



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Desarrollo de un modelo de infección en sangre  
periférica para evaluar la inhibición del crecimiento de  
micobacterias y su aplicación en pacientes con  
inmunodeficiencias en el eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ROMAN MEDINA ARCE**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. María Teresa Herrera Barrios**

**CIUDAD DE MÉXICO, 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por la sabiduría y la fuerza que me inspiró a seguir adelante en los momentos difíciles.

A mi esposa, mis hijos y mi madre que me impulsaron aún cuando no tenía la voluntad y energías para seguir.

A mi tutora Tere por su paciencia y esfuerzo para que este escrito pudiese hacer realidad.

A todos aquellos seres queridos que ya no están con nosotros, pero dejaron su huella en nuestros corazones.

*Proverbios 1:7*

## ABREVIATURAS

IL-12.....	Interleucina 12
IL-23.....	Interleucina23
IFN- $\gamma$ .....	Interferón gamma
BCG.....	Bacillus de Calmette y Guérin
TNF- $\alpha$ .....	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
<i>Mtb</i> .....	<i>M. tuberculosis</i>
IFN- $\gamma$ R.....	Receptor de Interferón gamma
NEMO.....	Factor Nuclear Kappa B Modulador Esencial (de sus siglas en inglés, Nuclear Factor Kappa B Essential Modulator)
MSMD.....	Síndrome Mendeliano de Susceptibilidad a Enfermedades Micobacteriana
ELISA.....	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EAF.....	Estreptavidina-fosfatasa alcalina
TLRS.....	(De sus siglas en inglés, Toll like receptors) Receptores tipo TOLL
DP-IFN- $\gamma$ R1.....	Deficiencia Parcial Dominante en el IFN- $\gamma$ R1
RC-IFN- $\gamma$ R1.....	Deficiencia Completa Recesiva en el IFN- $\gamma$ R1
Stat-1.....	Transductor de señal y activador de la transcripción-1
Stat-4.....	Transductor de señal y activador de la transcripción-4
IL-17.....	Interleucina 17
GAF.....	Factores de activación por IFN gamma

## ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b>	<b>2</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>3</b>
<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
<b>2. Justificación</b>	<b>22</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>4. Objetivo general</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Objetivos particulares</b>	
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Grupo de estudio (criterios de inclusión y exclusión)</b>	<b>24</b>
<b>5.2 Descripción de pacientes con probables inmunodeficiencias primarias (IDP)</b>	<b>24</b>
<b>5.3 Crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y <i>M. bovis</i> BCG.</b>	<b>26</b>
<b>5.4 Determinación de la concentración del stock de las micobacterias mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonia (UFC).</b>	<b>27</b>
<b>5.5 Ensayos de infección de leucocitos con micobacterias, en sangre total periférica.</b>	<b>27</b>
<b>5.6 Crecimiento intracelular de Mtb. y BCG por unidades formadoras de colonias (UFC).</b>	<b>28</b>
<b>5.7 Ensayo de Fagocitosis de las micobacterias.</b>	<b>28</b>

<b>5.8 Tinción de Kinyoun.</b>	<b>29</b>
<b>5.9 Cuantificación de la producción de IFN-<math>\gamma</math> por la técnica de ELISA.</b>	<b>29</b>
<b>5.10 Cuantificación de la producción TNF-<math>\alpha</math> por la técnica de ELISA.</b>	<b>30</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>31</b>
<b>7. Discusión</b>	<b>47</b>
<b>8. Conclusión</b>	<b>51</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>53</b>
<b>Apéndice</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

El sistema inmune en los humanos es el encargado de la defensa del hospedero ante los microorganismos que nos rodean, sin embargo, se han descrito inmunodeficiencias primarias (IDP) causadas por alteraciones genéticas que afecta su función. Esta condición incrementa la susceptibilidad de los pacientes a diversas enfermedades infecciosas, dentro de los que se incluyen las micobacterias de baja virulencia como *Mycobacterium bovis* BCG. Entre las IDP se encuentran las denominadas MSMD (Síndrome Mendeliano de Susceptibilidad a Infecciones Micobacterianas), donde los genes del eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  están afectados y alteran la producción o respuesta al IFN- $\gamma$  y que son necesarios en la eliminación de las bacterias. En los pacientes con IDP tipo MSMD se han descrito alteraciones en la producción de las citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ ; sin embargo, no se habían explorado las repercusiones en la fagocitosis y el control de la infección micobacteriana. En el presente trabajo se utilizó un modelo de infección con *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* en sangre de pacientes con probable IDP para determinar si los leucocitos tienen alteraciones en la capacidad para fagocitar ambas micobacterias y para controlar su crecimiento, y la producción de citocinas pro-inflamatorias. Se observó que en dos de los pacientes con probable IDP hay una alteración para controlar el crecimiento de *M. bovis*. Además, no se detecta alteración en la fagocitosis de ningún paciente, puesto que el 70% de casos son las células polimorfonucleares que llevan a cabo la fagocitosis micobacteriana y un 30% las células mononucleares. Se concluye, que las IDP alteran la capacidad para sintetizar IFN- $\gamma$  al infectar con *M. bovis* y en menor proporción con *M. tuberculosis*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es la novena causa de muerte a nivel global, y una de las causas principales por un agente infeccioso (*Mycobacterium tuberculosis*) por encima del VIH/SIDA<sup>1 2</sup>. De acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de la Salud, se estima que la cuarta parte de la población mundial ha sido infectada o está infectada por el bacilo (TB latente); sin embargo, sólo el 10% tiene el riesgo de desarrollar la enfermedad por una susceptibilidad natural o cuando la persona presente un estado de inmunodeficiencia (infección VIH, cáncer, diabetes, artritis reumatoide a consecuencia de tratamientos anti-TNF- $\alpha$ ) desarrollando la TB activa<sup>1</sup>. Se estima que 10.4 millones de personas enfermaron de TB en el 2016, donde 90% eran adultos, 65% eran hombres, el 10% eran personas viviendo con VIH (74% en África) y 56% en cinco países (India, Indonesia, China, Filipinas y Pakistán).<sup>2 1</sup>

Como medida preventiva y para evitar un aumento en las muertes y contagios por *M. tuberculosis*, se creó y aplicó por primera vez la vacuna contra la TB en 1921<sup>3</sup>, hasta que en 1971 la Organización Mundial de la Salud la introdujo como parte del programa ampliado de inmunización alcanzando tasas de 80% de la población mundial<sup>3</sup>. Actualmente, se sigue aplicando en la mayoría de los países administrándose a 100 millones de niños cada año, como una medida preventiva a nivel mundial<sup>1 2</sup>.

La vacuna contra la TB derivada del Bacilo Calmette y Guérin (BCG), se preparaba a partir de un extracto atenuado de cultivos de *Mycobacterium bovis*, conservando su antigenicidad más no su virulencia<sup>3</sup>. La vacuna BCG es una de las vacunas más utilizadas mundialmente como parte de los programas de inmunización de la mayoría de los países y que se administra a más del 80% de neonatos y lactantes la cual presenta efecto protector contra la meningitis tuberculosa y la TB diseminada. Sin embargo, no evita la infección primaria ni la reactivación de la infección pulmonar latente (fuente principal de propagación del bacilo) siendo el efecto en la infección diseminada<sup>3 2</sup>.

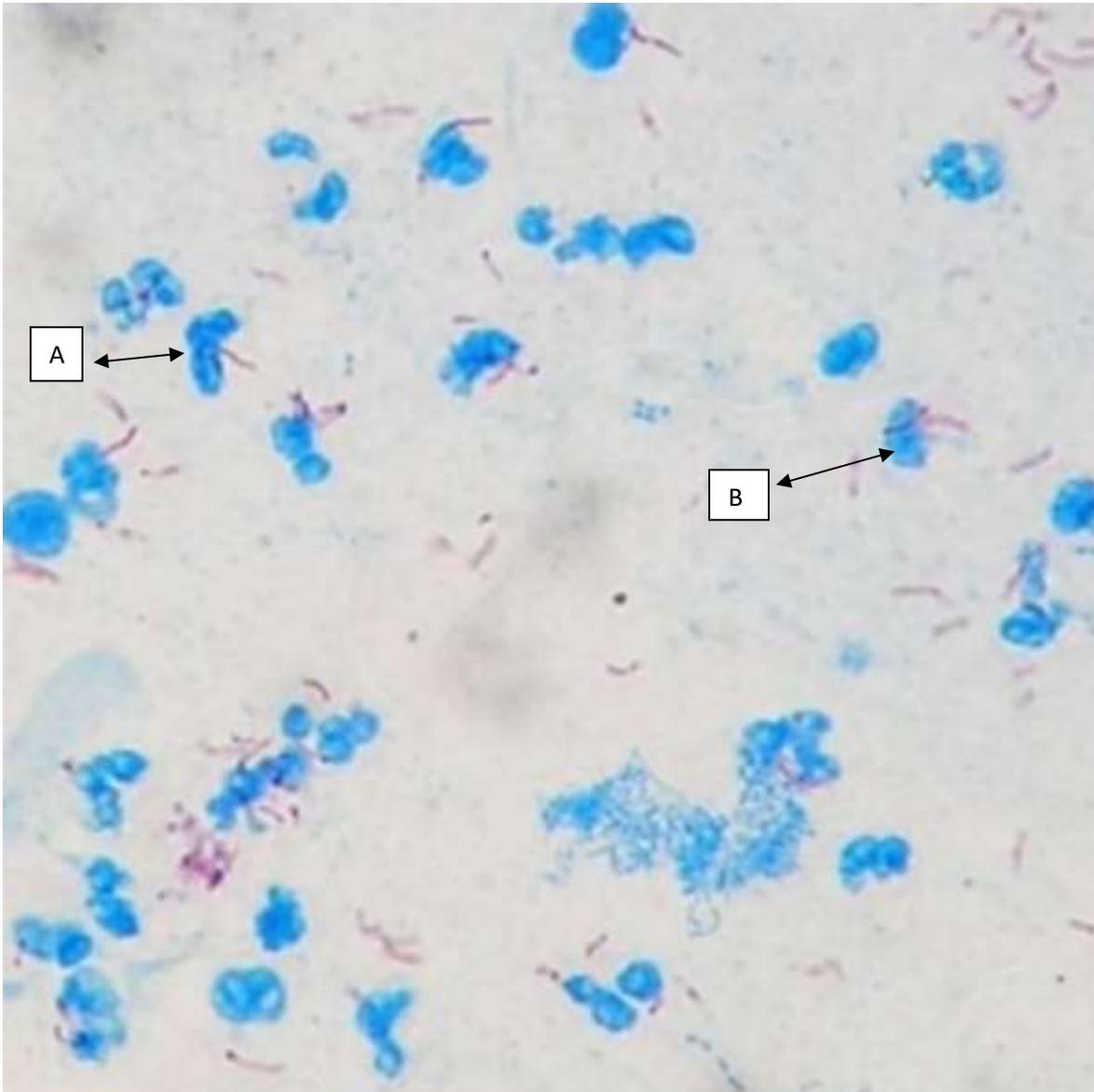
Las cepas utilizadas en la preparación de la vacuna BCG son la cepa francesa Pasteur 1173P2, la cepa Danesa 1331, la cepa Glaxo 1077 y la cepa Tokio 172, las cuales, constituyen cerca del 90% de las vacunas de BCG.<sup>2 3</sup>

### **Sistema Inmune**

El sistema inmune es esencial para nuestra sobrevivencia, ya que a diario estamos en contacto con muchos organismos patógenos. Este sistema está compuesto por la respuesta innata y la respuesta adaptativa; la respuesta innata es la primera línea de defensa y está caracterizado por la respuesta inmediata e inespecífica o poco específica<sup>4</sup>, en cambio el sistema inmune adaptativo es muy específico. El sistema inmune innato incluye el sistema fagocítico, el sistema de complemento y las barreras epiteliales naturales, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés PAMPs) y antígenos, de manera que el sistema inmune inespecífico inicia una respuesta y participa en la presentación de los antígenos (lipopolisacáridos, carbohidratos, proteínas, peptidoglicanos, ARN, ADN, etc.) interactuando con el sistema inmune adaptativo<sup>5</sup>.

### **Fagocitosis**

La fagocitosis es un mecanismo importante de la respuesta inmune innata que consiste en la modificación de la membrana de ciertos grupos celulares para invaginar partículas, microbios, restos celulares o incluso microorganismos completos que invaden el cuerpo y que posteriormente son eliminados en fagosomas y gránulos citoplasmáticos<sup>4</sup>. Este proceso es llevado a cabo por células que se especializan en el proceso de fagocitosis y se denominan como fagocitos profesionales. Las células polimorfonucleares son un grupo de fagocitos profesionales con un núcleo característico que forman diversos lóbulos segmentados y que dan la apariencia de tener varios núcleos. En este grupo encontramos principalmente a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Por otra parte, las células mononucleares contienen un núcleo no segmentado, en este grupo encontramos principalmente como fagocitos profesionales a los monocitos en sangre periférica, las células dendríticas y a los macrófagos en los tejidos <sup>4 .6</sup>



**Figura 1. Fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) por leucocitos.** Se observan las células polimorfonucleares (A) cuyo núcleo se encuentra segmentado y lobulado, y las células mononucleares (B) con un núcleo definido y sin segmentar. En rosa se puede observar a Mtb. teñida con Carbol-fucsina y en azul el núcleo de los leucocitos teñidos con azul de metileno.

### **Inmunodeficiencias primarias (IDP).**

Las inmunodeficiencias primarias son defectos en la función del sistema inmune y ocurren por defectos genéticos. Se han observado desórdenes genéticos que causan defectos en la

respuesta del sistema inmune que imposibilitan la eliminación de microorganismos patógenos y como consecuencia incrementan la susceptibilidad a enfermedades que normalmente nuestro sistema inmune no permitiría, como las bacterias atenuadas aplicadas en la vacuna de la tuberculosis, en donde se observa que lejos de crear la inmunidad se desencadena la enfermedad <sup>5</sup>. Las inmunodeficiencias se clasifican en: primarias y secundarias, en donde las primeras son producidas por defectos genéticos y hereditarios generadas por algún cambio en la secuencia del ADN (Ácido desoxirribonucleico) en el proceso de división celular; a diferencia de las inmunodeficiencias secundarias, que se producen a lo largo de la vida del individuo, ya sea por agentes químicos, intervenciones médicas o alteraciones inmunológicas causado por diversos agentes patógenos oportunistas como *M. bovis*, *Nocardia*, *Aspergillus*, entre otros<sup>7 8</sup>.

Las inmunodeficiencias primarias son agrupadas con base en los defectos que causan en el sistema inmune. De acuerdo al Comité de expertos en inmunodeficiencias primarias de la IUIS (Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas), la clasificación de las Inmunodeficiencias Primarias se estableció en 9 grupos <sup>9</sup>. En el grupo uno se encuentran las IDP que afectan la inmunidad celular y humoral, en el grupo dos Inmunodeficiencias combinadas asociadas a un síndrome, en el tres las IDP con deficiencias en anticuerpos, en el cuarto las IDP con enfermedades con desregulación inmune, en el quinto grupo se encuentran las IDP con defectos congénitos que afectan la fagocitosis, en el sexto los defectos intrínsecos en la inmunidad innata, en el séptimo los desórdenes autoinflamatorios, en el octavo las deficiencias del complemento, y el noveno grupo las IDP asociado a fenocopias.

#### **Mutaciones en pacientes con inmunodeficiencias tipo MSMD.**

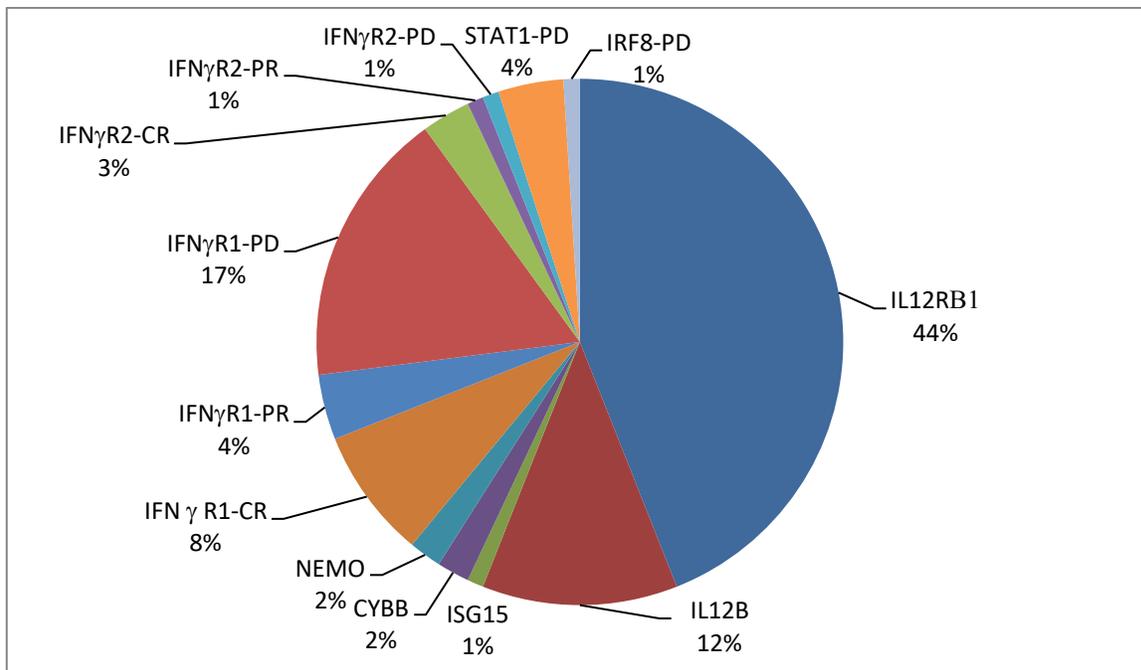
A partir de la década de los 90's, se reportaron mutaciones en genes en el eje IL-12/23-IFN $\gamma$ , relacionados con la producción de IFN- $\gamma$ , o bien, en la respuesta a la citocina<sup>10 11</sup>.

En 1951<sup>12</sup> se publicó por primera vez las complicaciones asociadas a la aplicación de la vacuna BCG, en donde 25 niños mostraron la formación de granulomas, edemas axilares, y la TB diseminada. Entonces se propuso por primera vez la posibilidad de una susceptibilidad de tipo genético que predispone a algunos individuos a infecciones micobacterianas

recurrentes. Posteriormente se le denominó Susceptibilidad Mendeliana a Enfermedades Micobacterianas (por sus siglas en inglés, MSMD) ya que las infecciones son principalmente micobacterianas y se presenta específicamente en ciertas familias<sup>13</sup>.

En 1995 Levin M. y colaboradores describieron seis casos de familiares con infección en respuesta a la vacuna BCG, en donde desarrollaron TB diseminada y disminución en la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro*<sup>13</sup>. La primera mutación fue reportada en 1996, donde se descubrió una deficiencia completa del receptor 1 (R1) de IFN- $\gamma$ , esto debido a una mutación nula recesiva en el gen de IFN- $\gamma$ R1, donde no hay una respuesta hacia esta citocina por falta de reconocimiento del receptor (IFN- $\gamma$ R) con su ligando (IFN- $\gamma$ ), lo que lleva a una nula activación de los macrófagos haciéndolos incapaces para eliminar a la bacteria<sup>14</sup>. En 1998, Ottenhoff y colaboradores describieron la existencia de una mutación en el gen que codifica para el receptor de IL-12 (IL-12R) en un paciente con infección por micobacterias y Salmonella<sup>15</sup>.

En la figura 2 se muestra la distribución de las mutaciones y los genes afectados por el síndrome MSMD. Algunos genes mutados comúnmente son : *IL12B* que codifica para la subunidad p40 de la IL-12 (proteína que forma el heterodímero con p35), *IL-12RB1* que codifican para la cadena  $\beta$ 1 del receptor para IL-12, *NEMO*, codifican para el Factor Nuclear Kappa B Modulador Esencial<sup>11</sup>. Así como genes relacionados en la respuesta hacia IFN- $\gamma$  como *IFNGR1* que codifica para la cadena R1 del receptor, *IFNGR2* que codifica para la cadena R2 del receptor de IFN- $\gamma$  y *STAT1* que codifica a un factor de transcripción presentes en monocitos y macrófagos que les permite activarse y eliminar a los patógenos fagocitados. El gen *CYBB* que codifica a la proteína gp91-*phox* ligado al cromosoma X que forma un heterodímero (con la proteína p22-*phox*) llamado flavocitocromo b558, una proteína importante en la formación de especies reactivas de oxígeno, que lleva a una incapacidad de los fagocitos para la eliminación de los patógenos intracelulares; y por último el gen *ISG15* que codifica a la proteína ISG15 tipo (ubiquitina), necesaria para la regulación del IFN- $\gamma$ <sup>11</sup>.



**Figura 2. Desórdenes genéticos conocidos en el eje IL-12/23-IFN- $\gamma$ .** Porcentajes de genes autosómicos (IL-12R $\beta$ , IFN- $\gamma$ R1, IL12p40, Stat1, IFN- $\gamma$ -R2, IL-12, IRF8) y genes ligados al cromosoma X (NEMO, CYBB, ISG15). CR=Completa recesiva, PR=Parcial recesiva, PD=Parcial dominante. Tomado de J. Bustamante<sup>11</sup>.

Actualmente, se han reportado mutaciones que afectan el IL-12/23-IFN- $\gamma$  en la mayoría de los países, sin embargo, diversos países como Belice, Guatemala, El Salvador, Puerto Príncipe, Puerto Rico, Costa Rica, Honduras, Panamá, Colombia, Ecuador, Nicaragua, Perú, Bolivia, Paraguay, Guyana, Suriname, Guyana francesa, Cuba, Jamaica, Haití y Uruguay aún no tienen registros de estas inmunodeficiencias.<sup>10</sup>

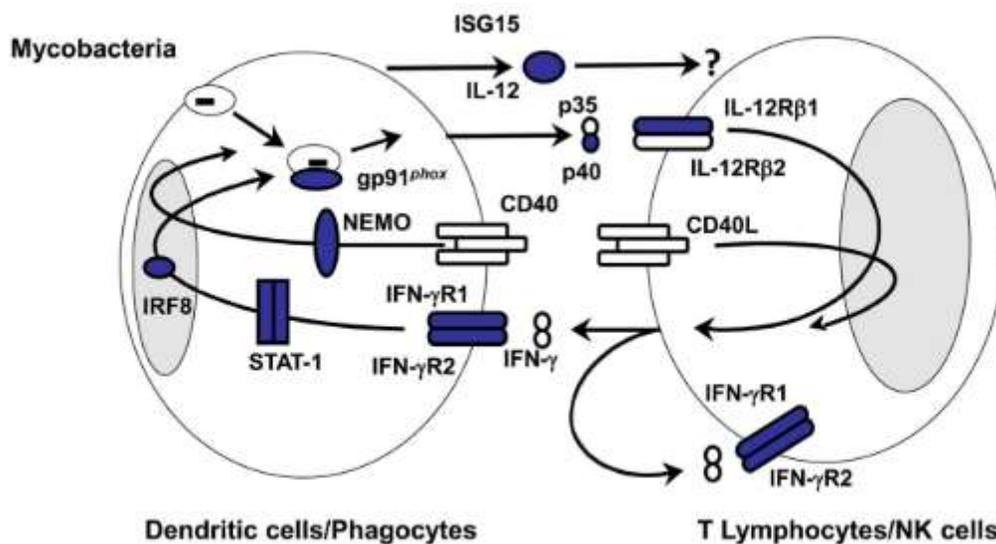
El estudio de las inmunodeficiencias es importante para que los resultados sean considerados y tener un tratamiento adecuado para los pacientes, ya que cada vez se incrementa el número de casos reportados aumentando la incidencia a nivel mundial.<sup>10 16</sup>

17

### Mutaciones que afectan el eje IL-12/IL-12/IFN- $\gamma$

El eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  implica la interacción de dos tipos celulares (fagocitos/linfocitos T) de la respuesta inmune, los cuales, participan en el control de infecciones por patógenos

intracelulares. Cuando las micobacterias son fagocitadas por el macrófago, a través del reconocimiento de algunos de sus componentes por receptores de manosa o TLRs (Toll like receptors) se inicia la transcripción de genes seguida de la producción de IL-12 y otras proteínas, siendo esta vía la que depende de la fagocitosis de la micobacteria<sup>4</sup>. Posteriormente, la IL-12 interacciona con su receptor presente en la membrana de los linfocitos T, que al ser activadas a través de la vía Tyk2/Jak2/STAT4 se inicia la producción del IFN- $\gamma$  necesario en la eliminación de patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* (Figura 3)<sup>11</sup>.



**FIGURA 3. Interacciones celulares que involucran el eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$ .** Cuando el monocito/macrófago fagocita al patógeno se desencadenan una cascada de señales dependientes de las citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ . Tomado de J. Bustamante<sup>11</sup>.

### Interleucina 12 (IL-12)

La IL-12 es una citocina producida por los monocitos, macrófagos y las células dendríticas<sup>4</sup>. Estructuralmente está constituida por dos polipéptidos (p35 y p40) formando la forma biológica activa (p70), que al unirse a su receptor (IL-12R) presentes en células T y NK

inducen la producción de IFN- $\gamma$  involucrando la vía de señalización intracelular Tyk2/Jak2/Stat4<sup>18</sup>.

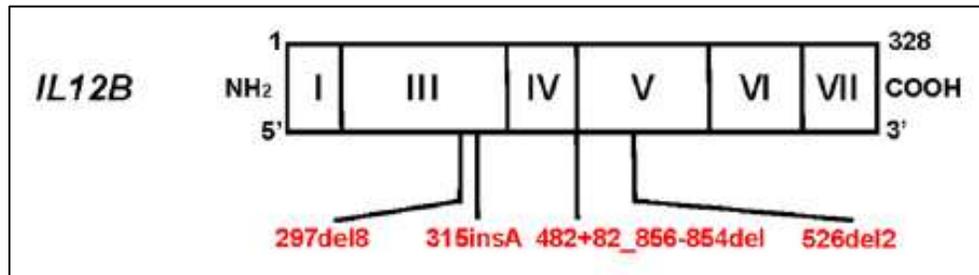
### **Mutaciones en el gen *IL-12B* que codifica la subunidad p40 de IL-12**

El gen *IL-12B* que codifica para la subunidad p40 de la IL-12 e IL-23, está formada por 7 exones que codifican un dominio extracelular tipo inmunoglobulina 3 N-terminal, un dominio transmembranal y un dominio intracelular (Figura 4)<sup>10</sup>. De acuerdo a lo reportado en el 2014, las mutaciones que afectan este gen se presentan el 12% de los pacientes con inmunodeficiencias<sup>11</sup>. Estas mutaciones afectan a la proteína p40, la cual, es una molécula que conforma a la IL-12 (p40 y p35) así como a la IL-23 (p40 y p19) que son encargadas en la activación de diferentes vías que concurren en la producción de IFN- $\gamma$  y de IL-17, necesarias para potenciar la proliferación y la actividad citotóxica en linfocitos T y células NK, así como la activación de los macrófagos, monocitos y neutrófilos involucrados en la respuesta inmune innata<sup>11</sup>.

Las uniones entre los heterodímeros protéicos (p40 y p35 o p40 y p19) están ligadas por puentes disulfuro generando la forma activa de las citocinas IL-12 e IL-23. Cada subunidad se une a una subunidad del receptor, siendo el IL-12R $\beta$ 1 la subunidad específica de la p40 y de IL-12R $\beta$ 2 el receptor de la p35. Existen casos de IDP debidas a una alteración en el gen de *IL-12B* (mutaciones recesivas completas y de pérdida de función) y afecta la funcionalidad y conformación de la citocina IL-12 y de IL-23, puesto que ambas citocinas están conformadas por la misma subunidad<sup>11 10</sup>.

Los primeros reportes registrados de esta mutación ocurrieron en 1998,<sup>15</sup> sin embargo, se ha observado que la mayoría de los pacientes presenta niveles bajos en la secreción de IL-12p40 (tanto en células de pacientes como en células B transformadas), de IL-12p70, IL-23, así como la presencia de niveles bajos de IFN- $\gamma$ . Todos los pacientes con la inmunodeficiencia fueron vacunados y presentaron diseminación de *Mycobacterium bovis* (BCG) y otras micobacterias de baja virulencia como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, así como casos de salmonelosis, lo cual puede indicar alteración en la vía IL-12/IL-

23 implicada en el control de bacterias intracelulares, por medio de la producción de IFN- $\gamma$  aunque la IL-23 puede también permitir la producción de IL-17 por parte de los linfocitos T.



**Figura 4. Mutaciones en el gen codificante del *IL12B*.** En rojo se observan las mutaciones recesivas con pérdida de función con defecto completo; los exones se muestran en número romano. Tomado de J Bustamante<sup>11</sup>.

#### Mutaciones en el gen *IL12B1* que codifica la subunidad IL12-R $\beta$ 1

El gen *IL12B1* codifica para el IL-12R $\beta$ 1 contiene 16 exones que codifican para una proteína que tiene un dominio extracelular 3 N-terminal semejante al de las inmunoglobulinas, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. En la figura 5, se observa que las mutaciones reportadas para este gen son recesivas, es decir, se expresan cuando los dos genes están mutados (condición homocigota para la mutación) y codifican para una pérdida de función completa del receptor. Los primeros 7 casos de estas deficiencias fueron publicados en 1998,<sup>1915</sup> sin embargo, nueve años después se describieron 89 casos y 62 casos publicados hasta ese año, por lo que hasta ahora las deficiencias en IL-12R $\beta$ 1 son las etiologías de MSMD más frecuentes<sup>20 21 17 22</sup>.

Como puede apreciarse en la figura 2, las mutaciones que afectan este gen son las que se presentan con mayor frecuencia en los pacientes con este tipo de IDP, y hasta 2014, de 406 pacientes estudiados, el 44% corresponde a mutaciones en este gen<sup>11</sup>. Desde 1998 a la fecha se han reportado más de 40 mutaciones distintas que afectan diferentes exones de este gen<sup>18</sup>. Las mutaciones en IL-12R $\beta$ 1 son recesivas nulas con pérdida de función completa (figura 5), lo que quiere decir que sólo se manifiestan en condición homocigota o

heterocigoto y que el receptor muestra deficiencia completa, sin embargo, las mutaciones son muy diversas y van desde mutaciones de cambio de una base (cambios en aminoácidos) que no permiten un procesamiento y maduración del RNA impidiendo la traducción y expresión de la proteína, hasta inserciones, microdelecciones o deleciones largas que de igual manera permiten un fenotipo desfavorable para la síntesis de la proteína del receptor<sup>10 18</sup>.

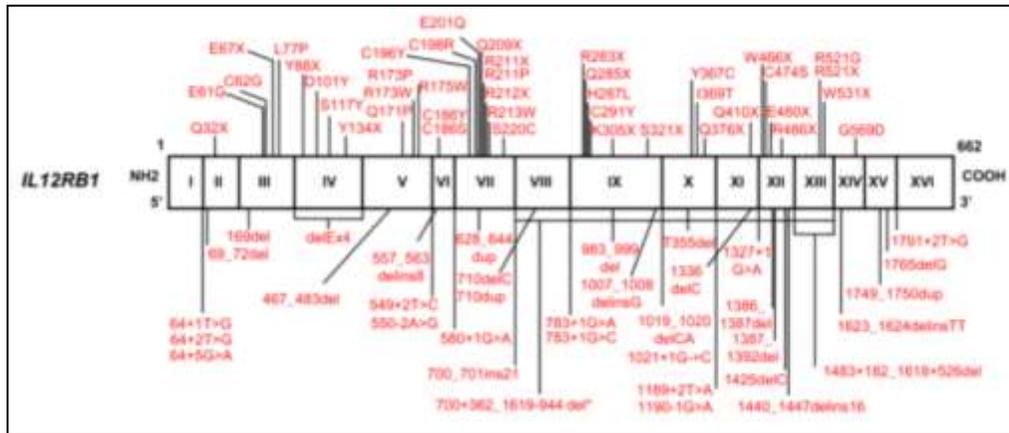


Figura 5. Mutaciones encontradas en el gen *IL12RB1* que codifica para el *IL12Rβ1*. En rojo se observan las mutaciones recesivas con pérdida de función y defecto completo. Tomado de J. Bustamante<sup>11</sup>.

### Interferón gamma (IFN-γ)

La molécula de IFN-γ es una citocina formada por dos cadenas antiparalelas de 143 aminoácidos, con peso molecular de 34kDa, producida principalmente por los linfocitos T y las células asesinas naturales<sup>10</sup>. Dentro de las funciones más importantes del IFN-γ es inducir la activación de los macrófagos al inducir la expresión de más de 200 genes involucrados en los mecanismos bactericidas<sup>23</sup>, seguida de su interacción con su receptor heterodímero presente en la membrana de los monocitos y macrófagos (R1 y R2)<sup>10 11</sup>.

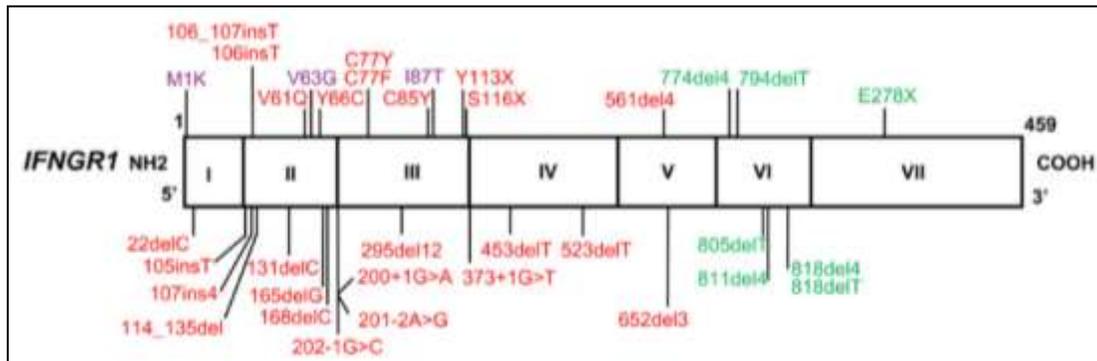
El mecanismo de acción del IFN-γ inicia cuando se une a su receptor (IFN-γR1/IFN-γR2) y se forma un tetrámero que consta de dos moléculas de los receptores heterodiméricos de IFN-γ, así como la citocina homodímera, permitiendo la activación de la vía Jak1 y Jak 2 que fosforilan las regiones tirosina cinasa y que permiten el reclutamiento de STAT 1, la

fosforilación y la dimerización de las moléculas Stat1 fosforilada formando un dímero. El dímero de Stat 1 fosforilado, se trasloca del citosol de la célula al núcleo en donde activa a múltiples genes y permitiendo su transcripción<sup>10 16</sup>.

### **Mutaciones en el gen de *IFN-γR1* que codifican el IFN-γR1**

El gen *IFGR1* que codifica el IFN-γR1 consta de siete exones que codifican para un dominio extracelular que interactúa con el complejo IFN-γ-IFN-γR2, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático requerido para la transducción de señales (Figura 6)<sup>11</sup>. Las mutaciones en este gen afectan al 21% de pacientes con inmunodeficiencias y fueron las primeras mutaciones genéticas descritas (mutación recesiva completa) en pacientes con MSMD<sup>11</sup>. Diez años después se han identificado en 86 pacientes (de los cuales 62 son consanguíneos) originarios cerca de 28 países. Desde entonces, han sido publicadas diferentes mutaciones y se han categorizado como mutaciones recesivas con deficiencia completa del receptor, o mutaciones recesivas/dominantes con deficiencia parcial en el receptor<sup>14</sup>.

Las deficiencias **dominantes parciales** (DP, por sus siglas en inglés) son resultado de la síntesis del dominio citoplasmático truncado que resulta en una pérdida “parcial” de función lo que impide la señalización que permita la activación de los macrófagos o monocitos<sup>4</sup>. Sin embargo, se han observado que los receptores responden a concentraciones altas de IFN-γ recombinante<sup>21</sup>. Es importante mencionar que clínicamente las deficiencias DP-IFN-γR1 son menos graves que las mutaciones **recesivas completas** (RC, de sus siglas en inglés), ya que las en las mutaciones DP pueden responder a tratamientos con altas concentraciones de IFN-γ recombinante mientras que en las RC los pacientes afectados no responden en lo absoluto al IFN-γ, por lo que no pueden recibir tratamiento con IFN-γ recombinante y tienen una esperanza de vida muy corta. A pesar de las diferencias mostradas en estas deficiencias, los pacientes muestran infecciones con micobacterias de baja virulencia como son BCG y las micobacterias ambientales así como infecciones por Salmonella que son bacterias intracelulares<sup>10 11</sup>.



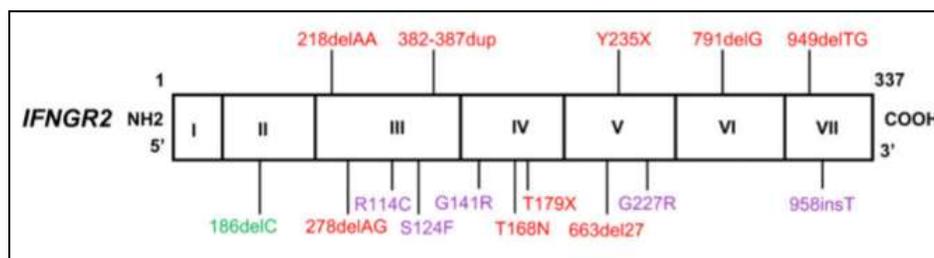
**Figura 6. Mutaciones en el Gen codificante al Receptor 1 de IFN- $\gamma$ .** En rojo se señalan las mutaciones recesivas con pérdida de función completa. En púrpura, las mutaciones recesivas asociadas con una mutación parcial, y en verde se observan las mutaciones dominantes con deficiencia parcial. Tomado de J. Bustamante<sup>11</sup>.

### Mutaciones en el gene *IFNGR2* que codifica el IFN- $\gamma$ R2

El gen *IFNGR2* que codifica para IFN- $\gamma$ R2 está compuesto por siete exones, los cuales codifican para un dominio extracelular que interactúa con el complejo IFN- $\gamma$ -IFN- $\gamma$ R1, un dominio transmembranal, y un dominio citoplasmático requerido para la transducción de señales (Figura 7)<sup>11</sup>. Las mutaciones encontradas en los exones del gen *IFNGR2* son mutaciones recesivas con pérdida de función completa, mutaciones recesivas con pérdida de función parcial y mutaciones dominantes con pérdida de función parcial. Los receptores IFN- $\gamma$ R1 y IFN- $\gamma$ R1 pertenecen a la familia de receptores clase II en donde ambos se unen fuertemente sólo cuando hay estimulación por parte del IFN- $\gamma$ , sin embargo, el IFN- $\gamma$ R2 es expresado en niveles bajos. La deficiencia en este receptor es de las mutaciones más raras ya que hasta el 2006 sólo se habían identificado nueve niños con la inmunodeficiencia presentando en su mayoría una mutación recesiva completa<sup>10</sup>.

Los efectos reportados de pacientes con mutación en el gen *IFNGR2* son la falta de expresión del receptor debido a una deleción en el gen o una proteína incompleta debido a un codón de terminación prematuro, así como la expresión de un receptor no funcional que al interactuar con el IFN- $\gamma$  no se lleva a cabo la señalización. En esta mutación se ha observado una expresión similar a las mutaciones en el IFN- $\gamma$ R1, sin embargo, los

tratamientos se realizan dependiendo la condición de cada paciente, ya que en pocos casos se ha observado éxito en el tratamiento con IFN- $\gamma$ <sup>24</sup>.



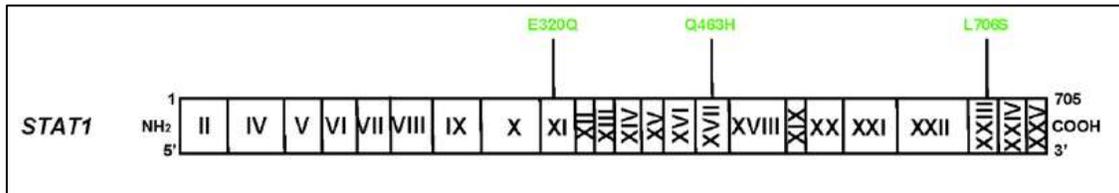
**Figura 7. Mutaciones en el Gen codificante al Receptor 2 de IFN $\gamma$ .** En rojo se señalan las mutaciones recesivas con pérdida de función completa. En púrpura, las mutaciones recesivas asociadas con una mutación parcial, y en verde se observan las mutaciones dominantes con deficiencia parcial. Tomado de J. Bustamante<sup>11</sup>.

### Mutaciones en el gen *STAT1* que codifica Stat-1

El gen del transductor de señal y activador de la transcripción-1 (Stat-1) está compuesto de 25 exones en los cuales se han registrado reportes de mutaciones dominantes parciales en el exón 11, 17 y 23 (Figura 8)<sup>10 11</sup>. Este gen codifica para una proteína con cuatro dominios, el dominio SH2 que juega un rol importante en la interacción con IFN- $\gamma$ R1, el dominio DNA-Binding, el Tail-Segment, y el dominio Transactivador (TA). La proteína Stat-1 es primordial para la respuesta celular mediada por IFN $\gamma$  ya que se induce la fosforilación y homodimerización de Stat-1 conocidos como también como Factores de activación del IFN Gamma (GAF por sus siglas en inglés) lo que resulta en la translocación de estas moléculas al núcleo donde actúan como factores de transcripción de IFN- $\gamma$  uniéndose así a secuencias conocidas como GAS (secuencias activadoras por el IFN gamma)<sup>4</sup>.

En el 2001, se encontró la primera mutación en el gen que codifica dicha proteína afectando la funcionalidad de GAF por una mutación que causa pérdida de función y una falta de activación causada por falta de fosforilación en el residuo de tirosina 701 del gen<sup>11</sup>. Sin embargo, se han documentado otras alteraciones en genes que codifican para el dominio DNA-Binding, así como para el dominio de SH2 que suelen clasificarse como mutaciones de pérdida de función o de pérdida de expresión<sup>11 10</sup>, y mutaciones con ganancia de función (GOF por sus siglas en inglés) que se ha observado desencadenan enfermedades de

candidiasis mucocutánea crónica al alterarse la desfosforilación nuclear y modificarse el dominio de unión del ADN y STAT1<sup>25</sup>.



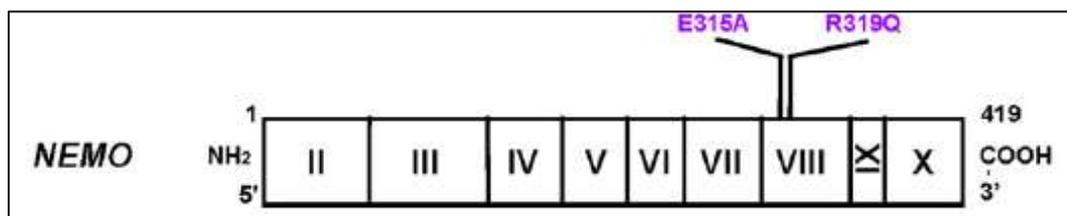
**Figura 8. Mutaciones en el gen del Transductor de señal y activador de la transcripción STAT1.** En verde se señalan las mutaciones dominantes causantes de una deficiencia parcial. Tomado de J. Bustamante<sup>11</sup>.

### Mutaciones en el gen *NEMO*

Las mutaciones descritas anteriormente son mutaciones autosomales, sin embargo, la mutación encontrada en el gen *NEMO* es ligada al cromosoma X, el cual está constituido por 10 exones formada por un dominio extracelular N-terminal semejante a la inmunoglobulina, un dominio transmembranal y un dominio intracelular COOH (figura 9)<sup>11</sup>. Las mutaciones registradas ocurren en el exón 8 codificando para una mutación recesiva con pérdida de función parcial. *NEMO* es una subunidad regulatoria del complejo IKK que activa la vía de señalización canónica NF- $\kappa$ B, por lo que regula la expresión de numerosos genes blanco por medio de la fosforilación, degradación y ubiquitinación de I $\kappa$ B $\alpha$ . *NEMO* contiene dos dominios coiled-coil (CC1, CC2), un dominio Leucina zipper (LZ por siglas en inglés) y un motivo ZF (zinc finger) por lo que está implicado en una interacción proteína-proteína, y que junto con la proteína IKK son necesarios para los procesos de oligomerización<sup>11</sup>.

Las mutaciones específicas que suelen presentarse ocurren en el dominio LZ de *NEMO* y están asociadas a una enfermedad ligada al cromosoma X. Esta alteración es de las menos frecuentes relacionadas en el eje IL-23/IL-12-IFN- $\gamma$  por lo que los pacientes presentan susceptibilidad a infecciones micobacterianas principalmente por *M. bovis* BCG, *M. avium*, *Salmonella*, *M. tuberculosis*<sup>18 26 27</sup>. Además de la inmunodeficiencia, los pacientes con mutaciones en *NEMO* tienen otras características fenotípicas relacionadas con tejidos

derivados del mesodermo como piel escamosa con displasia ectodérmica, ausencia de glándulas sudoríparas, y cabello escaso y delgado.<sup>10</sup>



**Figura 9. Mutaciones en el gen NEMO.** En Púrpura se señalan las mutaciones recesivas asociadas con una mutación parcial. Tomado de J. Bustamante<sup>11</sup>.

Todas las mutaciones reportadas afectan al eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  poniendo en evidencia su repercusión en la respuesta inmune de los pacientes con inmunodeficiencias primarias<sup>7 2 8</sup>.

### Inmunodeficiencias en México

En México, se han reportado IDP asociadas a desordenes genéticos que afectan el eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  y que causan una alteración en la capacidad del sistema inmune para eliminar microorganismos intracelulares. Una de estas inmunodeficiencias es la MSMD (Síndrome de Susceptibilidad Mendeliana a las Infecciones Micobacterianas)<sup>18 26 27</sup>. Algunos reportes descritos en nuestro país indican que entre las infecciones por bacterias más recurrentes en estos pacientes son las causadas por bacterias intracelulares como *M.bovis* BCG, *M.avium*, *Salmonella*, *M.tuberculosis*, *Nocardia*, *Leishmania*, *Cándida albicans*<sup>7</sup>. Sin embargo, en las infecciones por micobacterias la mayoría los pacientes no responden adecuadamente a los medicamentos de primera línea, siendo resistentes a rifampicina, pirazinamida e isoniazida complicándose su tratamiento<sup>18 26 27</sup>.

Es importante profundizar en el estudio de las inmunodeficiencias para poder saber si las mutaciones alteran la capacidad de las células del sistema inmune sobre el control de las infecciones y particularmente en la fagocitosis de las células mononucleares y polimorfonucleares, ya que se ha observado personas con MSMD no controlan

adecuadamente las infecciones causadas por patógenos intracelulares como *M. bovis* y *M. tuberculosis*<sup>11 9</sup> .

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En México, la vacuna BCG se aplica al nacimiento en los hospitales de gobierno como medida de protección para la TB; sin embargo, se han observado reacciones adversas en algunos recién nacidos, o bien, en edades pediátricas. Estas reacciones pueden deberse a inmunodeficiencias primarias que afectan la producción o respuesta al IFN- $\gamma$ , y el control de micobacteriano.

Por lo anterior, en este trabajo se propone la adaptación de un modelo de infección en sangre periférica para evaluar el control del crecimiento intracelular de micobacterias y su aplicación en pacientes con inmunodeficiencias en el eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  con la finalidad de demostrar el efecto de las mutaciones sobre el control de la infección.

## **3. HIPÓTESIS**

Los pacientes con mutaciones en el eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  tienen predisposición a infecciones diseminadas por micobacterias de baja virulencia, debido a que las mutaciones afectan la fagocitosis y los mecanismos bactericidas de los monocitos y PMN involucrados en la eliminación de las micobacterias.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si los leucocitos de pacientes con IDP tienen alteraciones en la capacidad para controlar el crecimiento de *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis* H37Ra, así como en la fagocitosis y la producción de citocinas pro-inflamatorias.

### 4.1 Objetivos Particulares

- 1) Adaptar el modelo de infección en sangre con *M.bovis* BCG y *M. tuberculosis* con un MOI 10.
- 2) Evaluar la capacidad bactericida de los leucocitos de sangre mediante el control del crecimiento intracelular de las micobacterias medida por unidades formadoras de colonia (UFC) en placas de agar 7H10.
- 3) Identificar las poblaciones (Polimorfonucleares y Mononucleares) involucradas en la fagocitosis de las micobacterias mediante el análisis microscópico y determinar posibles diferencias en la fagocitosis de Mtb. y BCG, así como en los pacientes.
- 4) Cuantificar la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en muestras sanguíneas infectadas con micobacterias mediante la técnica de ELISA.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo se realizó como un proyecto inter-institucional entre el Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición

y Ciencias Médicas Salvador Zubirán. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética de ambas instituciones.

## **5.1. Grupo de estudio**

### Criterios de Inclusión

Pacientes en diferentes instituciones (Hospital Infantil de México, Hospital del Niño en Morelos, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias) con un historial clínico por infecciones recurrentes por micobacterias y otras bacterias intracelulares (como *Nocardia*, *Klebsiella*, *Listeria*), así como la formación de granulomas o adenitis posterior a la aplicación de la vacuna por BCG. Los pacientes o sus padres, en caso de menores de edad, dieron su consentimiento informado por escrito para la realización de ensayos con muestras de sangre.

### Criterios de Exclusión

Pacientes que nieguen su consentimiento, o bien, que hayan dado su consentimiento pero que tengan infección con VIH, cáncer, diabetes mellitus o tratamientos con inmunosupresores que afectan la respuesta inmune

## **5.2. Descripción de pacientes con probables inmunodeficiencias primarias (IDP)**

Paciente 1. Mutación del gen *IL12RB2*

Masculino, 26 años, originario del estado de Veracruz. El diagnóstico molecular hecho en el laboratorio del Dr. J.L. Casanova en Paris fue una mutación en el gen *IL-12RB2* en el dominio intracelular de la cadena beta 2 de la proteína, causando un cambio de aminoácido E771K (el ácido glutámico, E) que se encuentra normalmente en la posición 771 de la proteína cambió a Lisina, K. Esto se traduce en un defecto en la producción de IFN- $\gamma$ . La mutación no se encontró en la madre y en el padre no fue posible hacerle el estudio.

Paciente 2.

Masculino con historia de infecciones recurrentes por micobacterias, aún sin establecer el diagnóstico molecular.

### Paciente 3

Masculino con infecciones recurrentes, pero hasta el momento de estudio sin evidencia de mutación en un gen del eje IL-12/1L23/IFN- $\gamma$ . La prueba de la Dihidrorodamina, para evaluar el estallido respiratorio en el paciente fue normal. No se ha concluido un diagnóstico molecular.

### Paciente 4. Mutación en el gen *IFNGR1* (Aumento de *IFNGR1*)

Masculino de 26 años, nació en la ciudad de México. Presentó adenopatía axilar a los dos años posterior a su vacunación con BCG, y después tuberculosis diseminada. A los 9 años reportó lesiones nodulares hepáticas acompañadas de vómito y fiebre. En el 2013 ingresó al hospital INNSZ donde presentó múltiples adenopatías en tórax. Del análisis molecular que se le realizó posteriormente, se encontró que el gen *IFNGR1* tiene la mutación 805 del T en el exón 6, causando un IFN- $\gamma$ R1 no funcional. Esta mutación causa una respuesta alterada en los monocitos y macrófagos del paciente que genera una sobreexpresión del receptor IFN- $\gamma$ R1 y una respuesta deficiente a IFN- $\gamma$ . También se observó un nivel bajo de fosforilación de STAT-1 y una baja producción de IL-12p40. La mutación no se encontró en los padres, por lo que es considerada una mutación de *novo* (apareció por primera vez en la familia).

### Paciente 5 (Probable defecto en la producción de IFN- $\gamma$ )

Masculino de 11 años nacido en el estado de Yucatán. Posterior a su vacunación con BCG presentó linfadenopatía axilar y ocho meses después volvió a presentar conglomerado de ganglios linfáticos. En el 2012 presentó lesiones cutáneas eritematosas ulceradas y nódulos axilares y en cabeza. En el 2013 presentó fiebre y nuevamente ganglios linfáticos axilares por una cepa de *M. bovis* resistente a rifampicina. Se encontró evidencia de una falla en la producción de IFN- $\gamma$ , pero no se encontró evidencia de defecto en la subunidad IL-12RB1.

Actualmente el paciente está en tratamiento y ha tenido una mejoría significativa sin evidencia en el control del crecimiento micobacteriano y continúa el estudio genético.

### **Muestra Biológica**

A los pacientes, familiares y voluntarios sanos se les tomó una muestra de sangre periférica (8 ml) en tubos con heparina (BD Vacutainer) debidamente etiquetadas con los datos de los pacientes.

### **5.3 Crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra y *M. bovis* BCG.**

Se realizó un cultivo masivo en medio de cultivo líquido 7H9-ADC para *M. tuberculosis* y 7H9-OADC para *M. bovis* (ver apéndice), incubando por 21 días en agitación a 100 rpm a 37°C. Cumplido el tiempo de incubación, se agregaron 30 ml de la suspensión micobacteriana en tubos de 50ml (Falcon) centrifugando a 3000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron de 3-5 ml de medio líquido (7H9-ADC para *M. tuberculosis* 7H9-OADC para *M. Bovis-BCG*) a cada uno de los tubos y resuspendiendo las bacterias por agitación en vórtex. Se juntaron las suspensiones micobacterianas en una botella estéril (una botella de 1L para cada cepa de micobacteria) para su homogenización y se hicieron las alícuotas de 1 ml en criotubos y se almacenaron a -70°C. Para determinar la concentración de las alícuotas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se eligieron al azar 3 viales de las alícuotas y se centrifugaron a 800 rpm durante 8 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió la micobacteria en 1 ml de medio 7H9-ADC y se procedió a la disgregación micobacteriana subiendo y bajando la muestra con jeringas de 3ml y 1ml seguido de sonicación durante 1 min a la máxima capacidad. Posterior a dicho proceso, se centrifugó a 1000 rpm durante 2 min y el sobrenadante con la bacteria disgregada fue transferido a otro vial para su posterior determinación de la concentración por UFC.

#### **5.4 Determinación de la concentración del stock de las micobacterias mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonia (UFC).**

Posterior a la disgregación de las bacterias (*M. tuberculosis* H37Ra o *M. bovis* BCG), se realizaron 10 diluciones seriadas 1:10 en medio 7H9-ADC tomando 100µl del vial micobacteriano adecuadamente mezclado en 900 µl de medio, posteriormente ya mezclado se tomaron 100 µl de la primera dilución y se depositaron en otro tubo con 900 µl de medio 7H9 para realizar la siguiente dilución así sucesivamente hasta completar las 10 diluciones. Posterior a la realización de las diluciones seriadas, se tomaron 10 µl de cada dilución mezcladas en vórtex y se sembraron por triplicado en medio sólido 7H10-OADC. Las placas de agar se incubaron 21 días a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> y se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) crecidas en cada triplicado, se hizo un promedio y se reportó en UFC/ml.

#### **5.5 Ensayos de infección de leucocitos con micobacterias, en sangre total periférica.**

El método es una adaptación del descrito por el Dr. Robert Wallis<sup>29</sup>. En un tubo de 4 ml (BD, San José, CA) se mezclaron 300 µl de sangre con 300 µl de la micobacteria disgregada (*M.bovis* o *M.tuberculosis H37Ra*) a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 (10 micobacterias por 1 monocito). Considerando que en 1 ml de sangre periférica hay 1x10<sup>6</sup>/ml células mononucleares de los cuales el 10% son monocitos (1x10<sup>5</sup>), es decir 3x10<sup>4</sup> monocitos entonces se requieren 300 µl con 30x10<sup>4</sup> de la micobacteria, para tener total de 600 µl (por duplicado). Las muestras se incubaron a 37°C con agitación constante a 50 rpm durante 24 y 96 h. A los dos tiempos de la cinética de estudio las muestras se centrifugaron durante 10 min a 1500rpm y los plasmas sanguíneos se recuperaron y se almacenaron a -20°C, para posteriormente hacer la cuantificación de IFN-γ y TNF-α por ELISA. Y el paquete celular se utilizó para determinar UFC.

## **5.6 Crecimiento intracelular de Mtb. y BCG por unidades formadoras de colonias (UFC).**

Después del paso anterior de infección, el paquete leucocitario se lisó con 2 ml de agua estéril mezclando en vórtex por 5 minutos para liberar las micobacterias y poder realizar la cuantificación de UFC. Se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm para concentrar los restos celulares y las micobacterias fagocitadas y se eliminó el sobrenadante. El paquete del lisado celular se resuspendió en 100µl de 7H9-ADC, para agregarlos en un tubo con 900 µl 7H9-ADC y hacer las diluciones seriadas 1:10. Las diluciones se mezclaron en vortex y se sembraron 10 µl de cada una por triplicado en agar sólido 7H10-OADC y se incubaron durante 21 días a 37°C. Se hizo la cuenta de UFC y el promedio para determinar la inhibición del crecimiento de la micobacteria por los monocitos y células polimorfonucleares en muestra de sangre periférica.

## **5.7 Ensayo de Fagocitosis de las micobacterias.**

Para realizar este ensayo, se tomaron 300µl de la muestra de sangre completa (600 por duplicados) y se agregaron en tubos de 4 ml de polipropileno (BD2063) y se mezclaron con 300 µl ( $30 \times 10^4$ ) de las micobacterias (*M. tuberculosis* H37 Ra o *M. bovis* BCG) para realizar la infección con MOI 10. Se incubó durante 1 hora en agitación constante a 50 rpm a 37°C y finalizado el tiempo de incubación se centrifugó la muestra a 1500rpm durante 10min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se lisaron los eritrocitos con 1 ml de cloruro de amonio (Apéndice) e incubación durante 5 min en hielo, se agregó 1 ml de PBS y se centrifugó nuevamente. El paquete celular se lavó con 1 ml de PBS, se mezcló y nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones. Se realizó un segundo lavado y finalmente el paquete celular fue resuspendiendo en 500 µl de PBS. Se tomaron de 150 µl de la suspensión celular y se depositaron en las copas de la citocentrífuga (Cytopro, Westor) para preparar el frotis, centrifugando a 800 RPM durante 3 minutos. Se dejaron secar las preparaciones y posteriormente se fijaron con metanol y se procedió a hacer la tinción de Kinyoun.

## **5.8 Tinción de Kinyoun**

Se realizó la tinción Kinyoun para micobacterias utilizando el TB quick stain kit (Beckton Dickinson) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la realización de la tinción fue necesario cubrir la laminilla con Carbol-fucsina durante 4 minutos necesarios para que el colorante permeabilizara la pared de las micobacterias y estas pudieran teñirse. Después se lavó con agua el exceso de colorante y con la finalidad de retirar adecuadamente el colorante no permeabilizado se agregó TB Decolorizer (alcohol-ácido) por 5 segundos seguido de un segundo lavado con agua corriente. Posteriormente, se realizó la contra-tinción con azul de metileno por 30 segundos que permitirán la tinción de los núcleos celulares seguido de un lavado con agua corriente. Ya finalizada la tinción, las preparaciones se analizaron en el microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión. Se identificaron las poblaciones celulares (monocitos o polimorfonucleares) que fagocitaron a las micobacterias y se reportaron en porcentaje considerando 100 células que hayan fagocitado por muestra como mi 100%.

## **5.9 Cuantificación de la producción de IFN- $\gamma$ por la técnica de ELISA.**

Para la sensibilización (cubrimiento del pozo con un anticuerpo primario) de las placas de 96 pozos, se diluyó el anticuerpo primario (Dilución 1:1000) anti-IFN- $\gamma$  agregando 5  $\mu$ l de dicho anticuerpo en 5 ml de PBS agregando 50  $\mu$ l por pozo y posteriormente se cubrió con parafilm y se incubó por 2 horas a 37°C y después a 4°C hasta su uso. Se eliminó el anticuerpo y se agregaron 100  $\mu$ l por pozo de Superblock (Thermo Scientific, Meridiac Rd, Rockford) que es una solución para cubrir todo el pozo y evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos y la enzima a temperatura ambiente por 15 minutos y se realizaron tres lavados (Apéndice) secando la placa para agregar las muestras. Se agregaron 50  $\mu$ l por pozo de cada una de las muestras de plasma sin diluir de los experimentos de infección en sangre, a diferentes concentraciones de estándares (con la citocina a identificar) y blancos (RPMI) con su respectivo duplicado, para su posterior incubación a 37°C por 2 horas. Se realizaron 3 lavados y se secó la placa antes de adicionar el anticuerpo secundario anti-IFN- $\gamma$  conjugado a biotina (Dilución 1:2000), el cual, se preparó agregando 2.5  $\mu$ l en 5 ml de PBS-

T-BSA 2% e incubando 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados para agregar 50  $\mu$ l por pozo de la enzima Estreptavidina-fosfatasa alcalina (EAF) (Dilución 1:2000) es decir 2.5  $\mu$ l en 5ml de buffer de albúmina (PBS-BSA 2%). Se dejó incubando 30 min a temperatura ambiente, y se realizaron 3 lavados y se adicionaron 50  $\mu$ l a cada pozo de sustrato de fosfatasa permitiendo 20 min para que se desarrollara el color de la reacción. Finalmente, se hizo la lectura en el lector de ELISA a 405 nm utilizando el modo de un solo blanco. Cuando el punto mayor de la curva estándar alcanzó la absorbancia de 1.2-1.4 nm la reacción se detuvo con NaOH para su posterior lectura. La concentración de IFN- $\gamma$  se calculó al interpolar en la curva estándar y se reportó en pg/ml.

#### **5.10 Cuantificación de la producción TNF- $\alpha$ por la técnica de ELISA.**

Se cubrieron los 96 pozos de la placa con el anticuerpo primario agregando 50 $\mu$ l (Dilución 1:500) anti TNF- $\alpha$ , preparado con 10  $\mu$ l en 5 ml de PBS e incubando a 4°C toda la noche. Ya realizada la sensibilización, se desechó la solución y se hicieron 3 lavados (solución de lavado) bloqueando posteriormente con 100  $\mu$ l de superbloc (Pierce, cat.17-516Q) e incubando a 37°C por 30 min. Después se hicieron otros tres lavados para quitar el exceso de la solución anterior y se agregaron 50  $\mu$ l de las muestras de plasma sin diluir de los experimentos de infección en sangre, estándares de la citocina y blancos (por duplicado) incubando a 37°C por 2 h. Pasado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados, y se agregaron 50  $\mu$ l por pozo del anticuerpo secundario anti TNF- $\alpha$  conjugado a biotina (Dilución 1:1000) preparado con 5  $\mu$ l de anticuerpo en 5ml de PBS-T-BSA 2%(Apéndice), incubando posteriormente a temperatura ambiente por 45 min.

Se realizaron 6 lavados para quitar el exceso de anticuerpo, y se agregaron 50  $\mu$ l en cada pozo de la enzima Estreptavidina-fosfatasa alcalina (EAF), preparada con 2.5  $\mu$ l de EAF en 5 ml de PBS-BSA2%, incubando a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se realizaron seis lavados y se adicionaron 50  $\mu$ l a cada pozo del sustrato de fosfatasa, después se dejaron pasar 20 min para que la reacción tomara color y después se realizó la lectura de la placa a 405 nm, parando la reacción con NaOH 1M cuando el punto mayor de la de la curva estándar alcanzó la absorbancia de 1.2-1.4 nm la reacción se paró con NaOH

para su posterior lectura. La concentración de TNF- $\alpha$  se calculó al interpolar en valor en la curva estándar y se reportó en pg/ml.

## 6. RESULTADOS

A continuación, se muestran las características de cada uno de los pacientes.

Tabla 1. Caracterización del historial clínico y molecular de los pacientes de estudio.

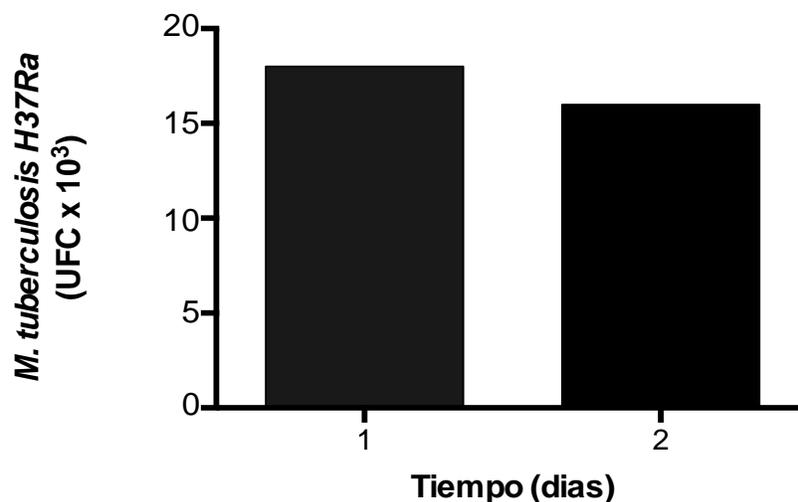
PACIENTE	SEXO	EDAD	LUGAR DE ORIGEN	HISTORIAL CLINICO	MUTACIÓN	ALTERACIÓN
P1	Hombre	26	Veracruz	Infecciones recurrentes por micobacterias	En el gen <i>IL12RB2</i> cambió de aminoácido E771K (El ácido glutámico cambia por una lisina) en la posición 771.	Defecto en producción de IFN- $\gamma$
P2	Hombre	28	India	Infecciones recurrentes por micobacterias	Sin evidencia	
P3	Hombre		Ciudad de México	Infecciones recurrentes por micobacterias	Sin evidencia	
P4	Hombre	26	Ciudad de México	Infecciones recurrentes por micobacterias	En el gen <i>IFNGR1</i> , con una mutación 805 del T en el exón 6.	Sobreexpresión de IFNGR1, deficiente respuesta a INF- $\gamma$ , niveles bajos de IL-12p40, y baja fosforilación de STAT1
P5	Hombre	11	Yucatán	Infecciones recurrentes por micobacterias	Sin evidencia	

### **-Crecimiento intracelular de *M. tuberculosis***

En este trabajo se propuso trabajar con un modelo de infección en sangre, para evaluar la participación de los leucocitos en el control de la infección. Este modelo ha sido descrito<sup>29</sup> anteriormente y nosotros hemos adaptado el modelo de infección con fines de nuestro estudio.

Con el objetivo de establecer las condiciones experimentales a un MOI 10, se inició con una muestra de sangre de un voluntario sano. Se hizo la infección con Mtb. a MOI 10 con una cinética de 1 y 2 días de incubación y los resultados del ensayo de control de crecimiento de micobacterias se presentan en la Figura 10.

Se observó disminución de las UFC en el día 2 post-infección de un 11.2% menos con respecto al día 1, lo que sugiere que los leucocitos de sangre inhiben el crecimiento de Mtb. al aumentar el tiempo.



**Figura 10. Inhibición de crecimiento de *M. tuberculosis*. por leucocitos de un control sano.** La sangre de un voluntario sano fue infectada con Mtb. a MOI 10 y se evaluó el control del crecimiento de la micobacteria al día 1 y 2 post-infección. Los resultados están expresados en UFC/ml.

### Crecimiento de *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Ra

Ya que los pacientes con IDP tienen infecciones frecuentes con BCG, entonces decidimos incluirlo en los experimentos del control de crecimiento intracelular en sangre de un voluntario sano a MOI 10 con cinética de 1 y 4 días (Figura 11). Se observó una disminución del 16.1% de las UFC en el control de la infección con Mtb. del día 1 respecto al día 4, coincidiendo con los resultados previos (Figura 10). Mientras que en el caso de la infección con BCG no se observó disminución de las UFC, indicando que no hubo muerte de la bacteria.

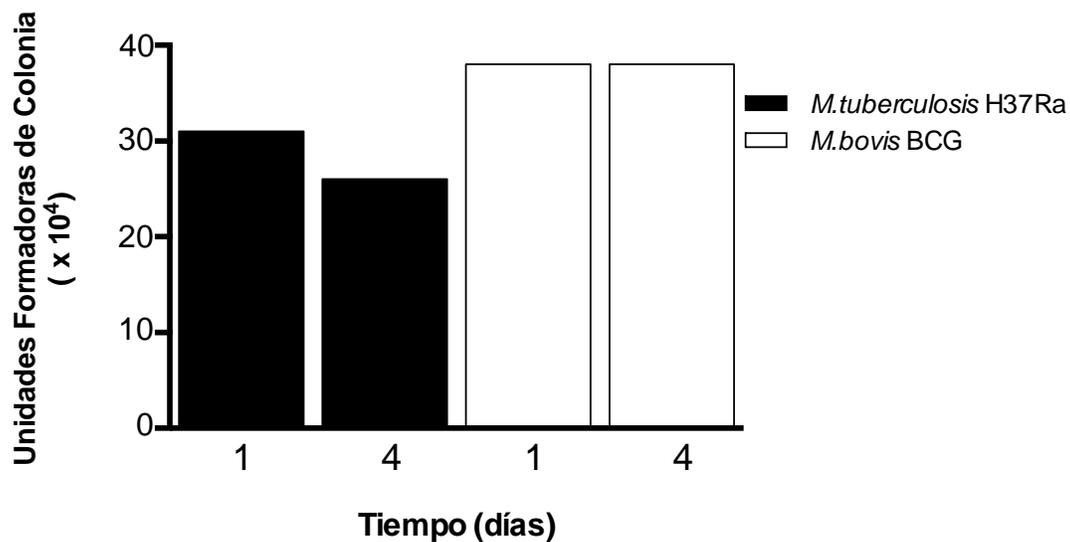


Figura 11. Control de crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. bovis* por leucocitos de un voluntario sano. La sangre de un voluntario sano fue infectada con Mtb. o con BCG a MOI 10 y se evaluó el control del crecimiento de la micobacteria a cinética de infección del día 1 y 4 post-infección. Los resultados están expresados en UFC/ml.

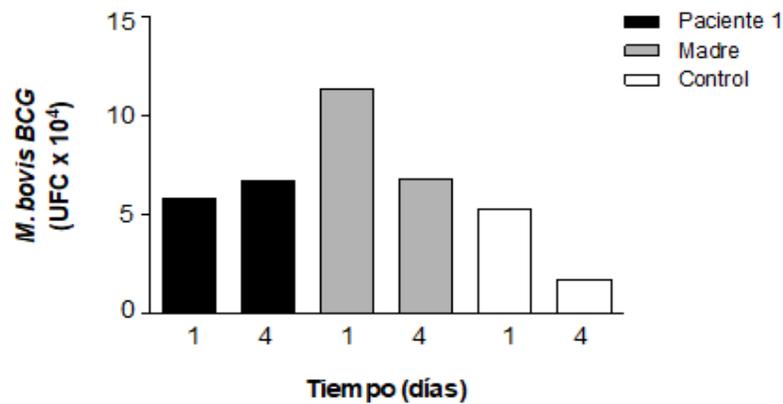
### Crecimiento de *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Ra en pacientes con probable inmunodeficiencia (IDP)

Se realizó el estudio en un paciente con probable IDP incluyendo a su madre. Con la finalidad de observar si hay alguna alteración en el control de infección por diferentes micobacterias en el estudio se incluyeron Mtb. y BCG con un MOI 10.

## Paciente 1

En la infección con BCG (figura 12 A) en el paciente 1 con mutación en el gen *IL-12RB2* se observó un incremento discreto del día 1 al día 4 de un 15.5% de las UFC, mientras que en la madre y el control hubo un decremento (39.8% para la madre y 66.9% en el control), sugiriendo que los leucocitos en el control y la madre controlan el crecimiento de la micobacteria, sin embargo, en el paciente 1 ocurre lo contrario. En la infección con Mtb. el paciente 1, la madre y el control muestran un aumento de las UFC al D4 del 181% para la madre, 34% en el paciente 1 y 27% para el control, sugiriendo una ausencia en el control del crecimiento micobacteriano para Mtb. (figura 12 B).

A)



B)

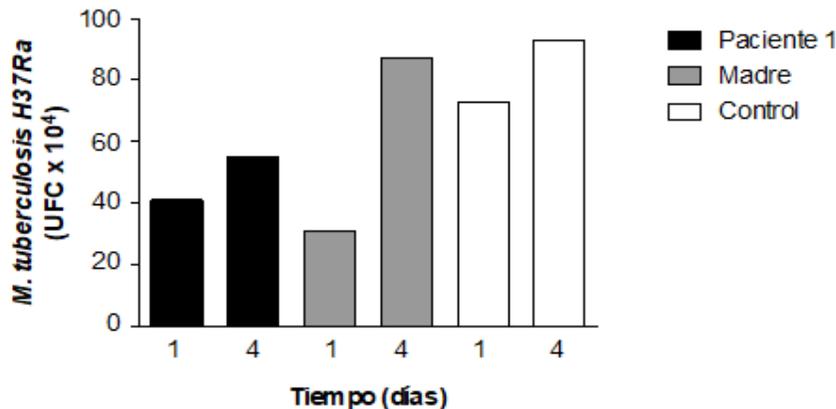
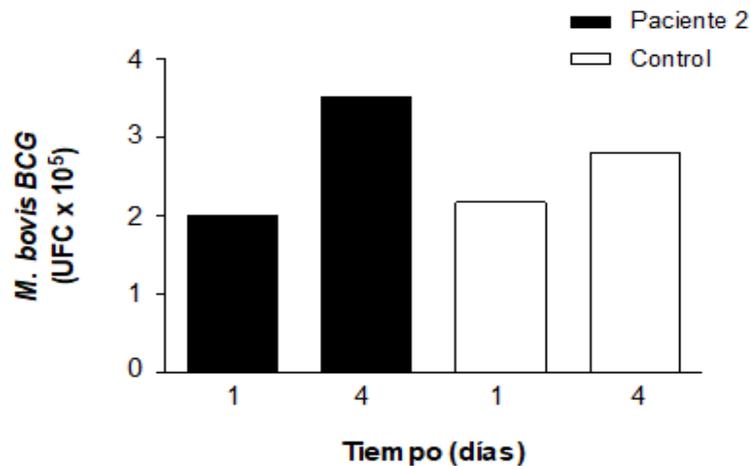


Figura 12. Inhibición de crecimiento por UFC de *M. bovis* BCG A) y *M. tuberculosis* B) por leucocitos del paciente 1, la madre y el control. Las muestras sanguíneas fueron infectadas con ambas micobacterias por separado. Los resultados fueron registrados mediante UFC.

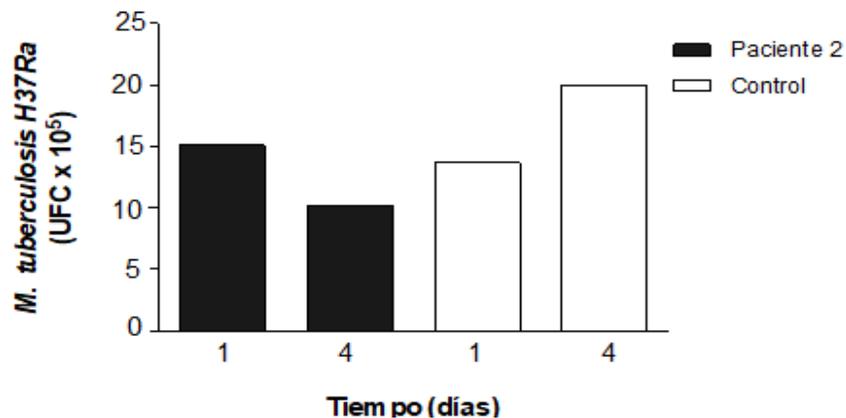
## Paciente 2.

Se procedió a analizar el paciente 2 con probable IDP y se observó que ante la infección con BCG las UFC se incrementaron 75% en el paciente 2 y 61.2 % en su control respectivamente al día 4 (figura 13 A). Por otra parte, los resultados de la infección con Mtb. mostraron que las UFC en el paciente 2 se reducen en el D4 (32.4%), mientras que en el control aumentan a 45.9% (Figura 13 B). Estos resultados indican que el paciente controló mejor la infección con Mtb. que el control sano.

A)



B)



**Figura 13. Inhibición de crecimiento de *M. bovis* A) y *M. tuberculosis* B) por leucocitos del paciente 2 y su control.** Las muestras sanguíneas del paciente 2 y su control fueron infectadas con ambas bacterias por separado. El control en el crecimiento micobacteriano en las muestras fue registrado por UFC.

### Paciente 3

Se observó en el paciente 3 con probable IDP una disminución en las UFC del 55% al día 4, y en el control que disminuyó un 9.9% al día 4 después de la infección con BCG (figura 14 A). Al infectar con Mtb. el paciente 3 disminuyó un 82.5% al día 4 y 50% para su control (figura 14 B). Estos resultados nos demuestran que tanto el paciente 3 como su control controlan el crecimiento de ambas micobacterias.

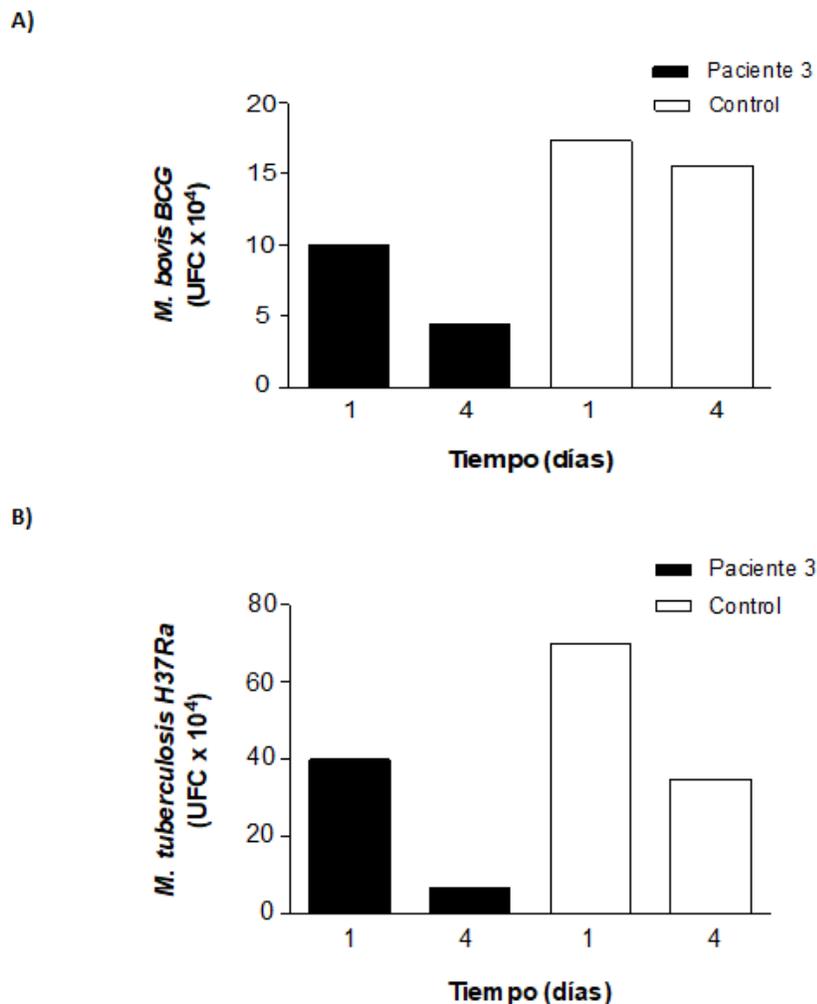


Figura 14. Inhibición de crecimiento de *M. bovis* A) y BCG *M. tuberculosis* B) en leucocitos del paciente 3. Se realizó la infección con ambas micobacterias por separado y los resultados se midieron por UFC considerando al día 1 y al día 4 post-infección.

#### Paciente 4

Se estudió un cuarto paciente con IDP en una mutación 805 del T que causa un IFN- $\gamma$ R1 no funcional, la muestra sanguínea de un familiar (tía) y el control sano realizando la infección solamente con Mtb. Se observó una disminución en el paciente 4 del 42.7% respecto al día 4, lo que nos indica que hay un control en la inhibición del crecimiento para esta micobacteria; sin embargo, se observó un comportamiento diferente en las muestras del control y del familiar donde hubo un aumento del 33% y 128% respectivamente, sugiriendo que no hay un control micobacteriano (figura 15).

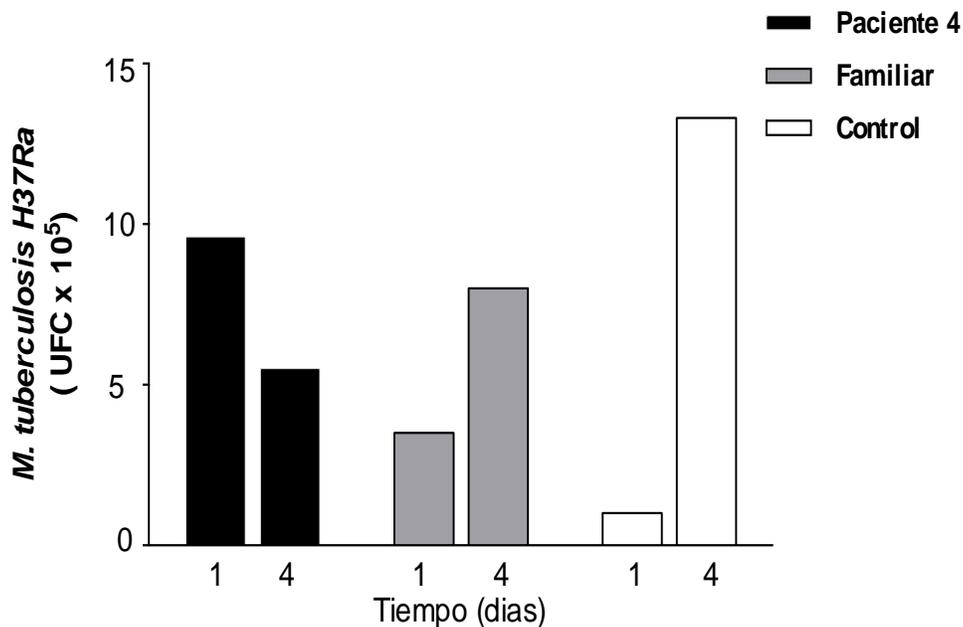
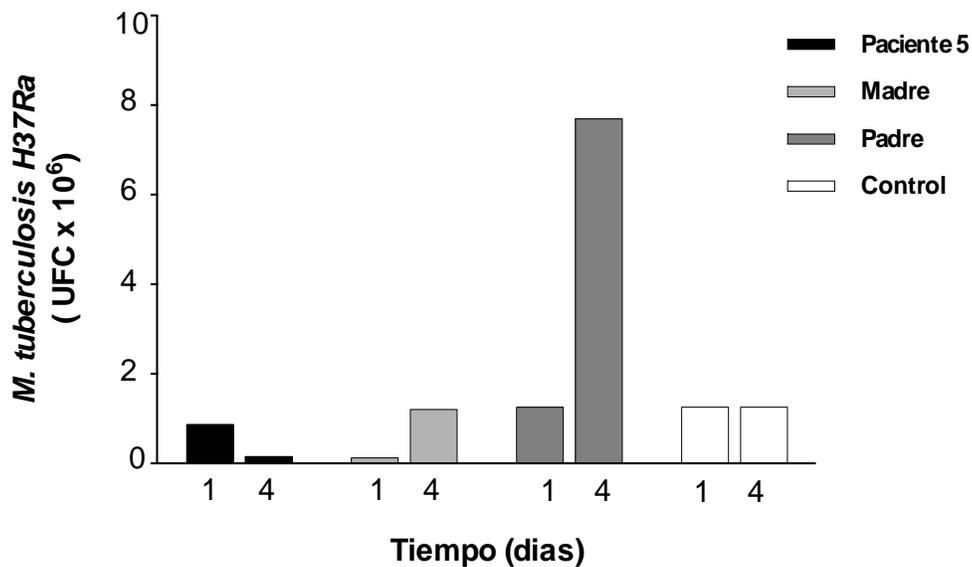


Figura 15. Inhibición de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra en leucocitos del paciente 4. El ensayo se realizó utilizando la cepa Mtb. con un MOI 10.

## Paciente 5

Al infectar con Mtb. el paciente 5 mostró una disminución de UFC del 82.7% lo que sugiere que hay un control en el crecimiento a diferencia de los padres que presentaron un incremento en la tasa de UFC del 860% para la madre y 516% para el padre, lo que sugiere que no hay un control en el crecimiento micobacteriano. Para el control, la tasa de UFC se mantuvo igual, por lo que se sugiere que hay un control en el crecimiento de la micobacteria al D4 (Figura 16).



**Figura 16. Inhibición de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra por leucocitos del paciente 5.** Después de la infección en las muestras de sangre con Mtb., se realizaron las UFC para observar el crecimiento micobacteriano.

## **Estudio de la de Fagocitosis**

Con la finalidad de conocer las poblaciones celulares implicadas en la fagocitosis de las micobacterias durante la infección en muestras sanguíneas, después de haber realizado la infección, la eliminación de eritrocitos y los lavados correspondientes, así como el ensayo de cytopspin y la fijación de la muestra con metanol, se hizo una preparación de frotis y tinción de Kinyoun para su posterior análisis bajo el microscopio. Se consideró una célula que ha llevado a cabo la fagocitosis a aquella que tiene en el citoplasma al menos una micobacteria identificando el tipo celular de acuerdo a la morfología del núcleo, ya sea monocitos (MN) o células polimorfonucleares (PMN). Se contaron en promedio 100 células mononucleares o polimorfonucleares y de ellas se contaron las que fagocitaron a las micobacterias y se reportó el porcentaje que corresponde al tipo celular. Los resultados de las poblaciones celulares involucradas en este fenómeno se resumen en la Tabla 2.

Los datos muestran que los PMN son la población que lleva a cabo preferentemente la fagocitosis de las micobacterias con una media del 68% en comparación con los monocitos de 32% siendo una diferencia significativa ( $p=0.0003$ , Mann-Whitney U test).

Los resultados muestran que no hay diferencias entre la fagocitosis de Mtb. y BCG.

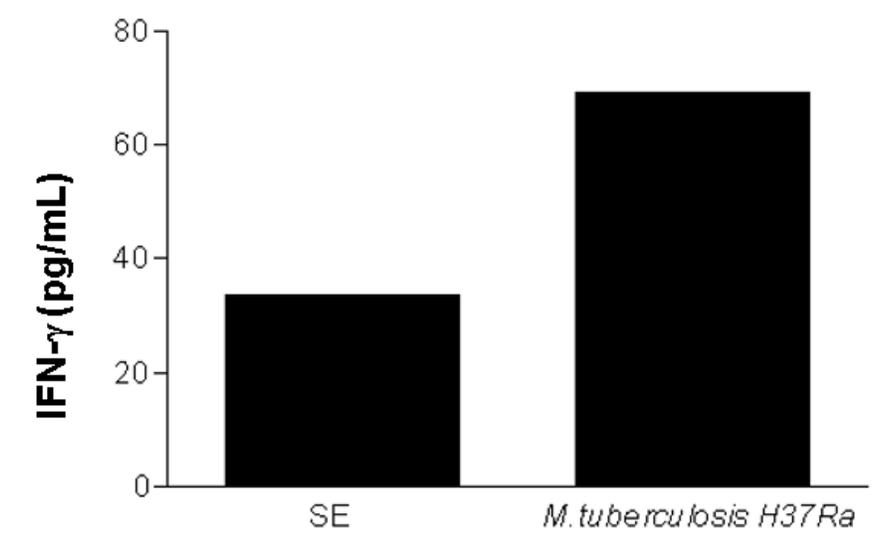
Tabla 2. Fagocitosis de micobacterias por en leucocitos de sangre periférica.

Experimento	Condición	Cepa	Fagocitosis por MN (%)	Fagocitosis por PMN (%)
1	Control	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	35	65
2	Control	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	33	67
		<i>M. bovis</i> BCG	29	71
3	Paciente 1	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	31	69
		<i>M. bovis</i> BCG	37	63
	Madre	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	44	56
		<i>M. bovis</i> BCG	36	64
	Control	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	37	63
		<i>M. bovis</i> BCG	37	63
4	Paciente 2	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	34	66
		<i>M. bovis</i> BCG	29	71
	Control	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	27	73
		<i>M. bovis</i> BCG	27	73
6	Paciente 4	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	21	79
	Tía	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	18	82
	Control	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	27	73
7	Paciente 5	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	30	70
	Madre	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	33	67
	Padre	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	28	72
	Control	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	28	72

MN=Monocitos PMN=Polimorfonucleares.

### Cuantificación de IFN- $\gamma$ por la técnica de ELISA en un control sano

Se realizó la cuantificación del IFN- $\gamma$  en un control sano ya que se ha descrito que esta citocina está implicada en el control de infecciones por micobacterias al potenciar la respuesta inmune. En el análisis (Figura 17) se observó que la infección con Mtb. favorece la producción del IFN- $\gamma$  incrementándose un 105.36% más en comparación con la condición sin infección.

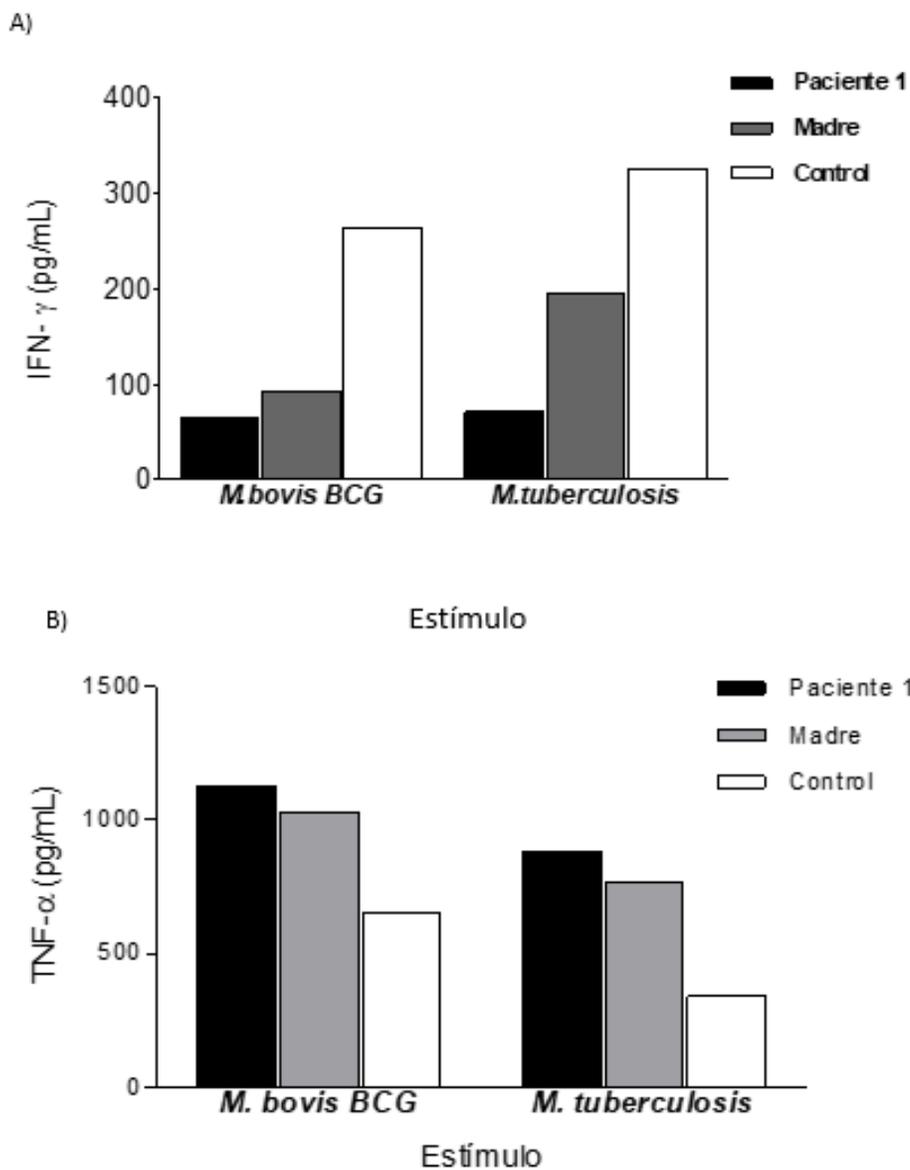


**Figura 17. Producción de IFN- $\gamma$  en sobrenadante de la muestra sanguínea de un control sano.** La determinación del IFN- $\gamma$  se hizo en los sobrenadantes obtenidos de los ensayos 24 hrs. post-infección. La determinación se hizo por la técnica de ELISA y los resultados son reportados en pg/ml. SE=Sin estímulo.

En las muestras post-infección con Mtb. y BCG del paciente 1, se analizó la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (figura 18). Para la determinación de IFN- $\gamma$  cuando las muestras se infectan con BCG se observó un aumento tanto de la madre del 275% así como en el control del 2078% respecto al paciente 1, lo que indica que la madre y el control responden mejor a este estímulo (figura 18 A). Cuando se infectó con Mtb. hubo un incremento del 751% en la madre y de 1566% en el control respecto al paciente 1, lo que nos muestra una posible

afectación para la síntesis IFN- $\gamma$  en el paciente 1 al infectar con ambas micobacterias comparadas con la madre y el control (figura 18 A).

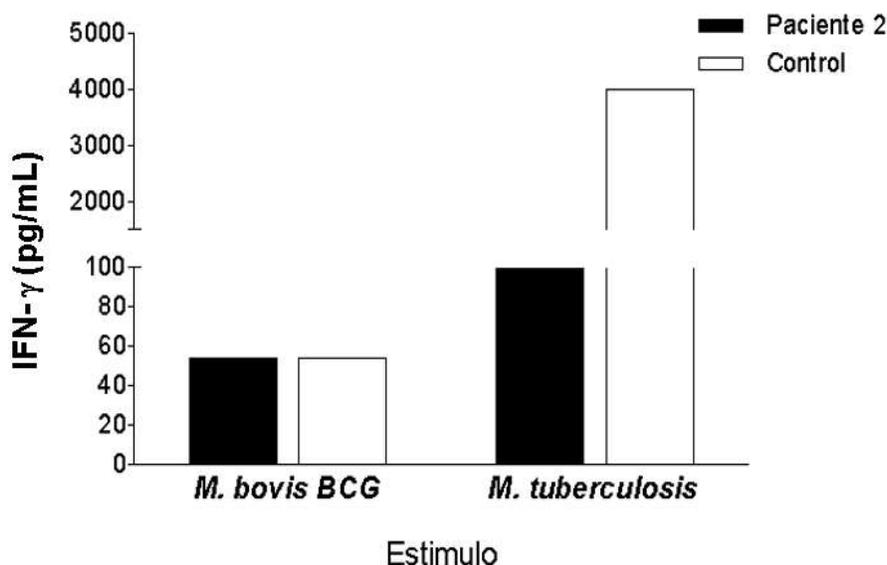
Para la determinación de TNF- $\alpha$  cuando las muestras se infectan con BCG se observó un decremento del 16.6% en la madre y un 41.6% en el control respecto al paciente 1 (figura 18B), por lo que se sugiere que el paciente 1 responde mejor a la síntesis de esta citocina a pesar de tener bajas concentraciones de IFN- $\gamma$  (figura 18 A). Para la cuantificación de TNF- $\alpha$  infectando con Mtb., se observó de igual manera una disminución del 22.2% en la madre y 66.6% en el control respecto al paciente 1, por lo que se sugiere que el paciente responde mejor a pesar de que no hubo una síntesis alta de IFN- $\gamma$  respecto al control y la madre (figura 18B). Sin embargo, para dicho ensayo no se pudieron recuperar los resultados de ELISA sin estímulo para ambas micobacterias, ya que habría sido un punto de referencia de comparación para confirmar la posible alteración del paciente 1 a nivel citocinas.



**Figura 18. Producción de IFN- $\gamma$  inducida A) y producción de TNF- $\alpha$  B) por la infección con micobacterias en el paciente1.** En los sobrenadantes se determinó la producción de la citocina a las 24h por la técnica de ELISA y los resultados son reportados en pg/ml.

En el paciente 2 se determinó solamente la producción de IFN- $\gamma$  y se observó que durante la infección con BCG la producción de la citocina en el paciente 2 es la misma a la mostrada por el control. Mientras que en la infección con Mtb. la producción del IFN- $\gamma$  es menor en el paciente 2 en comparación con el control donde se observa un aumento del 3900% siendo el control el que responde mejor ante la infección con Mtb. (Figura 19). De igual

manera, no fue posible recuperar los resultados sin estímulo para los ensayos de ambas citocinas, lo cual habría sido un punto de referencia de comparación que no habría confirmado nuestros resultados.

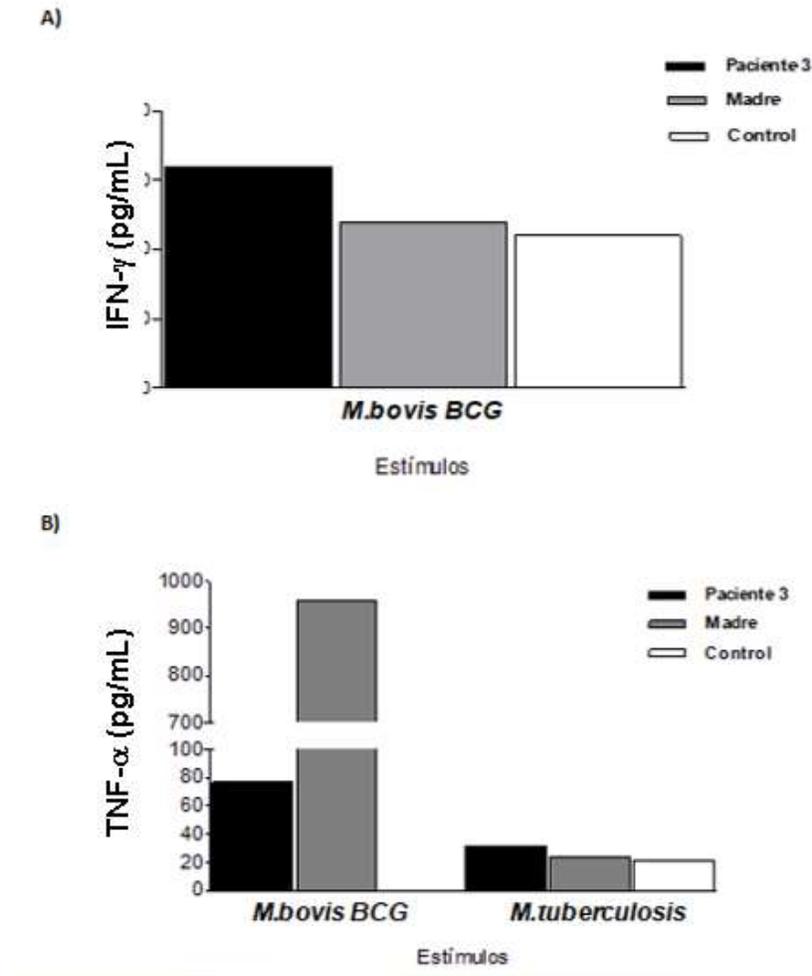


**Figura 19. Producción de IFN- $\gamma$  inducida por la infección con micobacterias en el paciente 2 mediante ELISA.** La detección de citocinas se realizó 24 horas post-infección en la muestra sanguínea del paciente 2 y su control sano.

En el paciente 3, se observó que después de la infección con BCG la producción de IFN- $\gamma$  hubo un decremento del 25% para la madre y del 34.3% para el control respecto al paciente 3 (figura 20 A), por lo que se sugiere que el paciente 3 responde bien cuando se infecta con BCG. Ante la escasez de los sobrenadantes a analizar no nos fue posible realizar el análisis de los sobrenadantes durante la infección con Mtb.

Respecto a la producción de TNF- $\alpha$ , cuando se infectó con BCG se observó que hay un incremento del 1115% en la madre respecto al paciente 3 (figura 20B) sugiriendo una mejor respuesta para la madre respecto al paciente 3 aún y cuando el paciente respondió mejor en la cuantificación de IFN- $\gamma$ . Por otra parte, cuando se infecta con Mtb. se observa un decremento del 33.3% en la madre y un 40% en el control respecto al paciente 3 (figura

20B), por lo que se observa que el paciente 3 responde mejor cuando se infecta con Mtb. en la determinación de TNF- $\alpha$ . Dicho lo anterior se sugiere una posible diferencia en la determinación de TNF- $\alpha$  al infectar con Mtb. y BCG.

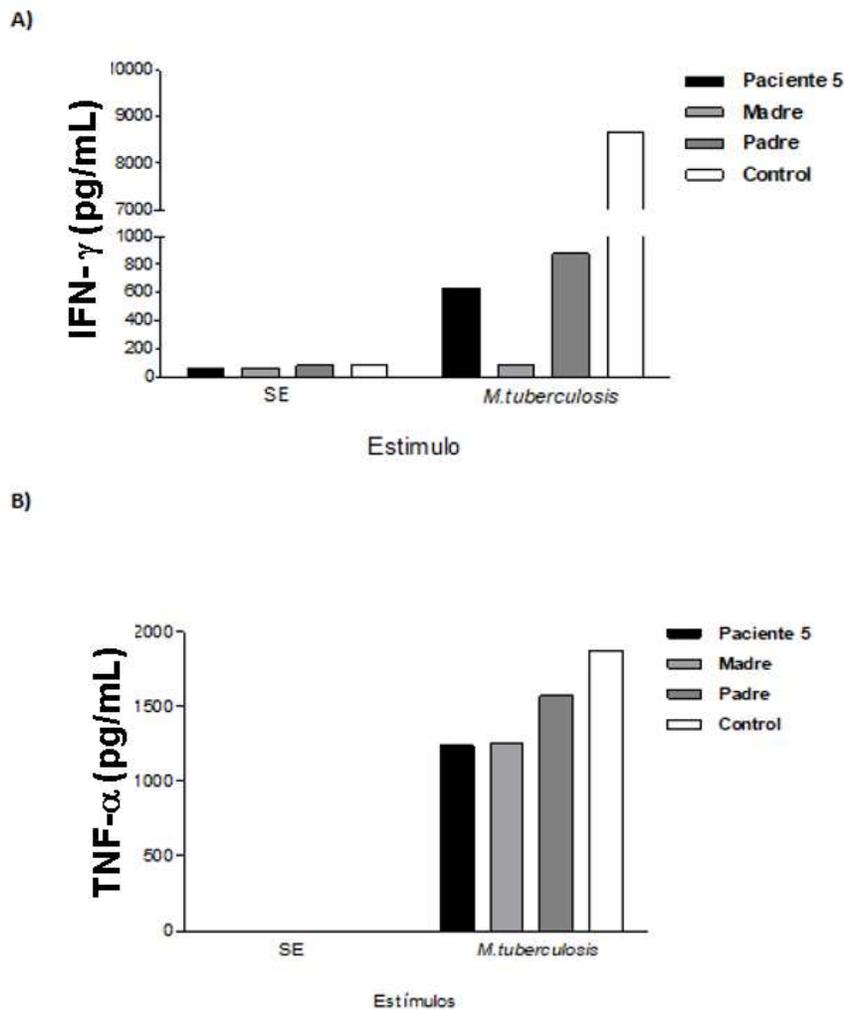


**Figura 20. Producción de IFN- $\gamma$  A) y TNF- $\alpha$  B) en sangre periférica del Paciente 3 mediante ELISA.** La detección se realizó 24 horas post-infección con las micobacterias.

Para el paciente 5, al realizar la cuantificación de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes sin estímulo, no se observaron diferencias respecto a los padres y el control, ya que los niveles fueron de los 64-79 pg/ml. Al infectar con Mtb. se observó un decremento del 86.4% en la madre respecto al paciente 5, y un decremento del 38.12% en el padre y del 1267.53% en el control

respecto al paciente 5, sugiriendo una mejor respuesta por parte del control y el padre a diferencia de la madre que se observa una menor respuesta ante la infección con BCG en comparación al paciente 5 (figura 21 A).

Para la cuantificación de TNF- $\alpha$  se observa que cuando no hay un estímulo no hay síntesis de dicha citocina, en cambio al infectar con Mtb. se observó un aumento del .92% en la madre, del 26.98% en el padre y del 51.69% en el control respecto al paciente 5 (figura 21B), sugiriendo que hay mejor respuesta para los tres casos tomando como referencia al paciente 5.



**Figura 21. Producción de IFN- $\gamma$  A) y TNF- $\alpha$  B) en sobrenadantes del Paciente 5 mediante ELISA. Se observa un aumento en la síntesis cuando las muestras sanguíneas fueron estimuladas con Mtb.**

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo estudiamos la capacidad de los leucocitos de sangre periférica en el control del crecimiento de bacterias intracelulares como BCG y Mtb., los experimentos fueron hechos con muestras de pacientes con datos clínicos y resultados de laboratorio que indican que esos pacientes tienen o muy probablemente tienen una IDP. La selección de estos microorganismos está basado en los reportes de la literatura que han demostrado que frecuentemente los pacientes con IDP son susceptibles a la infección por éstos patógenos<sup>15 30 18</sup>. Para llevar a cabo este proyecto hicimos experimentos para conocer la actividad microbicida de leucocitos en sangre contra las micobacterias con un MOI 10.

Para los ensayos piloto de inhibición de crecimiento (experimento 1 y 2), iniciamos con la infección en muestra de sangre de voluntarios sanos utilizando la cepa de Mtb. en el experimento 1, y la cepa BCG y Mtb. en el experimento 2. En el experimento 1 se observó una disminución de un 11.2% en las UFC al segundo día de infección con Mtb. (figura 10), en cambio en el experimento 2 hubo una disminución del 16.1% al infectar con Mtb., pero no hubo disminución con la cepa BCG (figura 11), sugiriendo una diferencia en el control de crecimiento micobacteriano entre las dos cepas. En el experimento 2, se observó que cuando se estimuló con Mtb. aumentaron los niveles de IFN- $\gamma$  a un 105.36% (figura 17) respecto a la condición sin estímulo, resultado que se relaciona con la disminución en las UFC de Mtb., ya que dicha citocina es muy importante para potenciar la respuesta inmune y específicamente en eliminar bacterias intracelulares como Mtb.<sup>4</sup>

En el experimento 3 (figura 12) se analizó al paciente 1 cuyo historial clínico revela una mutación en el gen de *IL-12RB2* marcada por una alteración en la producción de IFN- $\gamma$ . Se observó un aumento en las UFC en el paciente 1 cuando se infectó con Mtb. (34%) y BCG (15.5%) al cuarto día de infección, lo cual probablemente es ocasionado por la mutación en el gen de *IL12RB2* que codifica para el receptor IL-12RB2 y que se une a la subunidad p35 de la citocina funcional heterodímero IL-12 (p70) desencadenando una cascada de señales necesarios para la síntesis de IFN- $\gamma$ <sup>11 10</sup>. Se ha observado que la mutación en IL-12RB2 ocurre en menor proporción respecto a la mutación en IL-12RB1, es decir, hay menor

penetrancia, no porque estos trastornos sean más raros, sino porque tienen un efecto menos agresivo comparada con IL-12RB1<sup>31</sup>. En la figura 18 A se observamos que hubo una menor producción de IFN- $\gamma$  del paciente 1 respecto al control y la madre, que podría relacionarse al resultado obtenido de inhibición de crecimiento, donde dicha citocina es importante para la activación de los monocitos y polimorfonucleares en la eliminación de las micobacterias. Sin embargo, hay otras rutas que permiten la síntesis de IFN- $\gamma$  independientes a la vía de IL-12, como la citocina IL-2 en donde los linfocitos T son estimulados con dicha citocina para producir IFN- $\gamma$ , y la IL-18 es una citocina que en conjunto de IL-12 también ayuda en la síntesis de IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$ <sup>4 32</sup>.

En el experimento 4 se analizaron las muestras sanguíneas del paciente 2 con sospecha de IDP por infecciones recurrentes por micobacterias. Se observó un aumento (figura 13A) en las UFC del paciente 2 y su control sano cuando se infectó con BCG, sin embargo, cuando se infectó con Mtb., el paciente 2 respondió mejor que el voluntario sano (figura 13B). Estos resultados nos permiten observar una diferencia en el control de crecimiento de ambas micobacterias, pues al infectar BCG ni el control ni el paciente de estudio pudieron controlar el crecimiento micobacteriano, y al infectar con Mtb. el paciente respondió adecuadamente hecho que sugiere que el paciente 2 no tenga alguna alteración en el eje de estudio. Sin embargo, se observó que nuestro control no nos permite realizar una comparación adecuada, ya que se esperaba que al infectar con BCG disminuyera la tasa de UFC, hecho que no se sucedió, por lo que es complicado utilizarlo como referencia.

En el experimento 5 se observó que el paciente 3 y su control tienen la capacidad de controlar la infección cuando se infecta con Mtb. y BCG, pues ocurre una reducción en las UFC (Figura 14 A, B) al día 4. La historia clínica de este paciente sugiere una probable IDP por infecciones recurrentes por micobacterias, sin embargo, se observa que funcionalmente el sistema inmune tiene la capacidad para controlar el crecimiento de las micobacterias. La producción de IFN- $\gamma$  en el paciente 3 es mayor que el voluntario sano y el consanguíneo (figura 20A) lo que indica que no hay alguna posible alteración en el eje IL-/IL-23/ IFN- $\gamma$  para la síntesis de dicha citocina; sin embargo, en el ELISA de TNF- $\alpha$  se observó que hay una

menor concentración en el paciente que el control cuando se infecta con *M. bovis* BCG a diferencia que cuando se infecta con *M. tuberculosis* (Figura 20 B) donde no se observa diferencia respecto al voluntario sano.

En el experimento 6, se analizó al paciente 4 (figura 15) con una mutación de *novο* que afecta la funcionalidad del IFN- $\gamma$ R1 en los monocitos y que se caracteriza por la ausencia en la respuesta a dicha citocina. Al realizar la infección con Mtb., se observó que el paciente disminuye las UFC al día 4 por lo que a pesar de la mutación se logra controlar la infección por Mtb., a diferencia del voluntario sano y el consanguíneo, en donde hay un aumento de las UFC. Estos resultados hacen difícil interpretar el fenómeno inmunológico *in vivo*, pues se esperaba que nuestro control disminuyera la tasa de UFC y fuera un punto de referencia para nuestro paciente de estudio, por lo que no sabemos si el estado en el que se encontrara nuestro control para dicho experimento fuera el adecuado siendo un limitante para nuestra metodología. Por otra parte, se sugiere realizar la detección de citocinas por ELISA para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en dicho paciente, ya que en base a la literatura, este tipo de mutaciones alteran la respuesta hacia IFN- $\gamma$ , siendo más complicado su tratamiento por su efecto agresivo en el control de crecimiento micobacteriano<sup>21 14</sup>.

En el experimento 7, se analizó al paciente 5 con historial clínico por infecciones recurrentes por TB diseminada. Nuestros resultados mostraron una disminución en las UFC del paciente 5 cuando se infectó con Mtb., lo cual podrían deberse a la presencia de anticuerpos debido a la TB diseminada que ha presentado, y que pueden opsonizar a la micobacteria facilitando la fagocitosis por los monocitos y PMN, permitiendo la eliminación de la micobacteria. Sin embargo, se observó que los padres de dicho paciente presentaron un aumento en las UFC, y que el voluntario sano mantuvo los valores al día 4 de infección, lo que nos sugiere que el paciente probablemente no tenga alguna alteración en la inhibición de crecimiento. Por otra parte, se observó que el paciente responde adecuadamente para la síntesis de IFN- $\gamma$  (figura 13A) cuando se infectó con Mtb. Para la detección de TNF- $\alpha$ , cuando se estimuló con Mtb.(figura 13B), se observó que hubo una menor respuesta respecto a los padres y el

voluntario sano, por lo que se sugiere podría presentar una posible alteración en el eje IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$ .

Para el estudio de fagocitosis, los resultados (Tabla 2) sugieren que las células PMN y MN no se encuentran afectadas por las mutaciones en el eje IL-12/IL-23/ IFN- $\gamma$  en los pacientes estudiados en esta tesis, ya que se encuentra clasificada en el grupo 6 y no en el grupo 5 que es donde se clasifican las IDP con afectaciones en la fagocitosis<sup>9</sup>. Por otra parte, no se observa alguna diferencia en la fagocitosis de Mtb. respecto a BCG siendo que hay una diferencia en la virulencia de ambas.

Este trabajo muestra la utilidad del modelo de infección en sangre, el cual nos permite evaluar la capacidad de los leucocitos para controlar la infección por Mtb. y BCG, determinar la fagocitosis y conocer las poblaciones que participan en estos mecanismos y adicionalmente analizar la producción de citocinas pro-inflamatorias que se producen durante la fagocitosis de micobacterias. Y la contribución de nuestro trabajo es el desarrollo del modelo de infección que puede aplicarse en el estudio de pacientes con probable IDP con la finalidad de describir si las mutaciones afectan la funcionalidad de los leucocitos. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el tiempo de infección que se utilizó para la prueba del control de crecimiento de Mtb. y BCG mediante las UFC en dicho experimento, así como en las pruebas con los pacientes, se amplió hasta el día 4 post-infección, siendo que el tiempo de vida de los polimorfonucleares y los monocitos es menor a las 70 horas<sup>6 4</sup>, y son las células encargadas de fagocitar y eliminar a las micobacterias, lo que puede ser una variable que afecte en nuestro análisis de los experimentos in vitro contra lo que sucede in vivo y que puede explicar los resultados variables que se obtuvieron, por lo que se sugiere realizar una cinética de infección para identificar el tiempo óptimo para realizar el estudio de inhibición de crecimiento.

De igual manera se sugiere realizar estudios posteriores para identificar el MOI óptimo para realizar dichos fenómenos, ya que se ha observado que al utilizar una concentración mayor de micobacteria en una muestra, suelen alterar significativamente las condiciones y por

consecuencia nuestros resultados, sugiriendo un estudio previo para identificar el MOI óptimo para utilizar en nuestra metodología.

Una de las limitantes del trabajo se asocia por lo difícil de controlar adecuadamente el inóculo de las micobacterias que se le pone a cada muestra de sangre, y el crecimiento lento de las mismas para formar colonias, las citocinas que se producen localmente en el sistema ex vivo, la heterogeneidad de los pacientes, y la proporción de fagocitos en cada muestra de sangre que se prueba. Adicionalmente en los sobrenadantes de los experimentos de actividad bactericida o killing se puede analizar la producción de citocinas que se producen durante la fagocitosis de micobacterias. En la literatura no hay muchos trabajos semejantes, por lo que la contribución de nuestro trabajo es el desarrollo del modelo de infección que puede aplicarse en el estudio de pacientes en general con tuberculosis y pacientes con probable IDP con la finalidad de describir si las mutaciones afectan la funcionalidad de los leucocitos.

## 8. CONCLUSIONES

Se sugiere realizar una cinética para el modelo de infección en sangre con *M.bovis* BCG y *M.tuberculosis* a MOI 10 y estandarizar el tiempo óptimo de infección en el ensayo de inhibición de crecimiento. El análisis de fagocitosis nos permite concluir que los PMN son los que llevan a cabo principalmente la fagocitosis (69%) micobacteriana seguida por los monocitos (31%), y que la fagocitosis no se encuentra afectada por las IDP que intervienen en el eje IL-12/IL-23/ IFN- $\gamma$ . Se sugiere que la mutación en el *IL-12RB2* localizada en el paciente 1 afecta en la inhibición del crecimiento micobacteriano, así como en la síntesis de IFN- $\gamma$  pero no para TNF- $\alpha$ . Se observó que la mutación en el *IFNGR1* del paciente 4, no afecta la capacidad de inhibición de crecimiento micobacteriano, pues se sugiere que el proceso de eliminación es llevado a cabo principalmente por PMN. En el paciente 2 y 5 no se observa

alteración en el eje de estudio; sin embargo, se sugiere realizar una cinética para determinar el tiempo óptimo para detección del control del crecimiento micobacteriano y el MOI.<sup>33</sup>.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report*. Ginebra; 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259366/?sequence=1>. Accessed January 28, 2019.
2. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2019*. Ginebra; 2019. <http://apps.who.int/bookorders>. Accessed May 25, 2020.
3. José M, Cervellera B. *La Tuberculosis En La Historia*. <https://core.ac.uk/download/pdf/71020360.pdf>. Accessed February 5, 2019.
4. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman SP. *Inmunología Celular Y Molecular*. 6 edición. Elsevier Saunders
5. Victorio M. Collado, Rebeca Porras, Ma. Teresa Cutuli EG-L. El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Rev Complut Ciencias Vet.* 2008;2:16. <http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/download/RCCV0808120001A/22569>. Accessed February 5, 2019.
6. Lenin Pavón Romero, María C. Jimenez Martinez MEGA. *Inmunología Molecular, Celular y Traslacional*. 6ª. (Wolters Kluwer, ed.). Barcelona, España; 2016.
7. Erika Coria Ramirez, Sara espinosa Padilla, Francisco Espinosa Rosales et al. Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. *Rev Alerg México*. 2010;57(septiembre 2010):159-163. <http://www.latindex.org>. Accessed February 3, 2019.
8. Hernández-martínez C, Espinosa-rosales F, Elva S, et al. Conceptos básicos de las inmunodeficiencias primarias. *REV ALERG MEX*. 2016;63(2):180-189.
9. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*. 2015;35:696-726. doi:10.1007/s10875-015-0201-1
10. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, et al. Inborn errors of IL-12/23-and IFN-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol*. 2006;18:347-361. doi:10.1016/j.smim.2006.07.010
11. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- $\gamma$  immunity. *Semin Immunol*. 2014. doi:10.1016/j.smim.2014.09.008
12. MIMOUNI J. [Our experiences in three years of BCG vaccination at the center of the O.P.H.S. at Constantine; study of observed cases (25 cases of complications from BCG vaccination)]. *Alger Medecale*. 1951;55(8):1138-1147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14894415>. Accessed February 4, 2019.

13. Levin M, Newport MJ, Kalabalikis P, et al. Familial disseminated atypical mycobacterial infection in childhood: a human mycobacterial susceptibility gene? *Lancet*. 1995;345(8942):79-83. doi:10.1016/S0140-6736(95)90059-4
14. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al. Interferon- $\gamma$  Receptor Deficiency in an Infant with Fatal Bacille Calmette–Guérin Infection. *N Engl J Med*. 1996;335(26):1956-1962. doi:10.1056/NEJM199612263352604
15. de Jong R, Altare F, Haagen IA, et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*. 1998;280(5368):1435-1438. doi:10.1126/SCIENCE.280.5368.1435
16. Ecobar AG. Defectos en la expresión de las proteínas de membrana que predisponen a una alta susceptibilidad a Tuberculosis. *Rev Educ Bioquímica*. 2005;24(Redalyc):54-58. <http://www.who.int/gtb/publications>. Accessed January 22, 2019.
17. Sigifredo Pedraza, Jose Luis Lezana E al. Clinical disease caused by Klebsiella in 2 unrelated patients with interleukin 12 receptor beta1 deficiency. *Pediatrics*. 2010;126(4):e971-6. doi:10.1542/peds.2009-2504
18. Sigifredo Pedraza, Ruth Aldana, Maria Teresa Herrera, Martha Torres JB. Infecciones por Mycobacterium y salmonella en pacientes con inmunodeficiencias asociadas al circuito IL-12/IL-23/IFN-g: aspectos biológicos y clínicos. *Enfermedades Infecc y Microbiol*. 2007;27:88-99.
19. Frédéric Altare, Anne Durandy, David Lammas, Jean-Laurent Casanova et al. Impairment of Mycobacterial immunity in human Interleukin-12 receptor deficiency. *Science* (80- ). 1998;280:1432-1435.
20. Senanayake MP, Kumararatne DS, Doffinger R, Barcenas-Morales G. Disseminated BCG in an infant with interleukin-12 receptor B1 (IL12RB1) deficiency. *Paediatr Int Child Health*. 2015. doi:10.1179/2046905514Y.0000000129
21. Alangari A, Al-Zamil, F, A Al-Mazrou JL asanova. Treatment of Disseminated Mycobacterial Infection with High-Dose IFN- $\gamma$  in a Patient with IL-12R $\beta$ 1 Deficiency. *Clin Dev Immunol*. 2010;2011:5. <http://downloads.hindawi.com/journals/cdi/2011/691956.pdf>. Accessed January 28, 2019.
22. De Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J, et al. Revisiting human IL-12R $\beta$ 1 deficiency: A survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine (Baltimore)*. 2010;381-402. doi:10.1097/MD.0b013e3181fdd832
23. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular Responses to Interferon- $\gamma$ . *Annu Rev Immunol*. 1997;15(1):749-795. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749
24. Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, et al. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med*. 2003;197(4):527-535.

doi:10.1084/JEM.20021769

25. Toubiana J, Okada S, Hiller J, et al. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. *Blood*. 2016;127(25):3154-3164. doi:10.1182/blood-2015-11-679902
26. Sigifredo PS, Teresa HBM. Bacille Calmette–Guérin infection and disease with fatal outcome associated with a point mutation in the interleukin-12/interleukin-23 receptor beta-1 chain in two Mexican families. *Int J Infect Dis*. 2010;14:e256-e260. doi:10.1016/J.IJID.2009.11.005
27. Sandoval-Ramírez E, Roberto Pietropaolo-Cienfuegos D, Zamora-Chávez A, et al. *Tuberculosis Diseminada En Un Lactante Con Defecto Innato Del Eje IFN $\gamma$ -IL 12/IL 23.*; 2012. www.nietoeditores.com.mx. Accessed January 22, 2019.
28. Wang LH, Yen CL, Chang TC, Liu CC, Shieh CC. Impact of molecular diagnosis on treating Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012:411-417. doi:10.1016/j.jmii.2012.08.017
29. Wallis RS, Palaci M, Vinhas S, et al. A Whole Blood Bactericidal Assay for Tuberculosis. *J Infect Dis*. 2001;183(8):1300-1303. doi:10.1086/319679
30. Strickler A, Pérez A, Risco M, Gallo S. Enfermedad por bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y deficiencia del receptor B-1 de interleuquina 12: Experiencia clínica de dos casos en una familia y un caso aislado. *Rev Chil infectología*. 2014:444-451. doi:10.4067/S0716-10182014000400010
31. Martínez-Barricarte R, Markle JG, Ma CS, et al. *Human IFN- $\gamma$  Immunity to Mycobacteria Is Governed by Both IL-12 and IL-23*. Vol 3.; 2018. <http://gnomad>.
32. Mata-Espinosa DA, Hernández-Pando R. *Interferón Gamma: Aspectos Básicos, Importancia Clínica y Usos Terapéuticos RINCÓN DEL RESIDENTE Gamma Interferon: Basics Aspects, Clinic Significance and Therapeutic Uses*. Vol 60.; 2008.
33. Herbst S, Schaible UE, Schneider BE. Interferon Gamma Activated Macrophages Kill Mycobacteria by Nitric Oxide Induced Apoptosis. Tailleux L, ed. *PLoS One*. 2011;6(5):e19105. doi:10.1371/journal.pone.0019105

## APÉNDICE

-Medio de cultivo 7H9 para *M. tuberculosis* H37Ra.

En una botella de 500ml se mezcló y homogeneizó 1.88g de agar 7H9 en polvo (BBL, Cat. 371310), 1.6ml de glicerol y 400 ml de agua desionizada, (mezclando dicha solución con agitación constante hasta disolverse completamente) cerrando de forma parcial la botella con tapa de rosca para su esterilización en autoclave(121°C/15lb/15min.), por otra parte, debe observarse que el medio no debe de estar precipitado. Posteriormente se hizo el control de esterilidad incubando el medio a 37°C por 24-48 hrs. y posterior al control de seguridad, dentro del gabinete de seguridad, con un sistema de filtración (membrana de 0.22 µm) se filtró el medio 7H9 y adicionando 40ml de ADC (a través de un sistema de filtración) por cada 400 ml de medio 7H9, guardándose a 4°C debidamente etiquetado hasta su uso.

-Medio de 7H9 para *M. bovis* BCG.

Se pesaron 4.7 g de medio 7H9 (Middlebrook)y en un matraz se disolvieron con 900ml de agua desionizada, (mezclando dicha solución con agitación constante hasta disolverse completamente). Posteriormente, la solución se trasladó a una botella de vidrio de 1 L cerrando de forma parcial la tapa para su esterilización en autoclave, con cinta testigo. Pasado el tiempo de esterilización en autoclave (121°C/15lb/15min.), se dejó enfriar el medio para la realización del control de esterilidad, incubando a 37°C por 24hrs.

Dentro del Gabinete de Bioseguridad Biológica (GSB), se suplementó el medio 7H9 adicionando 100ml de OADC (BBL, Cat. 211886) usando un sistema de filtración y posteriormente se etiquetó y se guardó a 4°C hasta su uso.

-Preparación del medio de cultivo sólido (7H10) para *M. tuberculosis* H37Ra:

Se mezclaron en un matraz Erlenmeyer de 1 litro 11.4g de 7H10 agar, 2.5g de asparagina en 497ml de agua desionizada y 6ml de glicerol (agregando poco a poco el 7H10, glicerol y asparagina) observando que la solución tome una coloración verde opaco, después se puso a calentar en microondas de forma gradual (agitando continuamente y sin hervir) hasta tomar un aspecto verde traslúcido. Posteriormente se esterilizó la solución (poniendo tampón y sellando con bolsa y cinta testigo) a 121°C/15lb/15min. y dejándose enfriar de 40 a 50°C teniendo cuidado de que no gelifique se suplementó en el Gabinete de Bioseguridad con 60ml de OADC filtrado (filtro de .22 µm) mezclando adecuadamente para depositar 10 ml en cada caja de Petri teniendo cuidado de mantener su esterilidad.

Después de haber dejado enfriar el medio sólido en las cajas Petri, se empaquetaron y etiquetaron en un contenedor limpio para su depósito en incubadora (37°C/24hrs) como prueba de esterilidad, y posterior a ese tiempo se guardaron a 4°C hasta su uso.

-Preparación de Solución de lavado para ELISA (PBS 0.01M, pH 7.2; Tween-20 al 0.05%)

De la solución PBS 10X tomar 100ml, agregar 0.5ml de Tween-20 y en un matraz de aforo de 1L aforar con agua destilada. Mezclara adecuadamente y etiquetar para su uso.

-Preparación de solución para dilución de anticuerpos y enzima para ELISA (PBS 0.01M pH 7.2; Tween 20 al 0.05%, BSA 2%)

Se mezclaron 100ml de PBS con 50 µl de Tween 20, tomando 60ml de dicha disolución se disolvieron en 2 g de albúmina y se realizaron alícuotas de 60 ml para las respectivas diluciones del ELISA.