1 β / CCL4

miRNAs: micro RNAs

mRNA: messenger RNA

MMR: Manose Receptor

MNC: células mononucleadas

MOI: Multiplicity of Infection

MTBC: *Mycobacterium tuberculosis* complex

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

M1: Classically Activated Macrophages

M2: Alternatively Activated Macrophages

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NIK: NF- κ B Induced Kinase

NKs: Natural Killer cells

NO: Nitric Oxide

NUDE: mice with deletion of FOX1 gene, without thymus and immune deficient with nude phenotype

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns

PAT: polyacyltrehaloses

PBS: Phosphate-buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGF: Platelet-derived growth factor

PDGF-BB: Platelet-derived growth factor dimeric glycoprotein with two B subunits

PD1: Programmed Death 1 system

pdb: pares de bases

phoP: gene that codes for virulence transcriptional regulatory protein PhoP

PFA: Paraformaldehyde

PhoP/PhoR: transcription factor for PhoP/PhoR

PLAD: Pre-ligand binding Assembly Domain

PNGs: Polymorphonuclear Granulocytes

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ

PRRs: Pattern Recognition Receptors

PtpA: mycobacterial phosphatase

RANTES/CCL5: Regulated on Activation Normal T cell expressed and Secreted

RBX2: RING box 2

RD1: Region of Difference 1

RIN: RNA Integrity Number

RING: Really Interesting New Gene finger domain

RNA: Ribonucleic acid

ROS: Reactive Oxygen Species

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute

sCD14: soluble CD14

s: seconds

SC: Suero de Cerdo

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

SL: sulfolipids
SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms
SNV: Single Nucleotide Variation
Src: proto-oncogene tyrosine-protein kinase
SH2: Src- homology 2 domain
SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS1-SOCS7)
SOCS3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3
SODD: Silencer of Death Domain
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6
TA: temperatura ambiente
TACE: Tumor Necrosis Factor- α -Converting Enzyme
TCR $\alpha\beta$: T cell Receptor $\alpha\beta$
TCR $\gamma\delta$: T cell Receptor $\gamma\delta$
T_{eff}: T effector lymphocyte
TGF- β 1: Tumor Growth Factor β 1
Th1: T helper lymphocyte 1
Th2: T helper lymphocyte 2
Th9: T helper lymphocyte 9
Th17: T helper lymphocyte 17
TLRs: Toll Like Receptors
T_M: T memory lymphocyte
tmTNF: transmembrane TNF, pre-TNF
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNFR1: TNF Receptor 1

TNFR2: TNF Receptor 2

TRADD: TNF receptor type 1-associated death domain protein

TRAF1: TNFR-associated factor 1

TRAF2: TNFR-associated factor 2

Tregs: regulatory T lymphocytes

Tween 20: polyoxyethylene sorbitol ester

U: uracil

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WHO: World Health Organization

ZAP-70: Zeta-chain associated protein kinase 70

III. Introducción

1. Los monocitos

Después de los neutrófilos, los monocitos son las células del linaje mieloide más abundantes en sangre. Por cada litro de sangre, el número de monocitos varía entre un $0.15-0.6 \times 10^9$. Los monocitos son leucocitos que se forman en la médula ósea y continuamente entran a circulación sanguínea. En humanos representan el 10% de la población leucocitaria. Estas células fagocíticas circulan en la sangre y constantemente migran a los tejidos para completar su diferenciación a macrófagos (1).

En humano, la mayor parte de los monocitos (90%) expresan altos niveles de CD14 (CD, Cluster of differentiation, por sus siglas en inglés) y no expresan CD16 ($CD14^{++}CD16^{-}$), se hace referencia a ellos como monocitos clásicos. Sin embargo, la otra proporción de los monocitos (10%) expresan CD16, la cual se pueden subdividir en dos subpoblaciones: monocitos intermedios que expresan altos niveles de CD14 y poco CD16 ($CD14^{++}CD16^{+}$ o $CD14^{+}CD16^{+}$) y monocitos no clásicos que expresan niveles bajos de CD14 y altos niveles de CD16 ($CD14^{+}CD16^{++}$) (2). Dentro del conteo normal en un individuo sano, en sangre el promedio de monocitos por μL es de 300. Mientras que el rango normal va de 0 a 800 monocitos por μL (3).

Los monocitos son renovados constantemente y pueden permanecer en circulación de 1 a 2 días, después de ese tiempo si no son reclutados hacia un tejido mueren. Estas células se han considerado como el reservorio de los precursores para la renovación de macrófagos de tejido y células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) (4). Sin embargo, existe evidencia experimental que muestra que existen macrófagos en tejido que tienen la capacidad de auto-renovarse por proliferación local de células maduras diferenciadas (5).

A pesar de presentar una respuesta fagocítica menor a aquella de los neutrófilos y macrófagos; los monocitos se incluyen dentro del grupo de

fagocitos profesionales (6). La fagocitosis es el proceso mediante el cual las células ingieren partículas de gran tamaño. Este proceso juega un papel esencial en los mecanismos de defensa inmunológica a través de la captura, la destrucción de antígenos y también contribuye en procesos inflamatorios (7). Debido a su papel fagocítico, estas células son importantes en la respuesta de la inmunidad innata.

2. Plasticidad celular de los macrófagos

Los macrófagos son células de origen mieloide, considerados pilares de la inmunidad innata y adaptativa, . Los macrófagos son células presentadoras de antígeno, tienen la capacidad de eliminar patógenos, activar linfocitos T, y fagocitar células somáticas en apoptosis, infectadas, dañadas o envejecidas (8). Los macrófagos se encuentran en todos los tejidos, juegan un papel crucial en la homeostasis del organismo pues también ayudan a reparar tejido que se encuentra en un proceso inflamatorio bajo condiciones de esterilidad (9).

La activación de un macrófago ocurre mediante un estímulo que recibe mediante agentes exógenos los cuales pueden incluir: citocinas, productos microbianos, derivados de nucleótidos, estimulación mediante receptores Fc, o glucocorticoides. Estos fenómenos promueven el cambio de su estado de activación secretando un perfil de citocinas correspondiente (10).

De acuerdo al perfil de citocinas que liberan, los macrófagos se clasifican de manera general en pro- o anti-inflamatorios. Los primeros son denominados macrófagos activados clásicamente (M1), son activados a través de receptores tipo toll (TLRs, por sus siglas en inglés) e interferón γ ($IFN\gamma$, por sus siglas en inglés); presentan alta capacidad microbicida, y secretan citocinas pro-inflamatorias entre ellas: interleucina 1β , factor de necrosis tumoral, interleucina 12 e interleucina 8 (IL- 1β , TNF, IL-12 e IL-8, por sus siglas en inglés), y muestran un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras. Los macrófagos M1 se caracterizan por la expresión de la proteína SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3, por sus siglas en inglés). Por otro lado,

los macrófagos activados de manera alterna (M2), son activados mediante interleucina 4 (IL-4, por sus siglas en inglés) o interleucina 13 (IL-13, por sus siglas en inglés) se caracterizan por la expresión de arginasa-1, receptor de manosa (MMR o CD206, por sus siglas en inglés) y el receptor de IL-4. Estos macrófagos M2 secretan un perfil de citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10) y se polarizan ante infecciones por helmintos u hongos o bien en alergias (8, 9, 11).

De igual manera, el concepto de macrófagos en M1 y M2, proviene de observaciones en modelos murinos en donde cepas prototípicas Th1 (T helper lymphocyte 1, por sus siglas en inglés) (C57BL/6, C57 black 6, por sus siglas en inglés) eran activadas más fácilmente al producir óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), ante un estímulo con IFN γ o lipopolisacárido / endotoxina (LPS, por sus siglas en inglés). Mientras que aquellas cepas Th2 (T helper lymphocyte 2, por sus siglas en inglés) (BALB/c, Bagg and Albino, por sus siglas en inglés) al ser estimuladas con LPS incrementan su metabolismo de arginina a ornitina, mediante la acción de arginasa I. Por ello, la clasificación de macrófagos M1 o M2 no sólo describe la activación de estas células; sino que también representan condiciones de programas metabólicos distintos. El NO inhibe la división celular mientras que la ornitina la estimula, por la vía de las poliaminas. Estos resultados indican que las respuestas M1 (clásica) o M2 (alterna) pueden influenciar reacciones inflamatorias de manera contraria. Por su parte, el factor de crecimiento tumoral β 1 (TGF- β 1, por sus siglas en inglés), que induce la sintasa de NO y estimula la arginasa parece tener un rol importante en el balance de M1 y M2. Además, estos fenotipos (M1/M2) son independientes de linfocitos T y B, esto último se corroboró con cepas de ratón NUDE (carentes de timo), por lo tanto carentes de linfocitos T, o ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por sus siglas en inglés), estos últimos carecen de linfocitos T y B; aún así los macrófagos eran capaces de tener ambos perfiles M1 y M2 (12).

Además de la clasificación de macrófagos antes mencionada, en 2011 se reportó una subpoblación de monocitos de sangre venosa que expresa el

receptor para linfocito T $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$, por sus siglas en inglés) y que corresponde al 5% de monocitos totales. Estos autores también reportaron que un pequeño porcentaje de macrófagos alveolares de lavado bronco-alveolar, de sujetos sanos, expresaron el receptor TCR $\alpha\beta$ de 5 a 15% (macrófagos TCR $^+$) y moléculas que son parte del complejo de señalización del TCR como proteína tirosin-cinasa específica para linfocito (Lck, por sus siglas en inglés), proteína cinasa 70 asociada a la cadena zeta (ZAP-70, por sus siglas en inglés) y el adaptador de activación para linfocitos T (LAT, por sus siglas en inglés) (13).

Al cultivar monocitos de sujetos sanos, con Bacillus de Calmette y Guérin (BCG, por sus siglas en inglés) durante 4 a 6 días se observó que el porcentaje de TCR $^+$ se incrementó 4 veces más (de 8% a 32.5%) en respuesta al BCG. Además, encontraron que esta subpoblación es abundante en la zona epiteloide de granulomas de pacientes con tuberculosis, en donde el 87% de los macrófagos que se encuentran en esta zona expresan TCR $\alpha\beta$. Por último, al incubar macrófagos, infectados y no infectados por BCG, con Infliximab (anticuerpo anti-TNF), se observa una disminución en las células TCR $^+$ en aquellas tratadas con anticuerpos que reconocen al TNF (Tumor Necrosis Factor, por sus siglas en inglés), independientemente de la presencia de BCG (13).

3. Receptores tipo TCR fuera del linaje linfoide

La expresión del TCR (TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$), ha sido descrita como exclusiva en linfocitos T. Sin embargo, además de los macrófagos que expresan un receptor tipo TCR, en los últimos años se han descrito diversas poblaciones de origen mieloides con esta característica. Algunos involucrados en patologías y otros en estado fisiológico (13-17).

En estado basal, se reportó una población de neutrófilos que expresan de un 5-8% el receptor tipo TCR $\alpha\beta$, el cual es variable y presenta diferentes repertorios. Se observó que al estimularlo se protege a los neutrófilos ante apoptosis y se

induce la secreción de IL-8. La expresión de este receptor es abundante tanto en la superficie celular como en compartimentos vesiculares (14).

Por su parte, los eosinófilos presentan bajos niveles de expresión del receptor tipo TCR $\gamma\delta$ (T cell Receptor $\gamma\delta$, por sus siglas en inglés) el cual es heterogéneo e inducible ante antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Posterior a la activación de su receptor tipo TCR $\gamma\delta$ estos eosinófilos son capaces de responder: secretando proteínas de sus gránulos, peroxidasa de eosinófilo y otras citocinas (15).

En algunas patologías, se ha reportado que en el micro-ambiente tumoral existen macrófagos TCR $\alpha\beta^+$. Más del 40% de los macrófagos presentes en carcinomas (esófago y colon) son TCR $\alpha\beta^+$, los cuales varían marcadamente entre los diferentes tumores (16). Por otra parte, en un estudio de pacientes con aterosclerosis, 9 de 10 pacientes mostraron macrófagos TCR $\alpha\beta^+$ asociados a macrófagos espumosos. En la región de la placa aterosclerótica y en las áreas que bordean los núcleos lipídicos, alrededor de un 85-95% de los macrófagos son TCR $\alpha\beta^+$. Debido a que no expresan de CD2 se descartó que fueran linfocitos (17).

Mediante la técnica de "spectratyping", la cual consiste en un análisis cuantitativo de la diversidad del repertorio del TCR. Esta se basa en analizar la región de complementariedad 3 (CDR3, por sus siglas en inglés) a través de la obtención de ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés) generar la cadena complementaria del ácido desoxirribonucleico (cDNA, por sus siglas en inglés) para posteriormente amplificar las regiones CDR3 por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y finalmente separarlos mediante un capilar de electroforesis para analizar la longitud y la secuencia de los productos (18). La diversidad del CDR3 fue analizada (13), esta diversidad es generada por la diversidad de la unión de segmentos V,D,J la unión de múltiples segmentos génicos D y la introducción de nucleótidos P y N en las uniones VDJ.

En estas poblaciones atípicas previamente descritas, se evaluó la diversidad de los receptores tipo TCR y se observó que aún existiendo re arreglos en el CDR3 éstos ocurren en menor repertorio de diversidad que en los linfocitos T (13-16).

La infección por *M. tuberculosis* es un modelo atractivo para el estudio de la expresión del receptor tipo TCR ya que esta subpoblación de macrófagos juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad. Estos macrófagos TCR⁺ se acumulan en la zona interna epiteloide del granuloma caseoso durante el transcurso de la enfermedad (13), indicando que, posiblemente, estos macrófagos TCR⁺ constituyan la línea principal de defensa contra la infección por *M. tuberculosis*, porque además, de representar una primera línea de defensa contra antígenos, pueden también tener un reconocimiento específico.

4. Poblaciones celulares importantes en la infección por *M. tuberculosis*

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada principalmente por el bacilo *M. tuberculosis* que afecta el tejido pulmonar, aunque también puede provocar una infección sistémica. En el mundo un tercio de la población se encuentra infectada con *M. tuberculosis* en estado latente, de los cuales de un 5-10% está en riesgo de desarrollar la enfermedad activa. La tuberculosis fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) una pandemia mundial en 1993. En el 2018, a nivel mundial se reportaron 1.45 millones de muertes y 10 millones de casos nuevos. Los casos de tuberculosis se encuentran relacionados con factores de riesgo que incluyen: desnutrición, diabetes, personas fumadoras, que consumen alcohol o que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés) (19). En México, alrededor de 1,700-1,800 de personas fallecen anualmente por esta infección (20) (Figura 1).

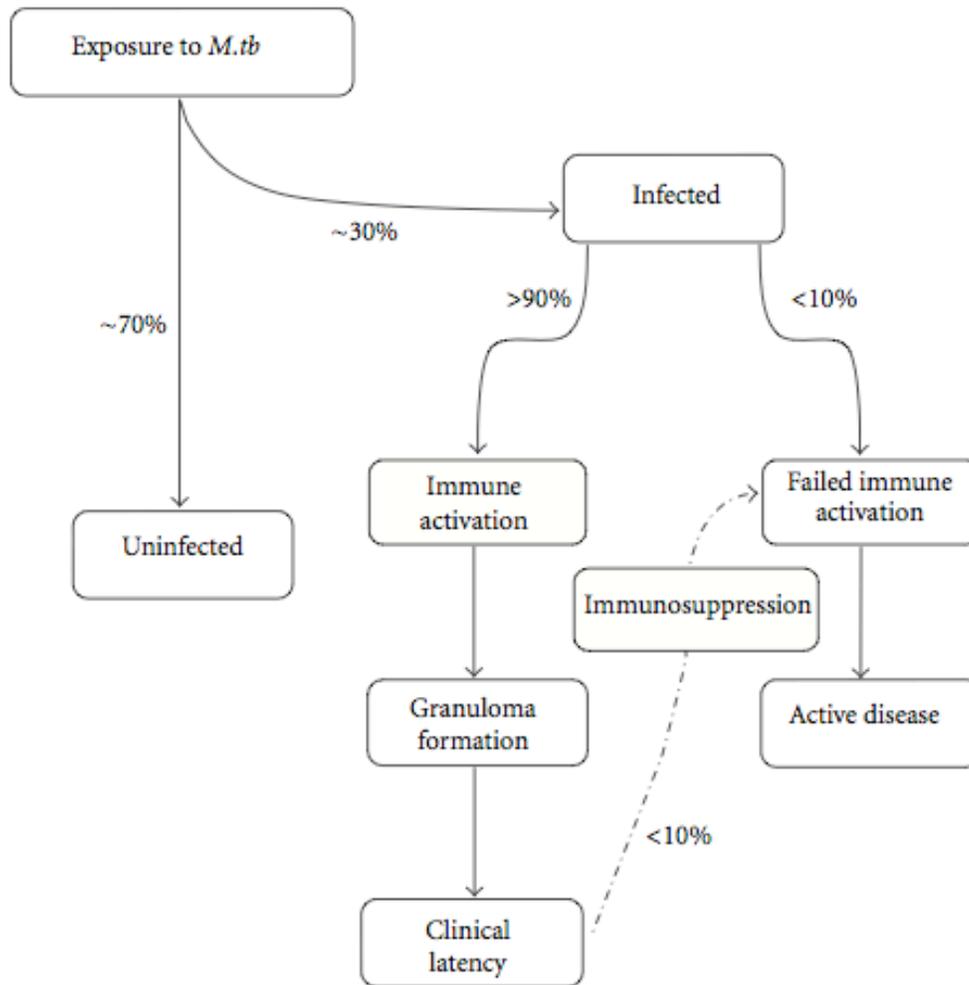


Figura 1. Diagrama de flujo de la progresión de la infección por tuberculosis. Los principales pasos se muestran para la progresión de un individuo infectado desde la exposición al bacilo de *M. tuberculosis* como el desarrollo de la enfermedad activa o en latencia (protección del hospedero). El porcentaje relativo de individuos que progresan en cada paso se muestra junto a la línea que marca la progresión (21).

Principalmente, la infección por *M. tuberculosis* afecta a los pulmones en un 80% de los casos. Sin embargo, puede también afectar otros sitios fuera del pulmón y se le denomina tuberculosis extrapulmonar, esta última conforma un tercio de los casos de tuberculosis reportados (22). La enfermedad se disemina cuando personas infectadas liberan bacterias al aire, por ejemplo cuando tosen. La dosis infectante varía entre 4-5 bacterias para el humano pero no se conoce con exactitud.

El desarrollo cronológico de los eventos en la patogénesis de la tuberculosis se puede dividir en cinco etapas: 1) la inhalación de los bacilos de *M. tuberculosis*, 2) la multiplicación de los bacilos de *M. tuberculosis*, lisis de macrófagos, monocitos de sangre; 3) el reclutamiento de otras células inflamatorias que son atraídas al pulmón, de 2 a 3 semanas posterior a la infección. En esta etapa se genera la acumulación de macrófagos, se da poco daño tisular y se desarrolla inmunidad de linfocitos T, los cuales proliferan dentro de las lesiones tempranas y activan a los macrófagos para matar a los bacilos intracelulares. Es aquí cuando el crecimiento bacilar logarítmico temprano se detiene. 4) Se generan lesiones necróticas centrales sólidas que inhiben el crecimiento extracelular de *M. tuberculosis*(23).

El resultado final de la infección por tuberculosis depende del equilibrio entre el crecimiento bacteriano y la capacidad del hospedero de montar una respuesta inmunitaria que elimine las bacterias y controle el crecimiento de las mismas. Esto se ve reflejado en el grado de necrosis tisular, fibrosis y regeneración (23).

Las células fagocíticas son claves en la iniciación de la respuesta innata y en la dirección de la inmunidad adaptativa por los linfocitos T al presentar antígenos de *M. tuberculosis* y expresar moléculas co-estimuladoras al igual que un perfil de citocinas pro-inflamatorio en los inicios de la infección y anti-inflamatorio en fases progresivas (23). Esta fase progresiva de la infección por *M. tuberculosis* podría considerarse como la quinta etapa de la infección.

En el tejido pulmonar, los macrófagos alveolares son los que inicialmente cubren su función fagocítica. En el pulmón, el receptor de complemento 3 (CR3, por sus siglas en inglés) es el más importante para la fagocitosis de *M. tuberculosis* (24), junto con el MMR/CD206. Este último reconoce residuos de manosa en la pared de la bacteria. Las cepas virulentas ingresan al macrófago a través del MMR mientras que las cepas atenuadas no lo hacen (25).

Con respecto a la fuente de nutrientes, *M. tuberculosis* requiere de ácidos grasos para su catabolismo, síntesis de aminoácidos y adquisición de minerales (hierro); estos últimos presentes en el grupo hemo unidos a

transferrina y lactoferrina. Los lípidos son esenciales para la sobrevivencia de la bacteria. En *M. tuberculosis* existen genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos los cuales se encuentran sobre expresados durante la infección (26). El metabolismo de ácidos grasos es una fuente preferida como recurso de carbono para la sobrevivencia de la bacteria. Ésta utiliza los lípidos derivados del colesterol y los triacilglicérolos de los macrófagos. Estos lípidos se acumulan en los fagosomas bacterianos durante la infección para formar macrófagos espumosos (27). La desregulación inducida por el patógeno en la síntesis y acumulación de lípidos juega un rol en la transición de macrófago a macrófago espumoso, los cuales son macrófagos cargados de lípidos generados por el secuestro masivo de lipoproteínas de baja densidad y acumulación citoplasmática de ésteres de colesterol (28).

El papel de los macrófagos es crucial en el control de la tuberculosis. Los macrófagos infectados pueden facilitar la propagación de la enfermedad debido a la necrosis celular mediante la cual se diseminan las bacterias en el espacio extracelular y permite su migración a sitios distales en el pulmón y otros tejidos. Una vez en el parénquima los bacilos inician un proceso inflamatorio lento a través de los macrófagos infectados. Estos macrófagos infectados reclutan a otros no infectados para finalmente formar un granuloma (29).

El granuloma es la huella principal de la inmunopatogénesis de la infección por *M. tuberculosis*, su estructura celular es compacta, dinámica y altamente organizada que se forma en respuesta ante la estimulación crónica de antígeno, en el contexto de factores mediados por macrófagos. Esta estructura agrega células del sistema inmunológico que incluye a macrófagos derivados de monocitos (no todos se encuentran infectados), macrófagos espumosos, células epiteloideas, y células gigantes multinucleadas. Las cuales se encuentran rodeadas por un anillo de linfocitos (29) (Figura 2).

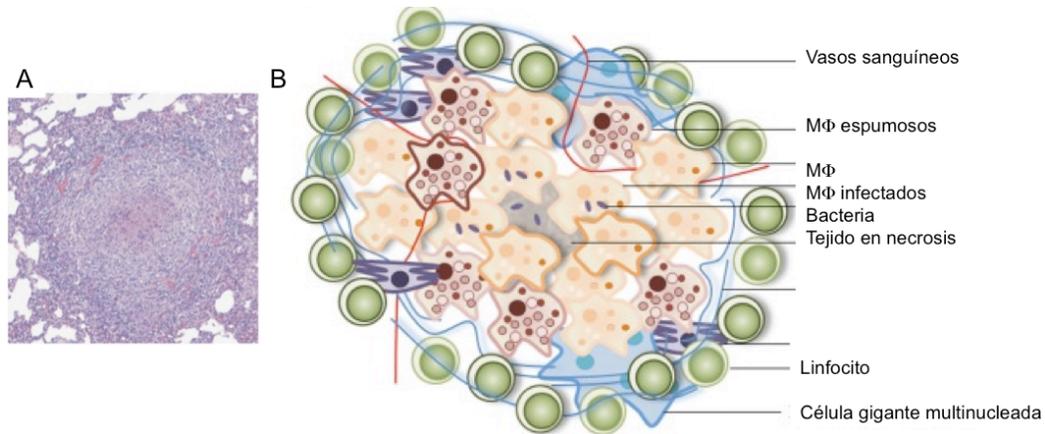


Figura 2. Arquitectura característica del granuloma. A. Corte histológico de tejido de pulmón de conejillo de indias que presenta granuloma con necrosis central fijado con formalina y teñido con hematoxilina-eosina B. Representación esquemática de los componentes celulares del granuloma. Modificado de (29)

El granuloma tiene como finalidad limitar el crecimiento y la dispersión de la bacteria. Sin embargo, su función puede actuar en beneficio o perjuicio del hospedero; ya que funciona tanto como un nicho en el cual el bacilo puede crecer y persistir, como un microambiente inmunológico en el cual las células y sus funciones anti-micobacterianas interactúan para controlar y prevenir la diseminación de la infección por *M. tuberculosis*. Los granulomas se observan en la infección por *M. tuberculosis* latente, activa y en reactivación. *M. tuberculosis* puede persistir por décadas dentro del granuloma. El clásico granuloma caseoso en tuberculosis se le denomina así por la forma "tipo queso". Histológicamente consiste de macrófagos epiteloideos que rodean una región necrótica, es decir una región compuesta de células muertas y *debries*. Los macrófagos son rodeados de un anillo de linfocitos B y T, su tamaño varía de 1 mm a >2 cm. La acumulación caseosa en el centro del granuloma promueve un incremento en la necrosis del tejido y el colapso del centro del granuloma; por lo que se liberan bacilos virulentos a otros sitios donde se formarán más lesiones (30).

En la tuberculosis activa (Figura 1), la bacteria se encuentra en multiplicación, el hospedero tiene varios granulomas que son incapaces de controlar la infección, es decir la bacteria se encuentra en el espacio extracelular y es

entonces cuando puede dispersarse en el pulmón o hacia otros órganos; causando tuberculosis extrapulmonar (29). En la infección crónica o latente, los granulomas caseosos pueden calcificarse. Este proceso inicia en el centro caseoso. Un granuloma calcificado por lo general representa una respuesta inmune exitosa y se asocia con menor cantidad de células inflamatorias a diferencia de otros granulomas, como los granulomas no caseosos o necróticos (30).

Las etapas tempranas de la infección por *M. tuberculosis* se caracterizan por la polarización de macrófagos hacia M1, principalmente debido a la secreción de IFN γ , lo que provee a los macrófagos de su capacidad micobactericida. Las etapas posteriores promueven una transición a macrófagos polarizados a M2; como consecuencia de la expresión de varios factores, incluidos el receptor γ activado por proliferación de peroxisoma (PPAR γ , por sus siglas en inglés) y el activador de la transcripción y transductor de señal 6 (STAT6, por sus siglas en inglés). Este escenario también contribuye a la formación de macrófagos espumosos y a las células gigantes multinucleadas (31).

En este contexto, el equilibrio de la respuesta pro y anti-inflamatoria es esencial para el control de la proliferación bacteriana dentro del granuloma y con el tiempo la resolución de la lesión granulomatosa. Este microambiente inmunológico es dependiente de: la localización tisular, de las células asociadas, de los factores de crecimiento y de las citocinas presentes que determinarán el patrón de diferenciación de las células que conforman el granuloma especialmente de los macrófagos (29).

En resumen, después de la internalización de la bacteria por los macrófagos alveolares, varios escenarios son posibles: *M. tuberculosis* es destruida inmediatamente, o la infección se establece y una respuesta inflamatoria no específica le sucede generando una red de citocinas pro y anti-inflamatorias principalmente secretadas por macrófagos y células dendríticas. Las células fagocíticas inician el proceso de presentación de antígenos y se monta la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T. En este proceso la característica

inmunofisiopatológica que la distingue es la formación del granuloma caseoso (29).

En cuanto a la respuesta adaptativa durante la infección por *M. tuberculosis*, se ha demostrado los linfocitos T CD4, se encuentran involucrados en la protección del hospedero. Estos linfocitos activan funciones efectoras en los macrófagos que controlan de manera intracelular la infección por *M. tuberculosis* (32). Existen diferentes subtipos de linfocitos T CD4. De acuerdo a su producción de citocinas se les ha clasificado principalmente en: linfocitos T cooperadores, Th1, Th2, Th17, Tregs (regulatory T lymphocytes, por sus siglas en inglés). El subtipo de linfocito T predominante durante la infección por *M. tuberculosis* dependerá del estado de la infección (activa vs. latente) (33).

La respuesta tipo Th1, es considerada protectora por su habilidad de producir citocinas como el IFN γ o el TNF, las cuales contribuyen al reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato (monocitos, macrófagos y granulocitos). Por su parte la respuesta Th17 produce IL-17, y está involucrada en la protección inmunológica ante la infección por *M. tuberculosis* principalmente por el efecto de esta citocina en la quimio-atracción de neutrófilos. Los linfocitos Th17 están involucrados en la protección durante etapas tempranas. Principalmente por su capacidad de reclutar monocitos y linfocitos Th1 al sitio de formación del granuloma . Se ha demostrado que el uso no restringido de la respuesta por los linfocitos Th17 determina una inflamación exacerbada mediada por neutrófilos y monocitos inflamatorios, lo que resulta en daño tisular (32). Los linfocitos que juegan un rol en el control o la supresión de la respuesta inmunológica durante la infección por *M. tuberculosis*, son los linfocitos Th2, que contra-regulan la acción de los Th1, y los Tregs (33). Estos dos subtipos de linfocitos contribuyen a la modulación de la respuesta inmunológica y a la reactivación de la infección por *M. tuberculosis* (32) (Figura 3).

Mientras que otros linfocitos antígeno específico como: los linfocitos CD8, NKs (Natural Killer cells, por sus siglas en inglés), los linfocitos T $\gamma\delta$, y los linfocitos T restringidos a CD1 también pueden producir IFN γ durante la infección pero no

pueden compensar por la carencia de linfocitos CD4. Estos linfocitos no convencionales son activados durante la infección por *M. tuberculosis* y son capaces de reconocer lípidos que son abundantes en la pared de la micobacteria. Los linfocitos T $\gamma\delta$, reconocen "*phosphoAgs*" (antígenos fosforilados, por sus siglas en inglés) del hospedero o de origen bacteriano y también pueden contribuir a la respuesta inmunológica ante la infección por *M. tuberculosis* (34).

En cuanto a su mecanismo de activación, los linfocitos CD4 reconocen antígenos peptídicos en el contexto de presentación por moléculas de MHC-II (Major Histocompatibility Complex class II, por sus siglas en inglés). Aunque el rol de los linfocitos CD8 durante la infección por *M. tuberculosis* es menos claro que el de los CD4, también son considerados como protectores y necesarios para una respuesta inmunológica óptima. Los linfocitos CD8 reconocen antígenos peptídicos, que son generalmente cargados en los compartimentos citosólicos en el contexto de presentación por MHC-I (Major Histocompatibility Complex class I, por sus siglas en inglés). Los linfocitos CD8 se diferencian a linfocitos efectores (T_{eff}), quienes producen moléculas citolíticas y citocinas que matan tanto a las células del hospedero como a los bacilos de *M. tuberculosis* intracelulares (32). También puede existir presentación cruzada, la cual ocurre cuando vesículas apoptóticas que provienen de macrófagos infectados o DCs pueden ser tomados por las DCs y ser presentados de manera canónica a través del MHC-I (33) (Figura 3).

Durante la respuesta inmunológica ante la infección por *M. tuberculosis*, las poblaciones infiltrantes tanto de la inmunidad innata como adaptativa se resumen en la Figura 3. Cabe señalar que dentro de la inmunidad adaptativa, el número de linfocitos T específicos para contrarrestar la infección por *M. tuberculosis* que producen una combinación de: $IFN\gamma$, IL-2 y/o TNF puede estar correlacionado a la carga micobacteriana.

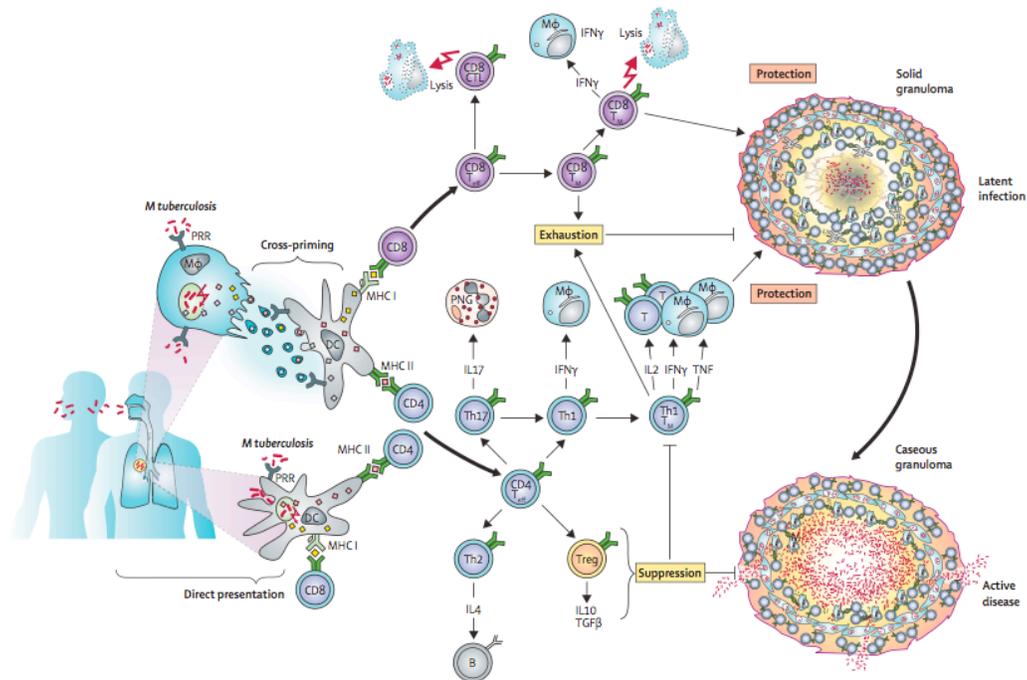


Figura 3. Resumen de la respuesta inmunológica durante la infección por *M. tuberculosis*. El control de la infección por *M. tuberculosis* es el resultado de un trabajo en equipo que resulta en la protección del hospedero. Este trabajo ocurre entre las subpoblaciones de linfocitos T y los macrófagos. El bacilo sobrevive dentro de macrófagos y DCs, dentro de los fagosomas. Péptidos micobacterianos son cargados en el MHC-II y son presentados a linfocitos CD4. La estimulación de los linfocitos CD8 requiere del cargado de MHC-I con moléculas de péptidos micobacterianos presentes en el citosol, ya sea por la egresión de antígenos micobacterianos hacia el citosol o por presentación cruzada; donde los macrófagos liberan cuerpos apoptóticos cargados de péptidos micobacterianos. Estas vesículas son tomadas por las DCs y los péptidos son presentados. Los linfocitos CD4 polarizan a diferentes subtipos dependiendo su secreción de citocinas. Las DCs y los macrófagos expresan PRRs (Pattern Recognition Receptors, por sus siglas en inglés), quienes sensan los PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns, por sus siglas en inglés) de la micobacteria. Los linfocitos Th1 producen IL-2 para la activación de linfocitos T, IFN γ , o TNF para la activación de macrófagos. Los linfocitos Th17, activan a PNGs (Polymorphonuclear granulocytes, por sus siglas en inglés), estos contribuyen a la formación temprana de inmunidad protectora en el pulmón después de la vacunación usando epítopes específicos (35). Los linfocitos Th2 y los linfocitos Tregs tienen un contrapeso en la respuesta protectora por los linfocitos Th1, utilizando: IL-4, TGF β , o IL-10. Los linfocitos CD8 producen IFN γ y TNF, los cuales activan a los macrófagos. También actúan como linfocitos citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) al secretar perforina y granzima, quienes lisan a las células del hospedero y atacan de manera directa a *M. tuberculosis*. Estos linfocitos T_{eff} son sucedidas por linfocitos de memoria (T_M). Los T_M producen varias citocinas principalmente: IL-2, IFN γ y TNF. Durante

su control activo en un granuloma sólido la infección por *M. tuberculosis* se encuentra temporalmente suspendida entrando a un estado de latencia. El agotamiento de los linfocitos T es mediado por interacciones entre linfocitos T y DCs a través de miembros de PD1 (programmed death 1 system, por sus siglas en inglés). Los linfocitos Tregs secretan IL-10 y TGF β , lo que suprime la respuesta Th1. Este proceso permite la reactivación de *M. tuberculosis*, lo cual conlleva a un granuloma caseoso y una enfermedad activa (36).

5. Producción de citocinas en la infección por tuberculosis

En respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, las interacciones entre los macrófagos, células presentadoras de antígeno, (APCs, por sus siglas en inglés) con linfocitos T antígeno-específicos genera una red de secreción de citocinas que determina el control de la infección. Las citocinas juegan un papel importante en la respuesta adaptativa y el desarrollo de actividades antimicrobianas mediada por la activación de linfocitos T, respuesta que principalmente genera un perfil Th1; lo que se ha asociado con el control de la infección (37, 38). El papel de la red de citocinas incluidas en el presente trabajo e involucradas tanto en la defensa del hospedero ante la infección por *M. tuberculosis* como en la regulación de la respuesta adaptativa se describe a continuación (Figura 6).

5.1 TNF y miembros de la familia de linfoxina

5.1.1 Actividades del TNF durante infección por micobacterias

Como se descubrió en sus inicios, el TNF es tumoricida pero también es un mediador esencial en la inflamación. En particular, la participación del TNF en la resistencia del hospedero ante infecciones por *M. tuberculosis* es fundamental, ya que esta citocina tiene la capacidad de: activar a monocitos y macrófagos, inducir la secreción de quimiocinas, el reclutamiento celular al sitio de la infección, activar los mecanismos bactericidas en macrófagos, como la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) y la apoptosis de fagocitos infectados, e inducir la respuesta de linfocito T, que a su vez en sinergia con IFN γ estimulan los mecanismos anti-micobacterianos en macrófagos (39).

5.1.2 TNF y linfoxinas

El TNF se descubrió en 1975 como una molécula inducible por LPS, la cual causaba necrosis en tumores *in vitro*, de ahí su nombre (40). A la par en 1968, se describió la linfoxina (LT, por sus siglas en inglés) como una proteína producida por linfocitos capaces de matar a las células tumorales (41). Los avances tecnológicos permitieron hasta 1984 la purificación de ambas proteínas (42), la determinación de la secuencia de aminoácidos (43, 44) y la clonación del DNA complementario (45). Con esto se pudo revelar la verdadera identidad de estas dos proteínas (TNF y LT) así como entender su relación. Se concluyó que estas eran proteínas homólogas por secuencia (30% de identidad en aminoácidos) y por estudios posteriores de unión a su receptor; se confirmó una homología funcional entre ellas (46). Esto, aunado a la existencia de receptores de superficie celular en común, llevó al renombramiento de estas dos citocinas de: TNF y LT a: $TNF\alpha$ y $TNF\beta$. Sin embargo, con el descubrimiento de más de una linfoxina ($LT\alpha$ y $LT\beta$), del complejo $LT\alpha\beta$ y su actividad biológica en desarrollo de los órganos linfoides (47), el renombramiento de $TNF\beta$ regresó a LT específicamente $LT\alpha$. Esto ha generado confusión entre la comunidad académica; para mitigar esto, actualmente se especifica la LT en cuestión.

Estas dos citocinas fueron fundamentales para el aislamiento e identificación de una familia más grande de citocinas actualmente conocidas como la superfamilia de TNF. Debido a que varios grupos de investigación descubrieron la misma citocina de manera independiente pero simultáneamente, existen varios nombres para cada miembro de la superfamilia de TNF. Hasta ahora se conocen 19 diferentes ligandos que pertenecen a esta superfamilia y más de 29 receptores, los cuales se caracterizan por un dominio rico en cisteínas en la porción extracelular (48).

Los genes de: TNF, $LT\alpha$ y $LT\beta$ se encuentran altamente compactados en el cromosoma 6 humano 12kb dentro de la región del MHC (49), por lo que la regulación de su expresión está íntimamente ligada al MHC. La producción de TNF es regulada a nivel de RNA mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés)

mediante sitios de unión en la región promotora de TNF a factores de transcripción como: el factor nuclear- κ B (NF- κ B, por sus siglas en inglés), c-Jun, activador de proteína-1 (AP-1, por sus siglas en inglés) y el factor nuclear asociado con células T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés) (50). La regulación post-traducciona también ocurre, principalmente mediante microRNAs (miRNAs, por sus siglas en inglés) y proteínas de unión al RNA; como elementos ricos en AU (adenina y uracilo), tristetraprolina y factores de decaimiento de mRNA específicos para TNF (51).

El TNF inicialmente es producido como un homotrímero de 26kDa que se encuentra como proteína de membrana. En este trabajo nos referimos a ella como tmTNF; en otros trabajos a veces se hace referencia como pre-TNF (52). El monómero de proteína precursora, de 26kDa, es escindida a monómeros de 17kDa por la enzima convertidora de TNF (TACE, por sus siglas en inglés, también conocida como ADAM17), una metaloproteasa unida a la membrana celular (53). Los monómeros de 17kDa forman trímeros solubles biológicamente activos y son los que encontramos en plasma. TACE, además de escindir tmTNF también libera los receptores de TNF (TNFRs, por sus siglas en inglés) (54).

Como mencionamos, la LT es estructuralmente el miembro de la superfamilia de TNF más cercano a TNF. La LT α (previamente nombrada TNF β) existe como un homotrímetro soluble o puede también formar una molécula membranal heterotrimérica en asociación con LT β formando moléculas heterotriméricas LT $\alpha\beta$, las cuales se encuentran en linfocitos activados (47). El heterotrímero LT α 1 β 2 es la forma predominante, y el LT α 2 β 1 es la forma menor (<2%) de la cual no se tiene un rol definido (55) (Figura 4).

Los ligandos de la superfamilia de TNF interactúan con más de un receptor. Tanto el TNF soluble y el tmTNF llevan a cabo su actividad a través de dos receptores: uno de 55 kDa el TNFR1 (CD120a, DR1 o p55/p60) y el de 75kDa el TNFR2 (CD120b o p75/p80). La LT α se une al TNFR1, al TNFR2 y al mediador de entrada del virus de herpes (HVEM, por sus siglas en inglés) (39).

El heterotrímero $LT\alpha\beta_2$ interactúa con el receptor de $LT\beta$ ($LT\beta R$). El receptor tipo linfotoxina/homólogo a linfotoxina (LIGHT/CD258, por sus siglas en inglés) interactúa con HVEM y $LT\beta R$ y juega un papel en la coestimulación de linfocitos T (56) (Figura 4).

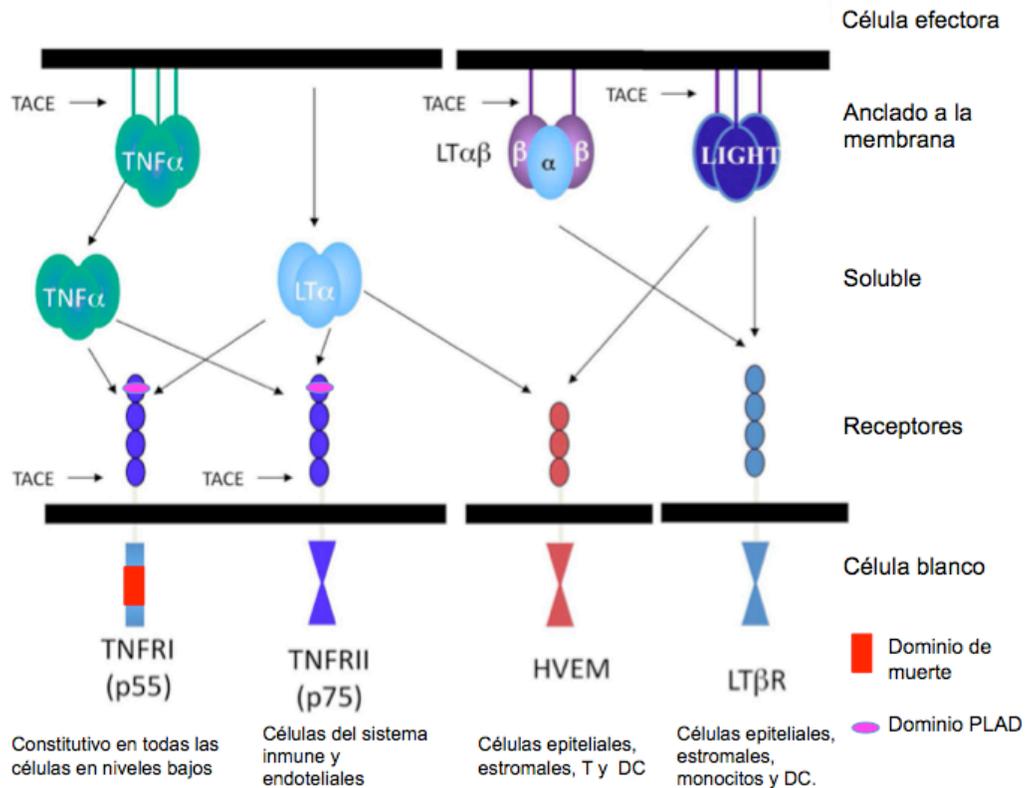


Figura 4. Interacciones entre ligandos solubles y anclados a membrana con receptores de TNF y LT. La metaloproteína TACE escinde tmTNF en TNF soluble -forma trimérica ($TNF\alpha$), que interactúa con $TNFR1$ y $TNFR2$. Los $TNFRs$ así como $LT\alpha\beta$ y LIGHT son escindidos a sus formas solubles por TACE (corte marcado con flecha). Las interacciones entre TNF-LT y sus receptores están indicadas por flechas. La $LT\alpha$ es secretada como homotrímero, interactúa con los $TNFRs$ y con HVEM. En asociación con $LT\beta$ -membranal actúa como complejo biológicamente activo al unirse con $LT\beta R$. LIGHT interactúa con HVEM y $LT\beta R$. LIGHT. Modificado de (57).

Hoy en día el TNF es reconocido como la citocina más pleiotrópica descrita en mamíferos y con actividades involucradas en casi todo sistema biológico tanto en la fisiología del sistema inmune como en la neurobiología (50). En el sistema inmune es principalmente secretado por macrófagos, células NK, linfocitos T y B.

5.1.3 Los receptores de TNF (TNFRs)

Los TNFRs son proteínas transmembranales de tipo I. Existe un dominio conservado en la región extracelular del TNFR1 y TNFR2, la cual media el ensamblaje específico de ligando independiente de los receptores triméricos. Este dominio de ensamblaje de pre-ligando (PLAD, por sus siglas en inglés) es físicamente distinto del dominio que forma el contacto principal con el ligando; sin embargo, es necesario para el ensamblaje de los complejos TNFR que unen TNF y median la señalización (58). Por lo que los TNFRs parecen funcionar como complejos preformados, más que subunidades individuales de receptores que oligomerizan después de su unión al ligando.

Los TNFRs comparten características estructurales en sus dominios extracelulares mientras que difieren en sus dominios intracelulares. Debido a estas diferencias estructurales, se ha sugerido que tienen actividades contrarias: apoptosis (TNFR1) *versus* supervivencia y proliferación (TNFR2) (52). Sin embargo, también existen estudios que sugieren una transducción de señal cooperadora entre ambos receptores. Se ha demostrado transferencia de señales entre los TNFRs indicando así un traslapamiento de las diferentes vías de señalización de ambos receptores y consecuentemente su función (59).

Los niveles de expresión de TNFRs pueden ser regulados por citocinas, principalmente interferones, lo cual explica de cierta manera el sinergismo entre estas dos citocinas (46). Además, se ha demostrado que la sobre-expresión de receptores tanto *in vitro* como *in vivo* puede inducir de manera espontánea la señalización de TNFR independiente de ligando (60).

5.1.3.1 TNFR1

Los receptores de la superfamilia de TNF se dividen en dos grupos. Los que tienen un dominio de muerte (TRADD, TNF, receptor associated death domain, por sus siglas en inglés) de aproximadamente de 80 aminoácidos y aquellos receptores que no lo tienen. El TNFR1 cuenta con un dominio de muerte por lo que también se le conoce como DR1 (por sus siglas en inglés, death receptor 1). Es expresado de manera constitutiva por todas las células en niveles bajos.

Su porción intracelular cuenta con 221 aminoácidos. Se ha sugerido que el TNFR1 es el receptor para TNF soluble. Debido a la presencia de TRADD, este receptor media apoptosis (59).

5.1.3.2 TNFR2

El TNFR2 a diferencia del TNFR1 no cuenta con un dominio de muerte intracelular. El TNFR2 es principalmente expresado en células del sistema inmune y células endoteliales. Este receptor cuenta con 174 aminoácidos en su porción intracelular (59). Este receptor media la proliferación y la activación celular principalmente mediante la activación de la vía de NF- κ B. De manera interesante, el tmTNF es un ligando más potente para el TNFR2 (52).

5.1.4 Señalización celular inducida por TNFRs

La señalización por medio de los TNFRs es compleja. La habilidad del TNF de inducir tanto señales de muerte y/o co-estimulación y activación celular depende de la señalización río abajo de cada uno de sus receptores que como veremos no es excluyente.

Para iniciar el proceso de señalización mediante los TNFRs es necesaria la asociación de estos receptores en trímeros para su unión con el TNF. Después de la unión del TNF con el TNFR1, el complejo se trasloca a microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas, ricas en colesterol y esfingolípidos. La interacción estable entre TNF-TNFR1 es internalizada, y permite la liberación de SODD (silencer of death domain, por sus siglas en inglés), el cual es un inhibidor intracelular de TNFR (61), lo que permite el reclutamiento de DISC (Death Inducing Signaling Complex, por sus siglas en inglés). Dentro del complejo de DISC se encuentra TRADD. La asociación de TRADD y su internalización permite reclutar a FADD (Fas Associated Death Domain, por sus siglas en inglés) formando un complejo de proteínas de andamiaje (62); las cuales permiten el reclutamiento de la pro-caspasa 3, 8 y 10, lo cual lleva a la degradación del DNA y muerte celular por apoptosis (59) (Figura 5).

Los TNFRs señalizan mediante la unión a uno a más factores asociados a receptor de TNF (receptor associated factor TRAFs, por sus siglas en inglés). El TNFR1 a través de TRADD también puede reclutar cIAP y RIP, quienes permiten la unión de TRAF2 (TNFR-associated factor 2, por sus siglas en inglés) al complejo de señalización del TNFR1. La formación de este complejo resulta en la activación de diferentes cinasas: NIK (cinasa inducida por NF- κ B por sus siglas en inglés), IKK α y β (cinasa de I κ B α y β , por sus siglas en inglés) o la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés) cinasa N-terminal de c-Jun (JNK, por sus siglas en inglés) y la cinasa de p38. La activación de estas cinasas media la activación de factores de transcripción (como NF- κ B) que traslocan a núcleo induciendo la expresión de genes anti-apoptóticos (52).

La unión de TNF con TNFR2 activa la vía de NF- κ B mediante la degradación por ubiquitinación de su inhibidor I κ B α lo cual induce la producción de citocinas principalmente pro-inflamatorias. También interfiere en la expresión de proteínas intracelulares regulatorias con potencial anti-apoptótico como: proteínas inhibidoras de apoptosis (c-IAP1 y c-IAP2), TRAF1 y TRAF2 (52). De manera interesante, la unión del TNF a TNFR2 induce el inhibidor de apoptosis (IAP-1, por sus siglas en inglés), el cual media la ubiquitinación y degradación por proteosoma de TRAF2. Lo cual otorga evidencia de la transferencia de señales entre los dos TNFRs, al igual que el TNFR1 el TNFR2 también activa la vía de AP-1 y MAPK (59) (Figura 5).

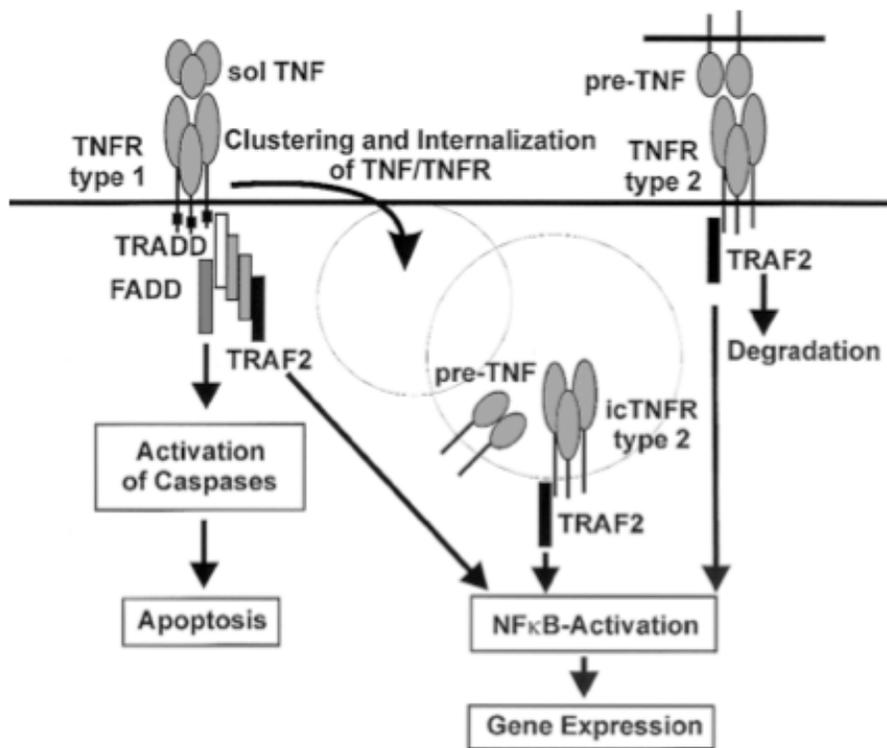


Figura 5. Modelo de transducción de señales ante el estímulo de los TNFRs. La activación del TNFR1 por TNF soluble lleva al reclutamiento de TRADD y de FADD, con ello es posible la activación de la cascada de caspasas para inducir muerte por apoptosis. Por su parte a través de la unión de TRAF2 al TNFR1, se activa la vía de NF- κ B y por lo tanto la activación celular y la expresión de genes anti-apoptóticos. El TNFR2 o el icTNFR2 (TNFR2 intracelular) enciende una vía de activación de NF- κ B dependiente de TRAF2 y la consecuente inducción de genes anti-apoptóticos (52).

El factor de transcripción NF- κ B, puede inducir: TNF, TRAF1 y TRAF2; generando una señal de amplificación de las vías de señalización mediadas por TNF-TNFRs. La inducción de NF- κ B por ambos receptores es importante en la inflamación ya que este factor transcripcional es un activador global de incontables citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y sus receptores además de ser un regulador crítico de la activación y función de leucocitos (50).

Aunque el TNFR2, no tiene manera directa de inducir apoptosis, datos experimentales muestran que la activación de ambos receptores incrementa la apoptosis. Este fenómeno puede ser explicado por una mayor afinidad del

TNFR2 al TNF soluble, por lo que se concentrarían bajas cantidades de TNF en la membrana celular pasándolo al TNFR1(52).

En años recientes se ha identificado que el TNF es capaz de activar tanto mecanismos apoptóticos como anti-apoptóticos o señales de supervivencia celulares. Las señales apoptóticas no requieren la síntesis activa de proteínas. Mientras que las señales anti-apoptóticas si lo requieren y esta síntesis es mediada a través de la activación de NF- κ B (63). Este balance de señales permitirá determinar el destino celular en respuesta a TNF.

5.1.5 Retro-señalización por tmTNF

La expresión transmembranal de esta citocina es un indicador de que está diseñada para actuar de manera local. Se ha descrito que el tmTNF es capaz de iniciar un proceso denominado señalización reversa o retro-señalización. La retro-señalización permite una comunicación de dos vías mediante el contacto célula-célula. Esta señal bi-direccional contribuye a la plasticidad del sistema ligando receptor del TNF (64).

En este proceso, la señal hacia la célula productora de TNF es mediada vía el tmTNF al unirse a un TNFRs. Es probable que el entrecruzamiento de los homotrímeros de tmTNF sirva como un primer paso en la iniciación de transducción de señales. Las regiones intracelulares del tmTNF poseen un sitio de fosforilación de caseína cinasa 1 (CK1, por sus siglas en inglés) que pueden ser fosforiladas en un residuo de serina, mediante la cual son capaces de transducir señales, dentro de la célula productora de TNF (65).

En este proceso, la retro-señalización puede llevar a: un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio y a una expresión alterada de citocinas en la misma célula productora de TNF. A su vez la retro-señalización puede utilizar la vía de las MAPK para llevar las señales al núcleo (64). Además, la porción citoplasmática del tmTNF tiene un fragmento susceptible de proteólisis

en la porción intracelular que genera una porción de traslocación nuclear de 10kDa (66).

Se ha descrito que algunos efectos de la estimulación con tmTNF son la inducción de apoptosis, mecanismo que sirve para controlar la respuesta inflamatoria. En linfocitos B y T parece inducir señales estimulatorias, que llevan a la producción de IL-2 y de moléculas de adhesión como la E-selectina (67). Mientras que en monocitos la retro-señalización por tmTNF ha sido descrita como un mecanismo de silenciamiento más que una señal estimulatoria (68). Lo anterior sugiere un rol diferente en el tipo de señal en la inmunidad innata y adaptativa a través del tmTNF.

Los sistemas de señalización contribuyen a la modulación fina de las funciones celulares y su interacción en el sistema inmune. Por lo que este tipo de comunicación bi-direccional; es decir del contacto célula-célula, incrementa la plasticidad del sistema inmune y provee mecanismos para crear una resolución espacio-funcional que confiere compartimentos o tipos celulares a cierta señalización (64).

5.1.6 El tmTNF es suficiente para la resistencia ante infección por BCG

A pesar de que la mayor parte de las actividades antimicrobianas están dadas por TNF soluble, el tmTNF también es importante para la respuesta inmune celular y es capaz de mediar activación de la célula productora de TNF mediante la retro-señalización.

Para investigar el papel de tmTNF en la infección por *M. tuberculosis*, ratones silvestres C57BL/6 (WT), deficientes para el TNF (TNF-KO) y *knockin* que expresan sólo la forma transmembranal del TNF, la cual es no escindible (tmTNF-KI), han sido usado como modelo. Los ratones tmTNF-KI, tienen una delección en la región de aminoácidos 1-9 y una sustitución en la posición 11 (tmTNF^{Δ1-9,K11E}) (69). Los ratones que expresaban el tmTNF no escindible se

encontraron protegidos ante la infección por BCG; mientras que los TNF KO murieron después de la infección (70).

La generación de ratones knock-in (KI) cuya delección hace que el tmTNF no sea escindible por TACE, ha confirmado que el tmTNF es capaz de sustituir muchas de las funciones del TNF soluble durante la fase aguda de la infección por *M. tuberculosis*. Sin embargo, para el control a largo plazo, el TNF soluble es crítico ya que los ratones KI murieron después de tres meses de infección. Mientras que los KO mueren 20-40 días después de la infección (71).

El tmTNF actúa a través de los TNFRs, por ello en un estudio se evaluó la presencia y ausencia de estos receptores y la supervivencia de los ratones ante la infección de una cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Los ratones tmTNFxTNFR2 KO son muy sensibles, tanto como los TNF KO. Mientras que los tmTNFxTNFR1 KO presentan un comportamiento similar a los ratones que sólo expresan tmTNF. Lo que sugiere que el efecto protector de tmTNF contra la infección por *M. tuberculosis* en la fase aguda está mediado principalmente por el TNFR2 (72).

Los datos anteriores sugieren un rol esencial del tmTNF durante el inicio de los mecanismos de respuesta inmune contra la infección por *M. tuberculosis*.

5.2 Citocinas pro-inflamatorias implicadas en la respuesta tipo Th1 y en la activación de macrófagos

5.2.1 IFN γ

El IFN γ pertenece a los interferones de tipo II, del cual se han descrito diversas propiedades antivirales. En el caso de la infección por *M. tuberculosis*, las actividades antimicrobianas ante la activación de macrófagos depende de linfocitos con perfil Th1 y linfocitos NK productores de IFN γ (37). Esta citocina sinergiza con el TNF para estimular mecanismos antimicrobianos incluyendo autofagia. El TNF promueve el reclutamiento de linfocitos T CD4 y NKs

productores de IFN γ , quien es el principal mediador inmunológico que promueve la muerte de las bacterias debido a: su gran potente capacidad activadora de fagocitos mononucleares, su alta capacidad de destruir microorganismos intracelulares, e a su capacidad de incrementar la expresión de MHC-I y MHC-II en macrófagos activados. Es importante mencionar que los linfocitos T restringidos por CD1 presentan actividad citotóxica y son capaces de producir IFN γ (23). El cual, también induce la secreción de IL-12.

5.2.2 IL-1 β

La IL-1 β , principalmente es producida por monocitos, macrófagos y DCs. Esta citocina, ayuda en el mantenimiento del granuloma. En el caso de la tuberculosis pleural existe un incremento de esta citocina, que estimula la diferenciación celular, la diferenciación, y la apoptosis. También induce prostaglandinas, las cuales a su vez inducen fiebre, cuando se encuentran en altas concentraciones (23).

5.2.3 IL-6

La IL-6, es secretada por macrófagos, se produce de manera temprana en la infección por *M. tuberculosis*, interviene en la producción de las inmunoglobulinas (Ig's) y activa a linfocitos T. Esta citocina, puede actuar también con capacidad anti-inflamatoria inhibiendo a TNF e IL-1 β y es justamente secretada en respuesta a estas dos citocinas (23).

5.2.4 IL-8

La IL-8, es una quimiocina y su receptor es el CXCR1. Por ello, es crucial en el reclutamiento y activación de neutrófilos y monocitos. Ésta, regula la expresión de moléculas de adhesión como ICAM (Intracellular Adhesion Molecule, por sus siglas en inglés) y CD11b (α M β 2-integrina); con ello facilita la adherencia de estas células al endotelio y así su migración. IL-8 es producida

principalmente por macrófagos y células endoteliales; y posee capacidad inmunomoduladora (23).

5.2.5 IL-9

Esta citocina facilita el crecimiento de clones de linfocitos T cooperadores pero no citotóxicos. Junto con IL-2, IL-3, IL-4 y eritropoyetina, la IL-9 induce la hematopoyesis *in vivo*. Facilita el crecimiento de células cebadas derivadas de médula ósea estimuladas por IL-3 y en respuesta a IL-2. Los linfocitos Th9 se caracterizan por la secreción de IL-9, éstos son funcional y fenotípicamente distintos del resto de linajes de linfocitos T descritos a la fecha incluyendo Th1, Th2, Th17 y Treg (73).

5.2.6 IP-10

La quimiocina IP-10/CXCL10 (IFN inducible protein, por sus siglas en inglés) tiene como receptor a CXCR3, que se expresa principalmente en linfocitos con perfil Th1. Es secretada por células estimuladas por: LPS e IFN de tipo I y II. Es un quimioatrayente de linfocitos T activados a sitios de infección (74).

5.2.7 IL-12 (p70)

Esta citocina actúa en los linfocitos T como un factor de maduración de linfocitos citotóxicos. También sirve como factor de crecimiento en linfocitos NK, T CD4⁺ y CD8⁺. Puede actuar en sinergia con IL-2 para incrementar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (75). La IL-12, es producida por células fagocíticas. La fagocitosis de *M. tuberculosis* parece ser necesaria para la producción de esta citocina. Es importante mencionar que la IL-12 tiene un rol crucial en la producción de IFN γ ya que induce la actividad de linfocitos NK y la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ al perfil Th1, caracterizado por la producción de IFN γ (37). A su vez el receptor de IL-12 (IL-12R) se encuentra incrementado en los sitios de la infección.

5.2.8 IL-2

El gen de la IL-2 en humano se encuentra en el cromosoma 4. Es una glicoproteína de 15.5 kDa sintetizada principalmente por linfocitos T CD4⁺; aunque también es producida en menor medida por linfocitos T CD8⁺. Su receptor es IL-2R quien se encuentra presente en linfocitos T, B y macrófagos activados. Previamente se le denominaba factor de crecimiento de linfocitos T. Esta citocina tiene un efecto autócrino actuando en los mismos linfocitos T CD4⁺ que la producen, o un efecto parácrino como factor de crecimiento en células cercanas. Sin embargo, las cantidades fisiológicas de IL-2 no tienen un efecto endócrino. La cantidad de IL-2 producida por los linfocitos T CD4⁺ es un factor determinante en la fuerza de la respuesta inmunológica. De hecho una cantidad inadecuada de producción de IL-2 puede llevar a anergia antígeno-específica del linfocito T (75).

La IL-2 también contribuye a la formación de otras citocinas incluidas el IFN γ y las linfoquinas. A su vez promueve el crecimiento de linfocitos NK y potencia su acción citolítica, los linfocitos NK requieren concentraciones altas de IL-2 para su activación. Además la IL-2 promueve una mejor respuesta de las células inmaduras en médula ósea a otras citocinas. En el timo promueve el crecimiento de linfocitos T inmaduros (75).

5.2.9 IL-7

La IL-7, es principalmente sintetizada por células estromales de la médula ósea, actúa como factor de crecimiento de linfocitos T y promueve la linfoyocitosis. De esta manera es la citocina maestra que facilita la diferenciación de células madre linfoides a progenitores pre-B o pre-T. Esta citocina también es formada por el estroma tímico donde promueve el crecimiento y activación de linfocitos T y macrófagos; así como la proliferación de timocitos (75).

5.2.10 MIP-1 α

Esta quimiocina MIP (macrophage inflammatory protein, por sus siglas en inglés) es secretada por macrófagos estimulados con endotoxina. Las fuentes que provienen de tejido incluyen: fibroblastos, monocitos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, células de músculo liso, células cebadas, plaquetas y células estromales de médula ósea. Difiere de pirógenos endógenos como TNF e IL-1 porque su acción no está asociada con la síntesis de prostaglandinas. Tiene un amplio espectro de actividades biológicas como: reparación tisular, quimiotaxis de monocitos y supresión de células progenitoras y células madre inmaduras en médula ósea. Algunas de sus células blanco son: linfocitos T, basófilos, precursores hematopoyéticos, monocitos, neutrófilos, linfocitos NK, eosinófilos, células cebadas y DCs (75).

5.2.11 MIP-1 β

MIP-1 β /CCL4 comparte el 70% de homología con MIP1- α . A pesar de compartir características estructurales, su función difiere bastante. Tiene como receptor a CCR5 y CCR4. Es producida por monocitos, macrófagos, linfocitos T y B. Estimula el crecimiento de células mielopoyéticas y promueve la quimiotaxis de leucocitos. Esta quimiocina participa principalmente en la migración de: macrófagos, monocitos, NKs y linfocitos T de memoria. A diferencia de MIP1- α , MIP-1 β no activa neutrófilos. También en lugar de inhibir el crecimiento hematopoyético temprano, como lo hace MIP1- α , MIP-1 β lo potencia. Sus principales células blanco son: monocitos, linfocitos T, precursores hematopoyéticos y basófilos (75).

5.2.12 IL-17A

Es una glicoproteína de 155 aminoácidos secretada como homodímero por linfocitos T CD4⁺ de memoria. También es conocida como CTLA8 (Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 8, por sus siglas en inglés). Esta citocina

estimula células epiteliales, endoteliales y fibroblásticas para la secreción de: IL-6, IL-8, G-CSF (Granulocyte - Colony Stimulating Factor, por sus siglas en inglés) y prostaglandina E2 mediante la activación de la vía de NF- κ B. Es un iniciador temprano de las reacciones inflamatorias dependientes de linfocitos T. También es parte de la red de citocinas que une el sistema inmunológico con la hematopoyesis. La IL-17 induce a un mejor apoyo de los fibroblastos en la diferenciación y crecimiento de células progenitoras CD34⁺. En humanos la expresión de CTLA-8 es exclusiva de los linfocitos T CD4⁺ de memoria (75).

5.3 Quimiocinas dependientes e independientes de TNF durante infecciones por *M. tuberculosis*

5.3.1 Eotaxina - CCL11

La eotaxina - CCL11 es inducida localmente ante la secreción de IL-4, su principal función es el reclutamiento de eosinófilos, por lo que puede inducir el acumulamiento de estas células. Esta quimiocina tiene 53% de homología con MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, por sus siglas en inglés) de humano (75).

5.3.2 MCP-1 (MCAF) - CCL2

MCP-1/MCAF/CCL2 (monocyte chemotactic and activating factor, por sus siglas en inglés) tiene como receptores a CCR4 y CCR2. Estos receptores se expresan principalmente en monocitos pro-inflamatorios. MCP-1 es producido en su mayoría por células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales, células de músculo liso (76), monocitos y macrófagos. Los antígenos de *M. tuberculosis* modulan la producción de esta quimiocina (23).

5.3.3 RANTES - CCL5

RANTES/CCL5 (Regulated on Activation, Normal T cell expressed and Secreted, por sus siglas en inglés), su papel principal es el reclutamiento de

leucocitos (linfocitos T, basófilos y eosinófilos) hacia sitios donde hay inflamación. Induce la proliferación de NKs. Tiene afinidad por múltiples receptores de quimiocinas (23).

5.4 Citocinas anti-inflamatorias y su rol en la infección por tuberculosis

Los macrófagos, activados alternativamente por IL-4, IL-10, IL-13, desprovveen a los macrófagos de su capacidad de controlar la infección por *M. tuberculosis* impidiendo el desarrollo de capacidad bactericida y antagonizando la respuesta pro-inflamatoria (23).

5.4.1 TGF β

El TGF β es la citocina anti-inflamatoria por excelencia, ya que puede inhibir el crecimiento de linfocitos T y B. Es producida por linfocitos T activados, y fagocitos mononucleares. Su principal efecto es inhibir la proliferación y diferenciación de linfocitos T, inhibir la activación de macrófagos y contrarrestar el efecto de a las citocinas pro-inflamatorias. Se ha demostrado que esta citocina incrementa la tasa de reparación de tejido e induce la fibrosis del mismo. Disminuye la producción de IL-2 inhibiendo así la proliferación y maduración de linfocitos T. También inhibe la diferenciación de los precursores a los linfocitos T citotóxicos. El TGF β puede revertir la activación de macrófagos al prevenir el desarrollo de actividad citotóxica y la formación de anión superóxido, ambos necesarios para efectos antimicrobianos. Además de suprimir la activación de macrófagos, TGF β puede disminuir la expresión de MHC-II (75). Esta citocina tiene un papel fundamental en la inducción de fibrosis y en la generación de linfocitos Tregs, cuyo papel se ha demostrado en tuberculosis (77).

5.4.2 IL-10

La IL-10, en la infección por *M. tuberculosis*, es producida por los macrófagos después de la fagocitosis del bacilo y también por los linfocitos T reactivos a *M.*

tuberculosis. A esta citocina se le considera un factor inhibitorio de la síntesis de citocinas, regula de manera negativa la producción de IFN γ y TNF, y suprime la síntesis de citocinas de perfil Th1. Por lo que es un antagonista de la respuesta pro-inflamatoria. También bloquea la presentación de antígeno. Estimula la producción de IL-2 e IL-4. Su función principal es inhibir macrófagos activados y mantener un control homeostático del sistema inmune innato y de reacciones inmunes mediadas por células (23).

5.4.3 IL-1ra

IL-1ra es el receptor antagonista de IL-1, es decir el inhibidor de IL-1. Es sintetizado principalmente por monocitos y macrófagos. Bloquea la acción de IL-1 al unirse a su receptor. Es sintetizado como un precursor y escindido por ICE (IL-1 β converting enzyme, por sus siglas en inglés) (78).

5.4.4 IL-4

Esta citocina suprime la producción de IL-1, IL-6, TNF e IFN γ . Además, es una citocina activadora de macrófagos M2 e inhibe la apoptosis. Induce la diferenciación de linfocitos T a un perfil Th2. Es un factor de crecimiento y diferenciación para los linfocitos B e induce el cambio de clase en linfocitos B para sintetizar IgE (Immunoglobulin E, por sus siglas en inglés)(23).

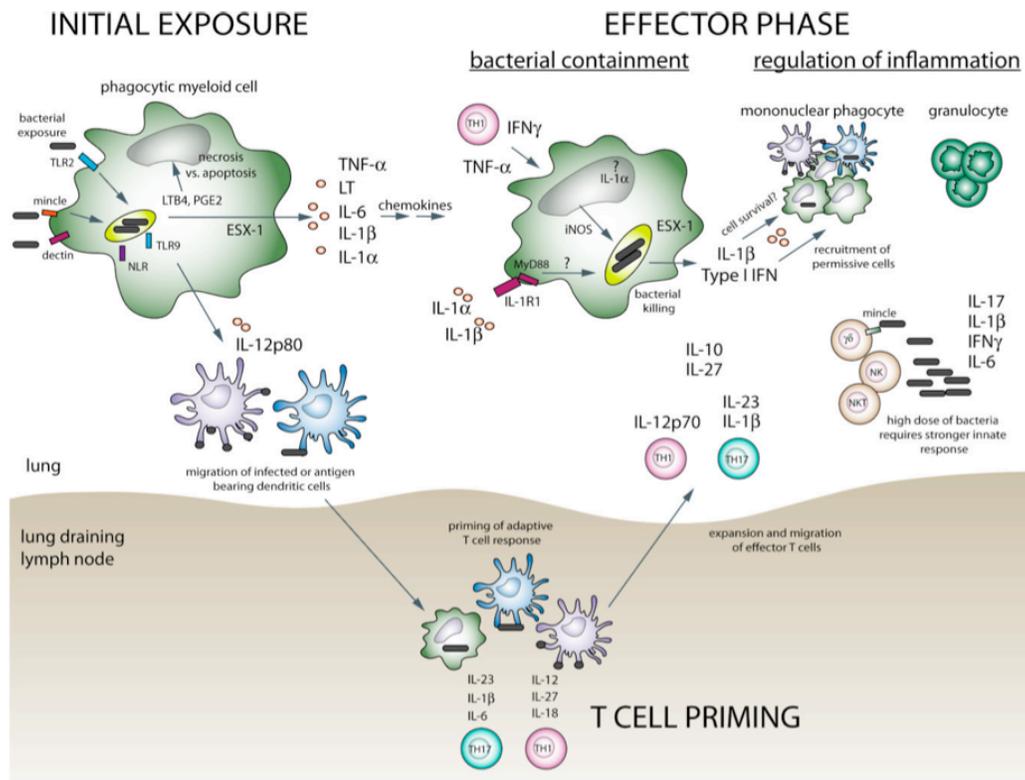


Figura 6. Papel de las citocinas durante la iniciación y etapas crónicas de la infección por *M. tuberculosis*. La exposición de las células fagocíticas de pulmón, principalmente macrófagos alveolares, ante los bacilos de tuberculosis inicia la producción de citocinas mediante la activación de PRRs a través de PAMPs, presentes en el bacilo de *M. tuberculosis*. Dentro de las primeras citocinas en ser producidas por los fagocitos infectados están el TNF, las LTs e IL-1 β y promueven la expresión de quimiocinas que reclutan células inflamatorias al pulmón. *M. tuberculosis* puede modular el nivel de TNF y la inflamación inducida al alterar la estructura de glicolípidos micolados en su superficie. Las bacterias virulentas modulan la respuesta de los fagocitos mediante la inducción de LTB4 y promueven la muerte vía necrosis de la célula infectada. La IL-12 promueve la migración de DCs que han endocitado bacterias, y por tanto contienen sus antígenos, desde el pulmón hacia los ganglios linfáticos para iniciar la respuesta adaptativa. La expresión de citocinas en el ganglio linfático define la función efectora de los linfocitos T, durante la etapa temprana de la infección se promoverá un perfil Th1. Dentro del sitio inflamatorio, los fagocitos infectados controlan el crecimiento de la bacteria mediante IFN γ , TNF y IL-1R1. La actividad de la bacteria por el sistema ESX-1 (ESAT-6 system exporters, por sus siglas en inglés (ESAT-6, Mycobacterial 6-kDa early secreted antigenic target, por sus siglas en inglés)) puede promover una respuesta protectora mediante IL-1 β ; y a su vez incrementa la respuesta mediada por IFN de tipo I, que puede llegar a causar detrimento en el hospedero. La inflamación mononuclear es promovida por IFN γ e IL-12p70 mientras que el daño por granulocitos e inflamación está mediado por IL-23 e IL-17 durante la etapa crónica de la enfermedad. La IL-10 e IL-27 regulan la respuesta protectora pero también

limitan la respuesta inflamatoria. Una dosis alta de bacterias en la infección en la ausencia de la respuesta adaptativa requiere una respuesta innata más potente para controlar la infección (38).

5.5 Factores de crecimiento

Los factores estimulantes de colonia son glicoproteínas que guían a las células madre en la: formación, crecimiento, diferenciación y función para producir sus colonias de células progenitoras del sistema inmunológico. Facilitan el desarrollo de células funcionales en su etapa terminal y promueven el crecimiento clonal de las células. Son producidos por linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales (75).

5.5.1 GM-CSF

El GM-CSF (Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor, por sus siglas del inglés), es una glicoproteína monomérica. Es un factor de crecimiento para células hematopoyéticas; participa en el crecimiento y diferenciación de los linajes mieloides y monocíticos que incluyen: DCs, monocitos, macrófagos y células del linaje granulocítico. Es secretada por: macrófagos, linfocitos T, NKs, células cebadas, células endoteliales y fibroblastos. Este factor de crecimiento es un promotor de la respuesta funcional de células maduras efectoras. Por lo que promueve la respuesta inmunológica de granulocitos y macrófagos. Es importante en la diferenciación de macrófagos a un perfil M1. Este también inhibe la migración de neutrófilos (75).

5.5.2 G-CSF

El G-CSF, es un factor de crecimiento que afecta únicamente a neutrófilos. Su gen se encuentra en el cromosoma 17 de humanos. Es sintetizado por linfocitos T activados, macrófagos y células endoteliales en sitios de infección. El G-CSF actúa en sinergia con IL-3 estimulando a células de la médula ósea. Induce a la médula ósea a incrementar la producción y movilización de neutrófilos a reemplazar a aquellos utilizados en procesos inflamatorios (75).

5.5.3 Factores de crecimiento involucrados en la reparación de tejido

De manera general, los factores de crecimiento implicados en la reparación de tejido permiten a las células endoteliales proliferar y por ende permitir la angiogénesis. Este proceso es esencial para la síntesis, el depósito y la organización de una nueva matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). El éxito en el remodelamiento y reparación tisular depende de los factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas involucradas en la integración de señales que coordinan los procesos celulares para este fin (79).

5.5.3.1 PDGF-BB

El PDGF (Platelet-derived growth factor, por sus siglas en inglés) alberga a una familia de factores de crecimiento homo y heterodiméricos incluyendo a PDGF-BB (Platelet-derived growth factor dimeric glycoprotein with two B subunits, por sus siglas en inglés). Es producido por: plaquetas, fibroblastos, células del endotelio vascular, macrófagos y queratinocitos (79). En un proceso de daño agudo sus niveles se encuentran incrementados y cuando el daño se vuelve crónico sus niveles disminuyen (80). Sus principales funciones son: inducir inflamación, la re-epitelización, la formación y remodelación de la ECM.

Ante daño tisular PDGF es liberado de plaquetas en proceso de degranulación. Lo que estimula la quimiotaxis de neutrófilos, macrófagos y células de músculo liso al sitio de daño (81). PDGF a su vez estimula a los macrófagos a producir y secretar factores de crecimiento como TGF- β . El PDGF permite la infiltración y proliferación de fibroblastos y permite los cambios fenotípicos en estas células convirtiéndolas en miofibroblastos que al alinearse entre ellos en el borde de la ECM, facilitan la reparación de tejido a través de la contracción de matriz de colágeno (82). El PDGF es importante durante la remodelación del tejido al permitir el rompimiento del colágeno viejo, al regular positivamente metaloproteinasas de ECM y finalmente la cicatrización (83). Los efectos del PDGF en la inducción de angiogénesis son órgano dependientes, aunque este efecto es menor que el de FGF (fibroblast growth factor, por sus siglas en

inglés) o VEGF (vascular endothelial growth factor, por sus siglas en inglés) (84).

5.5.3.2 VEGF

VEGF es expresado por: plaquetas, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células de músculo liso. Su principal función es la inducción de la diferenciación de células endoteliales en la formación de tejido y promoción de la angiogénesis (85). En un proceso de daño agudo sus niveles se encuentran incrementados y cuando el daño se vuelve crónico sus niveles disminuyen (80).

Es importante en los procesos de reparación tisular pues promueve los eventos tempranos en la angiogénesis, particularmente en la migración y proliferación de células endoteliales (85). El principal estímulo para la liberación de VEGF durante el proceso de reparación de tejido, es la hipoxia debido a desajustes metabólicos presentes en el ambiente de reparación. El resultado de la angiogénesis restablece la perfusión tisular, la microcirculación e incrementa las concentraciones de oxígeno al sitio de daño (86).

5.5.3.3 FGF

Esta familia está compuesta de 23 miembros. El más importante implicado en la reparación de tejido cutáneo es FGF-2, también denominado FGF básico. Este factor, permite la infiltración de fibroblastos y estimula la migración y proliferación de células epiteliales. Este proceso inicia con la disolución de contactos célula-célula y célula-sustrato seguido de una polarización y migración de células del tejido dañado a la ECM provisional (79).

Es expresado por: células cebadas, fibroblastos, condrocitos, queratinocitos, células endoteliales y de músculo liso. Sus principales funciones son: la re-epitelización, la formación y remodelación de la ECM; permitiendo la migración de fibroblastos y estimulándolos para producir colagenasa (87). En un proceso

de daño agudo sus niveles se encuentran incrementados y cuando el daño se vuelve crónico sus niveles disminuyen (80).

6. Moléculas de reconocimiento en macrófagos relevantes para este estudio

6.1 sCD14

CD14 fue caracterizado inicialmente como una proteína asociada a membrana y anclada mediante un glicosilfosfatidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés). También, es un marcador de superficie celular de diferenciación presente en células mieloides: monocitos, macrófagos, DC y neutrófilos (88).

CD14 existe en dos formas: anclada a la membrana (CD14) y soluble (sCD14, por sus siglas en inglés). Existen dos isoformas de sCD14: una con peso molecular de 48-50 kDa y una forma con peso molecular de 53-56 kDa (89). Las formas solubles pueden ser escindidas de la membrana o pueden ser liberadas de los compartimentos intracelulares (90).

El CD14 no contiene un dominio de señalización intracelular y requiere de interacción con un TLR para la activación celular (89). Actúa como un receptor de LPS bacteriano en cooperación con TLR4 y TLR2 (91). El CD14 media a través de estos receptores la fagocitosis y la eliminación de células apoptóticas (92).

Ante la activación celular, el CD14 es liberado por los monocitos y por lo tanto decrece mientras que el sCD14 se libera. Las citocinas inflamatorias pueden inducir su liberación; por lo que el sCD14 puede ser considerado como un marcador no específico de activación de monocitos, que no se encuentra restringido a LPS (93).

En células que expresan CD14, el sCD14 a altas concentraciones puede inhibir las funciones mediadas por unión a LPS (94). Mientras que en aquellas que carecen de CD14, incluyendo la mayoría de endoteliales o epiteliales, el sCD14 les permite responder a LPS (88).

Además de la función principal de CD14 en el reconocimiento del complejo LPS y en consecuencia la defensa del hospedero ante la infección de bacterias Gram-negativas (95), se ha reportado que *in vitro* se une con LAM (lipoarabino-mannan, por sus siglas en inglés) no recubierto de manosa (Ara-LAM, arabinosylated lipoarabinomannan, por sus siglas en inglés) presentes en la cubierta de *M. tuberculosis* de rápido crecimiento y no patógenas (96). También, se sugiere que CD14 puede jugar un papel en algunas respuestas inducidas por LAM-manosilado, (Man-LAM, mannosylated LAM, por sus siglas en inglés). Otras proteínas que reconoce CD14 son las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) en particular la: HSP-60 (97).

En su relación con la infección por *M. tuberculosis*, el sCD14 parece contribuir al desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica en el pulmón y aparentemente influencia de manera negativa el resultado de la infección (89).

El sCD14 se comporta como una proteína de fase aguda y niveles elevados de esta, se encuentran presentes en el lavado bronqueo-alveolar (BAL, por sus siglas en inglés) y en el suero de pacientes con tuberculosis activa (98).

6.2 SOCS3

Los supresores de la señalización por citocinas SOCS comprenden una familia de proteínas intracelulares. La mayoría de las proteínas SOCS son inducidas por citocinas y por lo tanto actúan en una retroalimentación negativa clásica para inhibir la señal de transducción de las mismas. Por ello están involucrados en una gran gama de procesos biológicos (99).

Existen siete miembros de la familia SOCS (SOCS1-SOCS7), cada uno cuenta con un dominio central Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase, por sus siglas en inglés) de homología 2 (SH2, por sus siglas en inglés). El cual es un dominio de proteína comúnmente encontrado en moléculas de transducción que interacciona de manera específica con péptidos ricos en fosfotirosina. Su dominio amino-terminal es de longitud variable y de secuencia divergente;

mientras que su carboxilo-terminal está compuesto de un módulo de 40 aminoácidos conocido como la caja SOCS. Ésta interacciona con elongina B y elongina C, cullina-5 y caja con dominio RING 2 (Really Interesting New Gene finger domain, por sus siglas en inglés) (RBX2, RING box 2, por sus siglas en inglés), los cuales reclutan a la ubiquitina E2 transferasa (100). La familia SOCS funciona como una ubiquitina E3 ligasa y media la degradación de proteínas que están asociadas con los miembros de esta familia a través de su región amino-terminal (99).

La vía de señalización más estudiada que es regulada negativamente por SOCS es la vía de activación JAK/STAT (Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription, por sus siglas en inglés). SOCS se asocia con residuos clave de tirosina fosforilados en proteínas JAK y/o con receptores de citocinas (para SOCS3: IL-6R o IL-10R), también por degradación de moléculas señalizadoras mediante la vía de ubiquitinación del proteasoma (101).

Además de suprimir la señalización mediante la degradación dependiente de ubiquitinación del complejo de señalización; tanto SOCS1 como SOCS3 pueden inhibir directamente la actividad JAK a través de KIR (Kinase Inhibitory Region, por sus siglas en inglés), la cual funciona como pseudo-sustrato y es importante para la supresión de señales por citocinas. El KIR de SOCS3 tiene una mayor afinidad por el dominio cinasa de JAK2 que SOCS1(102).

El dominio SH2 de SOCS3 contiene una inserción de un residuo-35 desestructurado PEST (prolina-, ácido glutámico-, serina-, y treonina), el cual no es requerido para la inhibición de STAT3, pero incrementa el recambio de SOCS3 y también interviene en su estabilidad como proteína, ya que el residuo de ubiquitinación de lisina 6 (Lys6) se encuentra presente en esta región (103).

Las proteínas SOCS presentan baja expresión en los macrófagos en reposo pero son inducidas rápidamente ante la activación (104). Estas juegan un papel importante en la polarización de los macrófagos hacia un perfil M1 o M2. Se ha propuesto que una alta expresión de SOCS3 se asocia con un perfil M1 (105, 106).

El mecanismo de regulación celular, mediante señalización, de las proteínas SOCS ocurre a través de los factores de transcripción STAT. Quienes son de gran importancia en la polarización de los macrófagos. STAT1 es un mediador esencial de la polarización hacia M1 en la presencia de $\text{IFN}\gamma$. Mientras que STAT6 se requiere para la activación a M2 ante la presencia de IL-4 y/o IL-13. La exclusividad mutua de estas vías de señalización es crucial para la polarización mutua entre M1 y M2 (Figura 7) (107).

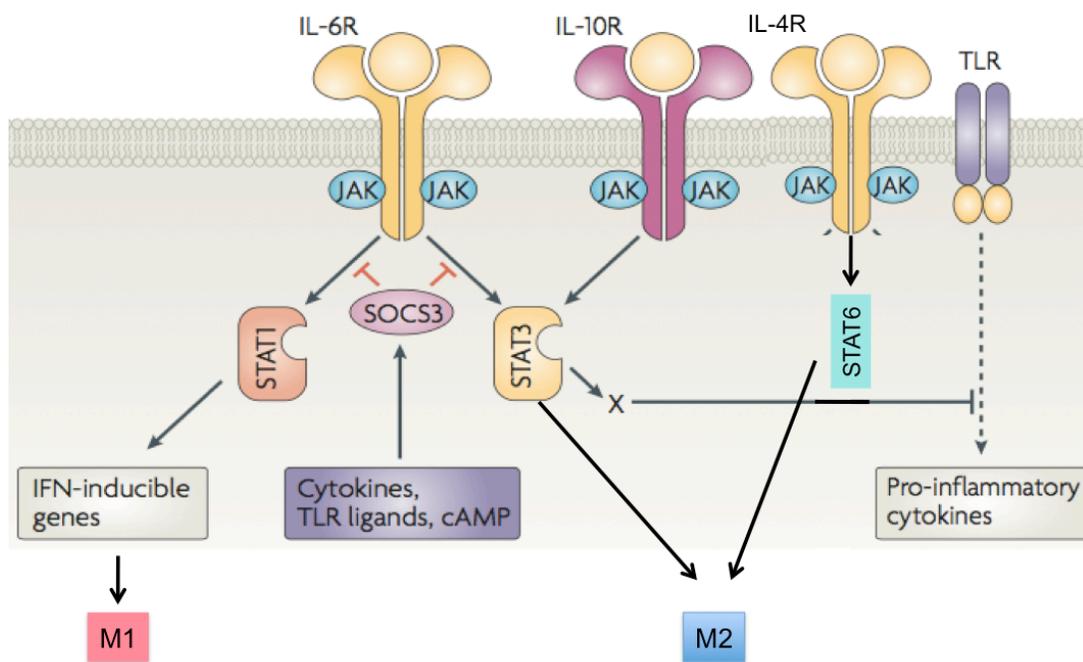


Figura 7. Rol de SOCS3 en la activación de macrófagos M1 a través de STAT. SOCS3 es inducido por la activación de macrófagos ante LPS, $\text{IFN}\gamma$, cAMP (3',5'-cyclic Adenosine Monophosphate, por sus siglas en inglés) o TLRs. SOCS3 suprime fuertemente STAT3 activado a través de su unión a la subunidad gp130 del receptor de IL-6 (IL-6R) pero no así por IL-10R, ya que no se une a este. IL-6 también activa STAT1, quien contribuye a la respuesta inflamatoria a través de genes inducibles por IFN generando un perfil de macrófagos M1. Por su parte una actividad sostenida por STAT3 suprime la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por ligandos de TLRs generando un perfil de macrófago M2. La activación de STAT6 por la vía de JAK/STAT a través de IL-4R induce también un fenotipo M2. Modificado de (99).

6.3 CD1 moléculas de reconocimiento de antígenos lipídicos CD1

Las moléculas de CD1 se unen y presentan moléculas anfipáticas para su reconocimiento por receptores TCR. Estas presentan tanto lípidos propios como extraños. Presentan homología en estructura y secuencia con el MHC-I. El ácido micólico fue el primer antígeno lipídico identificado que se presentaba a través de moléculas CD1 (108).

Con base en el análisis de secuencia se han identificado varias isoformas, que en humano se han dividido en tres grupos. El grupo uno presenta antígenos lipídicos a diversas clonas de linfocitos T e incluye a: CD1a, b, c. El grupo 2 presenta antígenos lipídicos específicamente a células NKT e incluye a CD1d, la única isoforma presente en ratón (108). Por último el grupo 3 incluye a: CD1e; esta isoforma es la única que no se expresa en la membrana celular de las DCs (109).

La estructura de las proteínas CD1 posee dos cadenas pesadas en donde el dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$ representan el sitio de unión al antígeno. Ambos dominios están unidos a un dominio tipo inmunoglobulina $\alpha 3$, el cual está unido a la membrana por un segmento transmembranal con una cola citoplasmática corta (108).

El dominio $\alpha 2$ está contenido dentro de dos alfa-hélices antiparalelas que dan soporte a las láminas-beta plegadas. Las moléculas CD1 se unen a cadenas de alquilos en canales hidrofóbicos que residen por debajo de la superficie de las moléculas CD1, mientras que la cabeza hidrofílica de los antígenos lipídicos sobresale de los canales hidrofóbicos que se abren al lado distal de la superficie de la molécula CD1 (108).

El sitio hidrofóbico de CD1 tiene dos compartimentos para la unión a antígeno el A' y F'. En cuanto al tamaño; A' es el grande, mide 15 Å de ancho y 20 Å de largo. Mientras que el pequeño F' mide 7 Å de ancho y 18 Å de largo (110). El A' puede unir moléculas de 18-23 átomos de carbono (108). En el caso particular de CD1a, cuya estructura cristalizada fue la primera (110), su

compartimento F' puede unirse tanto a grupos alquilo como péptidos, lo que permite a la molécula unirse y presentar antígenos a linfocitos T (108).

En cuanto a tamaño, CD1a tiene el surco de unión al antígeno más pequeño 1300 Å, seguido por CD1d 1650 Å, después CD1c 1800 Å, posteriormente CD1e 2000 Å, finalmente el que tiene el surco de mayor tamaño y el más complejo es CD1b de 2200 Å, además cuenta con dos compartimentos adicionales (C' y T') al resto de las moléculas CD1. Por lo tanto, CD1b puede unirse a cadenas de alquilo de inclusive tres cadenas llegando a contener moléculas de hasta 60 carbonos. El tamaño y complejidad del surco hidrofóbico de CD1a, b, c, d varía y explica en parte la diversidad de unión a antígenos (110).

Dependiendo de las propiedades químicas de las moléculas anfipáticas como la longitud y saturación de los grupos alquilo se modifican la concentración de micelas, el transporte, su transferencia a moléculas de CD1 y por tanto su presentación. Los ligandos de CD1, antígenos lipídicos como moléculas clásicas de la pared de *M. tuberculosis*, pueden ser presentadas por: CD1a, CD1b, CD1c y CD1d; y así activar de manera clonal a linfocitos T (108).

Entre algunos antígenos lipídicos de *M. tuberculosis* (Tabla 1), LAM es un derivado de lipoglicano, compuesto por un anclaje de fosfatidil-inositol, un esqueleto macromolecular de LPS y motivos que lo recubren, principalmente carbohidratos que se unen a las ramas del dominio arabinan en LAM. Esta molécula es un antígeno importante en el reconocimiento de las micobacterias y dependiendo de su estructura se relaciona con la patogenicidad de las mismas. Man-LAM se encuentra recubierta de manosas y estos grupos caracterizan a las bacterias patógenas. En cambio, Ara-LAM (arabinoglicano-LAM) se encuentra en bacterias no patógenas, por ejemplo las micobacterias de rápido crecimiento (*M. canetti*) en donde también pueden estar con grupos de manósidos de fosfatidil-inositol (108).

Origen	Antígeno	Isoforma de CD1	Referencia
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> y otras micobacterias	ácidos micólicos	CD1b	(111)
	monomicolato de glucosa	CD1b	(112)
	sulfolípidos (sulfoglicolípidos diacilados)	CD1b	(113)
	manósidos de fosfatidil-inositol	CD1b, CD1d	(114, 115)
	Man-LAM	CD1b	(115)
	manosil- b1- fosfomicokétidos	CD1c	(116)
	didehidroximicobactin	CD1a	(117)

7. El Complejo de *Mycobacterium tuberculosis*

Las micobacterias causantes de tuberculosis están agrupadas en el Complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC por sus siglas en inglés). Se les considera como patógeno profesional es decir; no cuentan con un reservorio ambiental y deben causar enfermedad para transmitirse de un hospedero a otro (118). Este complejo de micobacterias es altamente especializado para infectar humanos y ha evolucionado de una mezcla de micobacterias ambientales ancestrales.

El contacto intercepa permitió la transferencia de DNA y finalmente una estabilización eficiente de este material. Por lo que es posible, que los cambios evolutivos tempranos que permitieron la transición de las micobacterias ambientales a un patógeno profesional, ocurrieron a través de la adquisición de nuevos genes mediante la transferencia horizontal. Mientras que la transferencia intercepa parece haberse perdido en la generación del MTBC, éste probablemente emergió como un solo grupo clonal de una mezcla de cepas de micobacterias que se asemejan a la cepa remanente *M. canettii* (con morfología lisa) (119).

Las cepas de *M. canettii* producen lipooligosacáridos (LOSs, por sus siglas en inglés) de manera similar a las micobacterias ambientales [*M. marinum* (120) o *M. kansasii* (121)] . En contraste, las micobacterias del MTBC han perdido la habilidad de sintetizar LOSs a pesar de contar con el locus correspondiente.

Por lo que la pérdida de la producción de LOSs pudo contribuir al surgimiento de un linaje más virulento y potente quien sufrió expansión clonal y poca diferenciación. Estos sucesos evolutivos seguidos de una acumulación de eventos, específicos para ciertos linajes, de inserción y delección intragenómicos y polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, por sus siglas en inglés), son las modificaciones que aparentemente han conferido el cambio en el potencial de virulencia de los linajes presentes en el MTBC (119). Los SNPs son marcadores robustos de la variación genética para análisis filogenéticos (122). Las cepas del MTBC difieren a lo más en alrededor de 2,000 SNPs entre cada una (123).

Este grupo que sufrió expansión clonal se encuentra ahora representado por 7 linajes relacionados cercanamente a *M. tuberculosis*. Estos linajes globales se han definido por su distribución en: L1: Indo-Oceánico, L2: Asiático del Este, incluyendo Beijing, L3: Africano-Indico del Este, L4: Euro-Americano, L5: Africano del Oeste o *M. africanum*, L6: Africano del Oeste o *M. africanum II* y L7: Etiope (122). (Figura 8)

Los linajes más ancestrales del MTBC están representados por L1 y *M. africanum* (L5 y L6). Mientras que los linajes de *M. tuberculosis* L1 y L7 divergieron antes de la delección de la región genómica TbD1, la cual representa un evento característico molecular y cuello de botella evolutivo (124). En donde sólo un conjunto de diversidad bacteriana presente en un hospedero es transmitida al siguiente. Por lo que se considera como un linaje filogenético intermedio. Esta diferencia define el origen de los linajes "modernos": L2, L3 y L4. A estos últimos se les considera las cepas más recientemente evolucionadas de *M. tuberculosis* (118).

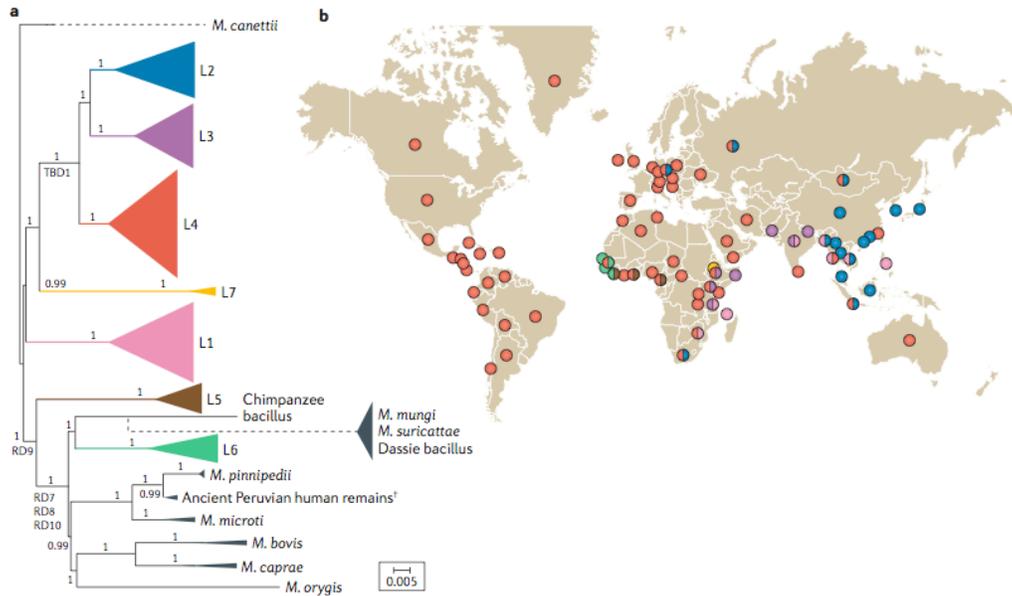


Figura 8. Filogeografía Global del MTBC. a. Muestra el árbol filogenético de los linajes del MTBC cada linaje se observa en un color distinto. Los linajes en gris representan linajes adaptados a varios animales domésticos y silvestres. b. Distribución global de los siete linajes adaptados a humano del MTBC. Nótese que los linajes L2 y L4 son los que tienen una distribución más amplia (118).

La variabilidad genética específica dentro del MTBC es un factor importante en la patogénesis, que puede afectar la virulencia, la transmisión, la respuesta del hospedero y el surgimiento de cepas farmacorresistentes (122). La virulencia de la micobacteria no está atribuida a una sola característica genética; sino a las interacciones epistáticas entre varios loci del genoma y su regulación transcripcional; que controlan el crecimiento, la persistencia y el ciclo de vida patogénico de la micobacteria (118).

7.1 *Mycobacterium bovis* y BCG

El sistema ESX-1 es uno de los elementos de virulencia clave en los bacilos de *M. tuberculosis*. Representa un elemento necesario para la ruptura del fagosoma y permitir así el contacto de la micobacteria con el citosol del hospedero durante la infección. RD1 (Region of Difference 1, por sus siglas en inglés) codifica para el sistema de secreción ESX-1 y es requerido para la virulencia completa de *M. tuberculosis* (119).

En el caso de *M. bovis* se ha perdido parte de los genes que codifican para ESX-1 y por lo tanto su acceso al citosol, por lo que no induce respuestas de reconocimiento de patrones citosólicos ((125) y (126)). La delección de RD1, se describió por primera vez en *M. bovis*, lo que contribuyó a uno de sus mecanismos de atenuación a través de la propagación *in vitro* de la misma por Albert Calmette y Camille Guérin a principios del siglo XX, actualmente es utilizada como vacuna y se le nombra BCG (127). Probablemente, las funciones de ESX-1 no eran requeridas por la micobacteria bajo las condiciones de cultivo *in vitro* y es por eso que se perdieron.

Una particularidad en la evolución del sistema ESX-1 en *M. africanum* (L6); es el decremento importante en la presencia de sustratos del sistema de secreción ESX-1 tipo 6 como EsxA (también conocido como ESAT-6) y EsxB (o CFP-10). Parece que la recuperación de EsxA/B podría haber creado las condiciones para una infección exitosa en nuevos hospederos de mamíferos y a su vez retener la capacidad de infectar humanos (119).

Datos recientes muestran que el sistema ESX-1 actúa en conjunto con dimycocerosatos de pterocerosol (DIM y PDIM, por sus siglas en inglés) estos lípidos, localizados en la membrana externa de la micobacteria, son necesarios para la inducción de la ruptura del fagosoma de los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (128).

Con respecto a la síntesis de lípidos, en la región genética que codifica para los dos componentes, PhoP/PhoR (factores de transcripción), se encuentran más de 100 genes involucrados en la virulencia de las micobacterias. Las mutaciones entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* son responsables de una producción mucho menor de los lípidos bioactivos de la familia de PAT y sulfolípidos (polyacyltrehaloses y SL, por sus siglas en inglés) y por lo tanto menor virulencia (129).

Por otra parte, la inducción de la ruptura del fagosoma también depende del control inicial de la acidificación del fagosoma. El cual es un mecanismo de control del hospedero para inhibir el crecimiento bacteriano. La micobacteria

tiene la capacidad de interrumpir este proceso mediante la asociación de la fosfatasa micobacteriana (PtpA, por sus siglas en inglés) con la V-ATPasa del fagosoma del hospedero (130). De manera alterna, se ha descrito recientemente, la interacción de la micobacteria con SOCS del hospedero, lo que lleva a la ubiquitinación y subsecuente degradación de V-ATPasa y como consecuencia el cierre de la bomba de protones (131) de esta manera la acidificación del fagosoma es inhibida por la micobacteria.

Por lo que la capacidad de ruptura del fagosoma depende de factores de virulencia tanto lipídicos, proteicos y mecanismos de inhibición para su acidificación. Los cuales, deben actuar en conjunto, sugiriendo que estas características, "aparentemente" independientes se establecieron durante la evolución de la micobacteria para convertirla en un patógeno obligado a diferencia de *M. bovis* (119).

7.2 Bases moleculares de la virulencia entre H37Ra y H37Rv

Históricamente H37Ra es la contraparte avirulenta de la cepa H37Rv. Ambas derivan de su cepa parental H37, la cual pertenece al L4: Euro-Americano. H37 fue aislada en 1905 por Edward R. Baldwin de un paciente con tuberculosis pulmonar crónica (132). Para obtener derivados estables y avirulentos, en 1935, William Steenken creció el aislado en medio sólido de huevo (133). Al final de la incubación, surgieron colonias con diferente morfología éstas no causaron enfermedad en cobayos y por lo tanto se les designó H37Ra "a" por avirulenta. Su contraparte virulenta con morfología rugosa se le denominó H37Rv "v" por virulenta (132).

H37Ra difiere de su hermana H37Rv en varias características: morfología de la colonia (133), menor sobrevivencia bajo condiciones anaeróbicas (134) o dentro de macrófagos (135), incapacidad de romper membranas del fagosoma (136), pérdida de virulencia en cobayos (133) y ratones (137).

El genoma de H37Ra es altamente similar al de H37Rv con respecto al orden y contenido genético. Sin embargo, como resultado de 53 inserciones y 21

deleciones, es 8,445 pares de bases (pdb) más largo que el genoma de H37Rv. En total existen 198 variaciones de nucleótido simples (SNV, por sus siglas en inglés) entre las dos cepas con 102 transiciones y 96 transversiones. Por lo que las mutaciones en factores de transcripción y genes relacionados a reguladores globales pueden conferir características únicas de crecimiento y atenuación en H37Ra (138).

Como mencionamos anteriormente, el gen *phoP* es un factor de virulencia bien conocido en *M. tuberculosis* (139), codifica para un regulador transcripcional en respuesta al sensor de cinasa, PhoR, localizado en la superficie celular. Este sistema, de dos componentes, controla la expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos de la pared celular como: SL, PAT y diaciltrealosa. En H37Ra PhoP tiene una sustitución de una base, la cual resulta en el cambio de un aminoácido de Ser a Leu (140). Esta mutación impide la unión de DNA a PhoP y la activación transcripcional por el mismo, lo que podría estar relacionado con la atenuación de virulencia de esta cepa (138).

Las mutaciones que afectan proteínas de la envoltura celular, lípidos poliketidos asociados a la pared celular están involucrados en la virulencia y la interacción con el hospedero y la respuesta inmune (141).

La síntesis de DIM y PDIM, lípidos localizados en la membrana externa de la micobacteria, son necesarios para la inducción de la ruptura del fagosoma de los macrófagos infectados (128). A nivel de DNA, el gen *pks12* se encuentra involucrado en la síntesis de DIM (142). Mutaciones con sentido en este gene es decir, una mutación puntual en un nucleótido que resulta en cambio del codón codificando para un aminoácido distinto, causa en gran medida la atenuación de H37Ra. A su vez en esta cepa, el gen *nrp* tiene una mutación sin sentido, es decir una mutación puntual que codifica para codón de paro lo cual causa una proteína trunca que afecta la síntesis de PDIM (138).

Desde los 50's se conoce que H37Ra tiene defectos en su metabolismo anaeróbico y por lo tanto sobrevive menos que H37Rv dentro de los macrófagos infectados y bajo condiciones anaeróbicas (134). LpdA es un factor

de virulencia involucrado en la remoción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) liberadas por las células del hospedero y por lo tanto contribuye a la virulencia *in vivo* (143). H37Ra tiene una inserción de 58 pdb en la región promotora del operón *lpdA-glpD2*. Normalmente a GlpD2, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, se le relaciona con la respiración aeróbica. Sin embargo, su localización junto a un operón de una enzima para la respiración anaeróbica, LpdA, sugiere que GlpD2 pueda ser funcionalmente más parecido al glicerol-3-fosfato deshidrogenasa anaeróbico (GlpA), involucrado en la respiración anaeróbica. Esta inserción en la región promotora de *lpdA-glpD2* de H37Ra puede causar una reducción en la sobrevivencia de la misma en los tejidos del hospedero en donde las condiciones oxígeno son reducidas (138).

Las mutaciones que afectan factores de transcripción y/o reguladores metabólicos globales relacionados en la sobrevivencia *in vitro* durante estrés por envejecimiento, y mutaciones que afectan la envoltura celular, metabolismo primario, crecimiento *in vivo* pueden explicar la base de la atenuación entre H37Ra y H37Rv (138).

Si bien los estudios genéticos ofrecen información valiosa con respecto a las bases de atenuación de H37Ra con respecto a H37Rv. El análisis proteómico y su cuantificación otorga una idea más realista acerca del contenido proteico y por ende el estado fisiológico de la micobacteria.

El análisis proteómico de *M. tuberculosis* H37Rv muestra 6 marcos de lectura abiertos que no habían sido identificado con los análisis genómicos (144). Con respecto a su similitud en proteómica, H37Rv y H37Ra presentan 3759 proteínas idénticas. Mientras que 172 proteínas presentan mutaciones: inserciones, deleciones y sustituciones. En cuanto a la distribución subcelular de proteínas no idénticas con variaciones en aminoácidos: 89 son proteínas integrales de membrana, 74 se encuentran en citoplasma, 6 son proteínas de secreción y 3 están ancladas a la membrana mediante un lípido (145).

La enzima pirofosfohidrolasa trifosfato es requerida para mantener la capacidad de la micobacteria para responder al estrés oxidativo a partir de la degradación de nucleótidos dañados por oxidación. Esta proteína presenta una sustitución en H37Ra comparada con H37Rv (145). Esta región es importante para la actividad catalítica y la mutación reduce la actividad de pirofosfohidrolasa 20 veces en H37Ra, lo que afecta la unión del magnesio y la estructura de la proteína (146). Esto finalmente incide en una menor capacidad de sobrevivencia de H37Ra en ambientes anaeróbicos.

Dentro de las proteínas de membrana, tres proteínas (Rv0933, Rv1273c y Rv1819c) que pertenecen los transportadores de proteínas transmembranales unido a ATP, presentan 5 veces más abundancia relativa en H37Rv (147). Estos transportadores son permeasas conformadas de múltiples subunidades que transportan varias moléculas: iones, aminoácidos, péptidos, antibióticos, polisacáridos, proteínas; a través de las membranas biológicas con cierta especificidad (148). Esta abundancia en H37Rv sugiere un rol importante en el transporte de nutrimentos y otras moléculas para el bacilo, lo que influye de manera positiva en su capacidad de sobrevivencia en el hospedero.

Los datos reportados a nivel genético han sido confirmados por análisis cuantitativos que estiman las diferencias en la abundancia de proteínas entre las dos cepas (147). Explicando así las diferencias en virulencia y por ende en la activación del sistema inmune entre las dos cepas.

II. Antecedentes directos

En los últimos años se han descrito poblaciones mieloides que expresan moléculas que se consideraban únicas de los linfocitos T (13-17). Durante la infección por *M. tuberculosis* tanto en modelos *in vivo* con ratones y en humanos infectados con *M. tuberculosis*; como en ensayos *in vitro*, infectando con BCG, se observó que la expresión de este receptor recombinado (TCR) en la población de macrófagos depende de la presencia del TNF y está implicado en la formación del granuloma (13). Los principales resultados muestran que

aproximadamente el 5% de monocitos de individuos voluntarios sanos, expresan TCR $\alpha\beta$. También se observó que el TCR $\alpha\beta$ de monocitos humanos es producto de la recombinación de segmentos génicos VDJ y VJ. Además se encontró que los macrófagos TCR $\alpha\beta$ humanos se acumulan en granulomas de tuberculosis (13).

En otro modelo de infección *in vivo* con BCG, se muestra el aumento en el número de macrófagos TCR $^+$ en el hígado de ratones de la cepa C57BL/6 después de dos semanas de ser infectados vía i.v. con diez millones de micobacterias (149). Adicionalmente, se identificaron macrófagos que expresan CD3 $^+$, los cuales pueden o no presentar el TCR $\alpha\beta$. El porcentaje de macrófagos CD11b $^+$ CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta^-$ fue de un 30%, mientras que los macrófagos CD11b $^+$ CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta^+$ fue menor al 4% (149).

Datos obtenidos por la Dra. Leslie Chávez Galán, mediante un modelo murino de tuberculosis pleural con BCG previamente validado (150), usando ratones deficientes de TNF (TNF-KO), se observa que en ausencia de TNF no se forman macrófagos CD3 $^+$. Estos resultados sugieren que los macrófagos CD3 $^+$ están involucrados en la respuesta innata a la infección por *M. tuberculosis* y que la vía de señalización del TNF es requerida para mantener a los macrófagos CD3 $^+$ (151).

Asimismo, con la finalidad de esclarecer cuál es la forma del TNF requerida para favorecer la presencia de los macrófagos CD3 $^+$, se utilizaron ratones silvestres C57BL/6 (WT), deficientes para el TNF (TNF-KO) y *knockin* que expresan sólo la forma transmembranal del TNF (tmTNF-KI). Estos últimos, tienen una delección en la región de aminoácidos 1-9 y una sustitución en la posición 11 (tmTNF $^{\Delta 1-9, K11E}$) (69). Los resultados de la Dra. Leslie Chávez muestran que la forma transmembranal del TNF (tmTNF) es necesaria para mantener la presencia de células mieloides CD3 $^+$ CD11b $^+$ TCR $^+$ y sólo una recuperación parcial de las células CD3 $^+$ CD11b $^+$ TCR $^-$ en el sitio de infección (Figura 9B y C). Los ratones TNF-KO son ineficientes para controlar la infección y mueren entre la semana 8 y la 9 post-infección (Figura 9A).

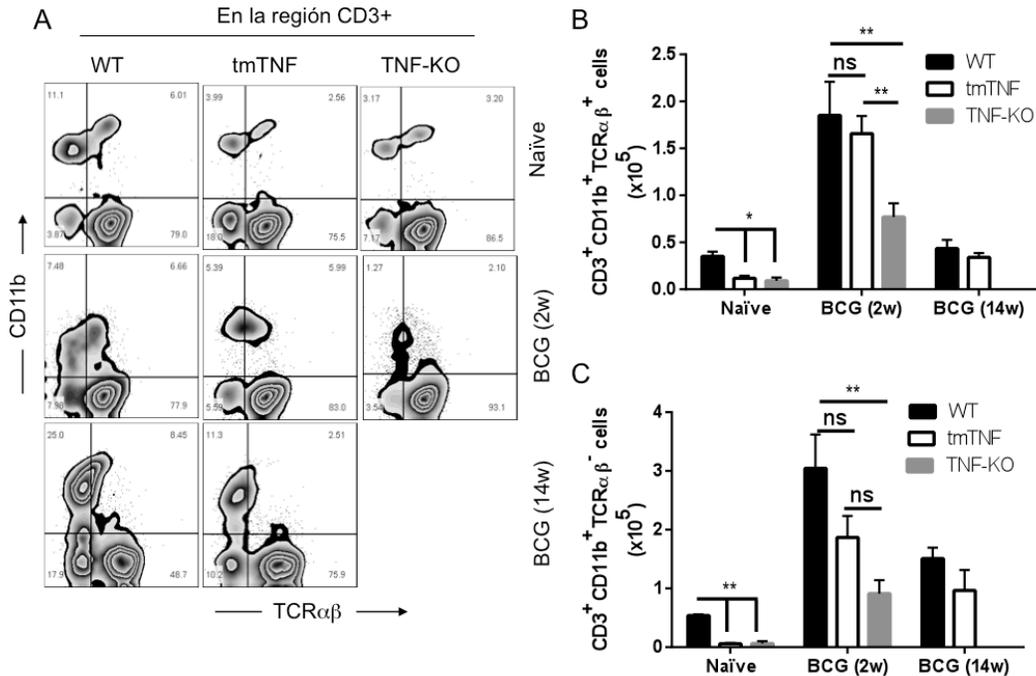


Figura 9. La forma tmTNF es suficiente para la presencia células $CD3^+CD11b^+TCR^+$ al sitio de la infección. Ratones silvestres (WT), deficientes para el TNF (TNF-KO) y *knockin* que sólo expresan la forma transmembranal del TNF (tmTNF). **A.** Zebra plots representativos de la estrategia de análisis, partiendo de la región de células $CD3^+$, se identifica la coexpresión de $CD11b^+$ y $TCR\alpha\beta^+$ en células pleurales de ratones no infectados (naïve), a las 2 y 14 semanas post-infección (2w y 14w, respectivamente). **B.** Número absoluto de células $CD3^+CD11b^+TCR^+$ y **C.** Número absoluto de células $CD3^+CD11b^+TCR^-$, este fue obtenido considerando el porcentaje y el número total de células pleurales recuperadas por animal. Las gráficas representan la media \pm desviación estándar de 3-9 animales por grupo. Se utilizó ANOVA seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni; ns = sin diferencia estadística, ** $p < 0.01$ (151).

Otro antecedente significativo obtenido por la Dra. Leslie Chávez Galán, es la evaluación de la expresión de moléculas HLA-A, B, C, HLA-DR, CD16, $TCR\gamma\delta$, tmTNF y moléculas de la familia CD1 en las subpoblaciones de macrófagos humanos $CD3^+$. Se encontró que únicamente la subpoblación $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ expresa en orden de importancia CD1c, CD1b, CD1a y en menor grado CD1d. Además, se encontró en la subpoblación de macrófagos $CD3^+$ que el $TCR\gamma\delta$ se expresa en muy baja frecuencia (menor al 2%) (151).

III. Justificación

Hasta el momento se desconocen las funciones de las subpoblaciones de macrófagos CD3⁺ y los mecanismos de activación celular que los diferenciarían a expresar un TCR comparado a aquellos que no lo expresan, a pesar de ser células CD3⁺. Consideramos que completar la caracterización fenotípica y funcional de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ y CD3⁺TCRαβ⁺, ayudará a explorar y esclarecer el papel de estas subpoblaciones. El estudio de ambas subpoblaciones de macrófagos en condiciones de infección con distintas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* servirá a entender el mecanismo de activación y su función lo que contribuirá al campo de la fisiopatología de la tuberculosis. Esto en un futuro conllevará a diseñar nuevas estrategias terapéuticas en las diferentes condiciones patológicas de la tuberculosis o donde la participación de los macrófagos es crucial. Una aplicación puntual de la importancia de estas subpoblaciones en la infección por *M. tuberculosis*, sería usarlas como referencia para determinar la prognosis de los pacientes y posiblemente también un diagnóstico más certero con respecto a la información indirecta sobre el estado del granuloma, según sea el caso.

IV. Planteamiento del problema

En el humano se ha descrito la existencia de macrófagos TCR⁺, cuya presencia depende del TNF. Además, la forma membranal del TNF (tmTNF) es capaz de activar vías de señalización mediante retro-señalización. En un modelo murino, además de encontrar esta subpoblación también se observaron células mieloides CD3⁺TCR⁻. Por lo que nos preguntamos ¿Cuáles son las diferencias fenotípicas y funcionales de estas subpoblaciones? y si ¿La generación, el fenotipo y la función de estas subpoblaciones se ven afectadas ante la infección por diferentes cepas de *M. tuberculosis*?

V. Hipótesis

Los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ están especializados en inducir una respuesta inflamatoria mediante la señalización por tmTNF y su generación se afecta en la infección por *M. tuberculosis*.

VI. Objetivos

1. Objetivo general

Completar la caracterización fenotípica y caracterizar funcionalmente a las subpoblaciones de macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+/TCR\alpha\beta^-$ y su función inflamatoria en homeostasis y después de la infección por distintas cepas de *M. tuberculosis*.

2. Objetivos particulares

1. Obtener macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+/TCR\alpha\beta^-$ a partir de monocitos de individuos sanos.
2. Completar la caracterización del fenotipo de los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ *versus* $CD3^+TCR\alpha\beta^-$.
3. Evaluar el perfil inflamatorio de las subpoblaciones de macrófagos ante el estímulo de anticuerpos anti-CD3 o anti-TNF o ambos mediante la secreción de citocinas, quimiocinas y expresión de SOCS3 en cada subpoblación.
4. Evaluar la frecuencia, caracterizar el fenotipo y el perfil de citocinas de macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+/TCR\alpha\beta^-$ posterior a la infección *in vitro* con las cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv.

VI. Métodos

1. Enriquecimiento de monocitos y obtención de macrófagos derivados de monocitos (MDM)

A partir de paquetes leucocitarios provenientes de donadores sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, CDMX. Con la aprobación del comité de bioética con código: IRB# B07-16, el estudio se condujo bajo los principios estipulados en la Declaración de Helsinki.

Se obtuvieron células mononucleadas (MNC, por sus siglas en inglés) mediante un gradiente de ficoll 1:3 (ficoll:sangre); se centrifugó a 800g, 30 minutos (min) a 20°C. Mediante selección positiva utilizando anticuerpos α CD14 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) acoplados con perlas magnéticas en un sistema MACS (Magnetic Activated Cell Sorting, por sus siglas en inglés) se obtuvieron monocitos (células CD14⁺). La pureza fue analizada por FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting, por sus siglas en inglés) utilizando los anticuerpos contra: CD14, CD19, CD3 (Tabla 2).

Los macrófagos se obtuvieron después de cultivar las células CD14⁺ en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, por sus siglas en inglés, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino decomplementado (ATCC 30-2020), aminoácidos esenciales (0.25X) y no esenciales (1X), piruvato de sodio (1mM), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, por sus siglas en inglés) (10mM) (Gibco) y antibióticos penicilina-estreptomina (1X, biowest) durante 7 días, a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

2. Microscopía confocal de macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ y CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻

Se sembraron 1x10⁶ células sobre un cubre objetos, el cual se encontraba en el fondo de una placa de 24 pozos, se realizaron lavados con PBS (Phosphate-buffered saline, por sus siglas en inglés) para después fijar las células con

PBS-PFA (Paraformaldehyde, por sus siglas en inglés) al 2% durante 10 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se bloquearon con PBS + 2% de Suero de Cerdo (SC) por 30 min. a TA. La incubación con anticuerpos primarios se realizó bajo las siguientes concentraciones: 4 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos anti-MMR (CD206) (abcam), 4 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos anti-TCR $\alpha\beta$ (Thermo Fischer) y anticuerpos anti-CD3 diluidos 1:100 (Cell Signalling Technologies) en PBS-SC durante 1 hora a TA. Se lavó el exceso de anticuerpo con PBS-tween al 0.01% por 5 min con agitación. Se incubó el anticuerpo secundario fluorescente conjugado a Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647 (ambos de Jackson) y Alexa Fluor 546 (Thermo Fischer) correspondiente a cada anticuerpo primario en una dilución 1:100 en solución de PBS + 2% SC por 1 hora a TA y en oscuridad. Se lavó el exceso de anticuerpo con PBS tween 20 (polyoxyethylene sorbitol ester, por sus siglas en inglés) al 0.01% con agitación.

Finalmente se incubó por 10 min con DAPI (NucBlue Fixed Cell Stain, Molecular Probes, 1 gota en 500 μl de PBS). Se lavó con PBS con agitación. El montaje de los cubreobjetos se realizó con ProLong Gold, se dejó fraguar el medio de montaje al menos 24 horas (hrs.) Después de las 24 hrs. las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal FV-1000 de Olympus con estativo IX-81, objetivo de 60X con NA de 1.42 de inmersión. Finalmente, las imágenes fueron analizadas con el software FIJI.

3. Separación de subpoblaciones de macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ y CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻ por citometría de flujo

Para la separación de las subpoblaciones mediante citometría de flujo, de ahora en adelante haciendo referencia a la técnica como *sort*, se obtuvieron suspensiones de macrófagos como se describe en obtención de células MNC y enriquecimiento de monocitos. Las células se incubaron por 20 min en oscuridad a TA con el marcador de viabilidad zombie aqua TM (Biolegend). Posteriormente, se utilizó una solución para bloquear receptores Fc, Fc Block, 10 minutos a TA (2.5 μg por millón de células, BD Biosciences), se incubaron

con anticuerpos contra: TCR $\alpha\beta$ y CD3 (Tabla 2) por 30 min a 4°C y en oscuridad. Las células fueron sorteadas en un FACS Aria II (BD Biosciences) con un nozzle de 85 μm , empleando la siguiente estrategia: las células muertas se excluyeron al seleccionar la región negativa del *aqua zombie*. Se eligió la región de *singletes* utilizando FSC-A vs. FSC-H. Finalmente, las células vivas CD3 $^-$, CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^-$ y CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^+$ fueron sorteadas de manera individual de acuerdo a sus marcadores.

4. Extracción de RNA y retro-transcripción

El RNA de las diferentes subpoblaciones de macrófagos se extrajo utilizando RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). El DNA genómico fue eliminado con el uso de RNA-Free DNase Set (Qiagen). El RNA se eluyó en 15 μL agua libre de nucleasas. La cuantificación del RNA extraído se realizó mediante nanodrop. Posteriormente, 3ng de RNA fueron usados para la síntesis del cDNA utilizando un kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Waltham, USA) en un volumen de 20 μL .

5. Integridad del RNA

La integridad del RNA es un paso clave para la obtención de datos confiables en expresión génica. Para verificar la calidad del RNA obtenida utilizamos capilares de electroforesis automatizados, siguiendo el protocolo de proveedor del 6000 RNA Pico kit de Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Las muestras fueron analizadas en el instrumento 2100 Bioanalizador de Agilent (Agilent Technologies). Los perfiles obtenidos otorgan información de la concentración de RNA obtenida y permiten una inspección visual de la integridad del RNA, generando relaciones entre la masa de las subunidades ribosomales del RNA (28s:18s). El algoritmo que genera los valores de RIN (RNA Integrity Number, por sus siglas en inglés), se aplica a las lecturas del gel de electroforesis y se basan en una combinación de diferentes características que contribuyen a la integridad del RNA. Un RIN por arriba de 5 se considera una buena calidad del RNA obtenido y por encima de 8 como una

calidad perfecta para cualquier subsecuente aplicación (152). Las muestras con un RIN mayor a 5 fueron diluidas para obtener cDNA.

6. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo-real (qPCR) fue desarrollada utilizando sondas TaqMan para los genes blanco: TCR β (Hs01588269_g1), CD3 ϵ (Hs01062241_m1) y SOCS3 (Hs023330328_s1). ACTB (β -actin) (Hs01060665_g1) y 18S (18S ribosomal RNA gene) (Hs03928990_g1) fueron utilizados como controles endógenos. Las reacciones *Singleplex* fueron preparadas con el master mix Maxima Probe/ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), todas las amplificaciones se corrieron por duplicado bajo las siguientes condiciones: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 60°C por 1 min y 95°C por 15 segundos (s), utilizando el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). La expresión relativa de la transcripción fue cuantificada usando el método Δ CT, donde Δ CT = CT (blanco) – CT (endógeno). Los resultados fueron reportados como veces de cambio para el gen blanco en cada condición experimental o subpoblación de macrófagos, que fue normalizado con el control endógeno ACTB y 18S y relativo al grupo control (= 1).

7. Estímulos de macrófagos post-sort

Después del sort, las subpoblaciones de macrófagos se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 10×10^5 células/200 μ l, se incubaron 24 horas a 37°C y 5% CO₂, utilizando las siguientes condiciones: sólo medio de cultivo (control negativo), anticuerpos anti-CD3 (1 μ g/mL), anti-TNF (1 μ g/mL), anti-CD3/TNF, anticuerpos control de isotipo (1 μ g/mL) y LPS (100 ng/mL) más IFN γ (20 ng/mL) como control positivo. Los sobrenadantes fueron recuperados y guardados a -20°C hasta su uso para medición de citocinas, mientras las células se recuperaron para obtener qPCR.

8. Análisis de citocinas y quimiocinas por Múltiplex

El sobrenadante de los cultivos de subpoblaciones de macrófagos tratados con diferentes estímulos fue utilizado para realizar un ensayo Bio-plex Pro Human Cytokine Standard 27 (BIO-RAD) siguiendo las indicaciones del proveedor (Tabla 1). Los datos fueron adquiridos en un equipo Bio-Plex 200 System y analizados con el software Bio-Plex Manager 6.1.

Tabla 2. Múltiplex			
Citocinas y quimiocinas incluidas			
Pro-inflamatorias	Anti-inflamatorias	Quimiocinas	Factores de crecimiento
•IL-6	•IL-10	•Eotaxin – CCL11	•PDGF-BB
•IL-8	•IL-1ra	•MCP-1(MCAF) – CCL2	•GM-CSF
•IFN- γ	•IL-4	•RANTES	•VEGF
•IP-10	•IL-5		•FGF
•IL-1 β	•IL-13		•G-CSF
•IL-12 (p70)			
•IL-2			
•TNF- α			
•IL-7			
•MIP-1 α			
•MIP-1 β			
•IL-15			
•IL-17A			
•IL-9			

9. Violin plots y Heat-map

Utilizando el programa RStudio se desarrollaron los scripts necesarios para graficar la variación experimental en la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento evaluados mostrándolos en una gráfica de violín (violin-plot). Los datos del Múltiplex se representaron en una matriz en donde el valor de la concentración de cada citocina (pg/ml) fue representada en una escala de color. En donde el azul corresponde a la concentración más baja (0.66 pg/ml) y el rojo a la más alta (21,654 pg/ml). Para generar el Heat-map se utilizó el programa Mathematica 11 (Wolfram Research). Los datos del Múltiplex fueron normalizados con respecto al control negativo y representado en log2 para

identificar el aumento o decremento en su producción. Para ello se utilizó el programa RStudio. A este script se le adicionó un dendograma con el fin de identificar grupos denominados *clusters* en los datos graficados.

10. Análisis de Componentes principales (PCA)

Utilizando el programa RStudio se generaron los scripts adecuados para realizar el análisis de componentes principales (PCA, Principal Component Analysis, por sus siglas en inglés). Este análisis nos permite analizar el agrupamiento de los datos con respecto al tratamiento y a la subpoblación celular de interés. El PCA simplifica la complejidad de las dimensiones de los datos mientras que mantienen las tendencias y los patrones. Esto lo hace al transformar los datos en menos dimensiones, que actúan como resumen de las características de los datos de interés. El PCA es un método similar al *clustering*, encuentra patrones sin necesitar una referencia de conocimiento previa acerca de si la muestra proviene de grupos con distintos tratamientos o si tiene diferencias fenotípicas. El PCA reduce los datos al proyectarlos geoméricamente en dimensiones más bajas denominadas componentes principales (PCs), con el objetivo de encontrar el mejor resumen de datos utilizando un número limitado de PCs (153).

11. Cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Las cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv se crecieron hasta una fase de medio logaritmo en medio Middlebrook 7H9 conteniendo, albúmina -dextrosa-catalasa (ADC), glicerol. Los concentrados (*stock*) fueron congelados en alícuotas y guardados a -70°C. Las alícuotas fueron descongeladas y colocadas en placas para determinar el número de bacilos por medio de Unidades Formadoras de Colonias (CFU's, por sus siglas en inglés).

12. Ensayo de Unidades Formadoras de Colonia (CFU's)

Se descongelaron al menos 3 alícuotas del *stock* de cada una de las cepas (inicial, medio, final). Se mezclaron con un agitador vortex vigorosamente y se

centrifugaron 5 min a 8000 rpm. Se descartó el sobrenadante en cloro al 10%. Se mezcló con un agitador vortex vigorosamente el botón de bacterias (*pellet*) y se agregó 1 mL de medio 7H9. Para H37Ra y H37Rv se separaron los agregados bacterianos (*declumping*) mezclando en vortex con 5 perlas de vidrio por 5 min; se centrifugaron a 1000 rpm por 2 min y se transfirió el sobrenadante a un vial nuevo. Se realizaron 10 diluciones seriadas de la suspensión de micobacterias y se colocaron en placas en medio agar Middlebrook 7H9. Se incubaron a 37°C de 2 a 3 semanas antes de realizar el conteo de CFU's.

Para obtener la concentración del *stock* de una cosecha de las cepas de *M. tuberculosis* en la cual se tomaron tres alícuotas (inicial, media y final); se promediaron las concentraciones encontradas para determinar la concentración final de ese *stock*. La dilución en donde se pueden contar las CFU's se multiplicó por 100 para pasarlo a mL y así se obtuvo la concentración de bacterias.

13. Infección de subpoblaciones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻ con *Mycobacterium tuberculosis* cepas H37Ra y H37Rv

Se obtuvieron los MDM, de seis donadores sanos, fueron obtenidos con las mismas características que se mencionan en la sección de obtención de MDM. A los 7 días fueron infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra a dos MOI: MOI 1 y MOI 10 (del inglés Multiplicity of Infection) durante 2 horas. Para la cepa *M. tuberculosis* H37Rv los MDM se infectaron con MOI 1 y MOI 5 también por 2 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados con medio de cultivo sin antibiótico. Se reemplazó el medio por medio fresco y fueron cosechados a las 24 hrs. Los sobrenadantes se recolectaron para realizar ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, por sus siglas en inglés) de diversas citocinas. Mientras que las células se recuperaron con PBS-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, por sus siglas en inglés) (2mM) durante 20 min en hielo (2°C), se lavaron con PBS 1X, las células se fijaron con PBS-PFA al 2% y se analizaron las moléculas incluidas en la caracterización fenotípica mediante citometría de flujo. Se adquirieron, al menos 50,000 eventos, en un

citómetro FACS-Aria II y fueron analizadas con FlowJo v10.2. Para el análisis de resultados, se identificaron las subpoblaciones de interés: CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻ y dentro de estas se evaluó la expresión de cada la molécula.

14. Caracterización fenotípica de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻ por citometría de flujo multiparamétrica en homeostasis y ante la infección con dos cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv

Los macrófagos fueron cosechados con PBS-EDTA (2mM) durante 20 min en hielo (2°C), se lavaron con PBS 1X y se analizaron mediante citometría de flujo. Mediante gráficas se identificaron las subpoblaciones CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻, las cuales fueron analizadas con los anticuerpos contra: CD80, CD86, CD11b, CD68, CD14, CD3, TCRαβ, TCRγδ, HLA-ABC, HLA-DR, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CCR2, CCR4, CCR7, CXCR1, CD16 y tmTNF (Tabla 4) en solución amortiguadora para tinción (BioLegend) por 30 min a 4°C, en oscuridad. Las células se fijaron con PBS-PFA 2%. Se adquirieron, al menos 50,000 eventos, en un citómetro FACS-Aria II y fueron analizadas con FlowJo v10.2.

15. Medición de las citocinas secretadas en el sobrenadante mediante ELISA

El día uno, en una microplaca un anticuerpo monoclonal específico para la citocina de interés, es colocado en una placa. Se incuba durante 1 hora en agitación con una rotación de 180° y se deja a 4°C toda la noche. El día 2, se realizan 4 lavados con 250 µl de PBS-tween 0.05%, entre cada lavado se agita la placa 30 segundos. Posteriormente, se añade a la microplaca una curva de la citocina de interés con concentración conocida y las muestras. Se incuba durante 3 horas en agitación y se deja a 4°C toda la noche. La citocina de interés se unirá al anticuerpo monoclonal inmovilizado. El día 3, se realizan 4 lavados bajo las mismas condiciones mencionadas, esto para eliminar las proteínas no unidas al anticuerpo monoclonal. Después, se añade un

anticuerpo policlonal acoplado a una enzima, específico para la citocina de interés. Se realizan 5 lavados para remover cualquier reactivo de anticuerpo acoplado a enzima que no se haya unido a la citocina de interés. Se agrega una solución de sustrato para la enzima y al llevarse a cabo la reacción se desarrolla color azul en proporción a la cantidad de citocina de interés unida al anticuerpo monoclonal inicial. Finalmente, la reacción se detiene con una solución de ácido sulfúrico 2N. El color de la intensidad es medido dentro de los siguientes 15 minutos por un lector BIORAD iMark Microplate reader, a una longitud de onda de 450nm. Debido a que no existe la opción de corrección de longitud de onda, se resta la lectura de 540 nm de la de 450 nm. Los datos se analizan con Prism-GraphPad Version 5 for Mac OS X. la regresión de la curva estándar puede ser lineal o no dependiendo de la citocina a medir. Las citocinas incluidas en este proyecto son: sCD14 (R&D), IP-10, MCP-1, TNF, IFN γ (Biolegend).

16. Análisis estadístico

Los análisis cuantitativos y estadísticos se realizaron utilizando el programa Prism (versión 5) (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Se realizó una prueba de normalidad D'Agostino & Pearson omnibus. Para los datos distribuidos de manera normal se realizó ANOVA seguido de prueba *post hoc* Bonferroni. Los datos que no tuvieron distribución normal fueron analizados con Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples de Dunns. El valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

VII. Resultados

1. Eficiente obtención de macrófagos derivados de monocitos (MDM)

La pureza de monocitos aislados por el sistema MACS fue mayor al 95%. Partiendo de la región negativa para CD2 y CD19, se corroboró la pureza para CD14 (Figura 10). De manera individual se analizaron las moléculas CD2 y CD19 para verificar que en los cultivos celulares no haya contaminación de

linfocitos T y B (Figura 11A). Después de los siete días de cultivo se obtuvieron MDM, los cuales fueron caracterizados por la expresión de moléculas clásicas para macrófagos: CD68, HLA-DR, CD11b^{hi}, CD80^{hi} y CD86 (Figura 11B y C).

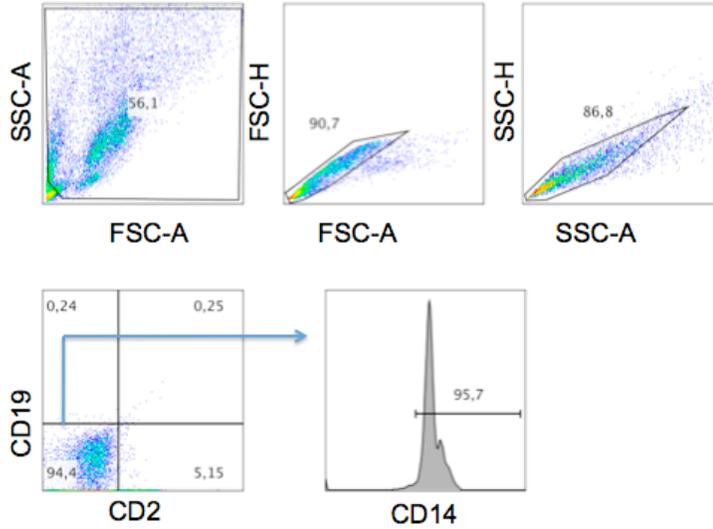


Figura 10. Pureza de monocitos CD14⁺. Estrategia de análisis para la pureza de los monocitos CD14⁺ donde se obtuvo al menos un 95%. n=12.

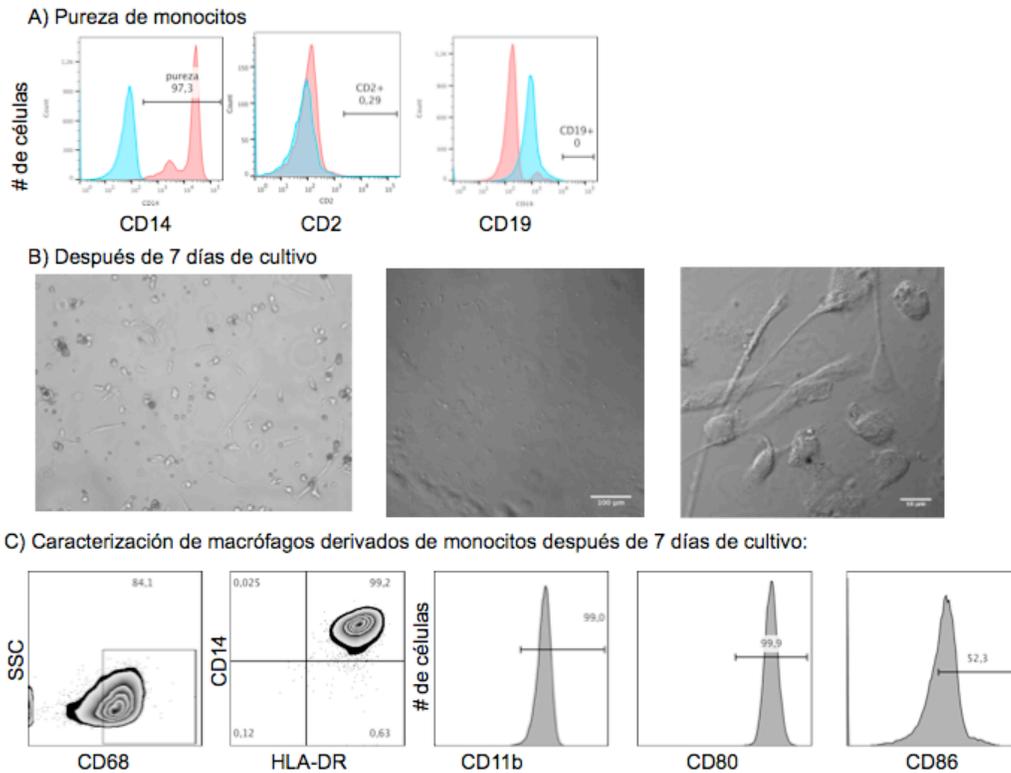


Figura 11. Pureza de monocitos CD14⁺ y obtención de macrófagos. A. El porcentaje de pureza de los monocitos CD14⁺ con los que se inició el cultivo celular fue de al menos 95% (región roja). Utilizando las células sin teñir como control negativo para cada una de las moléculas analizadas (región azul claro). B. Morfología de macrófagos en cultivo después de siete días de cultivo (barra = 10µm). C. Expresión de moléculas que no se expresan en linfocitos T. n=12.

2. Reproducibilidad en la obtención de las subpoblaciones CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻ a partir de MDM de origen humano

Con el fin de validar la reproducibilidad de los datos previos obtenidos por la Dra. Leslie Chávez Galán para la obtención de estas subpoblaciones recién descritas y obtenidas a partir de monocitos sanos de origen humano (151); en homeostasis, es decir sin introducir el modelo de infección, se corroboró que alrededor de un 10% de los macrófagos de cultivo son CD3⁺ (Figura 12B) y de ellos el 20% expresa TCRαβ (Figura 12C). Al igual que se había registrado, la mayoría de los macrófagos CD3⁺ son TCRαβ⁻. La expresión del TCRγδ en la subpoblación CD3⁺ se midió para corroborar y validar lo ya registrado (151). Se verificó que la expresión del TCRγδ fue menor al 2% por lo que no será estudiada en este trabajo. Únicamente como control de reproducibilidad de los datos se volvió a realizar la medición de TCRαβ y TCRγδ en la fracción de los macrófagos CD3⁻ (151) y se obtuvo el mismo resultado, previamente obtenido por la Dra. Leslie Chávez Galán (151), en donde no existió expresión de ambos receptores (Figura 12D).

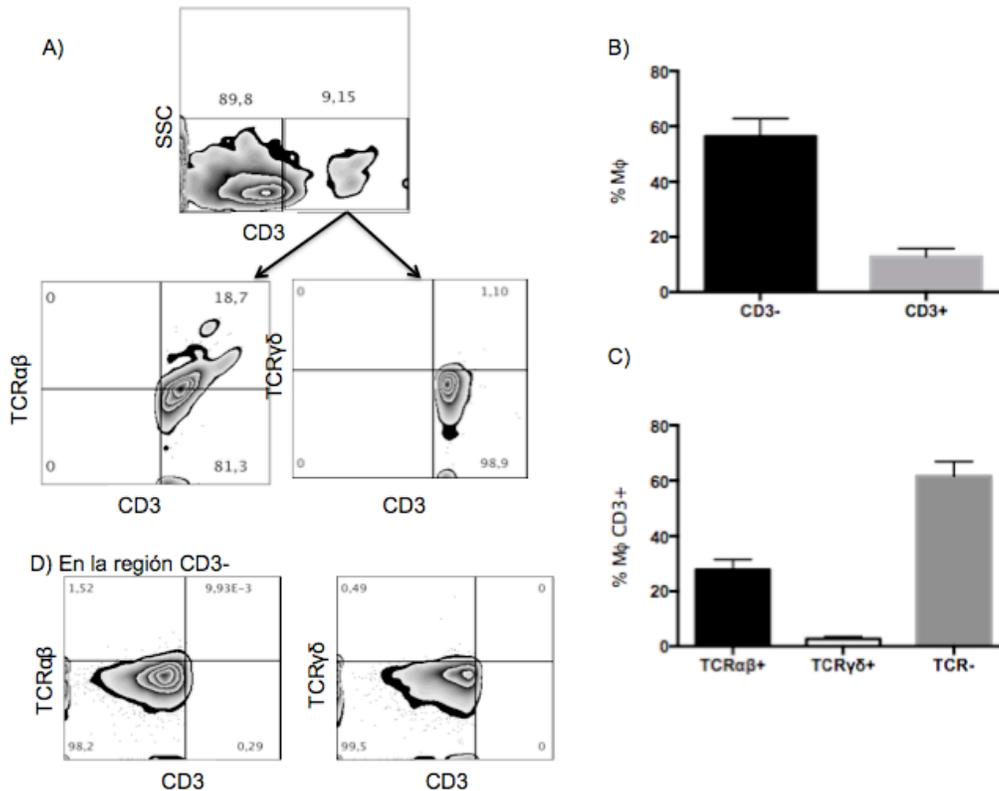


Figura 12. Reproducibilidad en la obtención de las subpoblaciones $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ y $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ a partir de monocitos de origen humano. A. Zebra plot representativo, obtenido por citometría de flujo. A partir de la región positiva para CD3, se re-evaluó la expresión de TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$. B. Gráfica de porcentaje de macrófagos CD3 $^+$. C. Gráfica de porcentaje de expresión de TCR en macrófagos CD3 $^+$. D. Zebra plot representativo de expresión de TCR a partir de la región de macrófagos CD3 $^+$. Datos representados en media \pm error estándar, n=15.

Con el fin de evaluar la expresión de las moléculas CD3 y TCR en estas recién descritas subpoblaciones, mediante microscopía confocal se analizaron los macrófagos obtenidos del cultivo de 7 días. El receptor de manosa (CD206/MMR) fue utilizado como molécula control, para hacer referencia a que las células analizadas son macrófagos y no linfocitos. Del total de células observadas en el cultivo un 90% fueron positivas para MMR. Con esta técnica se pudo corroborar que en el cultivo celular de las subpoblaciones de MDM no existe contaminación de linfocitos T ya que los macrófagos MMR $^+$ también expresan las moléculas CD3 y TCR, según la subpoblación de interés CD3 $^+TCR\alpha\beta^+$ o CD3 $^+TCR\alpha\beta^-$. Mientras que los macrófagos CD3 $^-$ a nivel de

proteína no expresan CD3 ni TCR (Figura 13) como se había observado también mediante FACS.

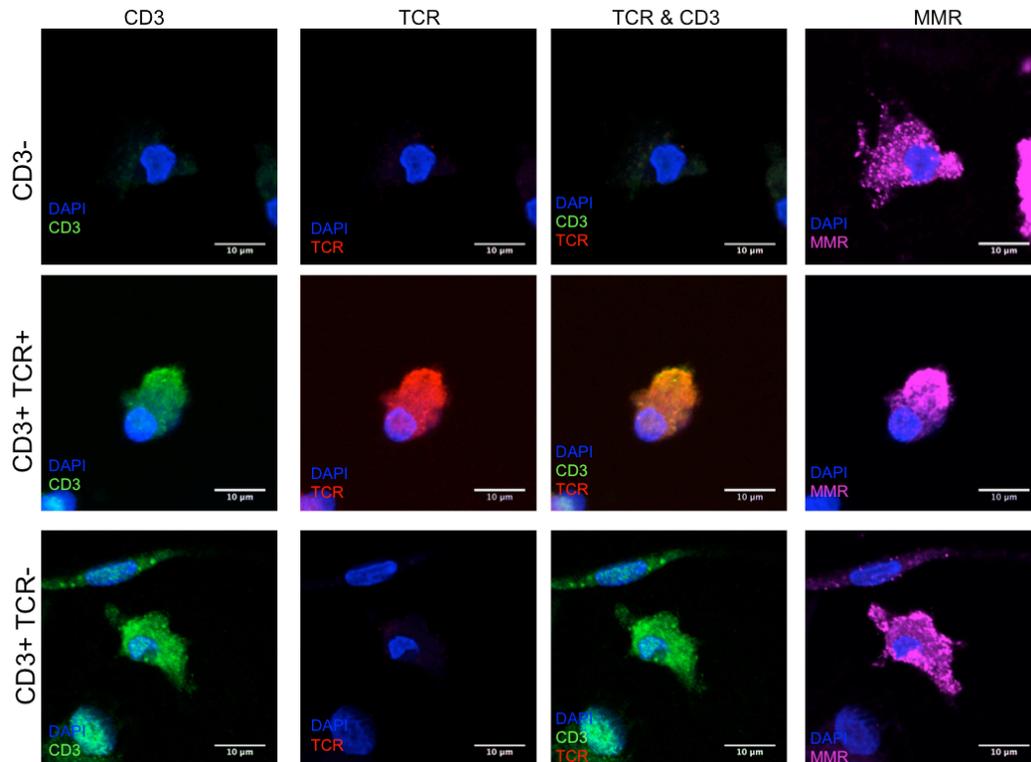
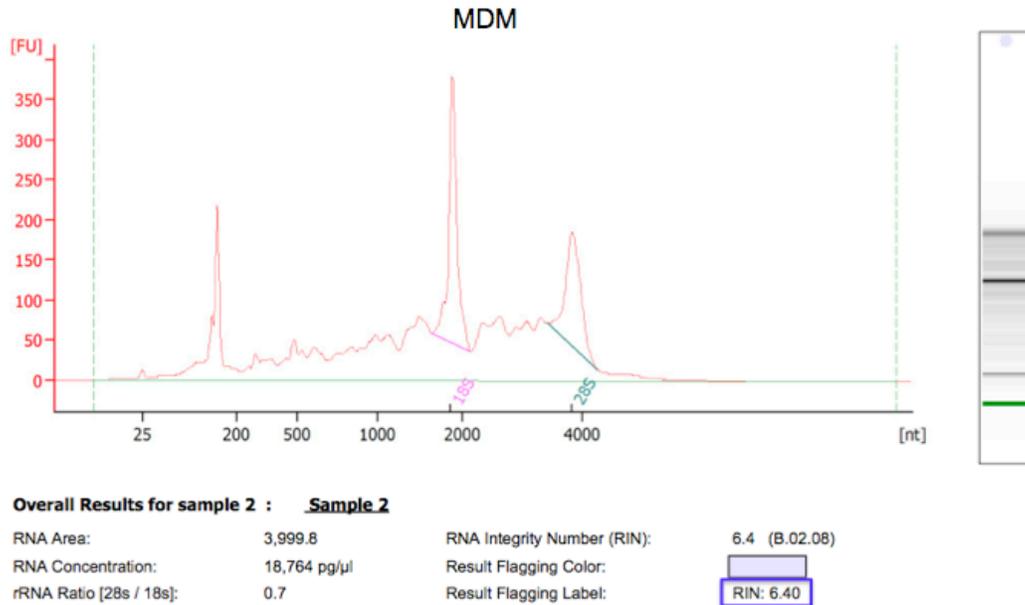


Figura 13. Inmunofluorescencia de las subpoblaciones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁻ y CD3⁺TCRαβ⁺. En los macrófagos CD3⁻ sólo se observa el núcleo (DAPI) y el MMR (magenta). En los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ se observa el CD3 (verde) y el TCR (rojo) que se encuentran co-localizados (amarillo); mientras que los CD3⁺TCRαβ⁻ se pueden distinguir sólo por la presencia de CD3 (verde). n=3, barra = 10μm.

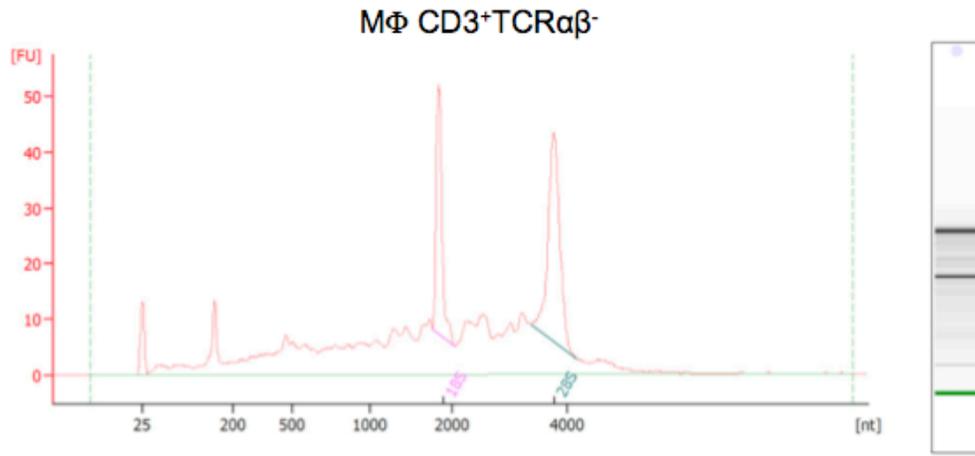
Además del análisis de estas subpoblaciones mediante citometría y microscopía confocal. Como una tercera técnica para corroborar la expresión de CD3 y TCRαβ en estas subpoblaciones y descartar de nuevo contaminación del cultivo o mecanismos biológicos como fagocitosis en futuros experimentos en modelos *in vivo*. Se evaluó la expresión de la cadena CD3ε y TCRβ del complejo TCR a nivel de RNA mensajero (mRNA) en cada una de las subpoblaciones. Debido a la posible degradación del RNA para realizar la qPCR, utilizamos únicamente muestras con un RIN por encima de 5 (Figura 14-16).



Fragment table for sample 2 : Sample 2

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,639	2,134	487.6	12.2
28S	3,416	4,275	318.3	8.0

Figura 14. Integridad del RNA de los MDM. El RIN otorga un valor numérico a las relaciones entre la masa de las subunidades ribosomales del RNA (28s-verde: 18s-rosa). Para los MDM fue de 6.4 (enmarcado en un cuadro azul). En la columna de la derecha se observa la electroforesis capilar para esta muestra. [FU] Unidades de fluorescencia eje (y), tiempo en segundos escala numérica en el eje (x). n=3.



Overall Results for sample 4 : Sample 4

RNA Area:	511.0	RNA Integrity Number (RIN):	6.6 (8.02.08)
RNA Concentration:	2,397 pg/ul	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.5	Result Flagging Label:	RIN: 6.60

Fragment table for sample 4 : Sample 4

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,756	2,037	44.9	8.8
28S	3,364	4,181	67.5	13.2

Figura 15. Integridad del RNA de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻. El RIN otorga un valor numérico a las relaciones entre la masa de las subunidades ribosomales del RNA (28s-verde: 18s-rosa). Para los CD3⁺TCRαβ⁻ fue de 6.6 (enmarcado en un cuadro azul). En la columna de la derecha se observa la electroforesis capilar para esta muestra. [FU] Unidades de fluorescencia eje (y), tiempo en segundos escala numérica en el eje (x). n=3.

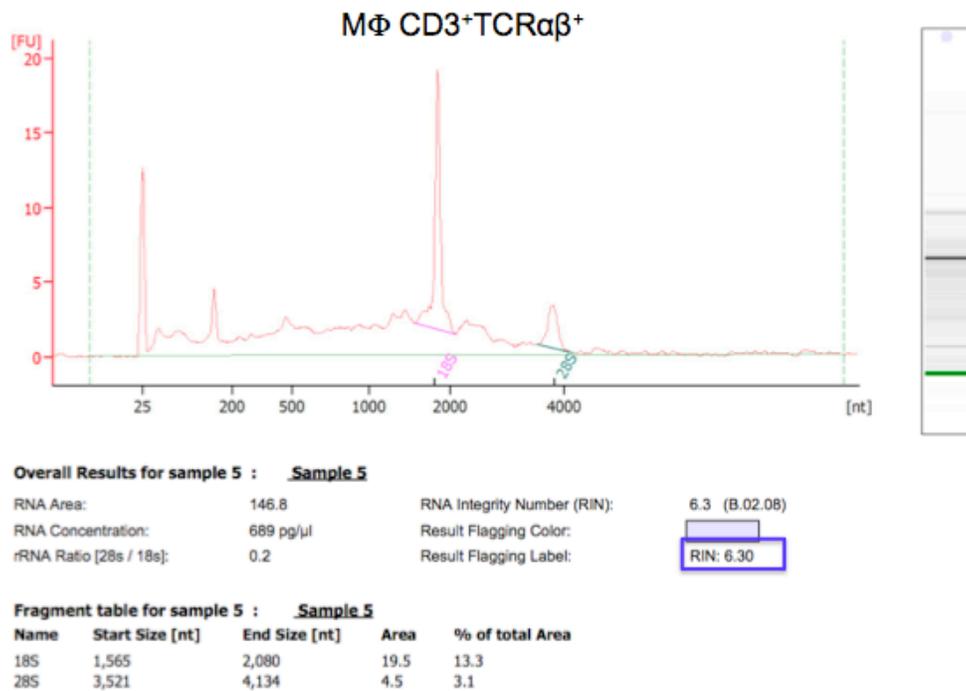


Figura 16. Integridad del RNA de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺. El RIN otorga un valor numérico a las relaciones entre la masa de las sub-unidades ribosomales del RNA (28s-verde:18s-rosa). Para los CD3⁺TCRαβ⁺ fue de 6.3 (enmarcado en un cuadro azul). En la columna de la derecha se observa la electroforesis capilar para esta muestra. [FU] Unidades de fluorescencia eje (y), tiempo en segundos escala numérica en el eje (x). n=3.

Observamos que CD3ε y TCRβ están presentes en las subpoblaciones a nivel de mensajero. Los valores del qPCR fueron normalizados y comparados contra aquéllos de los macrófagos clásicos (MDM). Para CD3ε se observa un incremento en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a los macrófagos totales y a los CD3⁻ (Figura 17A). Para la cadena TCRβ observamos que todas las subpoblaciones expresan un nivel basal a nivel de mRNA y un ligero incremento de 0.5 en las CD3⁺TCRαβ⁺ (Figura 17B). Estos resultados sugieren que los MDM tienen la capacidad a nivel de transcripción de expresar estas moléculas aun cuando se desconozcan los mecanismos postraduccionales que regulen su expresión hacia proteína.

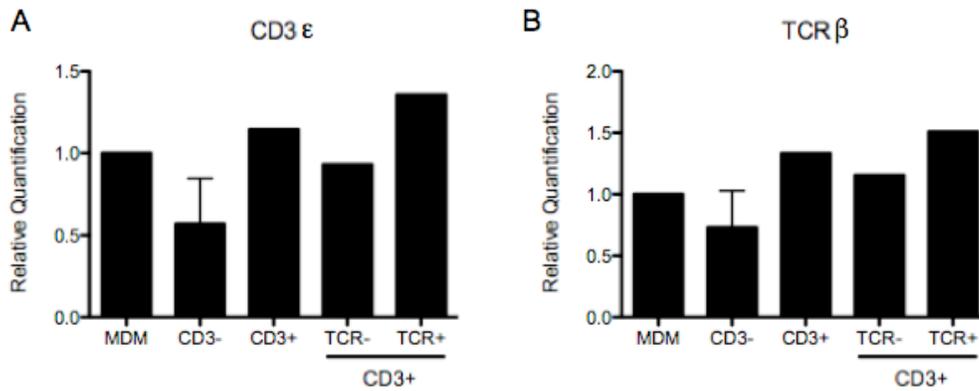


Figura 17. Las subpoblaciones $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ y $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ expresan a nivel de mRNA $CD3\epsilon$ y $TCR\beta$. A. Expresión de $CD3\epsilon$ en las subpoblaciones de macrófagos sorteadas por FACS y el análisis de su transcripción mediante qPCR. B. Expresión de la cadena beta del TCR en las subpoblaciones de macrófagos sorteadas por FACS el análisis de su transcripción mediante qPCR. Datos representados en media, n = 1-3.

Con el fin de validar la reproducibilidad de los datos obtenidos por la Dra. Leslie Chávez Galán para la expresión de moléculas presentadoras de antígenos proteicos (151). En este trabajo se repitió la medición de moléculas presentadoras de antígenos proteicos. Al igual que había sido registrado, la obtención de estas subpoblaciones recién descritas y obtenidas a partir de monocitos de individuos sanos, las subpoblaciones de macrófagos de interés expresan por encima de un 90%, las moléculas MHC clase I y II (datos no mostrados).

3. Macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ se caracterizan por la expresión de la forma transmembranal del TNF (tmTNF)

La expresión del tmTNF es importante para inducir la activación funcional en células de origen mieloides. Incluimos el análisis de la expresión de tmTNF en nuestras subpoblaciones de interés, ya que los antecedentes en el modelo murino muestran que la expresión de esta molécula es necesaria para el reclutamiento de células de origen mieloides al sitio de infección. Los resultados muestran que el tmTNF se encuentra expresado alrededor de 17% en los macrófagos humanos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$; mientras que las otras subpoblaciones muestran una expresión menor al 5% (Figura 18).

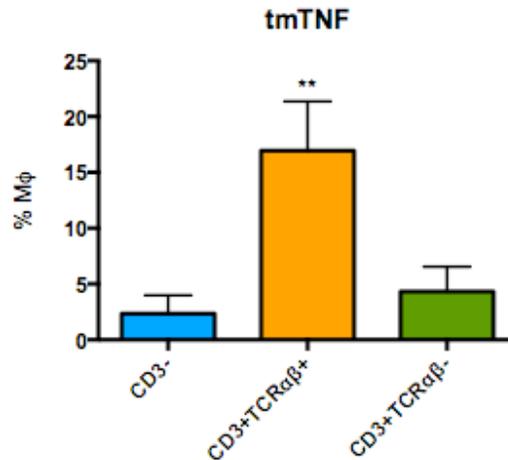


Figura 18. Los macrófagos humanos CD3⁺TCRαβ⁺ expresan en mayor porcentaje el tmTNF. Se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas tmTNF en las diferentes subpoblaciones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. Datos representados en media ± error estándar. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. **p<0.01, n=12.

4. La vía CD3/tmTNF es eficiente para activar macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻, sin embargo, difieren en el perfil de citocinas secretadas

Con el fin de evaluar la funcionalidad de estas moléculas no clásicas en macrófagos, nos preguntamos si la forma tmTNF es capaz de inducir una vía señalización que active a estos macrófagos y si esto lo hace de manera dependiente o independiente de la co-expresión de CD3.

Se realizó un *sort* para obtener a cada una de las subpoblaciones en individual, la pureza obtenida para cada una de las subpoblaciones de interés fue en promedio de 94% macrófagos CD3⁻, 99% para CD3⁺TCRαβ⁻ y 70% en macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ (Figura 19).

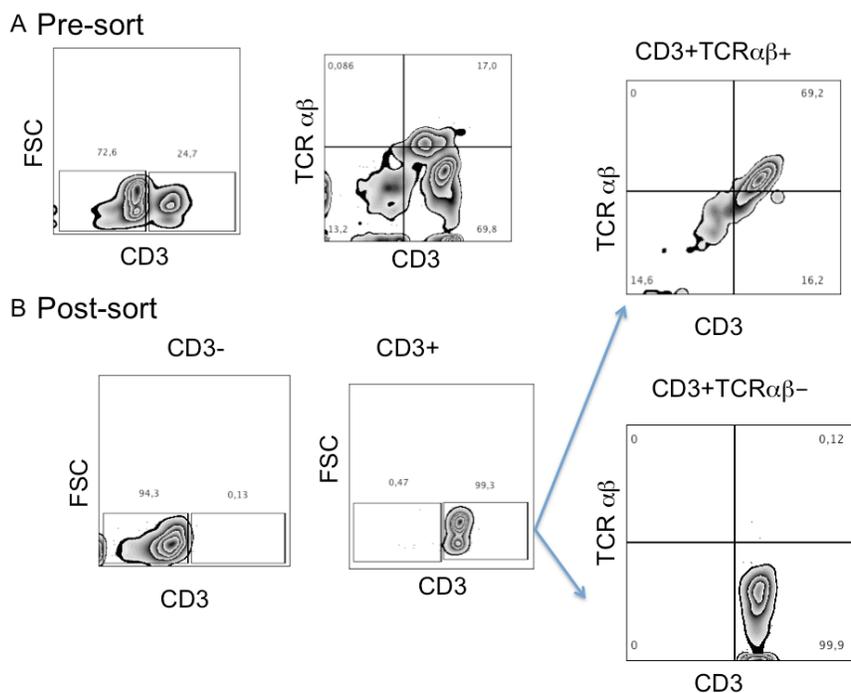


Figura 19. Sort de macrófagos $CD3^-$, $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ y $CD3^+TCR\alpha\beta^-$. A. Zebra plot representativo, obtenido por citometría de flujo de poblaciones de macrófagos previo al *sort*. B. Zebra plot representativo, se observa el porcentaje de pureza de cada una de las poblaciones de interés. Los resultados son representativos de $n=6$ donadores sanos.

Posteriormente, MDM totales y las 3 subpoblaciones sorteadas fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3, anti-TNF, ambos e IFN γ /LPS (como control positivo) con la finalidad de evaluar si mediante estas moléculas se puede inducir la activación celular de las subpoblaciones de macrófagos de interés. El sobrenadante del cultivo se recuperó para medir 27 proteínas mediante un múltiplex (Tabla 1).

Con el fin de evaluar la dispersión de valores en cuanto a la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento sintetizadas a partir del estímulo específico, los datos obtenidos a partir del Múltiplex son reportados en violin plot para observar la dispersión de cada una de las seis condiciones de estímulo (Apéndice II).

La dispersión en cuanto a la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento bajo cada una de las condiciones experimentales muestra que la mayor parte de ellos se encuentran bien agrupados y la dispersión mayor es en

la subpoblación de macrófagos CD3⁻. Con el fin de interpretar todos los datos en conjunto se procedió a realizar un *heatmap* (mapa de calor) tomando las medias de la concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en pg/ml para evaluar cuáles subpoblaciones de interés se encuentran más relacionadas en cuanto a funcionalidad.

Cuando reportamos los datos crudos en concentración de las proteínas analizadas, como se esperaba es en el control positivo donde los niveles de las moléculas analizadas muestran un mayor incremento. Por lo que todas las poblaciones son capaces de responder ante un estímulo fuerte como el IFN γ y LPS. Demostrando que cada subpoblación es funcional generando una producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en particular (Figura 20).

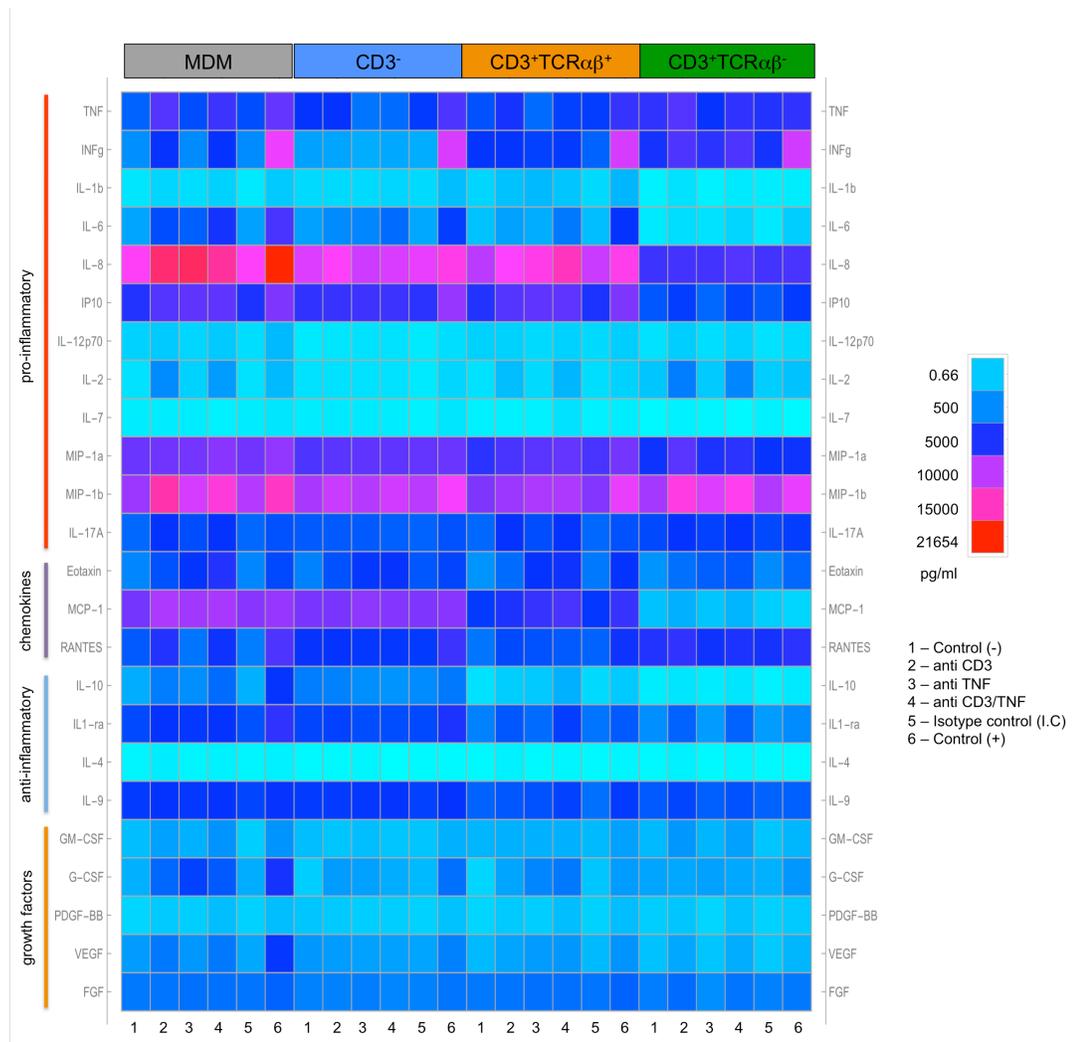


Figura 20. Niveles de producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por las subpoblaciones de interés ante 6 estímulos. Representación gráfica de los datos del nivel de citocinas producidas ante estímulos específicos. Los datos están contenidos en una matriz y representados por colores. La escala de color indica la menor (0.66 pg/mL) y mayor (21,654 pg/mL) concentración obtenidas. Las condiciones experimentales se describen numéricamente del 1-6. Donde para el control negativo se añadió únicamente el medio de cultivo, para el control positivo se agregó LPS (100 ng/mL) más IFN γ (20 ng/mL) y el control de isotipo I.C (1 μ g/mL). Los datos muestran la media de n = 6.

Con el fin de identificar el significado de la producción individual de cada una de las citocinas producidas, los datos fueron normalizados con respecto al control negativo y graficados en un *heatmap* por subpoblación (Figura 21) y por tratamiento (Figura 22). Al igual que en los datos de producción de proteínas totales, se observa que el mayor incremento es con el control

positivo. Las subpoblaciones que producen mayor cantidad de citocinas son los MDM y los $CD3^+TCR\alpha\beta^+$. Los macrófagos $CD3^-$ y los $CD3^+TCR\alpha\beta^-$, producen una menor cantidad de citocinas ante los tratamientos excepto en el control positivo (Figura 21).

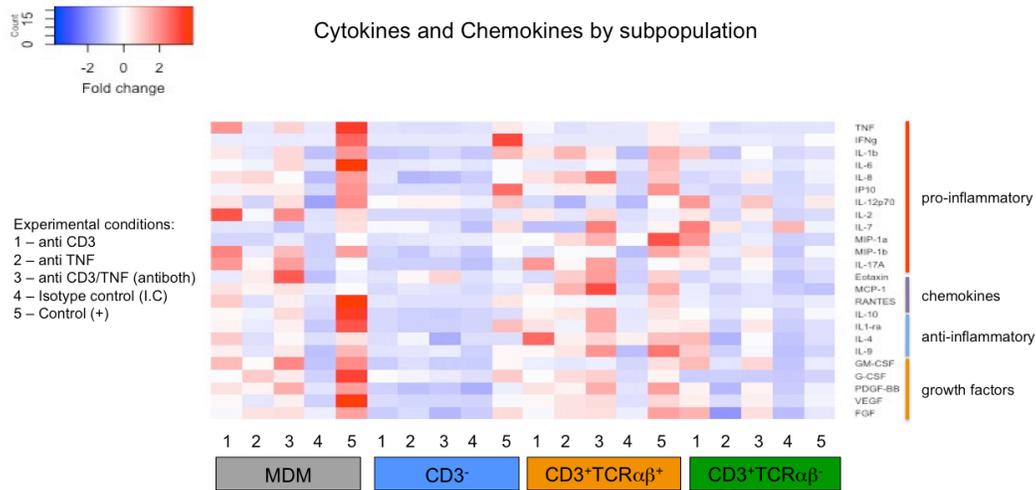


Figura 21. Niveles de producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por subpoblación de interés ante 6 estímulos. Representación gráfica de los datos del nivel de citocinas producidas ante estímulos específicos. Los datos están contenidos en una matriz y representados por colores. La escala de color indica un incremento (rojo) con respecto al control negativo si el valor es mayor a 0; y una disminución (azul) si el valor es menor a 0. Las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento evaluados se encuentran en la columna derecha. De izquierda a derecha se observa la subpoblación de MDM, $CD3^-$, $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ y por último $CD3^+TCR\alpha\beta^-$. Las condiciones experimentales para cada subpoblación en orden de izquierda a derecha se enumeran del 1 al 5. Los datos se encuentran normalizados con respecto al control negativo. Datos expresados en \log_2 .

Al agrupar los datos por tratamiento observamos de nuevo que el tratamiento que más induce la secreción de citocinas es el control positivo. De manera interesante, el segundo tratamiento que induce la mayor cantidad de citocinas es cuando se estimula tanto el tmTNF como el CD3 (antiboth), las subpoblaciones que más citocinas producen bajo este tratamiento son los MDM y los $CD3^+TCR\alpha\beta^+$. El tratamiento con anticuerpos contra CD3 induce un incremento de citocinas sobretudo en los MDM y en los $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ con un perfil de citocinas distinto al de los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^-$. El tratamiento anti-tmTNF induce una producción de citocinas mayor en los macrófagos

CD3⁺TCRαβ⁺ lo cual concuerda con los datos de caracterización, pues esta subpoblación cuenta con mayor tmTNF con respecto a las otras y por ello su estímulo genera una respuesta mayor (Figura 22). Adicionalmente en este *heatmap* se observa claramente como el estímulo utilizado es responsable de generar cada respuesta en particular; ya que nuestro control de isotipo para las cuatro subpoblaciones de interés no generó ninguna respuesta.

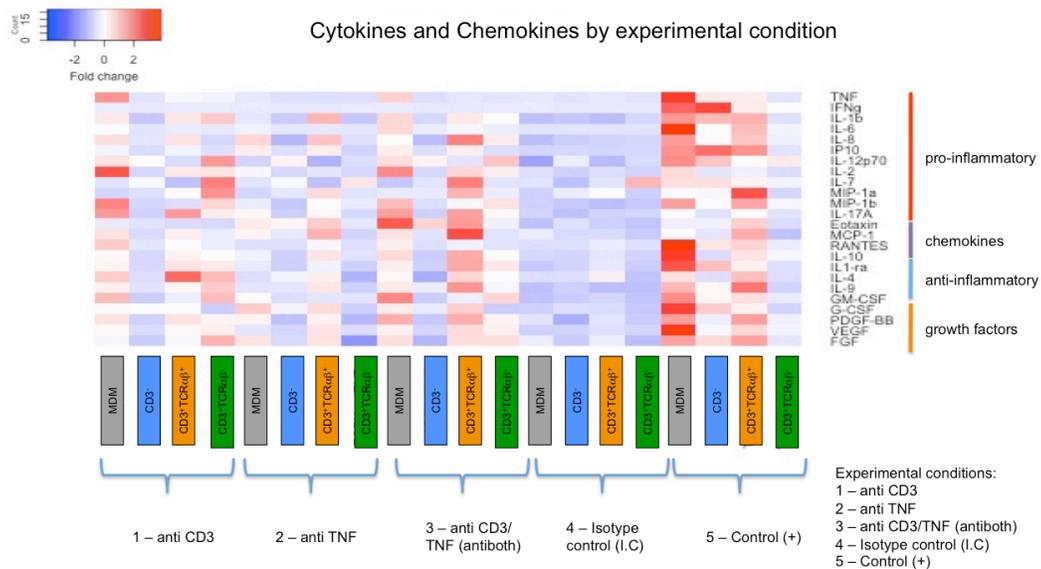
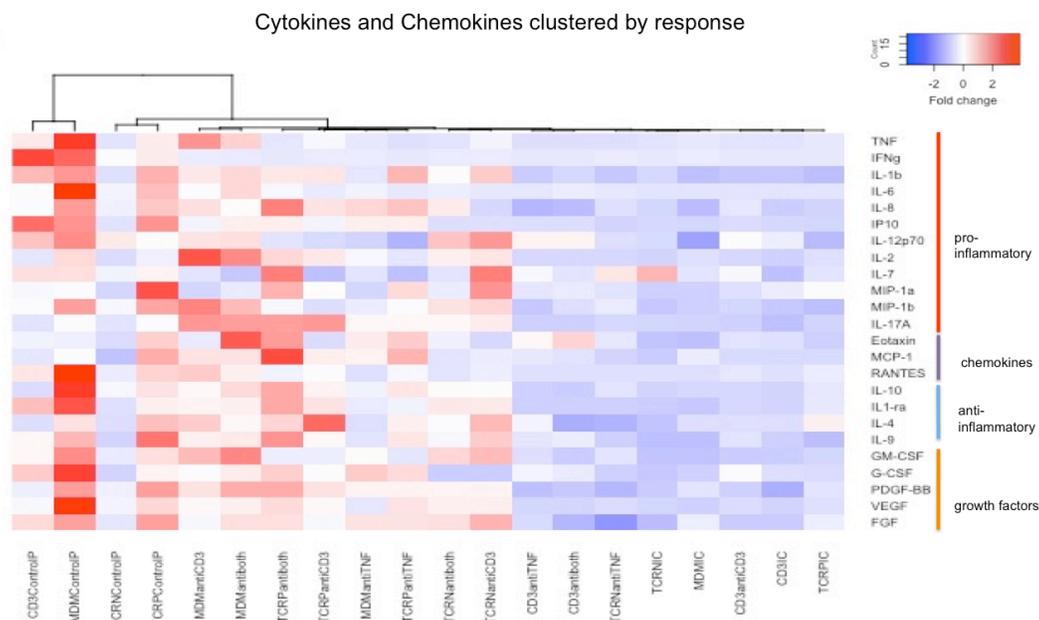


Figura 22. Niveles de producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en orden de tratamiento por las subpoblaciones de interés. Representación gráfica de los datos del nivel de citocinas producidas ante estímulos específicos. Los datos están contenidos en una matriz y representados por colores. La escala de color indica un incremento (rojo) con respecto al control negativo si el valor es mayor a 0; y una disminución (azul) si el valor es menor a 0. Las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento evaluados se encuentran en la columna derecha. Los datos se ordenaron de izquierda a derecha de acuerdo al tratamiento del 1 al 5. La subpoblación de interés se marca con un cuadro de color y el nombre de la subpoblación en cuestión. Los datos se encuentran normalizados con respecto al control negativo. Datos expresados en log2.

Los *heatmaps* previos nos demuestran la respuesta por subpoblación y por tratamiento en la producción de un perfil de citocinas. Con el fin de evaluar la similitud en cuanto a la respuesta de producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento; se realizó un análisis de *clusters* (agrupamiento) por dos métodos: dendograma (Figura 23) y análisis de componentes principales (PCA) (Figura 24).

El dendograma (Figura 23) muestra una agrupación inicial clave entre los macrófagos convencionales (MDM y CD3-) que los separa de las subpoblaciones de macrófagos poco conocidas que expresan CD3. También se observa claramente el efecto del control positivo (Control P), presentando mayor respuesta y el control de isotipo (IC) teniendo la respuesta menor.

Al momento de agrupar las subpoblaciones por respuesta y tratamiento; el dendograma muestra una cercanía entre los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ con los CD3⁺TCRαβ⁻ en condiciones de control positivo. Además, los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ se agrupan con los MDM ante el estímulo de CD3 y del estímulo conjunto de CD3 y tmTNF (antiboth). Lo cual sugiere un rol pro-inflamatorio de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺. Por su parte el estímulo de tmTNF únicamente induce producción de citocinas de los MDM y los CD3⁺TCRαβ⁺. El dendograma también agrupa más a estas subpoblaciones mientras que a los CD3⁺TCRαβ⁻ los agrupa junto con los CD3⁻ por su baja respuesta ante el estímulo de tmTNF o ambos (CD3 y tmTNF).



incremento (rojo) con respecto al control negativo si el valor es mayor a 0; y una disminución (azul) si el valor es menor a 0. Las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento evaluados se encuentran en la columna derecha. De izquierda a derecha se observa la subpoblación y tratamiento que mayor cantidad de citocinas produce mientras que a la derecha las que menor producción presentan. Subpoblaciones: MDM (MDM), CD3⁻ (CD3), CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ (TCRP) y por último CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻ (TCRN). Las condiciones experimentales para cada subpoblación son: anticuerpos anti-CD3, anti-TNF, antiboth (CD3 y tmTNF), control de isotipo (IC) y control positivo IFN γ y LPS (Control P). Los datos se encuentran normalizados con respecto al control negativo. Datos expresados en log₂

Para evaluar los datos obtenidos por el dendograma y profundizar el análisis de los clusters obtenidos mediante el *heatmap* se llevó a cabo un análisis de componentes principales el cual permite graficar los 600 datos observados en dos dimensiones en donde las variables obtenidas nos otorgan una idea más clara del comportamiento de estas subpoblaciones de macrófagos recién descritas.

En este resultado se confirma que cada subpoblación de macrófagos se agrupa independientemente del tratamiento recibido (Figura 24). De manera más precisa se observa al igual que en el dendograma que los controles positivos en cada subpoblación se alejan del resto de las condiciones experimentales. Las dos subpoblaciones más similares en el control positivo son los MDM con los macrófagos CD3⁻. En orden de agrupamiento se observa como los macrófagos CD3⁻ se agrupan cerca de los MDM, estos se agrupan más cercanos a los CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ y a su vez estos junto con los CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻. Las subpoblaciones que tienen una respuesta más similar sin importar el tratamiento son los macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ que se agrupan con los MDM. Mientras que los más diferentes son los macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻ de los CD3⁻.

Estos resultados indican que tanto el CD3 como el tmTNF expresados en estas subpoblaciones además de ser moléculas que las caracterizan fenotípicamente cumplen con una función biológica de activación; ya que son capaces de encender vías de activación de señal, aún no estudiadas, y como resultado de ello inducir un perfil de citocinas específico para cada subpoblación. Lo más interesante es que independientemente del tratamiento utilizado y por ende el

estado de activación de cada subpoblación, estas se agrupan indicando así una compatibilidad entre fenotipo y función, así como la cercanía entre las dos subpoblaciones que expresan el CD3.

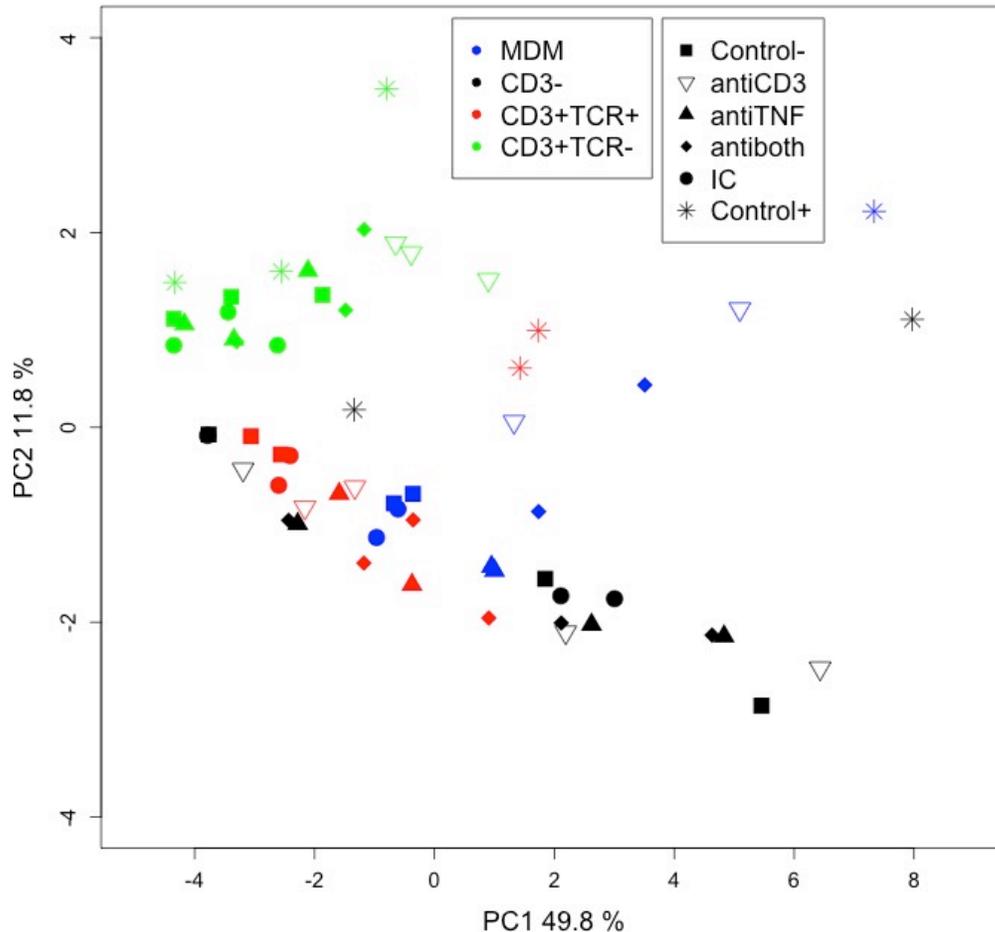


Figura 24. Análisis de Componentes Principales (PCA). Esta gráfica muestra la agrupación de las subpoblaciones de macrófagos bajo estudio con respecto a su producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento ante 6 condiciones experimentales (control negativo, anti-TNF, anti-CD3, ambas [antiboth], un control de isotipo [IC] y un control positivo). Las cuatro subpoblaciones de interés (MDM, macrófagos: $CD3^-$, $CD3^+TCR\alpha\beta^+$, y $CD3^+TCR\alpha\beta^-$) se comportan de manera característica sin importar el tratamiento recibido. n=6.

5. El perfil de citocinas secretado por la vía CD3/tmTNF en macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ y $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ es principalmente pro-inflamatorio

En un análisis específico de algunas de las citocinas de interés, observamos que las 4 subpoblaciones de macrófagos, producen baja cantidad de citocinas

anti-inflamatorias y factores de crecimiento (menos de 5,000 pg/ml). Mientras que las citocinas pro-inflamatorias y algunas quimiocinas se producen en mayor cantidad (por encima de 5,000 pg/ml). La citocina mayormente producida fue la IL-8, en todas las subpoblaciones excepto en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻. De manera contraria, los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ producen de 2 a 3 veces mayor cantidad de MIP-1β que los CD3⁺TCRαβ⁺. Dentro de las quimiocinas MCP-1 fue producida principalmente por los MDM y por los macrófagos CD3⁻.

Para la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺, se observa que principalmente secreta mayor cantidad de IL-6, IL-8, IL-1β e IP-10 siendo 30, 700, 10 y 800 pg/ml mayor para cada una respectivamente que en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁻, ante el co-estímulo CD3/TNF (Figura 25). En particular el incremento de IL-1β es mayor ante el estímulo de tmTNF.

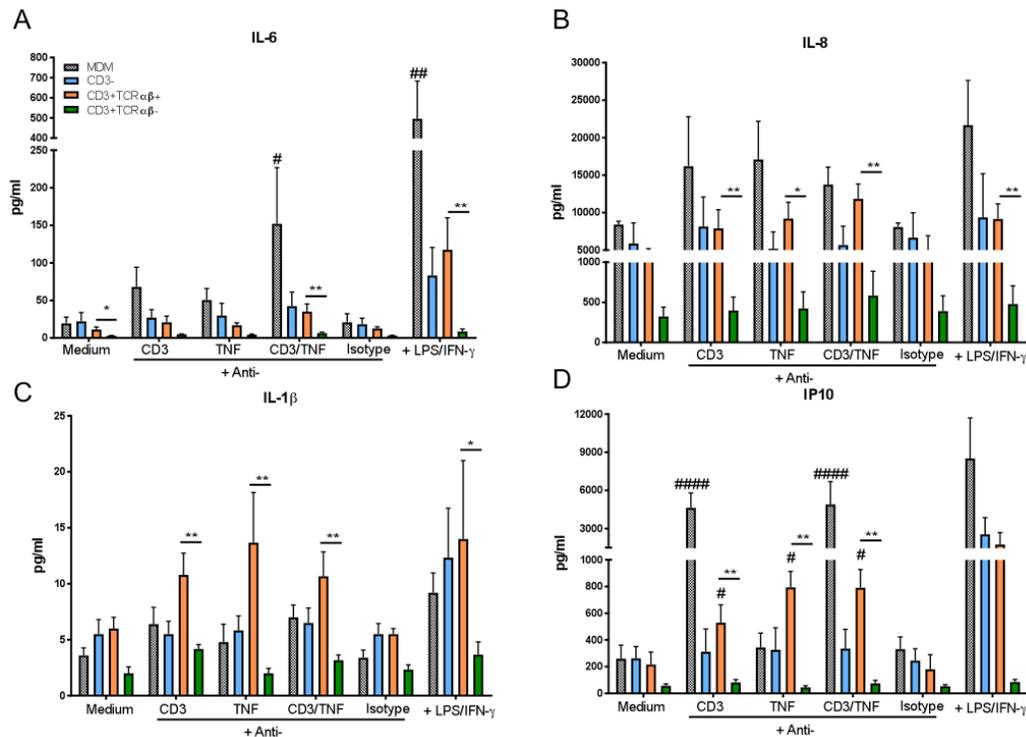


Figura 25. Los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ secretan citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8, IL-1β e IP-10). A. Secreción de IL-6, la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ después de los MDM, es la principal productora de esta citocina ante el co-estímulo CD3/TNF. B. Producción de IL-8, después de los MDM, los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ producen mayor cantidad de esta citocina

con respecto a los $CD3^+TCR\alpha\beta^-$. C. IL-1 β es producida principalmente por los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ y su incremento es mayor ante el estímulo de TNF. D. IP-10 es producido principalmente por $CD3^+TCR\alpha\beta^+$. Datos representados en media \pm error estándar. ANOVA seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. n=4-6. *p<0.05, #p<0.05, **p<0.01, ###p<0.01, ####p<0.0001, (* entre grupos, # con respecto al control basal de cada subpoblación).

Por su parte los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ presentan una mayor producción de las siguientes citocinas pro-inflamatorias: IFN γ , TNF y MIP-1 β . El IFN γ es producido mayoritariamente por los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ con 400 pg/ml más en comparación con los $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ ante el estímulo de CD3 y el co-estímulo CD3/TNF (Figura 26A). El TNF incrementa de 200 a 600 pg/ml comparados con el control basal, ante el estímulo de CD3 (Figura 26B). MIP-1 β , es producida por los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ hasta 500 pg/ml más que en su control basal, cuando se estimula con CD3 o bien CD3/TNF pero no con TNF (Figura 26C).

Ante el estímulo de CD3 se observa un aumento en la secreción de MCP-1/CCL2, en los macrófagos totales, que coincide con lo previamente reportado (13). Además, nuestros datos muestran que este incremento es específico de la subpoblación de macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ (Figura 26D).

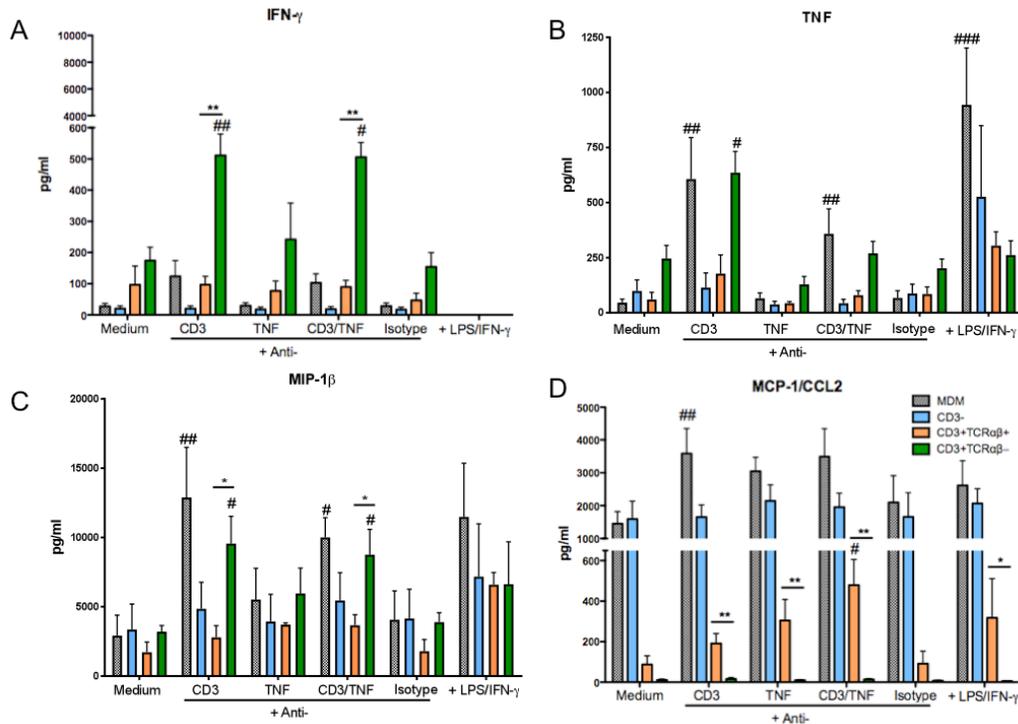


Figura 26. Los macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻ secretan citocinas pro-inflamatorias (IFN γ , TNF, MIP-1 β). A. El IFN γ es producido mayoritariamente por los macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻ en comparación con los CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺. B. El TNF incrementa en los MDM y en la subpoblación CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻, ante el estímulo de CD3. C. MIP-1 β es producida en mayor cantidad por MDM y CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻, ante el estímulo de CD3. D. Los MDM y CD3⁻ producen más MCP-1 bajo todos los estímulos y los macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ incrementan su secreción ante el co-estímulo CD3/TNF. Datos representados en media \pm error estándar. ANOVA seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. n =4-6. *p<0.05, #p<0.05, **p<0.01, ###p<0.01, ####p<0.0001, (* entre grupos, # con respecto al control basal de cada subpoblación).

En el análisis de citocinas anti-inflamatorias se incluyó a: IL1-RA, IL-4 e IL-10. Bajo los diferentes estímulos utilizados, no se observó una diferencia en cuanto a la producción de las citocinas anti-inflamatorias analizadas, ya que son producidas en cantidades bajas y sin variación entre todas las subpoblaciones de macrófagos. Siendo 100 pg/ml para IL1-RA y 2 pg/ml para IL-4 (Figura 27A y B). Los MDM y los macrófagos CD3⁻ producen 30 pg/ml de IL-10, mientras que las subpoblaciones CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ y CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻ producen 5 pg/ml (Figura 27C). Ninguna de las citocinas anti-inflamatorias evaluadas se vio afectada por la vía dependiente de CD3 y TNF.

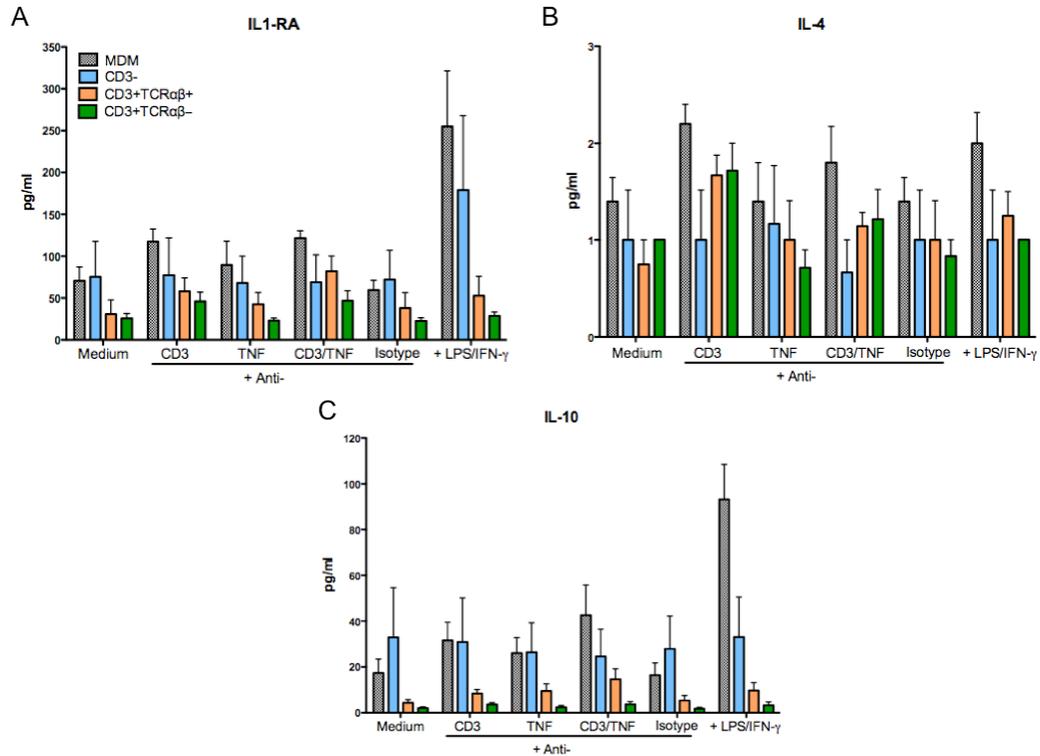


Figura 27. Producción de citocinas anti-inflamatorias (IL1-RA, IL-4 e IL-10) bajo diferentes estímulos en MDM, CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. A. Las subpoblaciones de interés no muestran una diferencia en cuanto a la producción de IL1-RA bajo todos los estímulos. B. IL-4, no presenta diferencias en cuanto a su secreción por las diferentes subpoblaciones. C. La IL-10 es producida en cantidades similares por todas las subpoblaciones de macrófagos. Datos representados en media ± error estándar. ANOVA seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. n =4-6.

6. SOCS3 es expresado en mayor cantidad por macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ que por CD3⁺TCRαβ⁻

El análisis de citocinas pro y anti-inflamatorias muestra que ambas subpoblaciones de interés presentan un perfil pro-inflamatorio. Por ello evaluamos la expresión de SOCS3, cuya expresión se asocia a un perfil de macrófagos M1 (104). Como resultado, se observa una tendencia en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ a incrementar la expresión de SOCS3, comparada con el control negativo (Figura 28). Sin embargo, la dispersión de los datos no permite detectar una diferencia significativa.

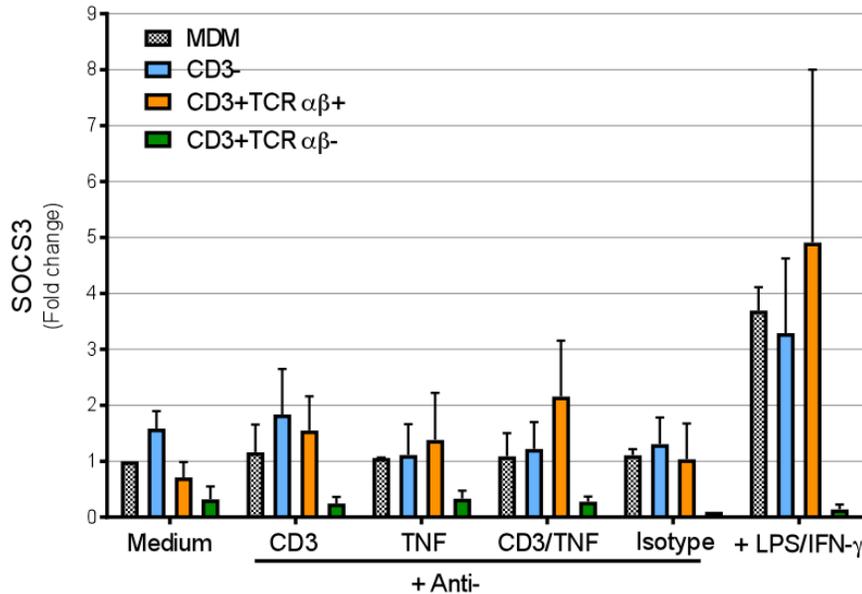


Figura 28. Expresión de SOCS3 por qPCR bajo diferentes estímulos en MDM, CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. La subpoblación parámetro son los MDM sin estímulo. Se observa un incremento en la expresión de SOCS3 de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto al control. Datos representados en media ± error estándar. ANOVA seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. n = 4.

7. Bajo infección con *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y H37Rv se mantiene la frecuencia de macrófagos CD3⁺

El porcentaje de macrófagos CD3⁺ se mantiene igual ante las diferentes condiciones de infección con H37Ra, MOI 1 y MOI 10 (Figura 29A y B) y también con *M. tuberculosis* H37Rv, MOI 1 y MOI 5 (Figura 29A y C). Esto difiere de los reportes en donde se observa que ante la infección con BCG incrementan número de macrófagos CD3⁺ (13).

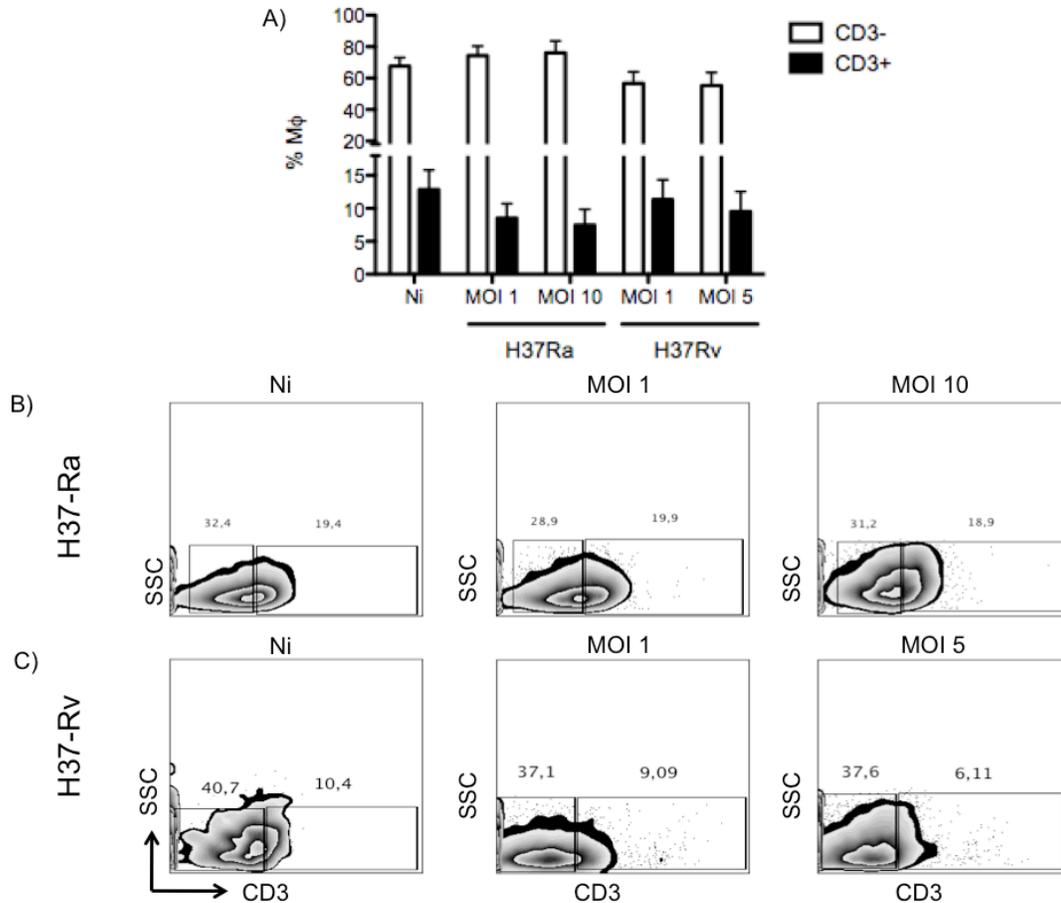


Figura 29. El porcentaje de macrófagos CD3⁺ se mantiene de manera independiente ante la infección con H37Ra y H37Rv. A. Gráfica de porcentaje de macrófagos CD3⁺ bajo las diferentes infecciones con H37Ra (MOI 1 y 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Zebra plot representativo de los macrófagos CD3⁺ ante la infección con H37Ra. C. Zebra plot representativo de los macrófagos CD3⁺ ante la infección con H37Rv. Datos representados en media ± error estándar. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 20, H37Ra n=10, H37Rv n=10.

Con el fin de observar si la infección por diferentes cepas de *M. tuberculosis* modifica la proporción de las subpoblaciones de macrófagos recién descritas. Se procedió a evaluar dentro de los macrófagos CD3⁺ tanto la expresión de TCR $\alpha\beta$ como TCR $\gamma\delta$ (Figura 30). La medición de la expresión del TCR $\gamma\delta$ fue incluida como control. Dentro de los macrófagos CD3⁺ la expresión del TCR $\gamma\delta$ fue menor al 5% al igual que bajo condiciones sin infección (Figura 30A). Se observa que ante la infección por diferentes cepas de *M. tuberculosis* con sus respectivas MOI, la frecuencia de las subpoblaciones de macrófagos de interés no se ven alteradas (Figura 30A-C). Lo anterior sugiere que sólo BCG (13)

induce un incremento en estas poblaciones, quedaría explorar que características o antígenos de esa cepa son los principales responsables de inducir la respuesta inmunológica y por ende incrementar los macrófagos CD3⁺.

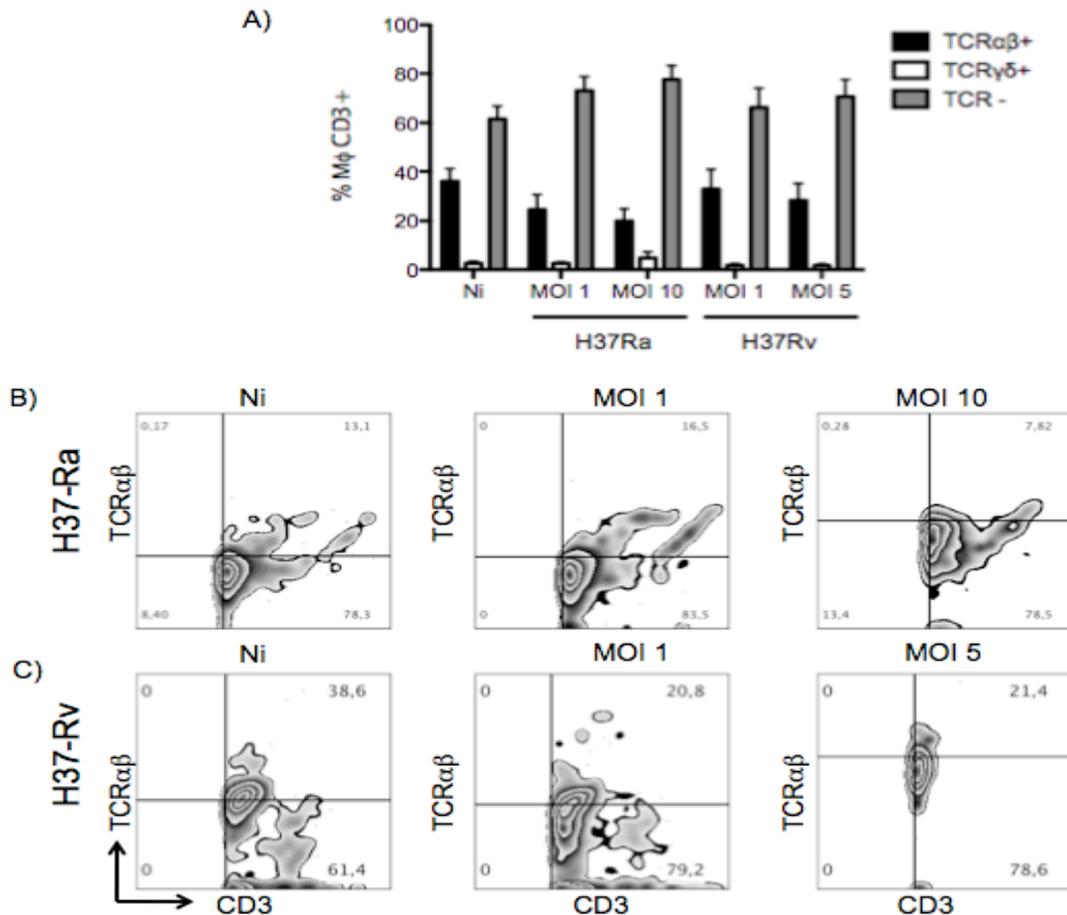


Figura 30. Las frecuencias de subpoblaciones de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ y CD3⁺TCRαβ⁺ se mantiene ante la infección con H37Ra y H37Rv. A. Gráfica del porcentaje de expresión de TCR de las subpoblaciones de macrófagos ante la infección *in vitro* con H37Ra y H37 Rv a las diferentes MOI. B. Zebra plot representativo obtenido por citometría de flujo, a partir de la región positiva para CD3, se evaluó la expresión de TCRαβ. Ante la infección de H37Ra de las subpoblaciones de interés. C. Zebra plot representativo de las subpoblaciones de interés ante la infección con H37Rv. Datos representados en media ± error estándar. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 20, H37Ra n=10, H37Rv n=10.

8. Caracterización de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ y macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ en homeostasis y ante la infección por *Mycobacterium tuberculosis*

Aun cuando la infección con las distintas cepas utilizadas de *Mycobacterium tuberculosis* no afectan la proporción de estas subpoblaciones de macrófagos, recién descritas; realizamos su caracterización fenotípica en homeostasis y en respuesta a la infección por dos cepas de *M. tuberculosis* (H37Ra y H37Rv) *in vitro*.

8.1 Moléculas presentadoras de antígenos lipídicos caracterizan a los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ y disminuyen su expresión ante la infección con H37Rv

Debido a que se ha descrito la presencia de macrófagos CD3⁺ en el granuloma de pacientes con tuberculosis (13), intentamos entender las modificaciones que la micobacteria podría generar en estas subpoblaciones con respecto al fenotipo previamente caracterizado por la Dra. Leslie Chávez Galán, en donde se encontró que la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ mostró un incremento estadísticamente significativo de la expresión de CD1c en homeostasis (151), datos que fueron reproducibles (Figura 31A). Para ello realizamos infecciones *in vitro* con dos cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv; con el fin de tener una aproximación del efecto de la virulencia sobre el fenotipo de nuestras subpoblaciones de interés.

El análisis realizado compara el efecto de la infección por dos cepas de *M. tuberculosis* en cada subpoblación de interés. Sorpresivamente, y comparando las dos cepas de micobacteria encontramos que la infección por la cepa virulenta (H37Rv) disminuye la expresión de CD1c en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺, hasta 8 veces (Figura 31A). Además, dentro de las diferencias entre subpoblaciones, observamos que la infección por H37Ra mostró un incremento en la proporción de la expresión de CD1c, de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a los convencionales (CD3⁻) tanto en condición basal (no infectadas) (60 veces mayor) como ante las diferentes MOI empleadas (70 veces mayor) (Figura 31A).

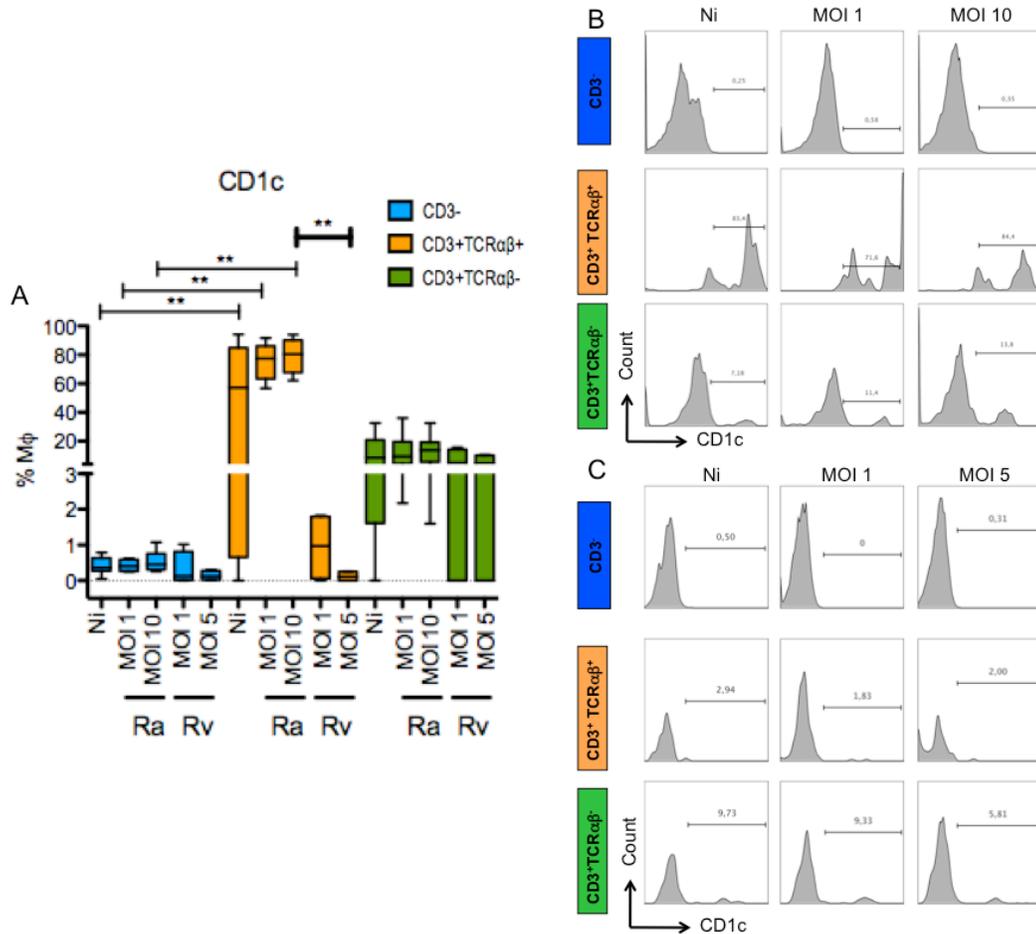


Figura 31. CD1c disminuye su expresión en los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ ante la infección por H37Rv. A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del porcentaje de expresión de CD1c, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD1c a partir de las regiones de macrófagos $CD3^-$, $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ y $CD3^+TCR\alpha\beta^-$. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD1c a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 10, H37Ra n=6, H37Rv n=4. **p<0.01.

Entre las subpoblaciones, observamos que la expresión de CD1d en $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ disminuye su expresión 20 veces, ante la infección por H37Ra con respecto a $CD3^+TCR\alpha\beta^+$. Si bien no encontramos más diferencias estadísticamente significativas, podemos observar la misma tendencia que para CD1c. Es decir, la infección por H37Ra parece incrementar la expresión de CD1d, de los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ con respecto a los convencionales

(CD3⁻). En cuanto al efecto de la expresión de CD1d influido por las distintas cepas, se observa algo similar que en CD1c, que la infección por la cepa virulenta (H37Rv) disminuye la expresión de CD1d en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ aunque la diferencia no fue significativa (Figura 32A).

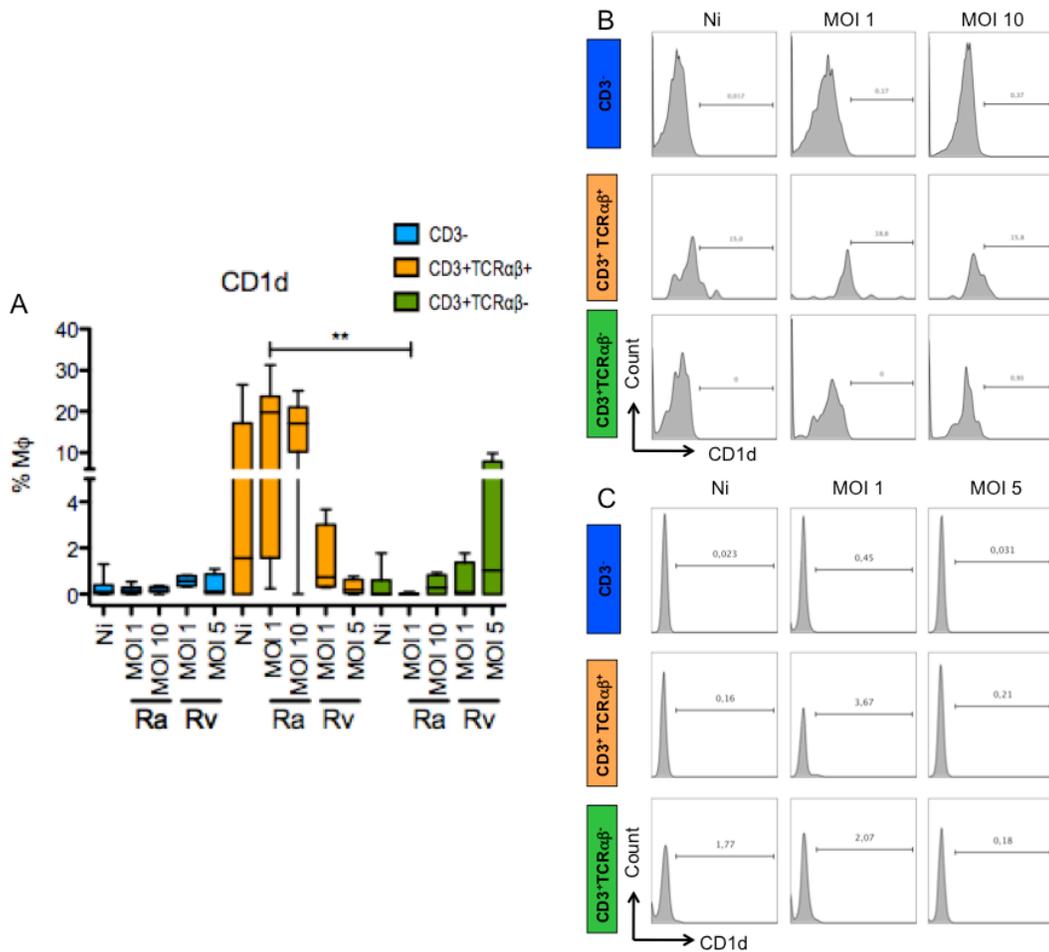


Figura 32. La expresión de CD1d en CD3⁺TCRαβ⁻ disminuye su expresión ante la infección por H37Ra con respecto a CD3⁺TCRαβ⁺. A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del porcentaje de expresión de CD1d, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD1d a partir de las regiones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD1d a partir de las regiones de sub-poblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 10, H37Ra n=6, H37Rv n=4. **p<0.01.

Al igual que para CD1d, entre las subpoblaciones de macrófagos, observamos que la expresión de CD1b en $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ disminuye su expresión 20 veces, ante la infección por H37Ra con respecto a $CD3^+TCR\alpha\beta^+$. No se encontraron mayores diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, podemos observar la misma tendencia que para CD1c y CD1d. Es decir, la infección por H37Ra parece incrementar la expresión de CD1b, de los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ con respecto a los convencionales ($CD3^-$). En cuanto al efecto de la expresión de CD1b influenciado por las distintas cepas, se observa que en $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ hay una tendencia a incrementar CD1b ante la infección con H37Rv (Figura 33A).

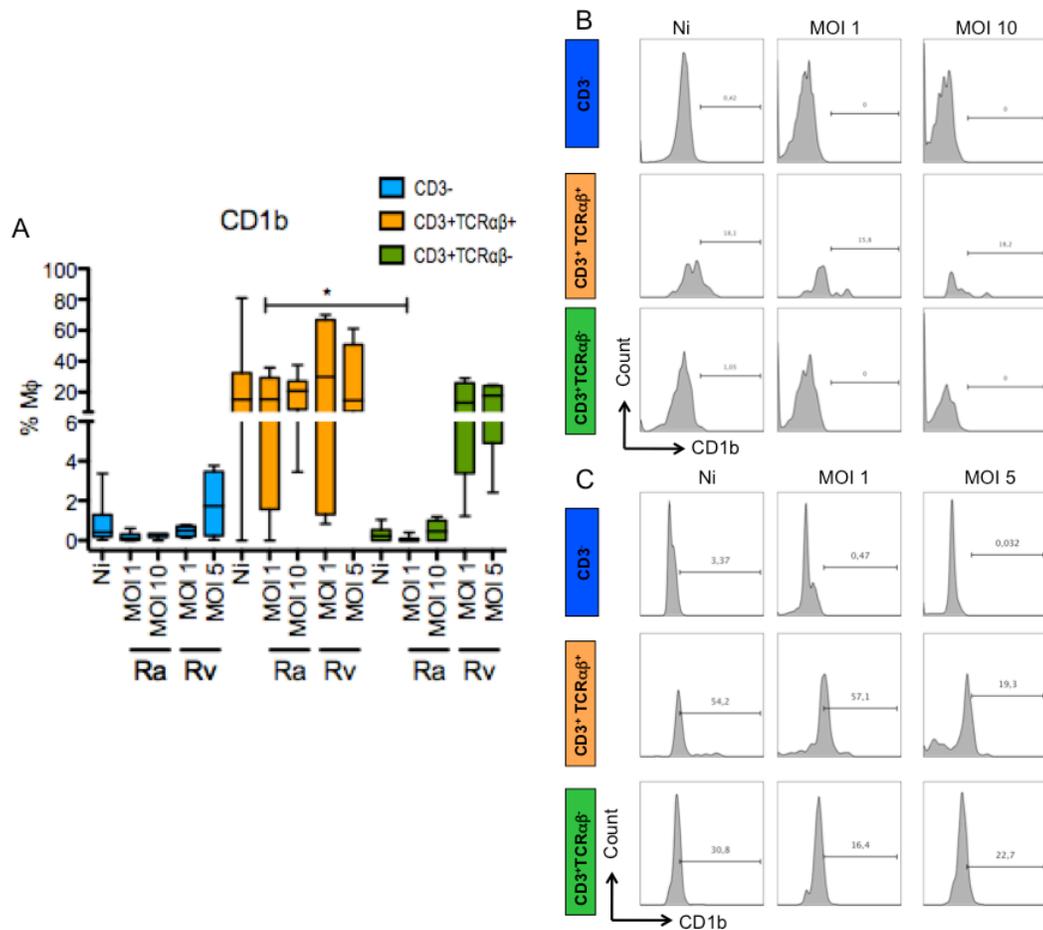


Figura 33. La expresión de CD1b en $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ disminuye su expresión ante la infección por H37Ra con respecto a $CD3^+TCR\alpha\beta^+$. A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del porcentaje de expresión de CD1b, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de

flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD1b a partir de las regiones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD1b a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 10, H37Ra n=6, H37Rv n=4. *p<0.05.

En el caso de CD1a no se observan diferencias, esto puede ser debido al número de repeticiones. Sin embargo, al igual que para CD1c y CD1d, entre las subpoblaciones observamos que la expresión de CD1a ante la infección por H37Ra parece incrementar, de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a los convencionales (CD3⁻). Recordando que la infección por la cepa virulenta (H37Rv), genera una disminución de CD1c en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ y en CD1d se observa esa misma tendencia. En este caso, CD1a también muestra esa tendencia a disminuir en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ infectados con H37Rv (Figura 34A).

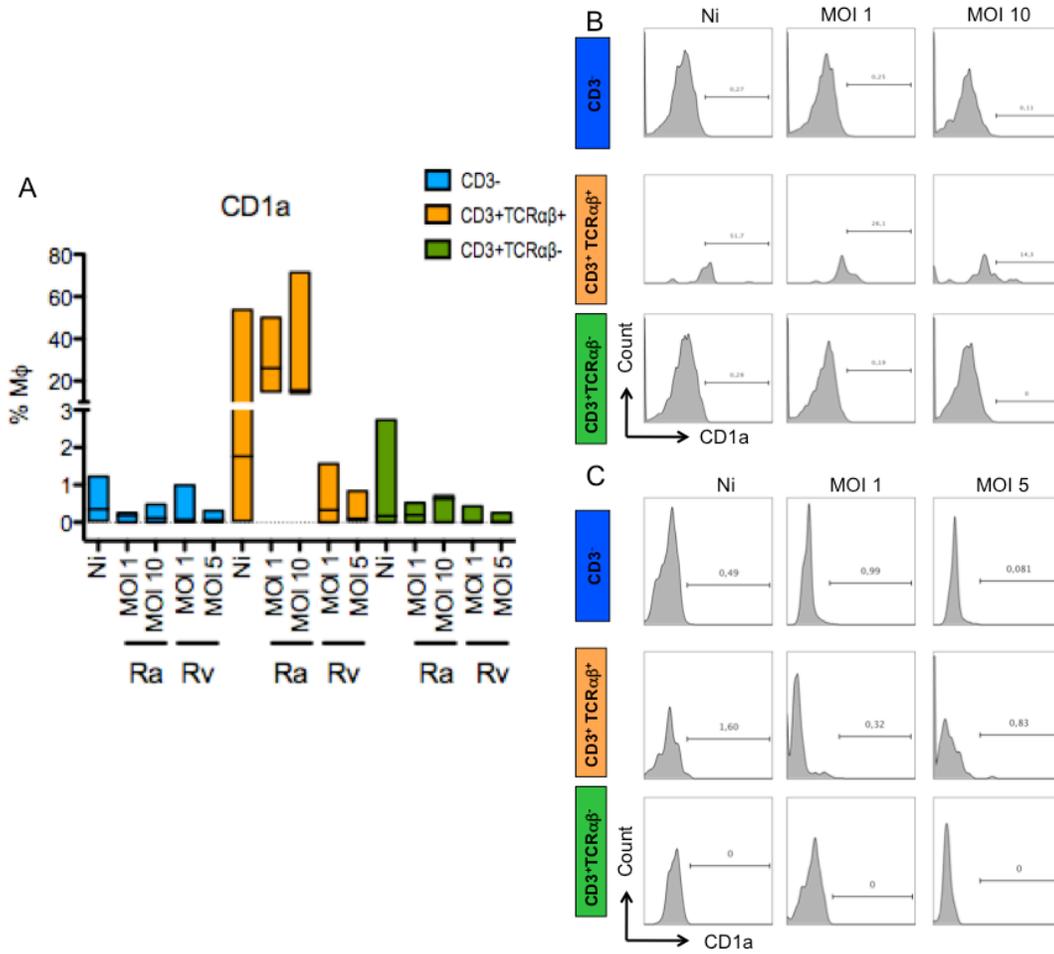


Figura 34. La expresión de CD1a no se ve modificada en las subpoblaciones de interés ante la infección por *M. tuberculosis*. A. Se presenta la mediana (línea) del porcentaje de expresión de CD1a, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD1a a partir de las regiones de macrófagos CD3⁺, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD1a a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 7, H37Ra n=3, H37Rv n=4.

8.2 Para el reclutamiento celular, el receptor CCR4 incrementa su expresión en macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ ante la infección por *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

Debido a que las quimiocinas son relevantes para el reclutamiento celular, evaluamos si estos macrófagos expresan de manera específica algunos receptores para quimiocinas, incluimos: CCR2, CCR4, CCR7 y CXCR1. En homeostasis, los resultados mostraron un incremento en la expresión de un 60% para CCR4, en la subpoblación de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺, al compararlas con las otras dos subpoblaciones CD3⁻ y CD3⁺TCRαβ⁻, donde la expresión de estos receptores fue menor a un 30%. En la subpoblación de macrófagos CD3⁺ que no expresa TCRαβ, la expresión de los receptores de quimiocinas no se incrementó con respecto a esa misma subpoblación en condiciones sin infección. El CCR2 no mostró cambios en las distintas subpoblaciones (Figuras 35-38). De igual manera nos interesó evaluar su modificación con respecto a la infección con *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv.

Los datos muestran que el CCR4 se expresa principalmente en las subpoblaciones CD3⁺ en particular en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ y su expresión incrementó 60 veces, con respecto a los macrófagos convencionales CD3⁻ ante la infección con *M. tuberculosis* H37-Ra. Si bien no se observan diferencias en cuanto a la infección por las cepas de tuberculosis, existe una tendencia a disminuir 50 veces su expresión en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ infectados con H37Rv con respecto a los infectados con H37Ra (Figura 35A).

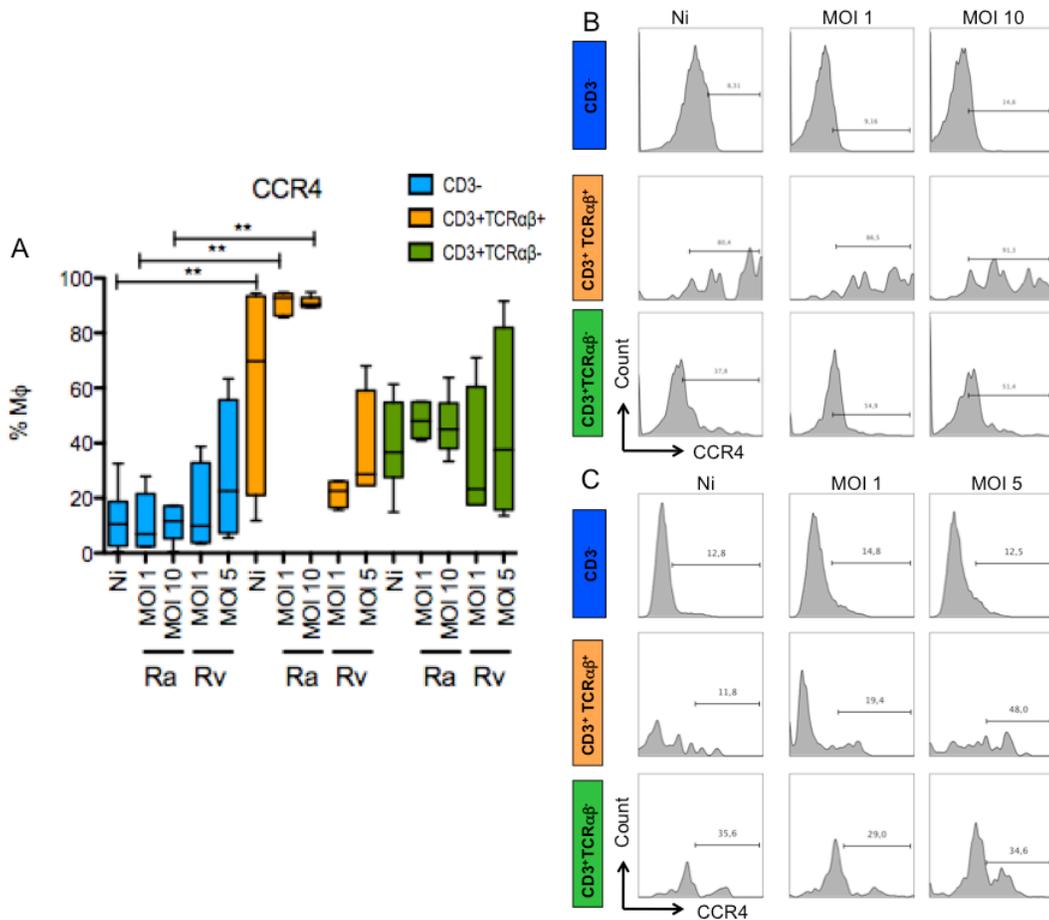


Figura 35. CCR4 incrementa su expresión ante la infección por H37Ra en macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺. A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del porcentaje de expresión de CCR4, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CCR4 a partir de las regiones de macrófagos CD3⁺, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CCR4 a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 10, H37Ra n=6, H37Rv n=4. **p<0.01.

El papel de presentación de antígenos proteicos es crucial para iniciar el proceso de respuesta adaptativa. Para ello los macrófagos necesitan migrar a ganglios y el CCR7 se une a quimiocinas presentes en los ganglios. Ante la infección por H37Rv se observa la tendencia de disminución de este receptor en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a la infección por H37Ra. Es interesante que el incremento observado de CCR4 en macrófagos CD3⁺

TCR $\alpha\beta^+$, con respecto a los macrófagos convencionales CD3 $^-$ ante la infección con *M. tuberculosis* H37Ra, replica la misma tendencia para CCR7, 30 veces más, en CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta^+$ que en macrófagos convencionales (Figura 36A).

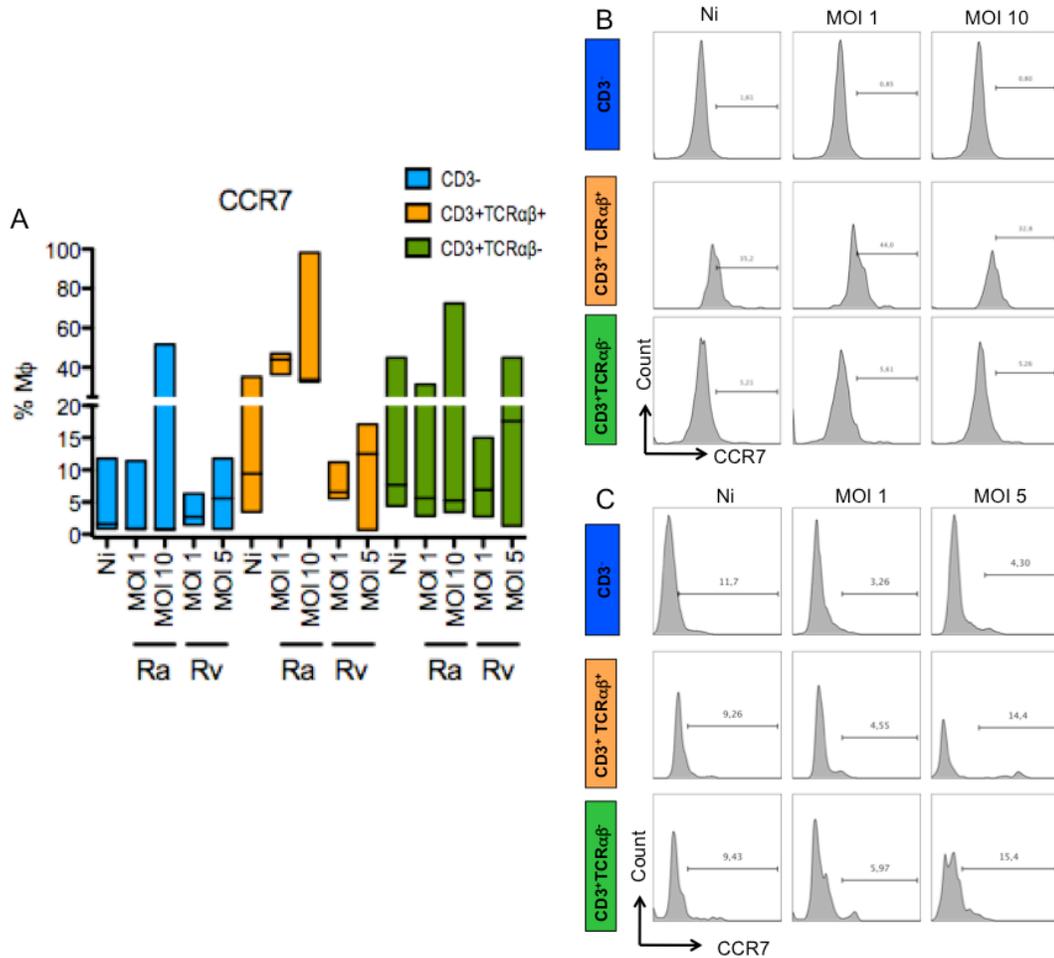


Figura 36. En la subpoblación de macrófagos CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta^+$ el CCR7 presenta una tendencia a disminuir el porcentaje de expresión con la cepa H37Rv mientras que aumenta con H37Ra. A. Se presenta la mediana (línea) del porcentaje de expresión de CCR7, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CCR7 a partir de las regiones de macrófagos CD3 $^-$, CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta^+$ y CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta^-$. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CCR7 a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 7, H37Ra n=3, H37Rv n=4.

El ligando de IL-8, CXCR1 se expresa de manera basal principalmente en los macrófagos CD3⁺. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión de CXCR1. Sin embargo, este receptor presenta la misma tendencia que CCR4 y CCR7. Para los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ infectados con H37Ra se observa un incremento con respecto a los CD3⁻. Ante la infección por H37Rv se observa la misma tendencia que para CCR4 y CCR7; es decir, la disminución, 20 veces, de este receptor en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a la infección por H37Ra (Figura 37A).

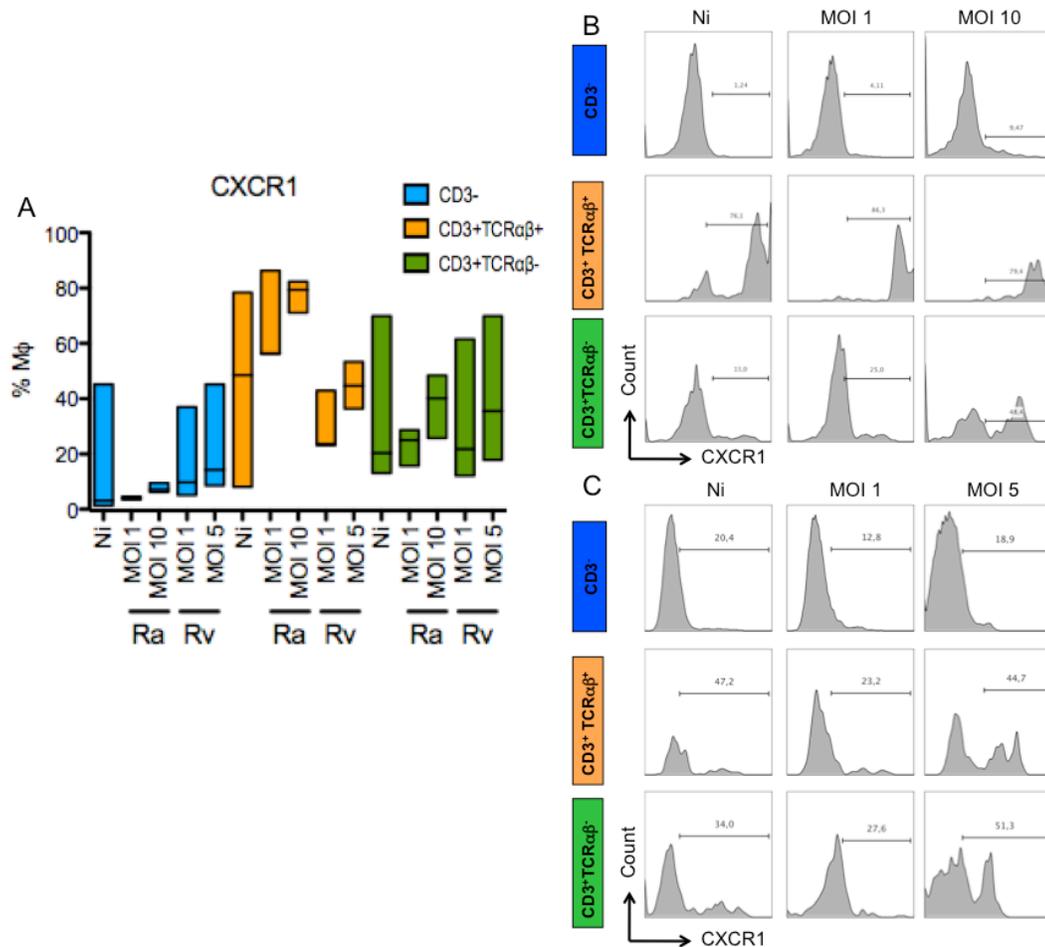


Figura 37. El CXCR1 presenta una tendencia a disminuir el porcentaje de expresión con la cepa H37Rv mientras que aumenta con H37Ra en la subpoblación de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺. A. Se presenta la mediana (línea) del porcentaje de expresión de CXCR1, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CXCR1 a partir de las regiones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻.

C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CXCR1 a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 7, H37Ra n=3, H37Rv n=4.

Los datos muestran que la expresión de CCR2 no varía ante las condiciones de infección con respecto al control no infectado y en ninguna de las dos cepas de *M. tuberculosis* empleadas (Figura 38A). La dispersión de los datos no permite identificar una tendencia estadísticamente significativa. Sin embargo, esto no descarta la función fundamental del CCR2, pues este receptor guía a los macrófagos durante la respuesta inflamatoria ya que es ligando de MCP-1. Además se ha reportado que los antígenos de *M. tuberculosis* modulan esta quimiocina (23).

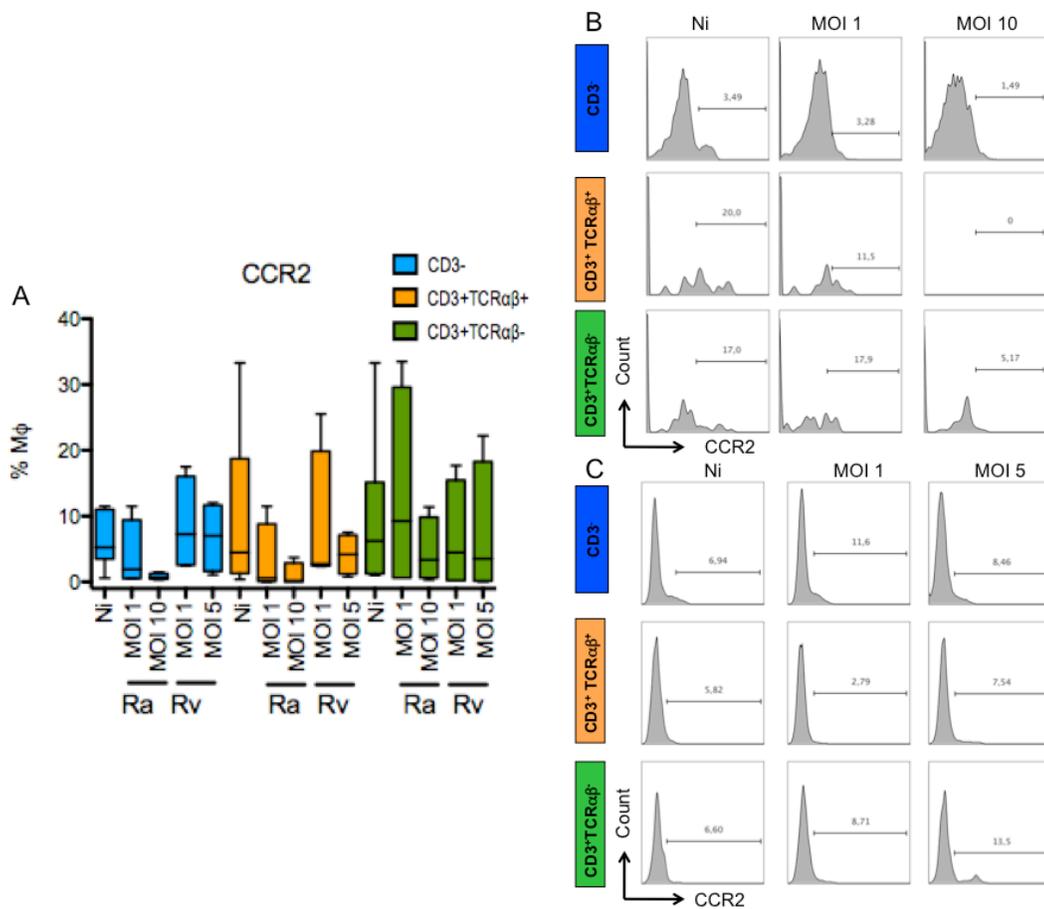


Figura 38. CCR2 no modifica su expresión en las subpoblaciones de macrófagos ante la infección por *M. tuberculosis*. A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del

porcentaje de expresión de CCR2, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CCR2 a partir de las regiones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CCR2 a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 8, H37Ra n=4, H37Rv n=4.

8.3 La infección por *M. tuberculosis* H37-Rv disminuye la expresión de CD16 en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺

Siendo CD16 un receptor clásico de fagocitosis y marcador de inflamación, evaluamos si su expresión se modificaba ante la infección por *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv. De manera interesante y comparando las dos cepas de micobacteria, encontramos que la infección por la cepa virulenta (H37Rv) disminuye la expresión de CD16 en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺, hasta 7 veces, comparada con la infección por H37Ra. Además, dentro de las diferencias entre subpoblaciones, observamos que la infección por H37Ra mostró un incremento (11 veces) en la expresión de CD16, de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a los convencionales (CD3⁻) ante las diferentes MOI empleadas (Figura 39A).

Estos datos son relevantes debido al papel de CD16 en inducir la capacidad fagocítica de los macrófagos de partículas opsonizadas. Por lo que estos datos sugieren que la función fagocítica, característica por excelencia de macrófagos, sería un campo interesante de analizar para poder determinar el papel de estas recién descritas subpoblaciones en la función fagocítica ante la infección por *M. tuberculosis*.

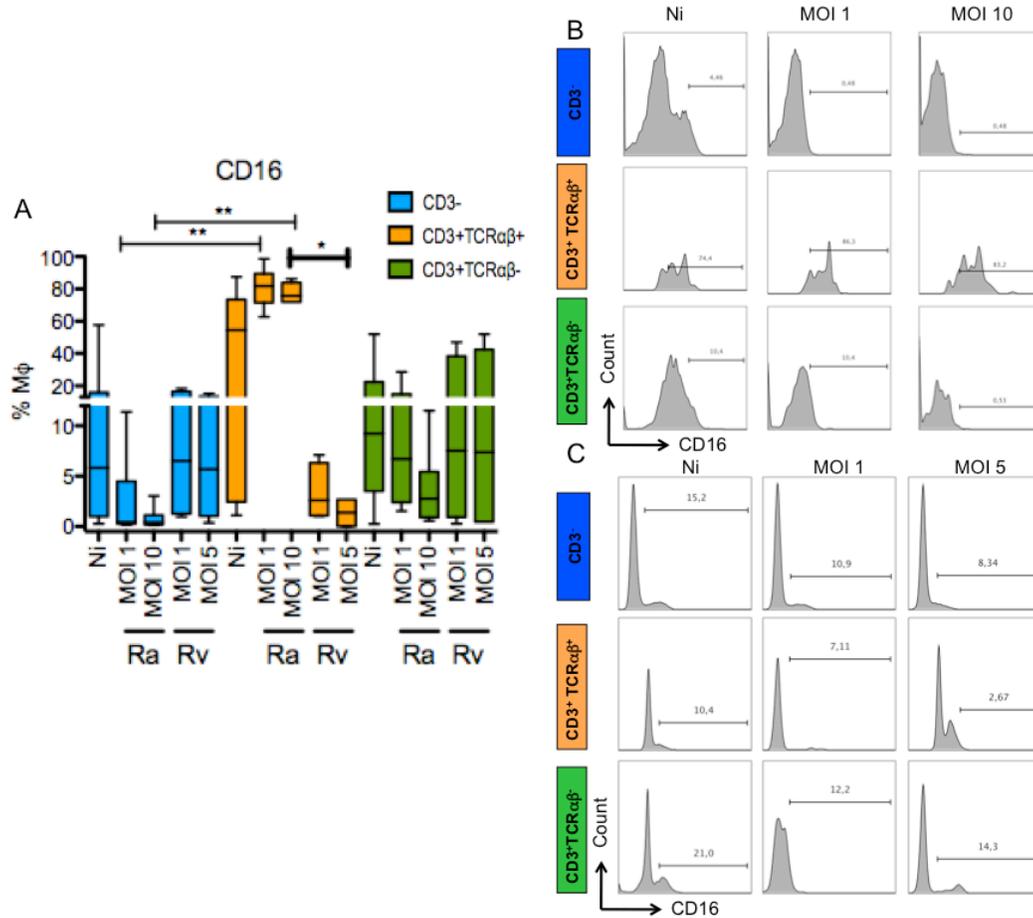


Figura 39. La infección con *M. tuberculosis* H37Rv disminuye la expresión de CD16 en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺. A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del porcentaje de expresión de CD16, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD16 a partir de las regiones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas CD16 a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 10, H37Ra n=6, H37Rv n=4. *p<0.05, **p<0.01.

9. El tmTNF se expresa en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ y no se modifica ante la infección con *M. tuberculosis* H37Ra ni H37Rv

En humano se han descrito macrófagos TCR⁺, cuya presencia depende del TNF (13). Además, la forma membranal del TNF (tmTNF) es capaz de activar

vías de señalización mediante retro-señalización y juega un papel importante para inducir la activación funcional en células de origen mieloide. Por lo que en particular nos interesó evaluar si la expresión del tmTNF, precursor del TNF soluble, se ve modificado en macrófagos humanos ante un modelo de infección *in vitro* por *M. tuberculosis*.

Con el precedente que esta molécula se expresa a nivel basal únicamente en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ evaluamos si era modificada durante la infección con dos cepas de *M. tuberculosis*. Contrario a lo que esperamos, la expresión del tmTNF no se vio modificada ante la infección con ambas cepas de *M. tuberculosis* (Figura 40A).

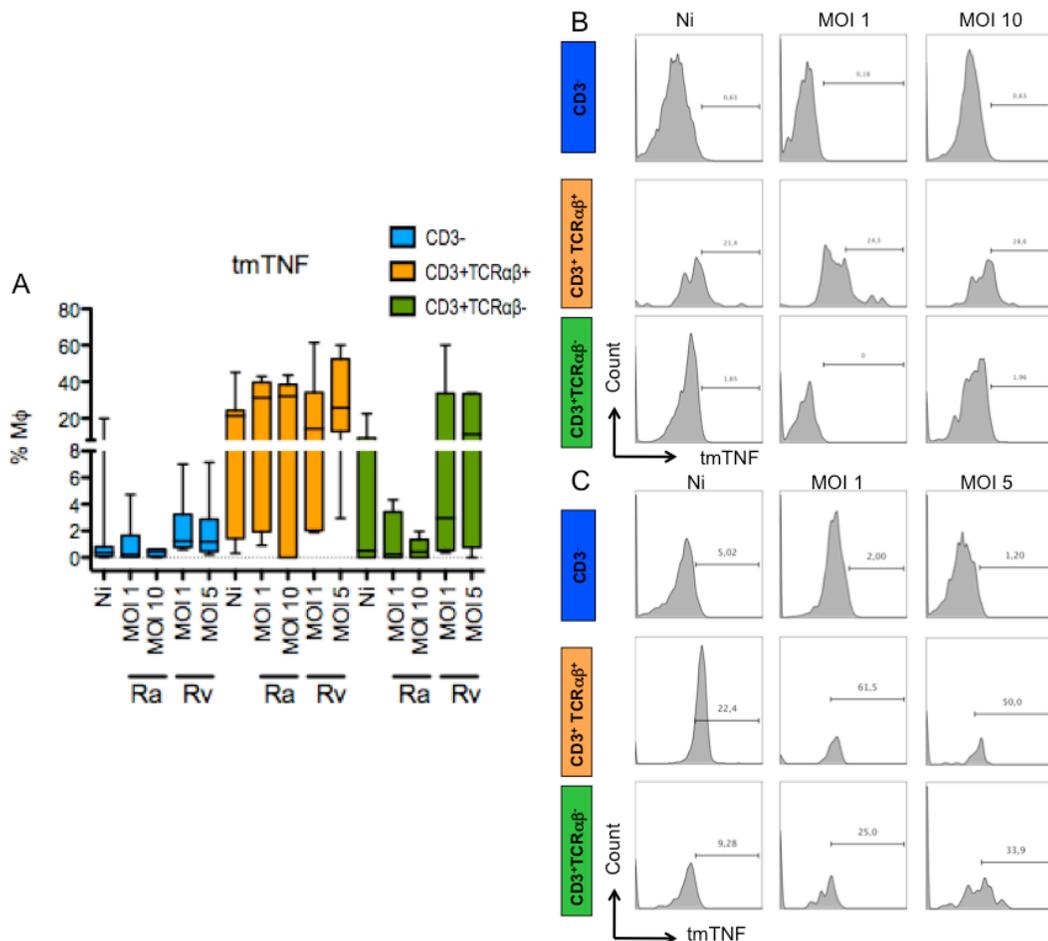


Figura 40. La expresión del tmTNF no se modifica ante la infección por *M. tuberculosis* .

A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del porcentaje de expresión de tmTNF, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por

H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas tmTNF a partir de las regiones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas tmTNF a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 12, H37Ra n=6, H37Rv n=6.

10. Los receptores de TNF se expresan diferencialmente en las subpoblaciones de macrófagos humanos CD3⁺ y se ven modificados ante la infección por las cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv

El papel del TNF es crucial ante la infección por micobacterias y existen dos receptores por los cuales el TNF o su forma transmembranal puede señalar. Nuestros resultados muestran una tendencia de mayor expresión (3 veces) del TNFR1 en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ que en las otras subpoblaciones de macrófagos. Ante la infección con H37Ra se muestra un incremento estadísticamente significativo (20 veces), de la expresión de este receptor para la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁻ con respecto CD3⁺TCRαβ⁺ (Figura 41A).

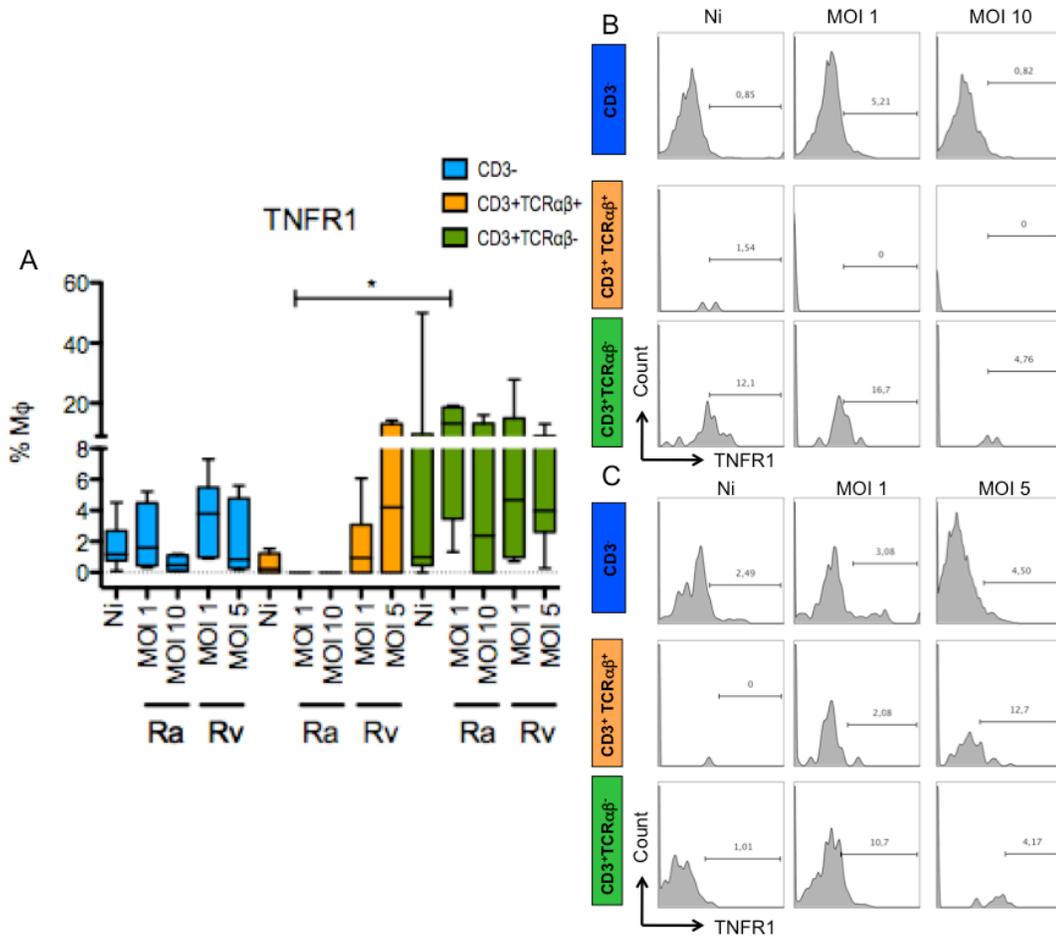


Figura 41. Los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ incrementan la expresión del TNFR1 ante la infección con H37Ra. A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del porcentaje de expresión de TNFR1, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas TNFR1 a partir de las regiones de macrófagos CD3⁺, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas TNFR1 a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 10, H37Ra n=4, H37Rv n=6. *p<0.05.

Mientras que el TNFR2 se expresa principalmente en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ y tiene la tendencia de incrementar su expresión de manera MOI dependiente ante la infección por las dos cepas de *M. tuberculosis*. La diferencia estadísticamente significativa que se encontró fue el incremento 8 veces del TNFR2 en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a los

macrófagos CD3⁻, ante la infección con H37Rv. Este receptor también se expresa pero en menor proporción en los CD3⁺TCRαβ⁻ (Figura 42A).

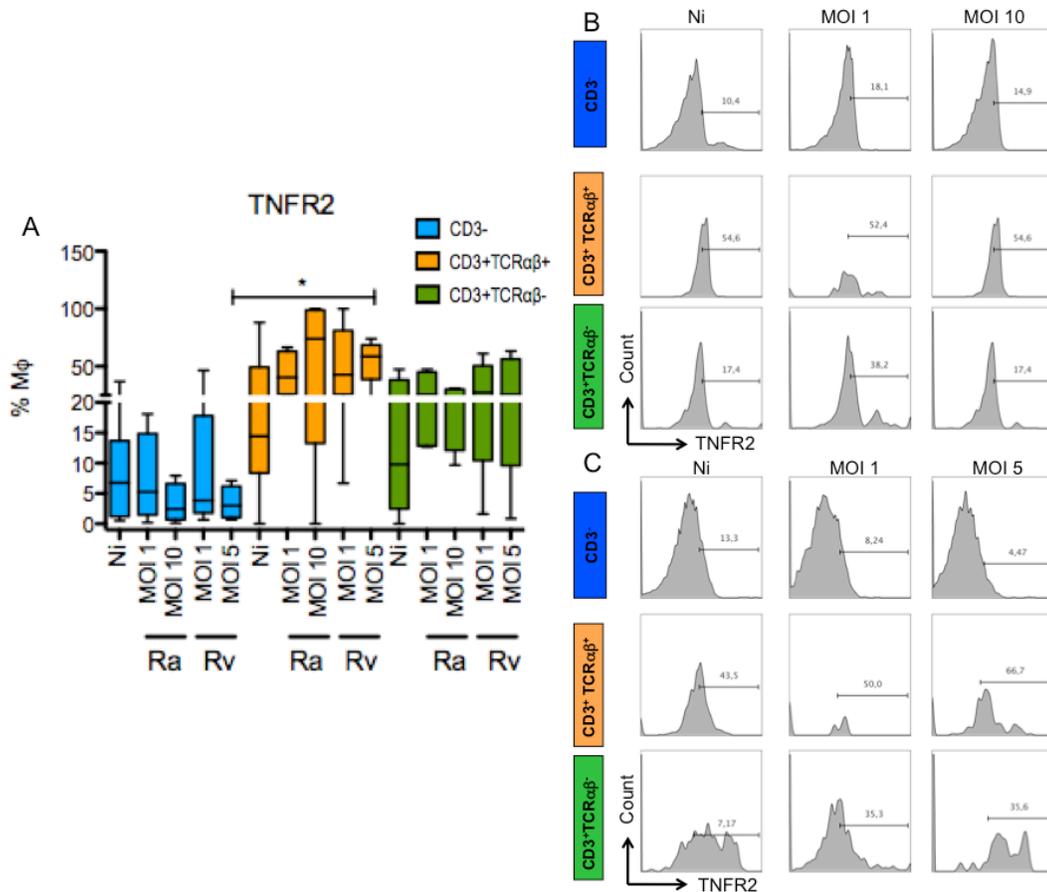


Figura 42. Los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ incrementan la expresión del TNFR2, con respecto a los macrófagos convencionales ante la infección con H37Rv. A. Gráfica de caja y bigote, se presenta la mediana del porcentaje de expresión de TNFR2, mínimo y máximo en las diferentes subpoblaciones de macrófagos ante la infección con H37Ra (MOI 1 y MOI 10) y H37Rv (MOI 1 y MOI 5). B. Histograma representativo de la infección por H37Ra, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas TNFR2 a partir de las regiones de macrófagos CD3⁻, CD3⁺TCRαβ⁺ y CD3⁺TCRαβ⁻. C. Histograma representativo de la infección por H37Rv, obtenido por citometría de flujo, se muestra el porcentaje de expresión de las moléculas TNFR2 a partir de las regiones de subpoblaciones de macrófagos de interés. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. No infectado (Ni) n= 10, H37Ra n=4, H37Rv n=6. *p<0.05.

11. En resumen ¿qué sucede ante la infección por *M. tuberculosis* en estas subpoblaciones de macrófagos?

En un esfuerzo por sintetizar todos los resultados obtenidos en los experimentos de infección para la caracterización de las subpoblaciones, poco estudiadas pero de importancia biológica en la infección por *M. tuberculosis*. En la Tabla 3 se muestran los cambios estadísticamente significativos de las moléculas de superficie estudiadas en las tres subpoblaciones de interés ($CD3^-$, $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ y $CD3^+TCR\alpha\beta^-$) con respecto a la infección por las cepas de *M. tuberculosis* (H37Ra y H37Rv), así como la comparación entre ellas.

Tabla 3 . de resultados de caracterización de sub-poblaciones de macrófagos ante la infección por <i>M. Tuberculosis</i>								
Infection	H37Ra			H37Rv			H37Ra vs. H37Rv	
Sub-population	CD3-	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁻	CD3-	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁻	Sub-population	Change
tmTNF	=	=	=	=	=	=		
TNFR1	=	=	+	=	=	=		
TNFR2	=	=	=	=	+	=		
CD1c	=	++	=	=	=	=	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺	-
CD1d	=	=	--	=	=	=		
CD1b	=	=	-	=	=	=		
CD1a	=	=	=	=	=	=		
CCR2	=	=	=	=	=	=		
CCR4	=	++	=	=	=	=		
CCR7	=	=	=	=	=	=		
CXCR1	=	=	=	=	=	=		
CD16	=	++	=	=	=	=	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺	-

Tabla 3. Síntesis de resultados de caracterización de subpoblaciones de macrófagos ante la infección por *M. Tuberculosis*. Se muestran las moléculas evaluadas en la superficie de las tres subpoblaciones de macrófagos de interés. Los resultados que mostraron diferencia estadísticamente significativa en aumento: + *p<0.05, ++ **p<0.01 (azul), disminución: - *p<0.05, - - **p<0.01 (rojo), sin cambio: =. En la última columna se compara la infección de H37Ra vs. H37Rv por lo que en resumen las únicas moléculas que se ven modificadas dependientes de la cepa son CD1c y CD16 ambas disminuyen ante la infección de H37Rv en la subpoblación $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ con respecto a H37Ra.

12. El TNF es la única citocina que se incrementa en los MDM por la infección de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*

Debido al papel fundamental que juegan las citocinas para el reclutamiento, activación y señalización celular, evaluamos los niveles de las citocinas proinflamatorias principales durante el proceso de infección por *M. tuberculosis* como lo son: TNF, IFN γ , la quimiocina IP10, la quimiocina MCP-1 y sCD14 como molécula de liberación estimuladora de TLRs. Los resultados muestran que el TNF incrementa de manera dependiente de la MOI ante la infección con H37Rv (Figura 43A). Aunque el IFN γ no muestra un incremento estadísticamente significativo se observa una tendencia a la alza (3 veces más) en respuesta a la infección con H37Rv (Figura 43B). La producción de IP10 fue similar (alrededor de 400 pg/ml) entre los MDM no infectados y las dos cepas utilizadas para la infección por *M. tuberculosis* (Figura 43C). Para MCP-1 se observa una tendencia de incrementar ante la infección con H37Rv a una MOI baja (Figura 43D). El sCD14 parece liberarse de manera similar al control que en los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* (Figura 43E).

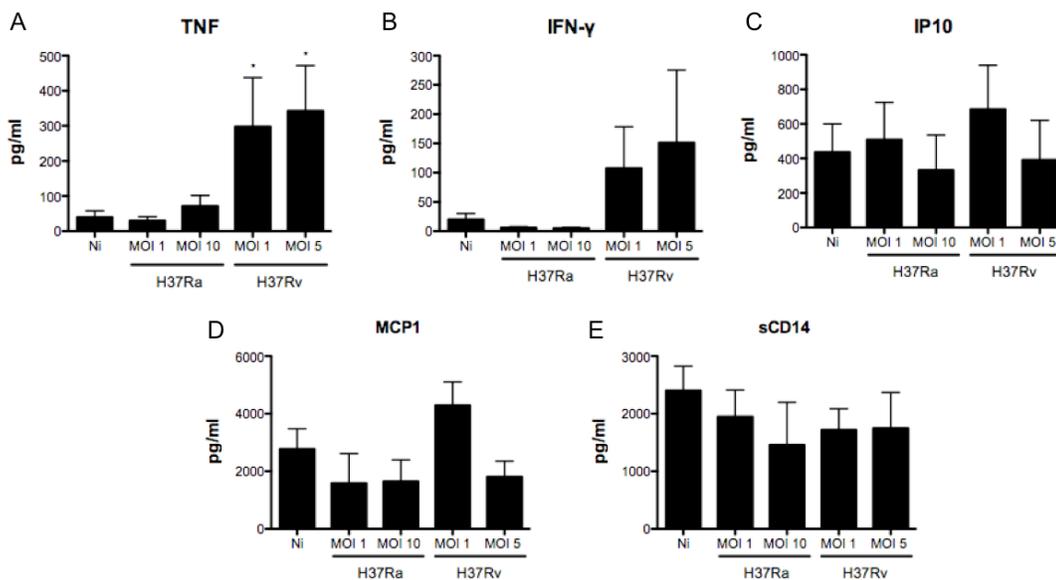


Figura 43. El TNF es la única citocina que se incrementa ante la infección de los MDM por la infección por H37Rv. A. Producción de TNF (pg/ml) por MDM ante la infección por H37Ra y H37Rv. B. Producción de IFN γ (pg/ml) por MDM ante la infección por H37Ra y H37Rv.

C. Producción de IP10 (pg/ml) por MDM ante la infección por H37Ra y H37Rv. D. Producción de MCP1 (pg/ml) por MDM ante la infección por H37Ra y H37Rv. E. Producción de sCD14 (pg/ml) por MDM ante la infección por H37Ra y H37Rv. Datos representados en media \pm error estándar. Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post hoc* Dunn's. TNF: No infectado (Ni) n= 13, H37Ra n=8, H37Rv n=5. IFN γ : Ni n= 11, H37Ra n=8, H37Rv n=5. IP10: Ni n= 12, H37Ra n=5, H37Rv n=6. sCD14: Ni n= 12, H37Ra n=8, H37Rv n=6. *p<0.05.

VIII Discusión

Usualmente el TCR, receptor inmune variable, se consideraba restringido para células de origen linfoide. Sin embargo, trabajos previos han descrito la presencia de este receptor fuera del linaje linfoide. Varios trabajos muestran la expresión de un receptor con recombinación en células de origen mieloides incluyendo: neutrófilos (14), eosinófilos (15) y macrófagos (13) en homeostasis y también en el microambiente tumoral (16) o ante la infección por *M. tuberculosis* (149) o bien ante patologías como aterosclerosis (17). En estos trabajos se describe la presencia de las poblaciones mieloides TCR⁺, pero la caracterización fenotípica y funcional de estas células mieloides portadoras de TCR no es estudiada. En este proyecto se describe a estas subpoblaciones en homeostasis y ante la infección por dos cepas de *M. tuberculosis*.

Lo anterior, sugiere un concepto extendido de la respuesta variable en cuanto la expresión de receptores tipo TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ en cuatro poblaciones de origen mieloides: neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos. Este reconocimiento flexible fuera del linaje linfoide tiene implicaciones en el pensamiento actual acerca del funcionamiento de la inmunidad innata y adaptativa.

En cuanto al aspecto evolutivo de este fenómeno biológico y su significancia; es necesario recordar que los receptores inmunes recombinados evolucionaron en precursores comunes mieloides-linfoide, antes de la divergencia entre estos dos linajes. También puede ser que el reconocimiento inmune flexible emergió de manera ancestral en los fagocitos mieloides y fue subsecuentemente transferida al linaje linfocítico. Es probable que los receptores flexibles hayan

ocurrido en una fase más temprana evolutivamente que lo que se ha considerado (154).

Debido a lo controversial de este hallazgo, utilizamos diferentes técnicas para detectar la presencia de este receptor tipo TCR en macrófagos, como había sido reportado previamente (13). Así como se reportó (151), los experimentos realizados pudieron replicar los resultados previamente obtenidos por la Dra. Leslie Chávez Galán, en donde macrófagos expresan el complejo CD3. Como control se utilizaron marcadores no presentes en linfocitos como: CD14, CD68, CD11b, HLA-DR, CD80 y CD86. Los datos de citometría, previamente obtenidos por la Dra. Leslie Chávez Galán, fueron reforzados mediante microscopía confocal en donde observamos la morfología clásica de los macrófagos, y la expresión del receptor de manosa (MMR/CD206) sobre estas células CD3⁺. Además a nivel de mRNA, los macrófagos CD3⁺ expresan tanto la cadena del CD3 ϵ como la cadena TCR β . Lo cual podría sugerir un estado transicional en el proceso de macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁻ a CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺. En esta última subpoblación, el complejo TCR se expresa completo como proteína en membrana.

La presencia de receptores tipo TCR en fagocitos es evidencia de una base molecular para un reconocimiento inmune flexible extra-linfocítico. Lo anterior también amplía la significancia fisiológica de la defensa basada en este receptor. Sugiere que las funciones biológicas en células del sistema inmunológico pueden co-existir; los fagocitos TCR⁺ tendrán capacidad fagocítica y reconocimiento inmune flexible. Lo cual, sugiere un puente molecular entre la inmunidad innata y adaptativa que hasta la fecha ha sido muy poco explorado.

Al parecer este puente molecular podría tener un papel crucial y específico en la respuesta a diversas enfermedades crónicas inflamatorias incluyendo la tuberculosis (149), la aterosclerosis (17) y el cáncer (16). En las primeras dos, el papel de los antígenos de carácter lipídico, como es el caso de los componentes de la pared celular de la micobacteria (LAM) y en las placas de núcleos lipídicos conformados también por macrófagos espumosos; el factor

común en ambas patologías es la gran cantidad de antígenos lipídicos y el alto porcentaje de macrófagos TCR⁺.

Con el fin de completar la caracterización fenotípica de estas recién reportadas subpoblaciones de macrófagos y corroborar la reproducibilidad de los datos previamente obtenidos por la Dra. Leslie Chávez Galán (151) se evaluaron moléculas de superficie características de las funciones de presentación de antígeno de macrófagos (HLA, CD1), moléculas fagocíticas (CD16) y se incluyeron también receptores de quimiocinas relacionados al panel de producción de citocinas por Multiplex (CCR2, CR4, CCR7 y CXCR1). Esto con el fin de evaluar el posible rol de estas subpoblaciones en homeostasis y ante la infección con dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra y H37Rv).

Debido a los mecanismos de evasión del sistema inmune por la micobacteria (155), y de acuerdo a los datos previamente reportados en donde la infección por BCG incrementa la proporción de células mieloides CD3⁺ en el modelo de ratón (149), esperábamos un incremento en estas subpoblaciones de macrófagos humanos ante la infección *in vitro* con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*. Pues las características de atenuación de esta cepa sugieren que el sistema inmune, en este caso los macrófagos, podrán montar una respuesta eficiente para la eliminación de la misma.

Reportes previos en donde se observa que los macrófagos TCR $\alpha\beta$ ⁺ juegan un papel importante al menos en el contacto de la zona del granuloma para contener la infección (13); sugieren que la proporción de estos macrófagos incrementa ante la infección. Sin embargo, ante la cepa virulenta H37Rv, no observamos *in vitro* un incremento en la proporción de macrófagos CD3⁺. Contrario a lo esperado, en ninguna de las dos cepas utilizadas para la infección, observamos diferencias significativas en cuanto a la proporción de macrófagos CD3⁺. Indicando que *in vitro* no se reproducen los mismos fenómenos observados *in vivo* (13) o ante la infección por BCG en modelo de ratón (149). Lo anterior sugiere una respuesta inmune distinta para la infección por cada cepa de *M. tuberculosis*. Sin embargo, la infección por *M. tuberculosis*

sí afecto el fenotipo de estas subpoblaciones de macrófagos al menos en algunas de las moléculas evaluadas en este trabajo.

En homeostasis, corroboramos los resultados de la Dra. Leslie Chávez Galán, que existe una mayor frecuencia de CD1c en el porcentaje de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a las otras subpoblaciones; lo cual sugiere un papel importante en la presentación de antígenos de origen lipídico. Se ha demostrado que la presencia de los macrófagos TCRαβ⁺ se incrementa con la infección por BCG (13) y la pared celular de *M. tuberculosis* contiene gran cantidad de moléculas lipídicas; por lo que esta subpoblación puede ser crucial para la degradación y subsecuente presentación antigénica de estos compuestos.

Hasta el momento, no es claro a través de qué mecanismos, los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ degradan a la micobacteria al unirse a sus lípidos de la pared bacteriana, como LAM. Además, con respecto a la importancia de esta subpoblación en presencia de antígenos lipídicos, se reportó que los macrófagos TCRαβ⁺, son abundantes en las arterias de pacientes con aterosclerosis grave (17).

Poniendo en contexto los datos obtenidos a partir de las infecciones *in vitro* de macrófagos humanos con las cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv. Para el grupo de CD1, únicamente se vio afectada la expresión de CD1c con respecto a la cepa virulenta, la cual disminuye ante con la infección de H37Rv en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a H37Ra. Mientras que ante la infección por H37Ra CD1c incrementó en los CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a los macrófagos convencionales CD3⁻. Se conoce poco acerca del potencial de los macrófagos para modificar la estructura covalente de los antígenos lipídicos de la micobacteria. Sin embargo se sabe que estos pueden ser presentados a los linfocitos T a través de las moléculas CD1 (156). Por lo que la disminución de su frecuencia ante una cepa virulenta sugiere una menor capacidad de presentación lipídica. Mientras que el incremento ante H37Ra indica una mayor capacidad de presentación.

De manera contraria, CD1d y CD1b disminuyen su expresión en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁻, ante la infección con H37Ra. Se ha descrito el transporte de los antígenos de lipoglicano a través del MMR hacia los endosomas a través de la presentación de antígeno mediante CD1b (157), por lo que la disminución en la frecuencia de CD1b, podría deberse a un mecanismo de evasión de estas cepas para su degradación.

Por su parte, la expresión de receptores de quimiocinas sugiere un papel importante de estas subpoblaciones de macrófagos CD3⁺ para el “homing”, migración y reclutamiento de células efectoras, durante la respuesta pro-inflamatoria. Los macrófagos TCRαβ⁺ se encuentran en la zona interna del granuloma ante la infección por *M. tuberculosis* (13), en donde el ambiente es principalmente pro-inflamatorio. Al evaluar la modulación de estos receptores ante la infección por *M. tuberculosis*, se obtiene información indirecta acerca de su reclutamiento, permanencia o migración celular.

Los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺, presentan de manera basal, mayor expresión de CCR4 con respecto a las otras subpoblaciones. El receptor CCR4 tiene como ligando a MCP-1 (CCL2), el cual es la principal proteína quimio-atrayente para monocitos (158). MCP-1 es principalmente producida por células el músculo liso, epitelio y endotelio (76) en las vías respiratorias ante un contexto de infección. En el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar o sistémica se han reportado incrementos en los niveles MCP-1 (159). También, CCR4 es ligando para CCL22 que es una quimiocina secretada por macrófagos y CCL4 (MIP-1) proteína inflamatoria. Las cuales al interactuar con su ligando, podrían incrementar el reclutamiento de estas células al sitio de infección y así se retroalimentaría de manera positiva la respuesta pro-inflamatoria. La modulación de CCR4 ante la infección, fue analizada mediante experimentos *in vitro* en donde se observa que incrementa la expresión de CCR4 en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ ante la infección por H37Ra, sugiriendo que la migración de estos macrófagos es inducida ante un estímulo antigénico. El CCR4 se caracteriza por expresarse en linfocitos T CD4⁺ y por promover su migración a sitios de infección (160). Por lo que estas subpoblaciones TCR⁺

parecen mantener las características de linfocitos T en cuanto a su expresión de receptores y respuesta ante la infección con *M. tuberculosis*.

Con respecto a CCR7, esta molécula tiene como ligando a CCL19 y CCL21, también conocidas como quimiocinas homeostáticas, las que juegan un papel importante en el tráfico de linfocitos a los órganos linfoides secundarios. Sin embargo, en un reporte de aterosclerosis, muestran que la expresión de CCR7 incrementa cuando monocitos THP-1 son diferenciados a macrófagos. Además, muestran que la presencia de CCL19 y CCL21 es mayor en las lesiones de aterosclerosis por lo que los macrófagos que expresan CCR7 al estar expuestos a estas quimiocinas incrementan la liberación de citocinas inflamatorias como IL-8 y TNF (161). Por lo que la expresión de CCR7 en la subpoblación de macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ podría estar implicada en la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Cabe mencionar que macrófagos que expresan CCR7 también han sido reportados en enfermedades inflamatorias de la piel (162). En la infección por *M. tuberculosis* se ha reportado que este receptor es necesario para la migración temprana de células dendríticas maduras hacia los ganglios linfáticos mediastinales (163) y que en ausencia de este receptor exhiben un impedimento en su migración (164); mediante este mecanismo se logra controlar la carga bacteriana. Dado que los macrófagos son también células presentadoras de antígeno profesionales, la expresión de CCR7, corrobora la posible implicación de este receptor de quimiocina en macrófagos para la migración a órganos linfoides secundarios ante ambientes inflamatorios como en el caso de la infección por *M. tuberculosis*.

Con base a los resultados de la infección por *M. tuberculosis* se observó una tendencia de incremento del CCR7 en la infección por H37Ra y a disminuir con H37Rv en los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$. Esto sugiere que debido a la característica de atenuación de H37Ra es posible que active la respuesta inmune de manera eficiente. En este caso incrementando la expresión de CCR7 en macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ y así, permitiendo la migración de los mismos a ganglios linfáticos. Donde llevarán a cabo su actividad de célula presentadora, como se ha reportado previamente como una tercera ruta alternativa de presentación de antígeno en macrófagos especializados que se

localizan en la zona subcapsular del sinus de los ganglios linfáticos (165). Mientras que H37Rv disminuye este receptor y de esta manera detiene la respuesta inmunológica.

Por su parte, CXCR1 es el receptor de la IL-8, citocina implicada en el reclutamiento y activación de neutrófilos al sitio de inflamación. También se ha descrito su actividad quimioatrayente para monocitos, pues regula de manera positiva la expresión de moléculas de adhesión como ICAM (166). Con respecto a la infección se observa una tendencia a disminuir en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ infectados tanto con H37Ra como H37Rv. Lo anterior sugiere que ambas cepas son capaces de modular la capacidad migratoria de la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ a través de CXCR1. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes.

La persistencia del CCR2 en las tres subpoblaciones de manera basal y ante la infección, podría explicar la residencia de los macrófagos en el sitio de inflamación, que es el caso en la formación del granuloma ante la infección por *M. tuberculosis*. Estudios en modelos murinos apoyan esta hipótesis ya que en ausencia de CCR2, los ratones son incapaces de controlar la infección contra *M. tuberculosis* y mueren de manera temprana además de tener 100 veces más carga bacteriana que aquellos que presentan el CCR2 (167). El principal componente celular al interior del granuloma está compuesto por macrófagos productores mismos de MCP-1, ligando de CCR2. Además, en el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar o sistémica se han reportado incrementos en los niveles MCP-1 (159).

Hasta ahora se sabe que los receptores de quimiocinas se expresan en las células del sistema inmune de acuerdo al estado de activación (168). Este proyecto otorga una primera aproximación de la modulación de algunos receptores de quimiocinas (CCR2, CCR4, CCR7 y CXCR1) importantes para el reclutamiento de macrófagos CD3⁺ ante la infección con dos cepas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, más trabajos de investigación son necesarios para explorar el cambio en la expresión de estos receptores en estas subpoblaciones.

Como parte de una evaluación funcional, se incluyó el receptor fagocítico CD16 (Fc γ RIII). De manera interesante, y comparando las dos cepas de micobacteria encontramos que la infección por la cepa virulenta (H37Rv) disminuye la expresión de CD16 en la subpoblación CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺, comparada con la infección por H37Ra. Además, observamos que la infección por H37Ra mostró un incremento en la expresión de CD16, de los macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ con respecto a los convencionales (CD3⁻).

Se ha reportado que ante la infección por *M. tuberculosis* la frecuencia de muerte de monocitos CD16⁺ incrementa (169). Esta información permite especular acerca de la modulación de receptores Fc ante la infección por tuberculosis en las subpoblaciones de macrófagos de interés. Probablemente debido a la característica de atenuación de H37Ra es posible que se active la respuesta inmune de manera eficiente y por lo tanto los receptores fagocíticos incrementen para mediar el proceso de fagocitosis en los macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺. Mientras que H37Rv disminuye este receptor y de esta manera posiblemente frena la función fagocítica efectora.

Los datos de fagocitosis en este proyecto son indirectos, pues se mide la presencia del receptor, pero sería necesario incluir experimentos funcionales en donde se evalúe la capacidad fagocítica de estas subpoblaciones de macrófagos. Complementando estos resultados, en macrófagos CD3⁺ se ha estudiado la influencia del TCR ante la fagocitosis de partículas inespecíficas, en donde los datos sugieren que la unión de las partículas al TCR $\alpha\beta$ facilita la fagocitosis y se muestra la proximidad física de las partículas ingeridas al receptor TCR. Como control utilizan macrófagos de peritoneo de ratones rag^{-/-} en donde observan una disminución en la capacidad fagocítica de los macrófagos comparados con los Rag^{+/+} (13). En conjunto estos datos sugieren que el TCR $\alpha\beta$ tiene un rol en la regulación de la actividad fagocítica de los macrófagos CD3⁺. Quedaría pendiente verificar si existen diferencias entre las dos subpoblaciones de macrófagos encontradas en este trabajo y conocer si el

rol de los receptores Fc es redundante o complementario en esta función característica de macrófagos.

Los antecedentes muestran que el TNF es necesario para mantener a la subpoblación de macrófagos $\text{TCR}\alpha\beta^+$ (13). Sin embargo se desconocía cuál era la forma del TNF requerida *in vivo*, para favorecer la presencia de células mieloides TCR^+ . En otro antecedente de la Dra. Leslie Chávez Galán usando un modelo murino de tuberculosis pleural, usando ratones deficientes de TNF (TNF-KO), se observó que en ausencia de TNF no se generan células mieloides CD3^+ . Los datos muestran que el tmTNF es necesario para mantener la presencia de células mieloides $\text{CD3}^+\text{TCR}^+$ (151). Tomando en cuenta la progresión de la infección, los resultados de la Dra. Leslie Chávez Galán muestran que es durante la fase temprana de la infección (2 semanas), cuando aparecen células mieloides $\text{CD3}^+\text{TCR}\alpha\beta^+$ (151). Sin embargo al momento los resultados de esos trabajos no permiten concluir si existe un reclutamiento celular o es al momento de llegar que las células mieloides modifican su fenotipo para expresar CD3.

A pesar de lo anterior, los datos de los antecedentes de la Dra. Leslie Chávez Galán sugieren que la contribución de las células mieloides CD3^+ parece estar involucrada en la respuesta innata ante la infección por *M. tuberculosis*. En particular sugiere que esta subpoblación tiene un papel durante el inicio de la infección, puesto que a las 14 semanas ya no se observa su presencia (151). Estos datos coinciden, con reportes que sugieren que el tmTNF confiere protección durante la fase aguda de la infección mientras que la forma soluble parece ser requerida para la inmunidad a largo plazo. Se ha descrito que el tmTNF contribuye a la formación del granuloma y que confiere resistencia ante la infección por tuberculosis (71, 72).

En caso de ser un reclutamiento celular, es incierto que vía de señalización está siendo activada por el TNF y el tmTNF para reclutar a esta subpoblación mioide CD3^+ al sitio de infección. Quizá el tmTNF también tenga un papel funcional como molécula de señalización, y la activación inducida a través del tmTNF sea la señal requerida para mantenerlos en el sitio de infección.

Dado que el tmTNF es una molécula eficiente para la activación celular (170, 171); y conjuntando los datos *in vivo* que se han sido reportados por la Dra. Leslie Chávez Galán, junto los datos corroborados de macrófagos de humano en donde los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺, expresan en mayor proporción el tmTNF (151). La interpretación lógica sugiere que el tmTNF puede inducir un proceso de activación.

Estos antecedentes de la Dra. Leslie Chávez Galán, abrieron la puerta a incluir como parte de la evaluación funcional de este trabajo la estimulación tanto de la molécula CD3 como el tmTNF, en estas subpoblaciones de macrófagos no convencionales. Esto brinda información acerca de la capacidad de inducir una función efectora; además de la presencia de estas subpoblaciones de macrófagos en el sitio de infección por *M. tuberculosis*.

Para evaluar este efecto se purificaron las subpoblaciones de interés. Dentro de los estímulos incluimos: anti-CD3, el anti-TNF, ambas moléculas (anti-both), además de un control negativo y un positivo (LPS/IFN γ). La valoración de la activación celular ante estos estímulos se enfocó en la producción de citocinas y en determinar si estas subpoblaciones de macrófagos presentan un perfil anti- o pro-inflamatorio. En respuesta a los estímulos de manera independiente o en conjunto.

El análisis de las citocinas anti-inflamatorias: IL1-RA, IL-4 e IL-10, no mostró diferencias significativas ante estos estímulos, sugiriendo que las subpoblaciones de interés no tienen un fenotipo M2.

Los resultados muestran que ambas subpoblaciones de interés pueden activar una producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento a partir de estos estímulos. Sin embargo, aunque ambas subpoblaciones secretan citocinas pro-inflamatorias, son independientes porque: primero, secretan citocinas distintas y en segundo, son inducidas ante estímulos distintos. Los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺, necesitan del co-estímulo CD3/tmTNF, mientras que los CD3⁺TCRαβ⁻ se activan sólo con anti-CD3.

Para corroborar el perfil pro-inflamatorio de las subpoblaciones de interés, evaluamos la expresión de SOCS3. Las proteínas SOCS presentan baja expresión en los macrófagos en reposo pero son inducidas rápidamente ante la activación (104). Estas juegan un papel importante en la polarización de los macrófagos hacia un perfil M1 o M2. Se ha propuesto que una alta expresión de SOCS3 se asocia con un perfil M1 (105, 106). Debido a la variación en los datos no se observa una diferencia significativa entre las subpoblaciones. Sin embargo, la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ presenta una tendencia positiva en la expresión de SOCS3, comparada con el control negativo, ante los diferentes estímulos sometidos. Por lo que se corrobora a nivel de mRNA el perfil pro-inflamatorio de esta subpoblación y se asocia a un perfil de macrófagos M1.

La producción de citocinas bajo los estímulos empleados por la sub-población CD3⁺TCRαβ⁺ genera preferentemente las siguientes citocinas pro-inflamatorias: IL-6, IL-8, IL-1β, y las quimiocinas: IP-10 y MCP-1/CCL2. En particular, la IL-6 es una citocina clásicamente pro-inflamatoria que es secretada por macrófagos y cuya liberación interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B y activa a linfocitos T. Esta citocina es producida de manera temprana en la infección por *M. tuberculosis* y en el sitio de infección, sugiriendo un rol protector contra la bacteria (172).

La IL-8, es ligando de CXCR1, receptor que se ve incrementado en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺, por lo que podría ser importante en la función de reclutamiento de estas células al sitio de infección, en particular durante la infección por *M. tuberculosis* y formación del granuloma. Principalmente la secreción de IL-8 proviene de monocitos que se encuentran infectados con la bacteria y es regulado por proteínas cinasas (173). Sorpresivamente, ante la infección con H37Rv en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺, se observa una tendencia de CXR1 a disminuir. Lo que sugiere que el reclutamiento de estos macrófagos ante la infección por una cepa virulenta no será tan eficiente y por lo tanto tampoco la función protectora de los mismos.

Tanto la IL-6 como la IL-8 se encuentran incrementadas más aún cuando el estímulo es en conjunto con CD3/TNF. Por lo que la co-estimulación es importante para la producción de estas dos citocinas. En particular la IL-6 es una interleucina pleiotrópica que se produce en respuesta a un estímulo inflamatorio. Sin embargo la relevancia de IL-6 durante la infección por *M. tuberculosis* depende de la ruta y la dosis de infección. Aunque datos *in vivo* muestran un rol protector de esta citocina en la inducción de respuestas protectoras mediadas mediante IFN γ (174).

La secreción de IL-1 β , incrementa en la subpoblación CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺, esta citocina se ve incrementada en pacientes con tuberculosis en el sitio de infección. Dentro de sus actividades celulares está incluida el estímulo de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (23).

El IP-10 es ligando de CXCR3 y se ha relacionado con la infección ante BCG (175). Se ha observado que ratones deficientes de CXCR3 son más resistentes a la infección por *M. tuberculosis* que los ratones silvestres; sugiriendo que CXCR3 puede atenuar la respuesta inmune del hospedero (176).

Se ha demostrado que al estimular el CD3 (con anticuerpos monoclonales hechos en ratón que reconoce a las cadenas ζ del CD3 de humanos) de estos macrófagos, se incrementa la liberación de MCP-1/CCL2 (13). En particular, nosotros logramos reproducir estos resultados con los MDM; e identificamos que la subpoblación de macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺, ante los estímulos utilizados, es capaz de incrementar la producción de esta quimiocina. MCP-1 es ligando de CCR2 y CCR4; nosotros observamos que en homeostasis, el CCR4 se encuentra en mayor proporción en la subpoblación de macrófagos CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺. Asimismo, la expresión de CCR4 incrementa de manera significativa ante la infección por la cepa H37Ra. Este receptor ocupa un papel importante durante el *homing* de los linfocitos particularmente en su migración hacia el pulmón. Dado que estos macrófagos presentan una molécula característica de linfocito T, esto sugiere que su función podría ser homóloga y de esta manera facilitaría la migración de la subpoblación CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ al sitio

de infección, conjuntamente este proceso de migración contribuiría en la regulación positiva del reclutamiento de estos mismos macrófagos; pues son ellos quienes producen MCP-1 ante el estímulo específico vía CD3 y tmNF. Por otra parte, también se ha reportado que los antígenos de *M. tuberculosis*, como PPD (tuberculina) pero no ManLam (177), modulan de manera específica la expresión de MCP-1(23).

Ahora bien, enfoquémonos en la secreción de citocinas por los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ bajo los estímulos utilizados. Estos se caracterizan por secretar principalmente la siguiente quimiocina: MIP-1β y citocinas pro-inflamatorias: IFN-γ y TNF.

MIP-1β (CCL4), es producida por CD3⁺TCRαβ⁻, cuando se estimula con CD3. MIP-1β, es ligando de CCR4. CCR4 es un receptor presente en mayor proporción en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ en condición basal e incrementa ante la infección por H37Ra. Por lo que la subpoblación de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ al liberar MIP-1β podría actuar de manera parácrina y estar reclutando a la subpoblación de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺. El IFN_γ es producido mayoritariamente por los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ ante el estímulo de CD3. Esta citocina sinergiza con el TNF para estimular mecanismos antimicrobianos incluyendo la autofagia (39).

El TNF es una de las primeras citocinas producidas por macrófagos alveolares después del reconocimiento de la micobacteria por TLRs (TLR2 y TLR4) (23). Esta provee una señal inicial para la inducción regulada de citocinas y quimiocinas y para el desarrollo del granuloma, controla el reclutamiento celular y la eliminación de la bacteria (178). Por ello, la secreción de esta citocina por los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ sugiere una regulación entre las dos subpoblaciones de interés ante el estímulo de CD3.

En resumen nuestros resultados sugieren que el estímulo, tanto CD3 como tmTNF, induce una respuesta efectora principalmente pro-inflamatoria (Figuras 20-22) en ambas poblaciones de macrófagos descritas en el presente trabajo.

A pesar de esto, aún no hemos esclarecido si el tmTNF solo o en conjunto con CD3 modula una vía de señalización celular hasta ahora desconocida que pudiera estar implicada en la activación de estas subpoblaciones excepcionales. Faltaría explorar cuáles son las señales intracelulares que inducen la respuesta efectora de estos macrófagos en la producción de citocinas pro-inflamatorias. Por lo que queda mucho campo de investigación sobre las vías de señalización que estas dos moléculas encienden en macrófagos CD3⁺.

El análisis por *clusters* nos permitió distinguir que aun cuando los estímulos otorgados a las subpoblaciones de macrófagos fueran distintos, en general las subpoblaciones se agrupan y comparten características de su respuesta ante la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Figuras 23 y 24). Sugiriendo que la plasticidad de estos macrófagos al expresar TCR les otorga una capacidad de respuesta característica y principalmente pro-inflamatoria.

El papel del TNF ante la infección por *M. tuberculosis* es sumamente importante. Como nuestros resultados lo muestran, el TNF soluble incrementa ante la infección por *M. tuberculosis*, principalmente ante la cepa virulenta H37Rv. El TNF es una citocina soluble típicamente inflamatoria que es escindida mediante la enzima TACE de su forma tmTNF. Esta citocina puede ocasionar una activación celular a través de dos receptores el TNFR1 y el TNFR2. Por lo general, la forma soluble del TNF actúa sobre el TNFR1, presente constitutivamente en todas las células mientras que la tmTNF actúa sobre el TNFR2, expresado principalmente en células del sistema inmune y endotelio (59).

Los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁻ incrementan la expresión de TNFR1 ante la infección con la cepa H37Ra, lo anterior sugiere que la activación de este receptor, principalmente con la forma soluble del TNF, juega un papel en la inducción de apoptosis de las células infectadas que lo expresan (en particular en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁻). Como ha sido previamente reportado, el TNFR1 induce principalmente la vía de apoptosis (59). Además como nuestros

datos muestran, esta subpoblación ante el estímulo de CD3 es la principal productora de TNF lo que sugiere una regulación autócrina a través de la secreción de TNF y su activación a partir del TNFR1. Por otra parte, la menor expresión del TNFR2 en los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^-$, permitiría la interacción con el tmTNF expresado en los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$, y de esta manera una interacción juxtácrina y por ende una regulación entre ambas subpoblaciones. Esta señal bi-direccional contribuye a la plasticidad del sistema ligando receptor del TNF.

Por su parte el incremento del TNFR2 en los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$, ante la infección por H37Rv, permitirá la interacción entre las dos subpoblaciones a través de tmTNF-TNFR2; lo que posiblemente activaría la retro-señalización por tmTNF y activación directa por el TNFR2, como ha sido reportado previamente (68). Exacerbando así la respuesta pro-inflamatoria a través del TNFR2 en la activación del factor de transcripción de citocinas pro-inflamatorias $NF\kappa B$. Ya que en monocitos, la retro-señalización por tmTNF ha sido descrita como un mecanismo de silenciamiento más que una señal estimuladora (68); lo anterior sugiere un rol diferente en el tipo de señal en la inmunidad innata y adaptativa a través del tmTNF. En el caso particular de estas subpoblaciones de macrófagos con característica de linfocito, por la expresión del TCR^+ , sería interesante explorar el rol de estas señales en la activación y función.

Se ha reportado que la infección por BCG no sólo induce la liberación del TNF, sino también la escisión de sus receptores (TNFR1 y TNFR2) por TACE (13). La función de los receptores solubles es un mecanismo que bloquea la actividad del TNF para reducir la sensibilidad celular ante sus actividades biológicas (58, 179). Por lo que el conocimiento actual de la modulación fina entre el TNF y sus receptores, así como la retro-señalización inducida por tmTNF en la mantención y funcionalidad de estas subpoblaciones de macrófagos poco reconocidas no es suficiente para comprender su verdadera implicación biológica.

La contribución del presente trabajo completa la descripción fenotípica de los datos de la Dra. Leslie Chávez Galán y caracteriza funcionalmente a dos

subpoblaciones de macrófagos humanos que presentan la molécula CD3⁺. Esta descripción abre una nueva perspectiva en el papel que un complejo proteico que se creía exclusivo del linaje linfoide, podría tener en una célula de origen mieloide. Aún no es claro a qué nivel el estímulo de CD3 se encuentra activando a estas células. Sin embargo, nuestros datos apoyan el hecho de que esta molécula es funcional en los macrófagos CD3⁺. Las implicaciones en la regulación y el papel del tmTNF, el TNF, así como sus receptores y sus interacciones; ameritan una exploración profunda para entender la significancia biológica durante la respuesta inmunitaria. Lo anterior abre un panorama de posibilidades que deben ser exploradas para un mayor entendimiento acerca de la biología de estas subpoblaciones, cuya existencia es controversial.

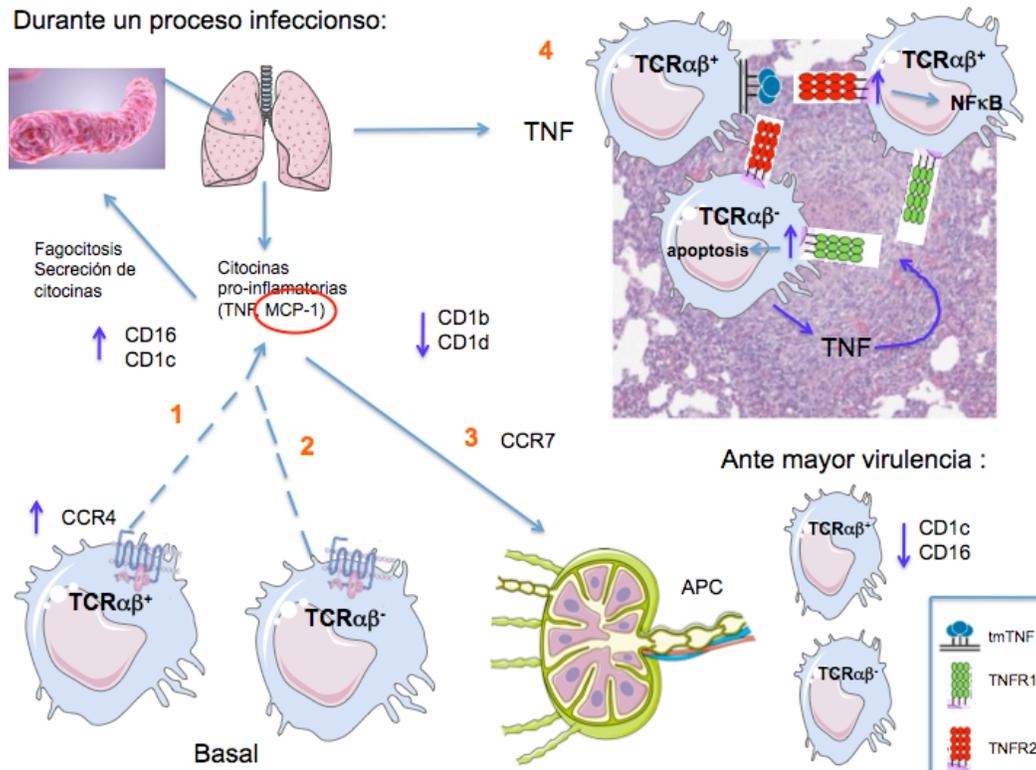


Figura 44. Resumen gráfico de la modulación de moléculas presentes en macrófagos CD3⁺ y su posible rol en la respuesta inmunológica ante la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Ante la presencia del bacilo de tuberculosis, la respuesta inmunitaria se caracteriza por secretar citocinas pro-inflamatorias principalmente el TNF, este juega un papel crucial para sostener el granuloma, característica patológica de la infección por *M. tuberculosis*. La producción de la principal quimiocina atrayente de macrófagos MCP-1, en el sitio de infección, sugiere primeramente el reclutamiento de los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ (1) y en

segundo lugar los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^-$, al sitio de infección a través de CCR4 (2). Una vez en el sitio de infección estas subpoblaciones secretarán citocinas, principalmente pro-inflamatorias, pero específicas para cada subpoblación. El incremento de CD16 en los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$, ante la infección sugiere una mayor capacidad fagocítica por los mismos actividad clásica de un macrófago. Por su parte la disminución de CD1b y CD1d en los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^-$, ante la infección sugiere que los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$, se especializarán en la presentación de antígenos lipídicos de la bacteria, ya que a su vez, estos incrementan la expresión de CD1c. En el proceso de presentación de antígeno estas subpoblaciones de macrófagos podrían migrar a órganos linfoides secundarios o terciarios mediante CCR7, molécula característicamente expresada en linfocitos T presente también en estas subpoblaciones (3). El rol del TNF y la interacción con sus receptores parece jugar un papel importante en la regulación de estas subpoblaciones. Como se ha reportado, los macrófagos $TCR\alpha\beta^+$, se encuentran principalmente en la zona interna del granuloma. Los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ se caracterizan por expresar el tmTNF, el cual tiene afinidad por el TNFR2, receptor que incrementa su expresión en la misma subpoblación de macrófagos ante la infección con la cepa H37Rv. Posiblemente, activan la vía de activación clásica de NFkB e inducen a la producción de citocinas pro-inflamatorias. Mientras que ante la infección los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ incrementan su expresión de TNFR1, receptor que tiene más afinidad por el TNF soluble, esto sugiere una regulación autócrina, pues es esta subpoblación la que produce mayor cantidad de TNF y a su vez podría activar un mecanismo de muerte controlada por medio de apoptosis a través de las señales del TNFR1. Por último, ante mayor virulencia de la cepa utilizada para la infección se observa una disminución en la expresión de CD1c y CD16 moléculas importantes tanto en la presentación de antígenos lipídicos como de capacidad efectora por medio de la fagocitosis.

IX Conclusiones

Con base en los hallazgos del presente proyecto, podemos concluir que:

1. Corroboramos lo que se ha descrito previamente por la Dra. Leslie Chávez Galán y podemos decir que existen dos sub-poblaciones poco reconocidas de macrófagos derivados de monocitos humanos de donadores sanos, que expresan $CD3^+$ y pueden o no expresar el $TCR\alpha\beta$.
2. Por su caracterización fenotípica la expresión del CCR4, es mayor en los macrófagos $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ comparados con la subpoblación $CD3^+TCR\alpha\beta^-$ y los macrófagos $CD3^-$.

3. En cuanto la funcionalidad de la expresión de CD3 y el tmTNF en estos macrófagos, el efecto de los estímulos empleados generan de manera independiente la producción de citocinas pro-inflamatorias principalmente. Sin embargo producen citocinas diferentes, en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ (IL-6, IL-8, IP-10, IL-1b, MCP-1), mientras que los CD3⁺TCRαβ⁻ (IFNγ, MIP-1b, TNF). Aunado a esto, los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ expresan SOCS3 confirmando así el perfil pro-inflamatorio tipo M1.

4. Los datos de la infección con *M. tuberculosis* indican que aunque no existe una diferencia en el porcentaje de los macrófagos CD3⁺ ante la infección por dos cepas una avirulenta y la otra virulenta; si se modifica el perfil de moléculas que expresan en su superficie.

5. Las únicas moléculas que se ven modificadas dependientes de la cepa son CD1c y CD16 ambas disminuyen ante la infección por H37Rv en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺ con respecto a la infección por la cepa H37Ra.

6. La expresión de la familia CD1 sólo se ve modificada por la infección con la cepa H37Ra. Para CD1c hay un incremento en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ mientras que CD1d y DC1b disminuyen en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁻.

7. El único receptor de quimiocina estudiado que sufrió cambios ante la infección fue CCR4, su expresión incrementó en la subpoblación de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ ante la infección por H37Ra. Mientras que la infección por H37Rv no produjo ninguna diferencia en estos receptores.

8. CD16 disminuyó su expresión en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ ante la infección por H37Rv y también presentó un incremento en su expresión durante la infección por H37Ra en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁺.

9. Ante la infección *in vitro* por *M. tuberculosis*, la expresión de tmTNF en las sub-poblaciones de macrófagos de interés no se modifica. Además, se corroboró como se había reportado por la Dra. Leslie Chávez Galán, que el

tmTNF se encuentra en mayor proporción en la subpoblación de macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺ en homeostasis.

10. Los TNFRs se expresan de manera diferenciada entre subpoblaciones de macrófagos CD3⁺ y ante la infección por H37Ra o H37Rv se ven modificados. El TNFR1 incrementa en la subpoblación CD3⁺TCRαβ⁻ ante la infección con H37Ra. Mientras que el TNFR2 aumenta en los macrófagos CD3⁺TCRαβ⁺, ante la infección con H37Rv.

11. Existe un incremento en la producción de TNF ante la infección por H37Rv en los MDM totales de las subpoblaciones de macrófagos.

X Referencias

1. P. T. Murphy Kenneth, M. Walport, Janeway's Immunobiology. (2012).
2. L. Ziegler-Heitbrock *et al.*, Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116** (2010).
3. A. H. L. A. K. Abbas, S. Pillai, Cellular and Molecular Immunology. Eight Edition. p 14.
4. P. Italiani, and D. Boraschi, From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* **5**, 514 (2014).
5. M. H. Sieweke, J. E. Allen, Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* **342**, (2013).
6. R. Michel, Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology* **5**, 85-87 (1995).
7. E. Garcia-Garcia, C. Rosales, Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J of leukocyte Biol* **72**, 1092-1108 (2002).
8. T. A. Wynn, A. Chawla, J. W. Pollard, Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* **496**, 445-455 (2013).
9. M. J. Crane *et al.*, The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. *PLoS One* **9**, e86660 (2014).
10. P. J. Murray *et al.*, Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14-20 (2014).
11. L. Chavez-Galan, *et al.*, Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol* **6**, 263 (2015).
12. C. D. Mills, *et al.*, M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The J Immunol* **164**, 6166-6173 (2000).
13. A. Beham *et al.*, A TNF-Regulated Recombinatorial Macrophage Immune Receptor Implicated in Granuloma Formation in Tuberculosis. *PLoS Pathogens* **7**, e1002375 (2011).
14. K. Puellmann *et al.*, A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14441-14446 (2006).
15. F. Legrand *et al.*, A functional gammadeltaTCR/CD3 complex distinct from gammadeltaT cells is expressed by human eosinophils. *PLoS One* **4**, e5926 (2009).
16. T. Fuchs *et al.*, A combinatorial alphabeta T cell receptor expressed by macrophages in the tumor microenvironment. *Immunobiology* **222**, 39-44 (2017).
17. T. Fuchs *et al.*, The macrophage-TCRalphabeta is a cholesterol-responsive combinatorial immune receptor and implicated in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* **456**, 59-65 (2015).
18. B. H. D. S.M. Ciupe, M.L. Markert and T.B. Kepler, Quantification of total T-cell receptor diversity by flow cytometry and spectratyping. *BioMed Central Immunology* **14**, (2013).

19. W. H. Organization, Global Tuberculosis Report 2019. (2019).
20. R. H. Pando, Respuesta Inmune a agentes infecciosos: *Mycobacterium tuberculosis* conferencia. UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Agosto, 2018).
21. C. R. Shaler, *et al.*, Understanding Delayed T-Cell Priming, Lung Recruitment, and Airway Luminal T-Cell Responses in Host Defense against Pulmonary Tuberculosis. *Clin and Dev Immunol* **2012**, 1-13 (2012).
22. E. Kulchavenya, Extrapulmonary tuberculosis: are statistical reports accurate? *Ther Adv Infect Dis* **2**, 61-70 (2014).
23. R. van Crevel, T. H. M. Ottenhoff, J. W. M. van der Meer, Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 294-309 (2002).
24. H. C. H. C. Cywes, M. Daffé, and M.R.W. Ehlers, Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect and Immun* **65**, 4258-4266 (1997).
25. L. S. Schlesinger, *et al.*, Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis by human macrophages. *J Immunol* **157**, 4568-4575 (1996).
26. D. Schnappinger *et al.*, Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *The Journal of experimental medicine* **198**, 693-704 (2003).
27. F. Vromman, A. Subtil, Exploitation of host lipids by bacteria. *Curr Opin Microbiol* **17**, 38-45 (2014).
28. D. G. Russell, *et al.*, Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* **10**, 943-948 (2009).
29. E. Guirado, and L. S. Schlesinger, Modeling the Mycobacterium tuberculosis Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Front Immunol* **4**, 98 (2013).
30. J. L. Flynn, J. Chan, and P. L. Lin, Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunology* **4**, 271-278 (2011).
31. G. Lugo-Villarino, *et al.*, Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas. *Front Immunol* **3**, 405 (2012).
32. S. H. Kaufmann, Tuberculosis vaccines: time to think about the next generation. *Semin Immunol* **25**, 172-181 (2013).
33. T. Prezzemolo *et al.*, Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol* **5**, 180 (2014).
34. G. De Libero, and L. Mori, Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat Rev Immunol* **5**, 485-496 (2005).
35. S. A. Khader *et al.*, IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* **8**, 369-377 (2007).

36. S. H. Kaufmann, G. Hussey, and P. H. Lambert, New vaccines for tuberculosis. *Lancet (London, England)* **375**, 2110-2119 (2010).
37. I. O. Garcia, Maria., Current Topics on The Profiles of Host Immunological Response To Mycobacterial Infections. Chapter 1. The roles of tumor necrosis factor and other macrophage-derived cytokines in host defense mechanisms during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. H. Tomioka, Ed., (Research Signpost, Kerala, India, 2009), pp. 1-46.
38. A. M. Cooper, K. D. Mayer-Barber, and A. Sher, Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol* **4**, 252-260 (2011).
39. I. Garcia *et al.*, Roles of soluble and membrane TNF and related ligands in mycobacterial infections: effects of selective and non-selective TNF inhibitors during infection. *Adv Exp Med Biol* **691**, 187-201 (2011).
40. E. A. Carswell *et al.*, An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-3670 (1975).
41. T. W. Williams, and G. A. Granger, Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* **219**, 1076-1077 (1968).
42. B. B. Aggarwal, B. Moffat, and R. N. Harkins, Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem* **259**, 686-691 (1984).
43. B. B. Aggarwal, *et al.*, Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J Biol Chem* **260**, 2334-2344 (1985).
44. B. B. Aggarwal *et al.*, Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* **260**, 2345-2354 (1985).
45. D. Pennica *et al.*, Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-729 (1984).
46. B. B. Aggarwal, T. E. Eessalu, and P. E. Hass, Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* **318**, 665-667 (1985).
47. J. L. Browning *et al.*, Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**, 847-856 (1993).
48. C. F. Ware, The TNF Superfamily. *Cytokine Growth F R* **14**, 181-184 (2003).
49. T. Spies *et al.*, Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8699-8702 (1986).
50. L. M. Sedger, and M. F. McDermott, TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth F R* **25**, 453-472 (2014).
51. K. D. Stamou P, Posttranscriptional regulation of TNF mRNA: a paradigm of signal-paradigm of signal dependent mRNA utilization and its relevance to pathology. *Curr Dir Autoimmun* **11**, 61-79 (2010).

52. T. H. D. N. Männel, The TNF-TNF Receptor System. *Biol Chem* **383**, 1581-1585 (2002).
53. R. A. Black *et al.*, A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733 (1997).
54. M. J.V.F. J. Quesniaux *et al.*, TNF in Host Resistance to Tuberculosis. *TNF Pathophysiology. Molecular and Cellular Mechanisms*. **11**, 157-179 (2010).
55. C. F. Ware, Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* **23**, 787-819 (2005).
56. D. N. Mauri *et al.*, LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* **8**, 21-30 (1998).
57. N. H. Ruddle, Lymphotoxin and TNF: how it all began-a tribute to the travelers. *Cytokine Growth F R* **25**, 83-89 (2014).
58. F. K. Chan *et al.*, A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**, 2351-2354 (2000).
59. B. B. Aggarwal, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756 (2003).
60. H. Hayder *et al.*, Adenovirus-induced liver pathology is mediated through TNF receptors I and II but is independent of TNF or lymphotoxin. *J Immunol* **163**, 1516-1520 (1999).
61. Y. Jiang *et al.*, Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* **283**, 543-546 (1999).
62. H. Hsu, J. Xiong, and D. V. Goeddel, The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504 (1995).
63. M. Karin, and A. Lin, NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-227 (2002).
64. G. Eissner, W. Kolch, and P. Scheurich, Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth F R* **15**, 353-366 (2004).
65. N. H. H. A.D. Watts *et al.*, A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumor necrosis factor ligand family is implicated in "reverse signalling".pdf>. *EMBO J* **18**, 2119-2126 (1999).
66. A. Domonkos *et al.*, Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *European cytokine network* **12**, 411-419 (2001).
67. S. Harashima *et al.*, Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. *J Immunol* **166**, 130-136 (2001).
68. G. Eissner *et al.*, Reverse Signaling Through Transmembrane TNF Confers Resistance to Lipopolysaccharide in Human Monocytes and Macrophages. *J Immunol* **164**, 6193-6198 (2000).

69. R. M. H. S. R. Ruuls *et al.*, Membrane-Bound TNF Supports Secondary Lymphoid Organ Structure but Is Subserving to Secreted TNF in Driving Autoimmune Inflammation. *Immunity* **15**, (2001).
70. M. L. Olleros *et al.*, Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection in the absence of secreted TNF and lymphotoxin-alpha. *J Immunol* **168**, 3394-3401 (2002).
71. B. M. Saunders *et al.*, Transmembrane TNF Is Sufficient to Initiate Cell Migration and Granuloma Formation and Provide Acute, but Not Long-Term, Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol* **174**, 4852-4859 (2005).
72. N. Allie *et al.*, Protective role of membrane tumour necrosis factor in the host's resistance to mycobacterial infection. *Immunology* **125**, 522-534 (2008).
73. M. H. Kaplan, M. M. Hufford, and M. R. Olson, The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 295-307 (2015).
74. G. M. L. F. Neville, and O. Bagasra, The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth F R* **8**, 207-219 (1997).
75. C. J.M., ATLAS of Immunology 343-377 (2010).
76. S. L. Deshmane *et al.*, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 313-326 (2009).
77. J. M. Hougardy *et al.*, Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 409-416 (2007).
78. W. P. Arend *et al.*, Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* **16**, 27-55 (1998).
79. S. Barrientos *et al.*, Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* **16**, 585-601 (2008).
80. M. C. Robson, The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen* **5**, 12-17 (1997).
81. C. H. Heldin, and B. Westermark, Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* **79**, 1283-1316 (1999).
82. S. Rhee, and F. Grinnell, P21-activated kinase 1: convergence point in PDGF- and LPA-stimulated collagen matrix contraction by human fibroblasts. *J Cell Biol* **172**, 423-432 (2006).
83. M. Jinnin *et al.*, Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by platelet-derived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* **202**, 510-517 (2005).
84. M. Uutela *et al.*, PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood* **104**, 3198-3204 (2004).

85. N. N. Nissen *et al.*, Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The Am J Pathol* **152**, 1445-1452 (1998).
86. S. I. A., The Measurement of Oxygen Tension in Healing Tissue. *Prog Resp Res.* **3**, 124-135 (1969).
87. T. Sasaki, The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. *J Dermatol* **19**, 664-666 (1992).
88. M. Leveque *et al.*, Soluble CD14 acts as a DAMP in human macrophages: origin and involvement in inflammatory cytokine/chemokine production. *FASEB J* **31**, 1891-1902 (2017).
89. C. W. Wieland *et al.*, CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis. *Immunology* **125**, 272-279 (2008).
90. P. Bufler *et al.*, Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol* **25**, 604-610 (1995).
91. S. D. Wright *et al.*, CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433 (1990).
92. A. Devitt *et al.*, Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* **392**, 505-509 (1998).
93. C. L. Shive *et al.*, Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS* **29**, 1263-1265 (2015).
94. C. Schutt, T. Schilling, and C. Kruger, sCD14 prevents endotoxin inducible oxidative burst response of human monocytes. *Allergie und Immunologie* **37**, 159-164 (1991).
95. R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias, Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* **13**, 437-457 (1995).
96. R. Savedra *et al.*, Mycobacterial lipoarabinomannan recognition requires a receptor that shares components of the endotoxin signaling system. *J Immunol* **157**, 2549-2554 (1996).
97. A. Kol *et al.*, Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* **164**, 13-17 (2000).
98. G. Hoheisel *et al.*, Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. *Chest* **108**, 1614-1616 (1995).
99. A. Yoshimura, T. Naka, and M. Kubo, SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* **7**, 454-465 (2007).
100. T. Kamura *et al.*, VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* **18**, 3055-3065 (2004).

101. J. Strebovsky, P. Walker, and A. H. Dalpke, Suppressor of cytokine signaling proteins as regulators of innate immune signaling. *Front Biosci-Landmark* **17**, 1627-1639 (2012).
102. M. Kubo, T. Hanada, and A. Yoshimura, Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* **4**, 1169-1176 (2003).
103. J. J. Babon *et al.*, The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Mol Cell* **22**, 205-216 (2006).
104. H. M. Wilson, SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. *Front Immunol* **5**, 357 (2014).
105. Y. Liu *et al.*, Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo. *J Immunol* **180**, 6270-6278 (2008).
106. C. E. Arnold *et al.*, A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology* **141**, 96-110 (2014).
107. T. Lawrence, and G. Natoli, Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* **11**, 750-761 (2011).
108. D. C. Barral, and M. B. Brenner, CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* **7**, 929-941 (2007).
109. C. Angenieux *et al.*, Characterization of CD1e, a third type of CD1 molecule expressed in dendritic cells. *J Biol Chem* **275**, 37757-37764 (2000).
110. V. F. Vartabedian, P. B. Savage, and L. Teyton, The processing and presentation of lipids and glycolipids to the immune system. *Immunol Rev* **272**, 109-119 (2016).
111. E. M. Beckman *et al.*, Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* **372**, 691-694 (1994).
112. D. B. Moody *et al.*, Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. *Science* **278**, 283-286 (1997).
113. M. Gilleron *et al.*, Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* **199**, 649-659 (2004).
114. K. Fischer *et al.*, Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10685-10690 (2004).
115. P. A. Sieling *et al.*, CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* **269**, 227-230 (1995).
116. I. Matsunaga *et al.*, *Mycobacterium tuberculosis* pks12 produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells. *J Exp Med* **200**, 1559-1569 (2004).
117. D. B. Moody *et al.*, T cell activation by lipopeptide antigens. *Science* **303**, 527-531 (2004).

118. S. Gagneux, Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol* **16**, 202-213 (2018).
119. M. Orgeur, and R. Brosch, Evolution of virulence in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Curr Opin Microbiol* **41**, 68-75 (2018).
120. H. Ren *et al.*, Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from Mycobacterium marinum. *Mol Microbiol* **63**, 1345-1359 (2007).
121. V. Nataraj *et al.*, MKAN27435 is required for the biosynthesis of higher subclasses of lipooligosaccharides in Mycobacterium kansasii. *PLoS One* **10**, e0122804 (2015).
122. F. Coll *et al.*, A robust SNP barcode for typing Mycobacterium tuberculosis complex strains. *Nat Commun* **5**, 4812 (2014).
123. M. Coscolla, and S. Gagneux, Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis. *Semin Immunol* **26**, 431-444 (2014).
124. R. Brosch *et al.*, A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3684-3689 (2002).
125. L. Majlessi, and R. Brosch, Mycobacterium tuberculosis Meets the Cytosol: The Role of cGAS in Anti-mycobacterial Immunity. *Cell Host Microbe* **17**, 733-735 (2015).
126. A. Kupz *et al.*, ESAT-6-dependent cytosolic pattern recognition drives noncognate tuberculosis control in vivo. *J Clinical Invest* **126**, 2109-2122 (2016).
127. A. S. Pym *et al.*, Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. *Mol Microbiol* **46**, 709-717 (2002).
128. J. Augenreich *et al.*, ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol* **19**, (2017).
129. J. Gonzalo-Asensio *et al.*, Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 11491-11496 (2014).
130. D. Wong *et al.*, Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19371-19376 (2011).
131. C. J. Queval *et al.*, Mycobacterium tuberculosis Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Rep* **20**, 3188-3198 (2017).
132. W. Steenken, and Jr., L. U. Gardner, History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc* **54**, 62-66 (1946).
133. W. Steenken, Lysis of Tubercle Bacilli in Vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **33**, 253-255 (1935).
134. J. Q. Heplar *et al.*, Virulence of the tubercle bacillus. I. Effect of oxygen tension upon respiration of virulent and avirulent bacilli. *J Infect Dis* **94**, 90-98 (1954).
135. G. B. Mackaness, N. Smith, and A. Q. Wells, The growth of intracellular tubercle bacilli in relation to their virulence. *Am Rev Tuberc* **69**, 479-494 (1954).

136. P. D. Hart, and J. A. Armstrong, Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **10**, 742-746 (1974).
137. C. H. Pierce, R. J. Dubos, and W. B. Schaefer, Multiplication and survival of tubercle bacilli in the organs of mice. *J Exp Med* **97**, 189-206 (1953).
138. H. Zheng *et al.*, Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One* **3**, e2375 (2008).
139. S. B. Walters *et al.*, The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **60**, 312-330 (2006).
140. J. S. Lee *et al.*, Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. *Cell Host Microbe* **3**, 97-103 (2008).
141. M. Jain, and J. S. Cox, Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**, e2 (2005).
142. T. D. Sirakova *et al.*, The largest open reading frame (pks12) in the *Mycobacterium tuberculosis* genome is involved in pathogenesis and dimycocerosyl phthiocerol synthesis. *Infect Immun* **71**, 3794-3801 (2003).
143. P. Akhtar *et al.*, Rv3303c of *Mycobacterium tuberculosis* protects tubercle bacilli against oxidative stress in vivo and contributes to virulence in mice. *Microbes Infect* **8**, 2855-2862 (2006).
144. P. R. Jungblut *et al.*, Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. *Infect Immun* **69**, 5905-5907 (2001).
145. L. Jena *et al.*, Comparative proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv versus H37Ra. *Int J Mycobacteriol* **2**, 220-226 (2013).
146. L. D. Lu *et al.*, Mycobacterial MazG is a novel NTP pyrophosphohydrolase involved in oxidative stress response. *J Biol Chem* **285**, 28076-28085 (2010).
147. G. A. D. S. H. Malen *et al.*, Comparison of membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra strains. *BMC Microbiology* **11**, (2011).
148. C. F. Higgins, ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113 (1992).
149. L. Chavez-Galan *et al.*, Myeloid cell TNFR1 signaling dependent liver injury and inflammation upon BCG infection. *Sci Rep* **9**, 5297 (2019).
150. L. Chavez-Galan *et al.*, Tumor Necrosis Factor and Its Receptors Are Crucial to Control *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Pleural Infection in a Murine Model. *Am J Pathol* **186**, 2364-2377 (2016).
151. A. Rodriguez-Cruz *et al.*, CD3+ Macrophages Deliver Proinflammatory Cytokines by a CD3- and Transmembrane TNF-Dependent Pathway and Are Increased at the BCG-Infection Site. *Front Immunol* **10**, (2019).

152. S. Fleige, and M. W. Pfaffl, RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* **27**, 126-139 (2006).
153. M. K. N. A. Jake Lever, Principal component analysis. *Nature Methods* **14**, 641-642 (2017).
154. W. E. Kaminski *et al.*, On the horizon: flexible immune recognition outside lymphocytes. *Immunobiology* **218**, 418-426 (2013).
155. J. A. A. a. T. H. Flo., Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages. *Cell Mol Life Sci*, (2016).
156. J. B. Torrelles, and L. S. Schlesinger, Diversity in *M. tuberculosis* mannose cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis* **90**, 84-93 (2010).
157. T. I. Prigozy *et al.*, The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* **6**, 187-197 (1997).
158. O. Yoshie, and K. Matsushima, CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int Immunol* **27**, 11-20 (2015).
159. Z. Hasan *et al.*, Relationship between circulating levels of IFN-gamma, IL-10, CXCL9 and CCL2 in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis is dependent on disease severity. *Scand J Immunol* **69**, 259-267 (2009).
160. A. Iellem *et al.*, Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* **194**, 847-853 (2001).
161. J.K. Damas *et al.*, Enhanced Expression of the Homeostatic Chemokines CCL19 and CCL21 in Clinical and Experimental Atherosclerosis. Possible Pathogenic Role in Plaque Destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **27**, 11-20 (2007).
162. H. M. Serra, and Y. Eberhard., Is secondary lymphoid-organ chemokine (SLC/CCL21) much more than a constitutive chemokine? *Allergy: Eur J Allergy Clin Immunol.* **59**, 1219-1223 (2004).
163. K. Bhatt, S. P. Hickman, and P. Salgame, Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. *J Immunol* **172**, 2748-2751 (2004).
164. S. Olmos, S. Stukes, and J. D. Ernst, Ectopic activation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cells in lungs of CCR7-/- mice. *J Immunol* **184**, 895-901 (2010).
165. L. Martinez-Pomares, and S. Gordon, Antigen presentation the macrophage way. *Cell* **131**, 641-643 (2007).
166. W.E. Holmes *et al.*, Structure and Functional Expression of a Human Interleukin-8 Receptor. *Science* **253**, 1278-1280 (1991).
167. W. Peters *et al.*, Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7958-7963 (2001).
168. S. G. Ward, K. Bacon, and J. Westwick, Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* **9**, 1-11 (1998).

169. D. Castano, L. F. Garcia, and M. Rojas, Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* **91**, 348-360 (2011).
170. M.L. Olleros *et al.*, Membrane-Bound TNF Induces Protective Immune Responses to M. bovis BCG Infection: Regulation of memTNF and TNF Receptors Comparing Two memTNF Molecules. *PLoS ONE* **7**, (2012).
171. A. Pallai *et al.*, Transmembrane TNF- α Reverse Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Formation in Macrophages by Inducing TGF- β : Therapeutic Implications. *J Immunol* **196**, 1146-1157 (2016).
172. M. W.K. Law *et al.*, Increased Release of Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α by Bronchoalveolar Cells Lavaged from Involved Sites in Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 799-804 (1996).
173. C. Ameixa, and J. S. Friedland, Interleukin-8 secretion from Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes is regulated by protein tyrosine kinases but not by ERK1/2 or p38 mitogen-activated protein kinases. *Infect Immun* **70**, 4743-4746 (2002).
174. B. M. Saunders *et al.*, Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun* **68**, 3322-3326 (2000).
175. I. Clark-Lewis *et al.*, Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *Journal Biol Chem* **278**, 289-295 (2003).
176. J. X. Soumya *et al.*, The Chemokine Receptor CXCR3 Attenuates the Control of Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection in BALB/c Mice. *J Immunol* **178**, 1723-1735 (2017).
177. M. A. Arias *et al.*, Mycobacterium tuberculosis antigens specifically modulate CCR2 and MCP-1/CCL2 on lymphoid cells from human pulmonary hilar lymph nodes. *J Immunol* **179**, 8381-8391 (2007).
178. D.R. Roach *et al.*, TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. *J Immunol* **168**, 4620-4627 (2002).
179. H. Wajant, and D. Siegmund, TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol* **7**, 91 (2019).

XI Apéndices

1. Apéndice I

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona
CD14	BV510	M5E2
CD11b	PerCpCy5.5	ICRF44
CD206/MMR	APC/Cy7	15-2
CD80	PE/Cy5	2D10
CD86	APC	IT2.2
CD68	PerCP/Cy5.5	Y1/82 ^a
CD19	FITC	LT19
CD2	FITC	TS1/8
CD3	APC	UCHT1
TCR $\alpha\beta$	BV421	IP26
TCR $\gamma\delta$	PE	B1
HLA-A,B,C	PE/Cy7	W6/32
HLA-DR	APC	L243
CD1a	PECy5	HI149
CD1b	FITC	MT101
CD1c	PerCP	L161
CD1d	PE	CD1d42
CD16	PE/Cy5	3G8
TNF	PE	6401.1111
CCR4	PE-Cy7	1G1
CCR7	BV421	G043H7
CXCR1	PE/Cy5	8F1/CXCR1

2. Apéndice II

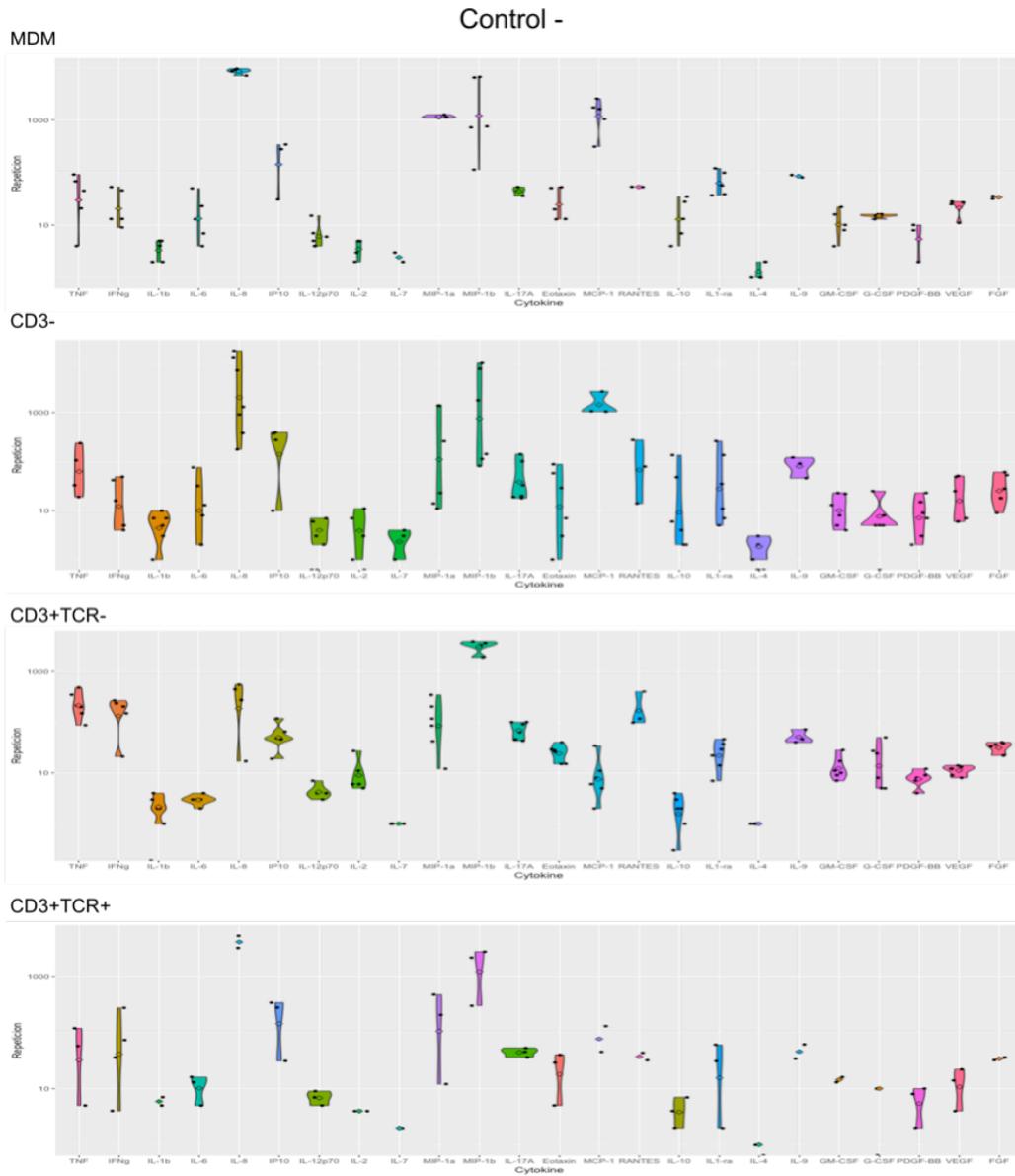


Figura 45. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés en el control negativo (sin estímulo). La subpoblación CD3- presenta mayor dispersión en las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizadas para describir la función de estas subpoblaciones de macrófagos. n=6.

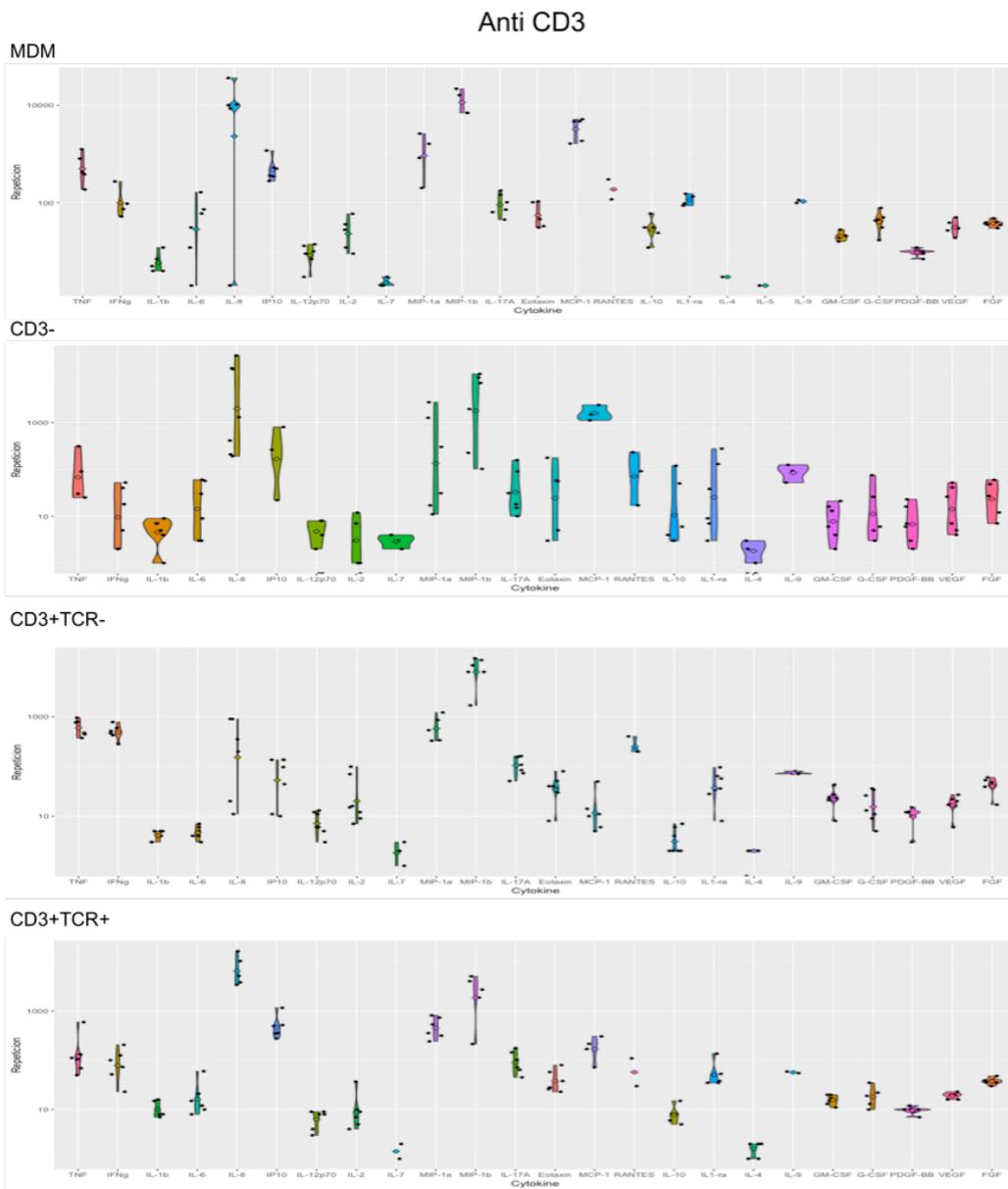
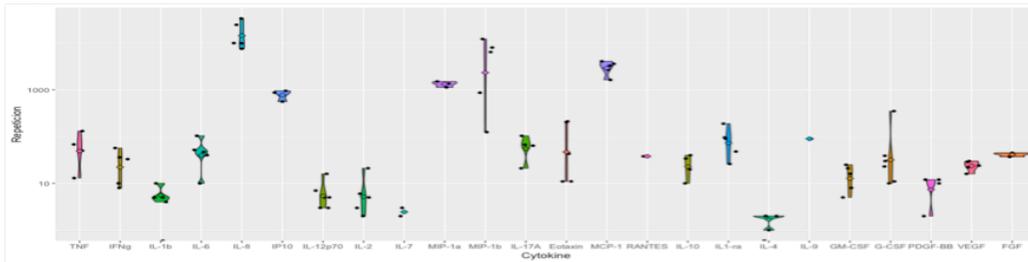


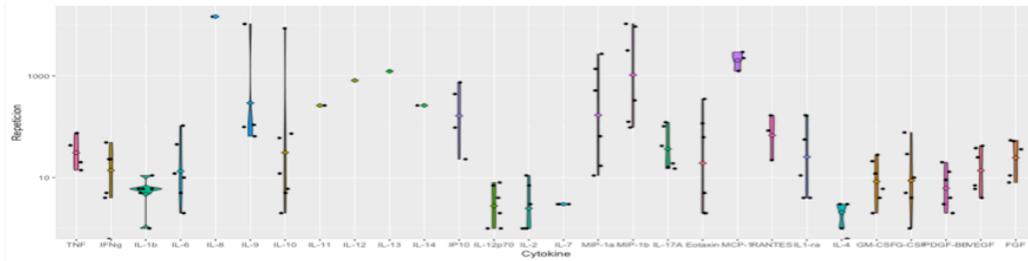
Figura 46. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés ante el estímulo de CD3. La subpoblación CD3- presenta mayor dispersión en las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizadas para describir la función de estas subpoblaciones de macrófagos. n=6.

Anti TNF

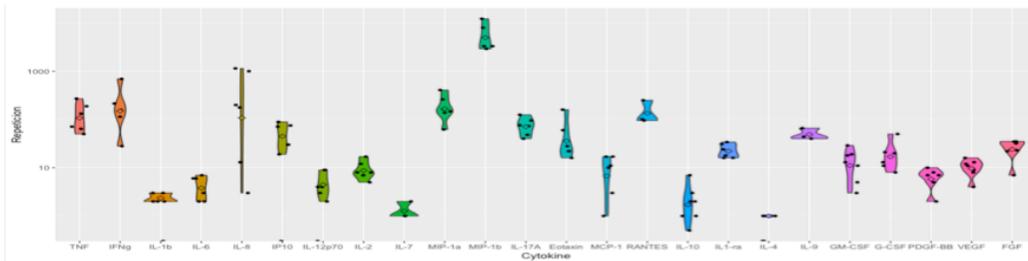
MDM



CD3-



CD3+TCR-



CD3+TCR+

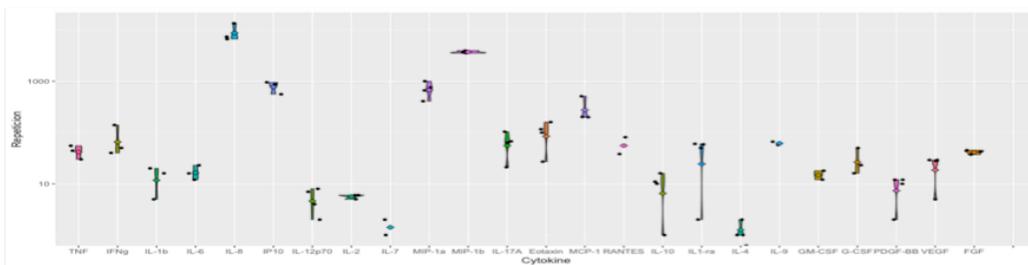


Figura 47. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés ante el estímulo de tmTNF. La subpoblación CD3- presenta mayor dispersión en las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizadas para describir la función de estas subpoblaciones de macrófagos. n=6.

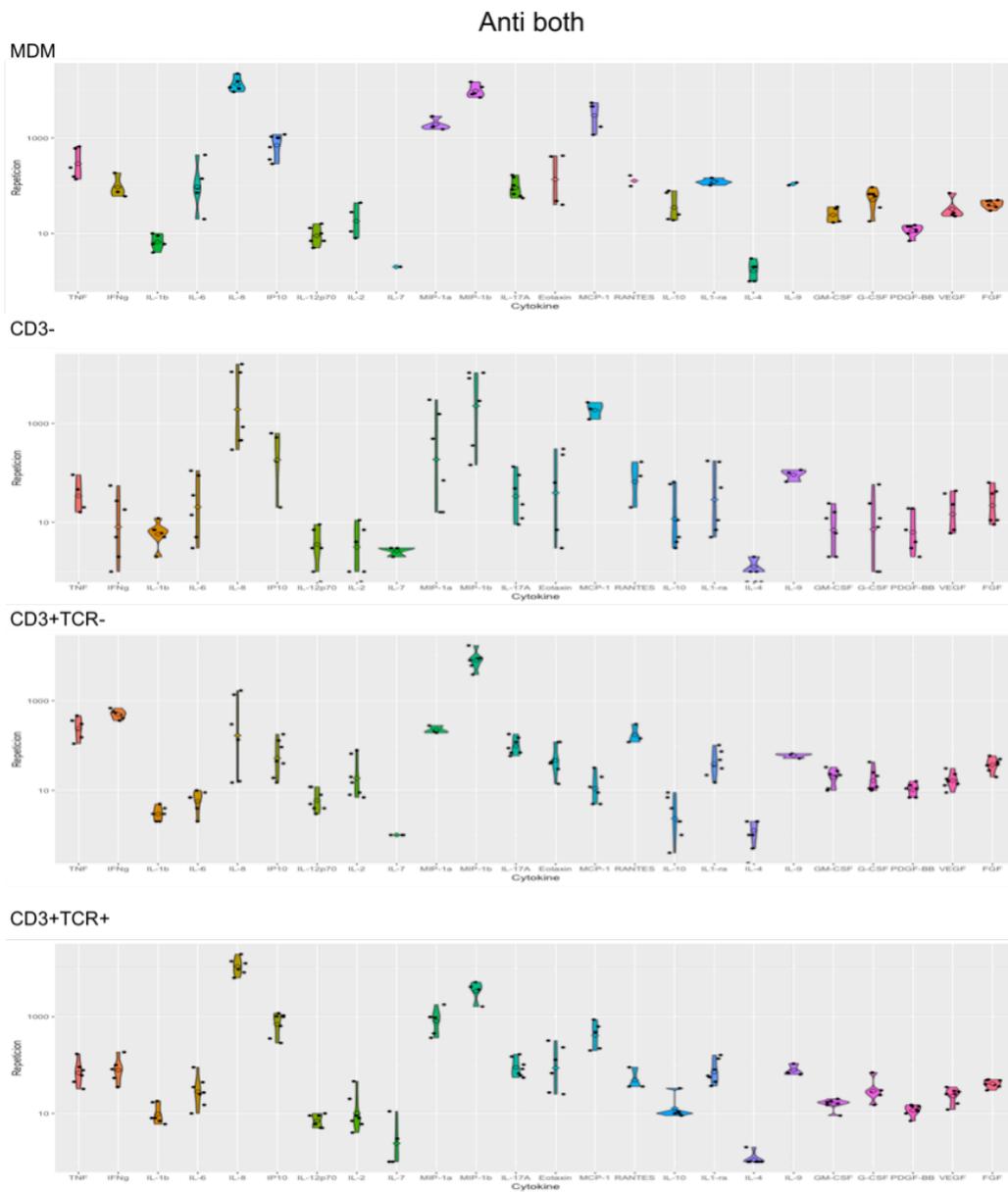


Figura 48. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés ante el estímulo tanto de CD3 como tmTNF. La subpoblación CD3- presenta mayor dispersión en las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizadas para describir la función de estas subpoblaciones de macrófagos. n=6.

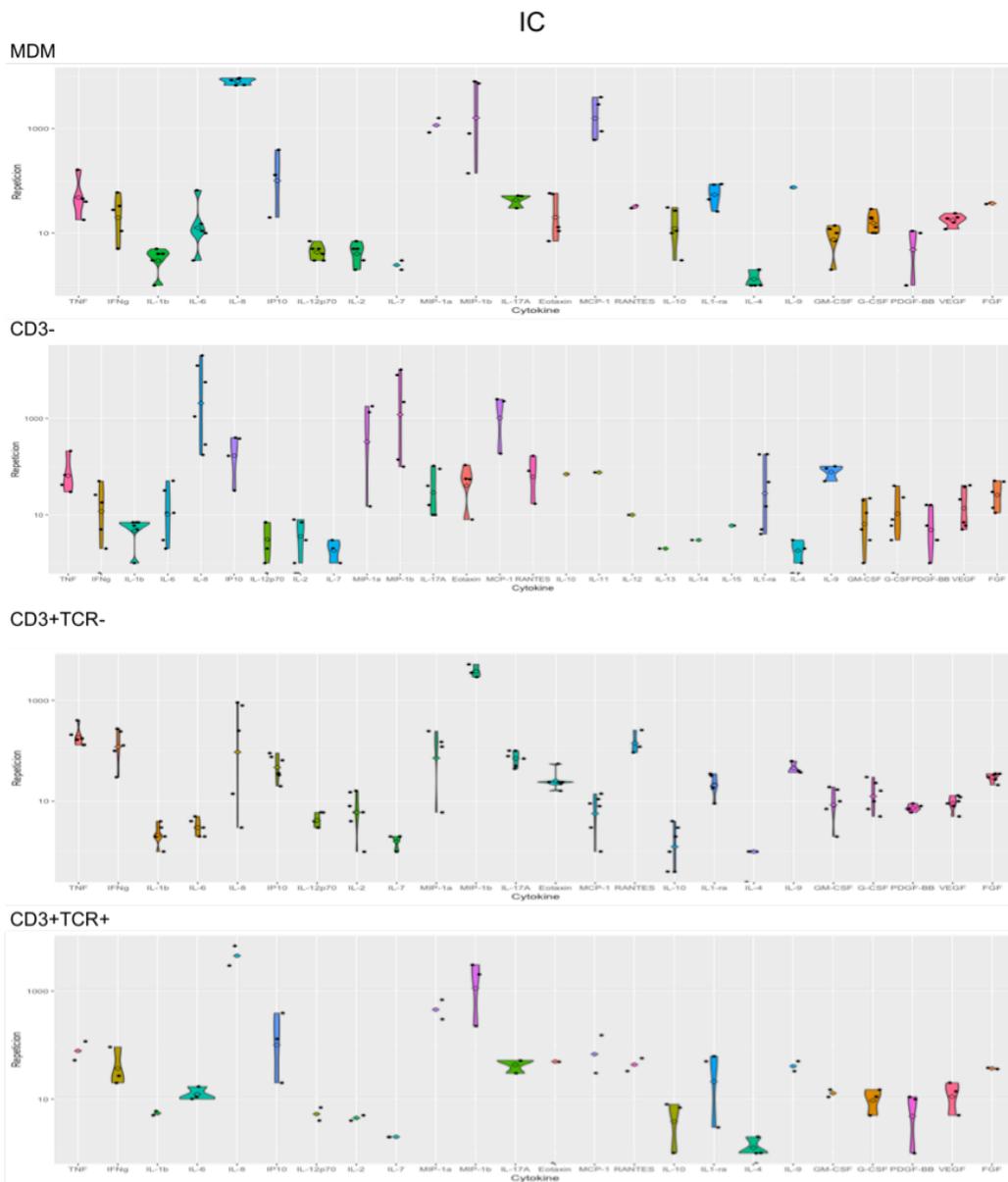


Figura 49. Dispersión de valores de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés utilizando un control de isotipo (IC). Las subpoblaciones: MDM y CD3- presentan mayor dispersión en las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizadas para describir la función de estas subpoblaciones de macrófagos. n=6.

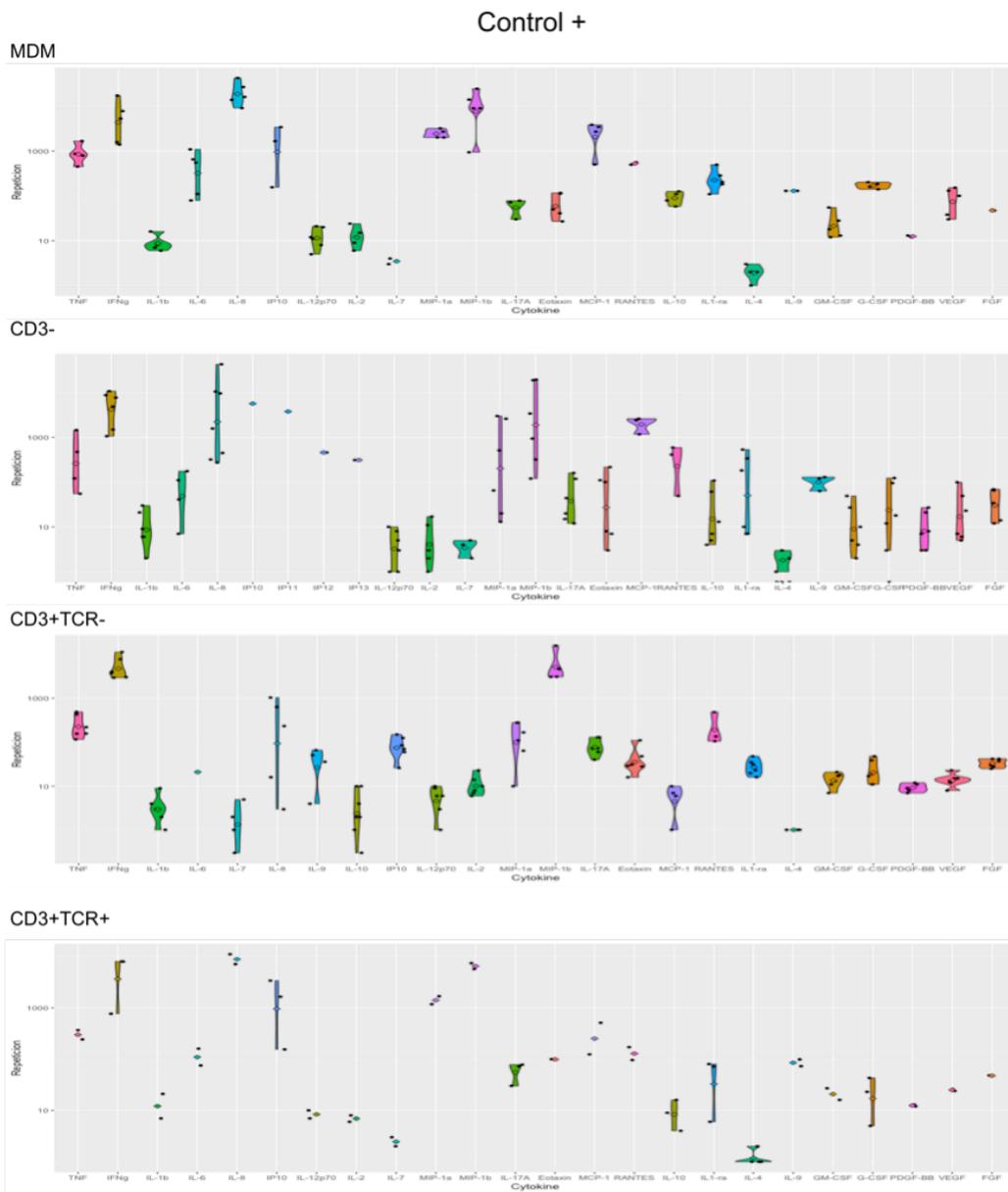


Figura 50. Dispersión de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las subpoblaciones de macrófagos de interés en el control positivo (IFN γ y LPS). La subpoblación CD3- presenta mayor dispersión en las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizadas para describir la función de estas subpoblaciones de macrófagos. n=6.