

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR**

“Producción de TNF- α en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* por macrófagos de ratones C57BL/6 y BALB/c”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**LICENCIADA EN CIENCIAS
ÁREA TERMINAL
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

PRESENTA

Erika Carrillo Ortega

DIRECTOR DE TESIS
Dra. Yvonne Rosenstein

CUERNAVACA, MORELOS
ENERO, 2022

Miembros de Comité Tutorial

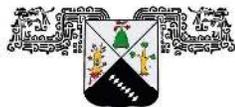
Dra. Yvonne J. Rosenstein Azoulay
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Ramón Antonio González García-Conde
(Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM)

Dr. Iván Martínez Duncker
(Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM)

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama
(Facultad de Medicina, UAEM)

M. en C. Estefanía Alemán Navarro
(Instituto de Biotecnología-UNAM)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CARRILLO ORTEGA ERIKA** con número de matrícula **10002743** cuyo título es:

“Producción de TNF- α en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* por macrófagos de ratones C57BL/6 y BALB/c”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 04 de mayo del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE	(PRESIDENTE).
DR. IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER	(SECRETARIO).
DRA. YVONNE J. ROSENSTEIN AZOULAY	(VOCAL).
DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA	(SUPLENTE).
M. EN C. ESTEFANÍA ALEMÁN NAVARRO	(SUPLENTE)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2022-05-09 20:04:25 | Firmante

BTTf3asBJZpYEzDJZdxlaY+E8IYQlFPLyPS2NpldLj4cZGAg/XjYWon0JByJAcylmoaGGIwCKcZAKtLb3PWBZAvRqhergAYEroYwffaLF11VXa4wWkXNpPDAmto/RdvoW2z/2t1i sH0SXYXworMmp8EqireGj5NpX3gOX0xB1rc8p+j1IRgWUvvgZoWJYYNzsB641FM+S2KndMKD0GqcTnjG+8UArJDYfCotgChvDN8mNj6hnARjC9SHy9jZBSUZvutcnfFWSMyI6 R3ZlABglq/olA3RME1ugskjuvFgZyoyGhZmKvc4PQf5OLgE44+OtYFdcYkFqNkv33tAy7m0A==

YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY | Fecha:2022-05-11 23:21:50 | Firmante

Mb5CdzrmGakfnKAWqzJN9AKYGoihcqlOuSN0LMATJP/nmjWKjWD5pr9UEbgjpFNphyLvi0gfkp9687HCE7JeU5gB4hVrtI5owuVbfwOhuZ1E6hJTvlm0gXwHmXF187SzoA52u2F Xp5JritU1jncNTwalD18a2sp/95l68suppPVUv5d4zQ9p8wC6HOYe1UxAUy0/HZnJhBFJUc+iCu6TuU0mG8zXPListKt09HPkLPLn0oan8iS7nxClOufUQppO34UZuGYKtp2tuqDdA EIZIUTclAtf5JFa4iZJ3MDdCmMGWwguLEj6fSnroA5dJPKGvKTCNvx8AZSyZQBec0ixeA==

ESTEFANÍA ALEMÁN NAVARRO | Fecha:2022-05-12 08:24:19 | Firmante

q4loLV9ABov1UUEPabeqUmg9id14PRRvsAVlxncCa+zRq0bZYPP7XK2ma+ecwlvAGIXBI7Sma6dviY0dW10CA1TqIjT7IAgaavqTWrWAHkZFBekh/EXVXCE/zwUyMVz+Al9d0+Z wu5221kAfuo4lqAR+MmanZKX1+r7XJL2wCPbqfKUusxNJtvo/bOCemR08YGjrynRelg/HYBxcqJPcmpT6xqxUN9qqr9M/yoLnusqzwJq9j8ytEHH/QBy/z5ZlgOco2JNilxvOxHm GtVHBvh3rINWuAnyI6qNKwMXP2RvU+MfOiS8fd87IH2ZbFS0vRrir+yKcnkFWh0J4Q==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2022-05-12 11:42:33 | Firmante

OqrCsQ8oSyu/KM7pLv7z0ufnZTYZ9p4zMZUu6kOoewS9SxP6cDZFB869FCJd4OlfiFeP5q+uLtnUvW7SzUsrMgIDtMwVe1T9zc7tdYVd/Kt14c0NnByum31mhct4GoHxZD9HFj3Sv 0XzO8N8k3eiZddykrbNCf5U5Q34gZerryah5Bwhd7xOyxcccUYh4LI7j0VK+mnfwhbCD6rLs/wEJHhhuAl03gpqMFJWqbDGBp/qa6n8CPawVth4To2cUynyeYTdJq1F6mAXOi2Ze 8iachCJ+CSqSNvNmyhMFdO6CRFJwu74h9a8nk4vwsqgHtD/L5/pLFSbz4Fttg4G/8A==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2022-05-12 20:57:41 | Firmante

o7Yx51fkYQivs7xFDm07GPxokDTrXyJFRXRrOESpIV/nlAnqVLSxFD9Qc4ooMMNN13C0f9aQCwugFc4Rdaq2lpMH6lxmhuMvArmj0nPzZ5zXfz4L+3xf3EdHjwFTN0ujSGzFo0gO Tv6NDvEkowmyUQ13eYY9SmunQaf4OizYLle4vpfMI5EB9lPKvKcNSA/PgHWY3OrhZxkAydCRQmrm53wm7n0yA1fOGOMsvvAG9BbUR9HosEbhYlthFkfpAEzwBsQLafzRw8E C93M6bLxAc32rFGdTycOXSDht6LJSJRyRyPrS5ZzT2+9rBQZ3YFXAcUUEL9M4eQWnn7Mx8reCEw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



zfi5B9eLA

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/z41Str8RGjZOV0cVKB9zMDxtFTOfsTa>



Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.

Para su realización, el proyecto contó con fondos provenientes de los proyectos IN212519 (PAPIIT/DGAPA/UNAM) y CONACYT A1-S-15601

A mi más valioso tesoro

Mi familia, mi amado esposo Johnny, mi querida mamá Rita y mi hermano Fernando, tenerlos junto a mí es la manifestación de amor en mí vida. Son mi inspiración para ser mejor cada día, me dieron grandes enseñanzas y fueron parte de este “sueño alcanzado”.



Con amor incondicional
Erika Carrillo Ortega

Agradecimientos

Yo sé que concluir este proyecto no fue fácil. Sin el apoyo que se me brindó para el desarrollo de esta tesis no lo hubiera logrado, por eso deseo expresar mi agradecimiento a cada uno de los involucrados en este proceso.

Agradezco a la directora de esta tesis, Dra. Yvonne Rosenstein, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué al laboratorio.

Asimismo, agradezco a mi mentora de tesis M. en C. Estefanía Alemán por sus palabras que fueron sabias, sus conocimientos rigurosos y precisos. Donde quiera que vaya, te llevaré conmigo en mi transitar profesional. Gracias por tu paciencia, por compartir tus conocimientos de manera profesional e invaluable, por tu dedicación, perseverancia y tolerancia.

Por su orientación y atención durante el desarrollo de esta tesis, mi agradecimiento al Dr. Ángel Flores, a la Biól. Erika Melchy y al M. en C. Erick Pérez, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Finalmente, gracias al Dr. Ramón García-Conde, al Dr. Iván Martínez del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM y al Dr. Fernando Esquivel de la Facultad de Medicina de la UAEM, por sus valiosas sugerencias.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

• Resumen.....	1
• Abstract	2
• Abreviaturas.....	3
1 Introducción	1
1.1 La Tuberculosis en el mundo.....	1
1.2 La lucha contra la TB.....	3
1.2.1 Diagnóstico de TB	3
1.2.2 La vacuna contra TB	4
1.2.3 El tratamiento para TB	4
1.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1.4 Envoltura celular de Mtb.....	7
1.5 Respuesta inmune a Mtb	9
1.5.1 Diferencias de la respuesta inmune entre sexos.....	12
1.6 Interacción de Mtb con los macrófagos.....	14
1.7 Tipos de receptores en macrófagos.....	15
1.7.1 Receptores Tipo Toll	15
1.7.2 Receptores Tipo Nod.....	15
1.7.3 Receptores Tipo Scavanger.....	16
1.7.4 Receptores de Lectinas	16
1.7.5 CD14	17
1.7.6 F4/80	17
1.7.7 CD43	17
1.8 Estrategias de Mtb para sobrevivir en los macrófagos	20
1.9 Producción de citocinas por la infección con Mtb.....	20
1.9.1 TNF- α	21
3 Antecedentes	23
4 Planteamiento del problema	25
4.1 Justificación	25
4.2 Hipótesis	26
4.3 Objetivo.....	26
5 Materiales y métodos	27
5.1 Uso de animales	27

5.2	Obtención de macrófagos derivados de la médula ósea (BMMs).....	27
5.3	Fenotipificación de BMMs por inmunotinción.....	28
5.4	Acoplamiento de las proteínas Cpn60.2 y DnaK a perlas Ni-NTA.....	29
5.5	Activación de BMMs con BCG, Cpn60.2 y DnaK.....	30
5.6	Cuantificación de TNF- α mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	30
6	Resultados	32
6.1	CD43 no está involucrado en la maduración de los macrófagos. La ausencia de CD43 afecta diferencialmente la expresión de los TLRs 2 y 4 entre las cepas C57BL/6 y BALB/c.....	32
6.2	La producción de TNF- α por BMMs de ratones C57BL/6 y BALB/c en respuesta a BCG, Cpn60.2 y DnaK depende parcialmente de CD43.....	36
7	Discusión.....	40
8	Conclusiones	43
9	Perspectivas.....	43
10	Bibliografía.....	44
11	Anexos.....	55

- **Resumen**

La tuberculosis (TB) es la principal causa de muerte a nivel mundial por un único agente infeccioso, posicionándose como un problema grave de salud pública. En 2020 se registró un total de 1.5 millones de muertes y un aumento del 10% de casos con respecto al año anterior, según datos de la OMS. Además, la pandemia de COVID-19 y la interrupción de los servicios de salud derivada de esta amenazan con revertir el progreso reciente en la reducción de casos de tuberculosis. La TB es provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb); para prevenir esta enfermedad existe una vacuna disponible: el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* que se aplica principalmente en niños. También existen tratamientos que son exitosos, sin embargo duran mucho y son costosos, además de que hay un gran número de cepas de Mtb resistentes a los antibióticos.

La infección ocurre cuando un individuo infectado tose y otro individuo sano inhala tan solo de tres a cinco micobacterias. Cuando Mtb llega a los pulmones a través del tracto respiratorio se encuentra con su blanco principal de infección, los macrófagos alveolares. Los macrófagos reconocen a Mtb a través de múltiples receptores, uno de los cuales es la sialomucina CD43. La interacción macrófago-Mtb resulta en la activación de la respuesta inmune, generando la secreción de citocinas y quimiocinas pro- y anti- inflamatorias. En ratones C57BL/6, la ausencia de CD43 disminuye la capacidad de unión de Mtb a los macrófagos y la capacidad fagocítica de los macrófagos, resulta en una producción baja de las moléculas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-12p40 (esenciales para controlar la infección en la fase aguda) y favorece una infección más grave en los animales.

Para comprender mejor la función de la molécula CD43 en la infección por Mtb, el objetivo del proyecto es comparar la producción de la citocina proinflamatoria TNF- α en macrófagos de ratones C57BL/6 y BALB/c, como dos prototipos de respuestas Th1 y Th2 respectivamente. Se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea (BMMs) de ratones silvestres y CD43KO, cuyo fenotipo se verificó para los marcadores CD43, F4/80, TLR2 y TLR4. Los macrófagos fueron expuestos a BCG y se evaluó la producción de TNF- α por ELISA al cabo de 24 y 48 horas.

- **Abstract**

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death worldwide by a single infectious agent, positioning itself as a serious public health problem. In 2020, a total of 1.5 million deaths were recorded and a 10% increase in cases compared to the previous year, according to WHO data. In addition, the COVID-19 pandemic and the resulting disruption of health services threaten to reverse recent progress in reducing TB cases. TB is caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). There is an available vaccine to prevent this disease: the Bacillus Calmette-Guérin (BCG), an attenuated strain of *Mycobacterium bovis* that is mainly applied in children. There are also treatments that are successful; however, they are lengthy and expensive, and there is a large number of antibiotic-resistant strains of Mtb.

Infection occurs when an infected individual coughs and another healthy individual inhales just three to five mycobacteria. When Mtb reaches the lungs through the respiratory tract it encounters its main target of infection, alveolar macrophages. Macrophages recognize Mtb through multiple receptors, one of which is the sialomucin CD43. The macrophage-Mtb interaction results in the activation of the immune response, generating the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines. In C57BL/6 mice, the absence of CD43 decreases the binding capacity of Mtb to macrophages and the phagocytic capacity of these cells, resulting in a low production of the pro-inflammatory molecules TNF- α , IL-6 and IL-12p40 (essential for controlling acute phase infection) and promoting a more severe infection in mice.

To better understand the role of the CD43 molecule in Mtb infection, the objective of the project is to compare the production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α in the macrophages of C57BL/6 and BALB/c mice, as two prototypes of Th1 and Th2 responses, respectively. Macrophages derived from the bone marrow (BMMs) of wild-type and CD43KO mice were used. Cell phenotypes were verified for the markers CD43, F4/80, TLR2 and TLR4, macrophages were exposed to BCG, and TNF- α production was evaluated by ELISA after 24 and 48 hours.

• Abreviaturas

SSA	Secretaría de Salud
OMS	Organización Mundial de las Salud
TB	Tuberculosis
TST	Prueba Cutánea de Tuberculina
PPD	Derivado Proteico Purificado
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
BCG	Bacilo de Calmette- Guérin
STR	Estreptomina
INH	Isoniazida
EMB	Etambutol
RIF	Rifampicina
PZA	Pirazinamida
CoA	Coenzima A
MDR	Cepas de Mtb resistentes a múltiples fármacos
XDR	Cepas de Mtb extremadamente resistentes a los fármacos
RR-TB	TB resistente a rifampicina
LTBI	Infección latente de tuberculosis
AG	Arabinogalactano
PDIM	Dimicocerosatos de tiocerol
PIM	Glicolípidos a base de manosil-fosfatidil-mioinositol
LM	Lipomanano
LAM	Lipoarabinomanano
ManLAM	Lipoarabinomanano manosa
TMM	Monomicolatos de trehalosa

TDM	Dimicolatos de trehalosa
SL	Sulfolípidos
DAT	Diacil-trehalosas
TAT	Triacil-trehalosas
PAT	Poliacil-trehalosas
CD	Células dendríticas
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
TLR	Receptores tipo Toll
CLR	Receptores de lectinas tipo C
FcR	Receptores Fc
SR	Receptores Scavenger
CR	Receptores del complemento
NF-κB	Factor nuclear κB
MAPK	Proteínas activadas por mitógenos
Mφ	Macrófagos
ITAM	Motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina
ITIM	Motivo de inhibición inmunorreceptor basado en tirosina
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa
BCL10	Linfoma / leucemia de células B 10
MALT1	Tejido linfoide asociado a las mucosas 1
CPA	Célula presentadora de antígenos
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
TIR	Receptor Toll/IL-1
IFN	Interferón

TRIF	Dominio TIR que contiene un adaptador inductor de IFN- β
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
S/T	Serina/Treonina
Asn	Asparagina
LAM	Lipoarabinomanano
SapM	Fosfatasa ácida secretada
PtpA	Proteína tirosina fosfatasa A
KO	<i>Knockout</i>
Th	Células T cooperadoras
IL	Interleucina
TNF	Factor de necrosis tumoral
WT	Tipo silvestre
PBS	Buffer de fosfatos salino
FBS	Suero Fetal Bovino
PFA	Paraformaldehído
LPS	Lipopolisacárido
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

1 Introducción

1.1 La Tuberculosis en el mundo

La tuberculosis (TB) es una enfermedad transmisible que constituye una importante causa de morbilidad. Se encuentra entre las 10 principales causas de muerte y es la principal causa de muerte a nivel mundial por un único agente infeccioso por encima del VIH/SIDA y COVID-19 hasta el 2020. La incidencia de la tuberculosis comenzó a disminuir a principios del siglo XX en los países con mejores condiciones de vida, esta tendencia se aceleró con la aplicación de vacunas y el desarrollo de antibióticos como la estreptomina y la isoniazida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la TB como una emergencia de salud pública mundial en 1993 [Global tuberculosis report, 2021].

La TB está presente en el mundo entero, y en la actualidad la mayoría de los casos nuevos se registraron en la Región de Asia Sudoriental (43%), África (25%) y el Pacífico Occidental (18%), con porcentajes menores en el Mediterráneo Oriental (8.2%), las Américas (3%) y Europa (2.5%) (Figura 1B) [Global tuberculosis report, 2021]. En 2020 la OMS estimó que 10 millones de personas enfermaron de TB en todo el mundo, de los cuales 5,6 millones son hombres, 3,3 millones mujeres y 1,1 millones niños (Figura 1A), y un total de 1,5 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad. Las muertes por TB se dan con mayor frecuencia en países en desarrollo. En los países con condiciones socioeconómicas bajas los contagios por TB se producen frecuentemente durante la infancia por formas meníngea o diseminada de la TB.

En México se estima que hay 30 000 casos de TB por año con una tasa de incidencia de 23,5 por cada 100 000 habitantes [Tuberculosis en las Américas, 2020]. Cada año surgen nuevos casos de TB en el país, las entidades federativas de México con mayor incidencia y mortalidad por esta causa son Baja California, Veracruz, Guerrero, Sonora, Tamaulipas, Chiapas, Nuevo León y Tabasco (SSA, 2016) (Figura 1C).



Figura 1 **Tuberculosis en el mundo.** (A) Individuos enfermos de TB en el mundo durante 2020. (B) Porcentaje de casos nuevos en el mundo por región de la OMS en el 2020. (C) Estados de México con mayor incidencia de nuevos casos. Datos de la OMS 2021 y SSA 2016.

El aumento de la tasa de incidencia por TB comenzó en la década de los 90s junto con la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En 1989, hubo aproximadamente 1,3 millones de casos y 450 000 de muertes en el mundo, estas tasas globales aumentaron en un 20,8 % a paritr de 1990 de las cuales 4,6 % de todas las muertes de ese año se atribuyeron a la infección por VIH. [Dolin et al., 1994, Raviglione MC et al., 1995, World Health Organization, 1999]. El riesgo de desarrollar TB activa en personas coinfectadas por VIH/TB es del 8% por año [Selwyn et al., 1989]. La tuberculosis ha demostrado ser la principal causa de mortalidad entre las personas VIH positivas en los hospitales y el VIH es más prevalente entre los pacientes con tuberculosis que en el resto de la población, lo que indica una trágica sinergia entre las dos enfermedades. Según la OMS, más del 30% del aumento de casos de tuberculosis desde 2000 puede estar asociado con la coinfección por el VIH [Borgdorff et al., 2002]. En el mundo, se estima que hubo 1,3 millones de muertes por tuberculosis entre personas VIH negativas en 2020 (un aumento de 100 mil en 2019), y 214 000 muertes adicionales entre personas VIH positivas (un aumento de 209 000 en 2019). Los hombres (≥ 15 años) representan el 53% de las personas que desarrollaron TB en 2020; las mujeres representan el 32% y los niños (menores de 15 años) el 16%. De los individuos coinfectados con

Mtb y VIH el 50% son hombres, el 40% mujeres y el 9,8% niños [Global tuberculosis report 2021].

La TB es un problema grave de salud pública, para lograr controlarla es crucial comprender y caracterizar detalladamente los eventos que ocurren durante el encuentro inicial entre el macrófago y la bacteria, el proceso de infección junto con la evasión de la respuesta inmune de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Al entender cómo funciona la infección por Mtb nos permitirá desarrollar nuevos tratamientos.

1.2 La lucha contra la TB

La lucha contra la TB se ha basado en la prevención, diagnóstico temprano y tratamiento adecuado de los casos de TB. Algunas veces estos tratamientos resultan exitosos, sin embargo, son largos y costosos, además de que hay un gran número de cepas de Mtb resistentes a los antibióticos. Aunado a esto, la pandemia de COVID-19 y la interrupción de los servicios de salud derivada de esta, amenazan con revertir el progreso reciente en la reducción de casos de TB.

1.2.1 Diagnóstico de TB

Una herramienta ampliamente utilizada para diagnosticar la tuberculosis es la prueba cutánea de tuberculina (TST). La TST mide la respuesta de hipersensibilidad retardada al derivado proteico purificado (PPD), una mezcla de varios antígenos micobacterianos [Huebner et al., 1993]. Un gran inconveniente de este diagnóstico es la alta tasa de falsos positivos debido a la vacunación o la exposición previa a micobacterias no tuberculosas [Ellie J. C. Goldstein et al., 2007].

Los frotis de esputo también se han utilizado como un método confiable de diagnóstico, pero tienen limitaciones importantes como la incapacidad para distinguir entre infecciones con diferentes cepas [Ellie J. C. Goldstein et al., 2007]. Los nuevos métodos de diagnóstico incluyen pruebas biológicas moleculares basadas en amplificación de ácidos nucleicos, análisis de secuenciación

automatizada y ensayos inmunológicos para la detección rápida de antígenos de *M. tuberculosis* y anticuerpos contra estos antígenos [Cho S. N., 2007].

1.2.2 La vacuna contra TB

El bacilo de Calmette-Guérin (BCG) se originó a partir de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* [Luca S et al., 2013] y es la única vacuna existente contra esta enfermedad. En 1951 se introdujo esta vacuna en México y a partir de 1961 forma parte del esquema rutinario de vacunación en los recién nacidos [Agger et al., 2002, Vacunación Universal, 2014]. Sin embargo, no evita la infección primaria y, lo que es más importante, no evita la reactivación de la infección pulmonar latente que es la principal fuente de propagación del bacilo en la comunidad. [Santos et al., 2002]. A partir de 1971 se empezó a preparar la vacuna liofilizada en el laboratorio BCG de México, con la cepa 1331 procedente del Instituto Serológico de Copenhague, Dinamarca. También en México se emplearon vacunas liofilizadas procedentes del Laboratorio Glaxo de Inglaterra y del Laboratorio del BCG de Japón [Pérez GC, 2014]. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que cada vacuna producida por diferentes fabricantes varía en su viabilidad, integridad y capacidad de despertar respuesta inmune. Por ejemplo la BCG fabricada en Dinamarca y Japón provocaron una producción robusta de citocinas y quimiocinas esenciales para la respuesta inmune contra las micobacterias como CCL7, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, en comparación con BCG fabricada en India y Bulgaria [Angelidou et al., 2020]. La cobertura de la BCG en los niños menores de un año fue de 93.9%; en los de 12-23 meses fue de 98.3%, y en los de 24-35 meses, de 98.6% [Díaz-Ortega et al., 2018].

1.2.3 El tratamiento para TB

Actualmente hay medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés) para tratar la tuberculosis que debe tomarse durante un periodo de 6 a 9 meses. Entre estos medicamentos aprobados están los fármacos de primera línea: estreptomina (STR), isoniazida (INH), etambutol (EMB), rifampicina (RIF) y pirazinamida (PZA)

[Flores-Valdez M.A et al., 2014]. STR, que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, se descubrió a mediados de la década de 1900 y se demostró que es eficaz contra la tuberculosis pulmonar en uno de los primeros ensayos clínicos aleatorizados [Ruiz, P. et al., 2002]. INH funciona inhibiendo la síntesis de la pared celular, de manera similar a EMB, que se descubrió poco después de INH [Takayama K et al., 1972, Bobrowitz et al., 1971]. RIF impide la síntesis de RNA de *M. tuberculosis* al unirse con la polimerasa de RNA dependiente del DNA [McClure WR et al., 1978]. A pesar de que PZA se descubrió en 1950, su mecanismo de acción aún no se ha comprendido completamente, sin embargo, se sabe que actúa inhibiendo múltiples procesos como la producción de energía, la trans-traducción y la vía biosintética de pantotenato / CoA, que es necesario para la supervivencia persistente de la micobacteria. El uso de PZA permitió la disminución del tiempo para el tratamiento contra TB a 9 meses, con la terapia combinada de INH / RIF se redujo aún más el tiempo del tratamiento a 6 meses. Actualmente se recomienda este tratamiento combinado con PZA / INH / RIF y EMB en casos de TB sensibles a fármacos [Njire et al., 2016, Zhang et al. 2014, Dillon et al., 2014].

Debido al tiempo que duran estos tratamientos la mayoría de los pacientes suspenden el medicamento antes de completar el régimen; este mal seguimiento de terapia conduce a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistente a rifampicina (RR-TB), resistentes a múltiples fármacos (MDR), extremadamente resistentes a los fármacos (XDR); en 2019 se detectaron y notificaron un total mundial de 206 030 personas con MDR / RR-TB, un aumento del 10% desde 2018 [Global tuberculosis report 2021].

Lamentablemente los efectos secundarios de los medicamentos (neuritis, hepatitis, hipersensibilidad, etc.), la duración del tratamiento y, especialmente en países en desarrollo, el acceso a servicios de atención médica adecuados impide un avance en el cumplimiento del tratamiento. Estos obstáculos se complican aún más por el aumento de las tasas de MDR y XDR. El éxito del tratamiento para la tuberculosis depende de mejorar la detección de la enfermedad; ampliar la cobertura de las pruebas de resistencia a los medicamentos entre las personas con tuberculosis confirmada bacteriológicamente; y asegurar que todos los diagnosticados con TB

cumplan con el tratamiento.

1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

Un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), y del 10% de las personas que adquieren una infección latente de tuberculosis (LTBI) y no reciben terapia preventiva están en riesgo de desarrollar TB activa durante su vida [Council of the Infectious Disease Society of America, 1999]. Cuando se desarrolla tuberculosis activa, la localización de la enfermedad, la gravedad y el resultado son muy variables. La TB puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo, pero por lo general se presenta como una infección pulmonar, que varía desde una infiltración leve hasta una enfermedad crónica, cavitaria y severamente destructiva [Council of the Infectious Disease Society of America, 1999]. La TB extrapulmonar se presenta en la laringe, los ganglios linfáticos, el cerebro, los riñones o los huesos y las articulaciones. La manifestación más grave de la enfermedad es la TB miliar, ocurre cuando los bacilos de la tuberculosis ingresan al torrente sanguíneo y se diseminan por todo el organismo, donde crecen y causan enfermedades en múltiples sitios, es fatal si no se trata [Reinout van C. et al., 2002]. Cuando la tuberculosis se presenta en el tejido que rodea el cerebro o la médula espinal, se denomina meningitis tuberculosa [Wilkinson et al., 2017]. La infección por Mtb se manifiesta de diferentes formas, esto se ve reflejado en el equilibrio que existe entre la micobacteria y la respuesta inmune del hospedero, en el que la calidad de la respuesta inmune del huésped determina el resultado [Reinout van C. et al., 2002].

Mtb fue descubierta por Robert Koch en 1882, es un bacilo gram-positivo recto o ligeramente curvo con extremos redondeados. Esta micobacteria varía en ancho de 0,2 a 0,5 μm y en longitud de 1 a 4 μm . Es aerobia facultativa, lo cual explica su preferencia por causar enfermedades en tejidos muy oxigenados como el lóbulo superior del pulmón, es inmóvil [González-Martin et al., 2014].

1.4 Envoltura celular de Mtb

Además de los desafíos en el diagnóstico de la tuberculosis, existen otras barreras que interfieren con los esfuerzos de prevención y tratamiento, como la compleja envoltura celular que caracteriza a las micobacterias.

La compleja envoltura celular de *M. tuberculosis* está formada por tres segmentos principales: la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula. La pared celular tiene alto porcentaje en lípidos que las vuelve impermeables, lo que determina su gran resistencia a la actividad bactericida del complemento y a la digestión intracelular por macrófagos [Barkan et al., 2009]. Esta pared celular consta de peptidoglicano unido covalentemente a Arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (C70-C90) asociados a una gran variedad de lípidos atípicos unidos no covalentemente, también conocidos como lípidos extraíbles [Daffé et al., 2014]. Los ácidos micólicos unidos a AG y los lípidos extraíbles interactúan para formar una membrana externa atípica llamada micomembrana. La micomembrana es un determinante importante de la virulencia del patógeno; y consiste en una variedad de glicolípidos, polisacáridos, lipoglicanos y lipoproteínas. Algunos de estos son: dimicocerosatos de tiocerol (PDIM), manosil-fosfatidil-mioinositol (PIM); lipomanano (LM), lipoarabinomanano (LAM), lipoarabinomanano manosa (ManLAM). Estos componentes de la micomembrana están presentes en las membranas internas y externas de Mtb. como dimicocerosatos de tiocerol (PDIM); glicolípidos a base de manosil-fosfatidil-mioinositol (PIM); y lipoglicanos como lipomanano (LM), lipoarabinomanano (LAM), lipoarabinomanano manosa (ManLAM). Las acil-trehalosas encontradas en la micomembrana de Mtb incluyen monomicolatos de trehalosa (TMM), dimicolatos de trehalosa (TDM), sulfolípidos (SL), diacil-trehalosas (DAT), triacil-trehalosas (TAT) y poliacyl-trehalosas (PAT). [Daffé et al., 2014, Angala et al., 2014, Kalscheuer et al., 2019] (Figura 2). En general, estos lípidos participan como moduladores de la respuesta inmune del huésped durante la infección, por ejemplo, le confiere resistencia a la desecación, permitiendo la supervivencia del bacilo en el esputo seco. Por todo esto se plantea que los lípidos les sirven a las micobacterias patógenas como una armazón protectora [Brennan et al., 2003].

Los monomicolatos de trehalosa (TMM) y los dimicolatos de trehalosa (TDM), también llamados “factor de cordón”, son componentes esenciales y abundantes de la envoltura celular micobacteriana que desempeñan un papel crucial en la función de la pared celular y las interacciones huésped-patógeno [Daffé et al., 2014, Angala et al., 2014]. El LAM de *M. tuberculosis* tiene "capas" cortas de oligosacáridos que contienen manosa y que le permiten unirse al receptor de manosa en los macrófagos. Además, LAM puede unirse a los receptores tipo Toll (TLR) e insertarse físicamente en las membranas, induciendo eventos de señalización importantes en la respuesta del huésped en la TB, como la regulación de la secreción de citocinas, el bloqueo de la activación transcripcional del interferón- γ (IFN- γ) y la neutralización de los radicales libres de oxígeno potencialmente citotóxicos. Los PIM se pueden dividir en dos grupos dependiendo del contenido de manosa, que determina su efecto inmunogénico. Otros lípidos de la pared celular que se han descrito como activadores/moduladores de la respuesta inmune incluyen a PDIM, DAT y PAT [Kalscheuer et al., 2019, Chalut et al., 2016, Chatterjee D et al., 1998, Gilleron et al., 2000].

La cápsula de *M. tuberculosis* tiene una amplia variedad de proteínas con un alto nivel de la chaperonina molecular Cpn60.2 (Hsp65) y la chaperona DnaK (Hsp70), que pertenecen a la familia de proteínas de la proteína de choque térmico (HSP) [Brennan et al., 2001]. Se sabe que Cpn60.2, como otras chaperoninas moleculares en Mtb, pueden exportarse a la superficie celular en condiciones de estrés, es una proteína abundante en bacterias no estresadas y que actúa fuera de la célula para promover la supervivencia y la virulencia micobacteriana. [Hickey et al., 2009]. A pesar de que Cpn60.2 y DnaK tienen función de chaperonina/chaperona también tienen otras funciones llamadas moonlighting functions. Estas funciones son adquiridas durante procesos evolutivos, se refieren a cuando una sola proteína realiza más de una función y también se asocia con una localización específica para una función específica, sin embargo, estas no se conocen completamente [Henderson et al., 2010]. El silenciamiento del gen Cpn60.2 es letal para las micobacterias, lo que confirma que es indispensable para la supervivencia de las micobacterias [Cehovin et al., 2010]. También Cpn60.2 es un antígeno inmunodominante que provoca una respuesta inmune robusta en el hospedero

[Lewthwaite et al., 2007]. Al igual que DnaK, inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias [Lehner et al., 2000].

Algunos de los componentes de la envoltura celular de la micobacteria son importantes para mediar la interacción con las células del sistema inmune del hospedero, al igual que para la evasión de la respuesta inmune convergiendo en la replicación y posible diseminación del bacilo.

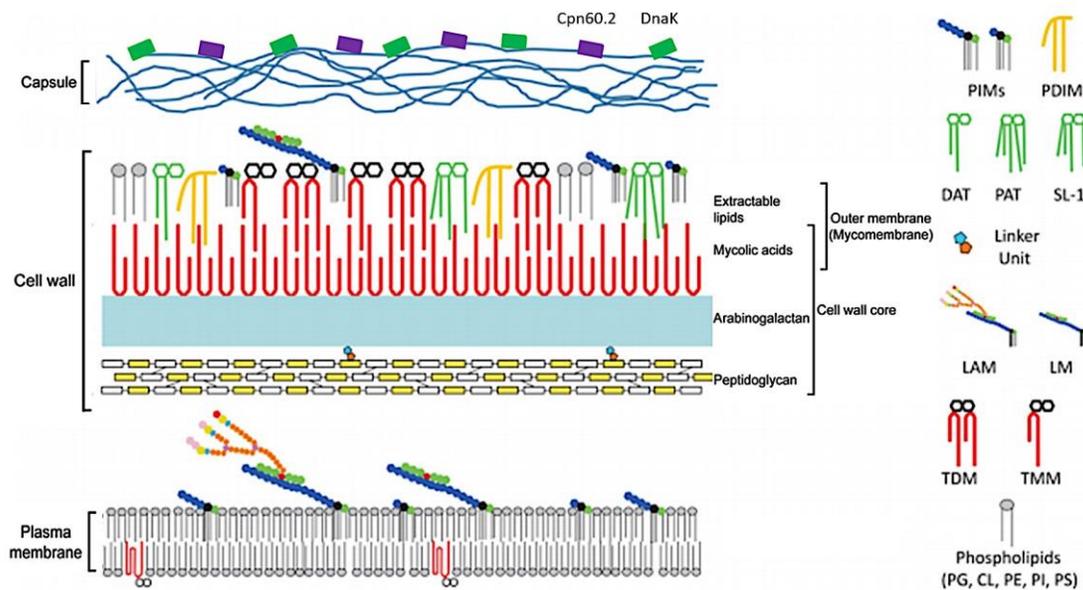


Figura 2 **Representación esquemática de la envoltura celular de *M. tuberculosis*.** La envoltura celular está compuesta por una membrana plasmática, una pared celular y una cápsula. La pared celular consta de peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos, y una gran variedad de lípidos asociados, conocidos como lípidos extraíbles, interactúan con los ácidos micólicos unidos al arabinogalactano para formar la membrana externa (micomembrana). Se presume que LAM no está asociado covalentemente con la membrana celular, aunque también se ha encontrado en la micomembrana. [26]. PE, fosfatidiletanolamina, PI, fosfatidil-mioinositol; CL, cardiolipina; PS, fosfatidilserina; PG, fosfatidilglicerol. Los lípidos extraíbles también se encuentran en la cápsula (no se muestra), al igual que las chaperoninas Cpn60.2 y DnaK. Las capas y estructuras químicas no se dibujan a escala. Las abreviaturas de lípidos extraíbles son las mismas que se utilizan en el texto. Adaptado de Angala et al. 2014.

1.5 Respuesta inmune a Mtb

La infección primaria por TB (Figura 3) ocurre cuando un individuo infectado expulsa micobacterias al aire, ya sea tosiendo o estornudando y otro individuo sano inhala aerosoles que contienen a Mtb. Tan solo se requieren de tres a cinco micobacterias para transmitir la infección. Una vez que Mtb es inhalada llega a los alvéolos en el pulmón a través del tracto respiratorio, donde es captada por fagocitos,

principalmente los macrófagos alveolares (M ϕ). La mayoría de estos bacilos se destruyen gracias a diferentes mecanismos bactericidas de los macrófagos, como la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNI) y de oxígeno (ROI) [Zuñiga et al., 2012].

Las micobacterias que persisten evaden la destrucción intracelular a través del sistema de secreción que usa Mtb para exportar proteínas, por ejemplo la proteína de 6 kDa ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target) que pertenece a la familia ESX e inhibe la maduración del fagosoma. Estos bacilos pueden diseminarse a través de los canales linfáticos o del torrente sanguíneo a tejidos y órganos más distantes como los riñones, los huesos y el cerebro [Zuñiga et al., 2012]. Cuando esta diseminación ocurre, los M ϕ y las células dendríticas (CD) inducen la producción de mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-12p80, IL-1 α e IL-1 β que activan a los macrófagos para inducir la muerte bacteriana. Las CD y M ϕ activados se trasladan a los ganglios linfáticos para inducir la respuesta inmune adaptativa donde presentan antígenos micobacterianos a las células T CD4 + y CD8 +, las células T $\gamma\delta$ y las células T restringidas a CD1, así como a las células asesinas naturales (NK). En este punto la infección ya está establecida (la respuesta inmune adaptativa ocurre de 2-6 semanas post-infección); donde se genera la producción de IFN- γ y TNF- α , son citocinas proinflamatorias que activan la capacidad de control de *M. tuberculosis* en macrófagos y pueden matar las micobacterias presentes en los macrófagos por medio de perforina y granulisina. Además de que son fundamentales para aislar a *M. tuberculosis* dentro de los granulomas [Kaufmann et al., 2005]. En este escenario inflamatorio pulmonar inducido por la proliferación de Mtb, las células inflamatorias periféricas, incluidos los monocitos, neutrófilos y CD, se reclutan al pulmón. Las CD se activan a través de la señalización de TLRs, y los monocitos se diferencian en macrófagos efectores que producen sustancias microbicidas, incluido el TNF- α , como se dijo es importante para el control de la infección [Watkins RE et al., 2006].

Luego ocurre el control de la proliferación del bacilo, las células T específicas de antígeno inducen la formación de un granuloma alrededor de los macrófagos infectados que contienen Mtb, principalmente compuestos por macrófagos

derivados de monocitos (algunos de los cuales se transforman en células gigantes multinucleadas), células T CD4 + y un anillo externo de células T CD8 +, este granuloma previene la diseminación de los bacilos. Además, las citocinas pro-inflamatorias (p. Ej., IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17 e IL23) tienen un papel clave de en la formación y estabilidad del granuloma, la presencia de quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 y CXCL10 que son cruciales para el reclutamiento de células inflamatorias para formar granulomas. Algunas de las células T secretan perforina y granulisinina que matan directamente a las micobacterias dentro de los macrófagos [Kaufmann et al., 2005].

El granuloma priva a las micobacterias limitadas de oxígeno y nutrientes. Estos mecanismos permiten el desarrollo de una infección de tuberculosis primaria que eventualmente puede convertirse en una infección estable o latente. En las infecciones tuberculosas latentes (LTBI) se contienen Mtb vivo donde está delimitado por las paredes del granuloma, esto previene la replicación y propagación de Mtb [Watkins RE et al., 2006]. Como resultado de una reinfección o inmunosupresión ocurre la tuberculosis activa (ATB), que rompe el equilibrio de la respuesta inmune y la micobacteria en los alvéolos induciendo la ruptura del granuloma llevando a la diseminación de Mtb en otras partes del pulmón, en este estado el paciente puede contagia tosiendo [Kaufmann et al., 2005].

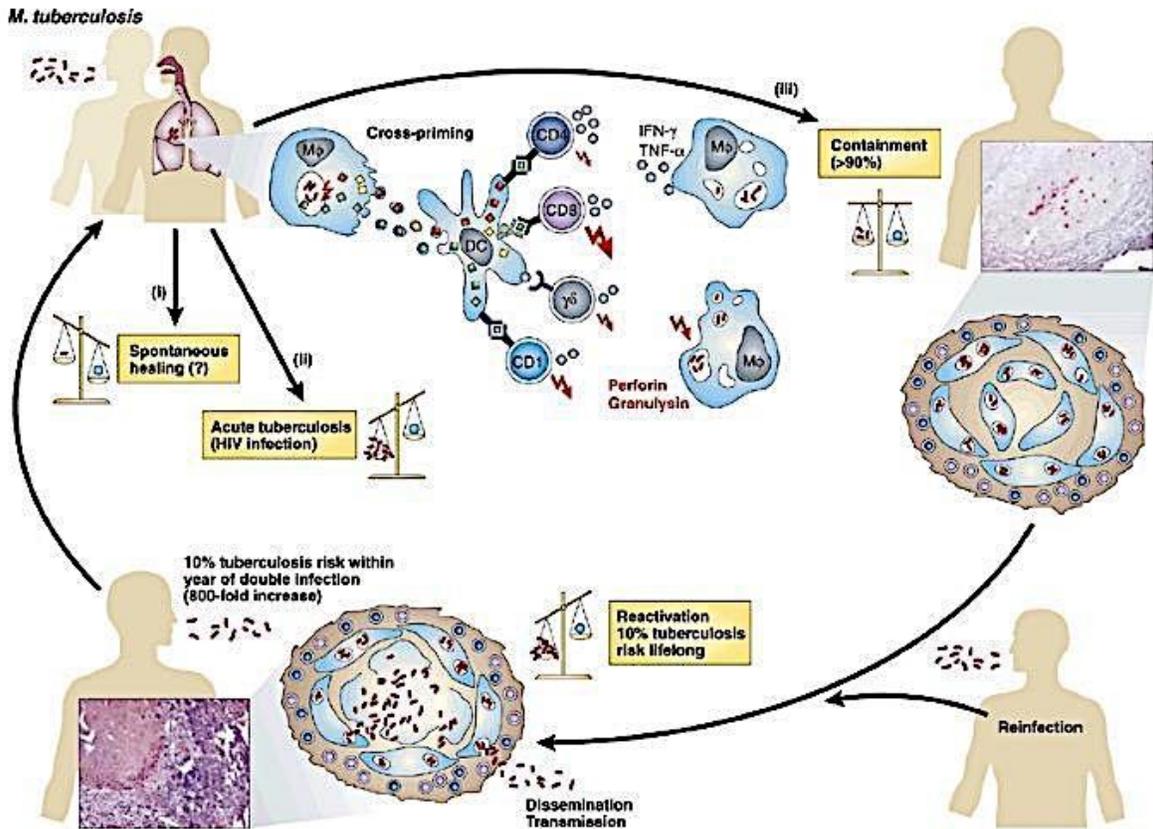


Figura 3 **Infección por Mtb.** Mtb ingresa al huésped por aerosol inhalado. Son posibles tres resultados. (i) Erradicación inmediata de Mtb por el sistema inmunológico pulmonar. (ii) La infección se transforma en tuberculosis. Esto ocurre con frecuencia en individuos inmunodeficientes, con el ejemplo notable de la infección por VIH que aumenta el riesgo de desarrollar tuberculosis. (iii) La infección latente, donde Mtb está contenida dentro de los granulomas. Después de la inhalación, Mtb es ingerido por los Mφ y CD que producen mediadores inmunológicos (TNF-α, IL-6, IL-12p80, IL-1α e IL-1β) para controlar la infección. Luego los Mφ y CD activados se trasladan a los ganglios linfáticos, donde presentan antígenos micobacterianos a diferentes poblaciones de células T. La presentación de antígenos probablemente implica cebado cruzado, lo que permite la transferencia de antígenos micobacterianos de macrófagos infectados a células dendríticas. Las células T CD4+ específicas de antígeno, las células T CD8+, las células T γδ y las células T restringidas a CD1 participan en la protección contra Mtb. Más importante aún, los macrófagos son activados por IFN-γ y TNF-α que contribuye al control del crecimiento de Mtb y la formación de granulomas. Además, las células T inducen la formación de un granuloma alrededor de los macrófagos infectados que contienen Mtb y pueden matar las micobacterias presentes en los macrófagos por medio de perforina y granulicina. En un individuo con TB latente se puede convertir en TB activa por una reinfección o simplemente reactivarse. En TB activa Mtb ya no está contenido, dando como resultado la diseminación y transmisión de *M. tuberculosis*. Kaufmann, et al. 2005.

1.5.1 Diferencias de la respuesta inmune entre sexos

Las enfermedades infecciosas rara vez afectan por igual a hombres y mujeres y la tuberculosis no es una excepción. Los datos de notificación de tuberculosis en todo el mundo para 2020 muestran una relación hombre-mujer de 1.7:1 [Global tuberculosis report 2021]. Aunque no hay estudios directos, muchos de los aspectos clave de la respuesta inmunitaria contra la tuberculosis son modificadas por

hormonas sexuales masculinas y femeninas.

El género puede afectar la exposición a *M. tuberculosis* debido a las diferencias en los roles sociales, los comportamientos de riesgo y las actividades cotidianas. El tabaquismo es mucho más frecuente en hombres que en mujeres, y un análisis correlaciono el tabaquismo, el sexo y la tuberculosis sugiere que fumar podría explicar hasta un tercio del sesgo de género observado en este entorno [Marais BJ et al., 2004].

Por una parte, las mujeres exhiben respuestas inmunes más robustas a los desafíos antigénicos, como la infección y la vacunación en comparación con los hombres, esto se debe a que las hormonas sexuales masculinas no surgen hasta la pubertad [Fish EN, 2008].

Las hormonas sexuales tienen diversos efectos sobre muchos tipos de células inmunitarias, incluidas las células B, las células T, los neutrófilos, las células dendríticas, los macrófagos y las células asesinas naturales [O'Garra A et al., 2013].

Una respuesta inmune Th1 robusta, caracterizada por la producción de interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), es vital para el control de la tuberculosis, mientras que un perfil Th2 (producción de IL-10), impulsado por infecciones helmínticas, es perjudicial [Lotter H et al., 2013].

Se sabe que el estrógeno estimula la secreción de IFN- γ (más TNF- α e IL-12, respuesta Th1) e inhiben la producción de IL-10, mientras que la testosterona aumenta la secreción de IL-10 (respuesta Th2) y reduce la secreción de IFN- γ [Martinez FO et al., 2009]. Los niveles bajos de 17 β -estradiol, se demostró que promueven la diferenciación de Th1 y la producción de citocinas como el TNF- α , mientras que los niveles altos promueven la polarización de Th2, con el consiguiente efecto sobre las citocinas [Lotter H et al., 2013].

Los macrófagos son fundamentales para el control de la tuberculosis, sobre todo a través de la destrucción directa de los bacilos de *M. tuberculosis* por macrófagos

activados. Se cree que el estradiol mejora la activación de los macrófagos, mientras que la testosterona la regula a la baja al reducir la expresión de TLR4 [Lotter H et al., 2013].

1.6 Interacción de Mtb con los macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas que cumple diversas funciones, como la eliminación de patógenos y homeostasis. Son un componente de la respuesta inmune innata, a pesar de que también cumple un rol importante en la respuesta inmune adaptativa como célula presentadora de antígenos profesional (CPA). Su función efectora puede ser modulada por estímulos endógenos como las citocinas y exógenos como los antígenos [Van Crevel R et al., 2002].

La interacción inicial de Mtb con los macrófagos implica un reconocimiento de la micobacteria por el macrófago que está mediada por ligandos y múltiples receptores de membrana. Los macrófagos tienen variedad de receptores que pueden clasificarse en opsónicos y no opsónicos, dependiendo de su capacidad para interactuar directamente con los estímulos o su necesidad de unirse a una molécula como un anticuerpo o fragmentos del complemento, que actúan como opsoninas [Van Crevel R et al., 2002].

Mtb puede ingresar a los fagocitos de forma opsonizada a través de los receptores del complemento (CR, CR1, CR3 y CR4), el receptor de la proteína A de surfactina (Sp-A), receptores de Fc (FcR). Las pentraxinas, colectinas, ficolinas y fragmentos de C3 (una proteína central del sistema de complemento) median la unión de estos receptores a bacterias opsonizadas. Los receptores Fc y el receptor del complemento (CR) se expresan en la superficie de los macrófagos. CR3 juega un papel clave en la fagocitosis de Mtb por macrófagos con reconocimiento de polisacáridos de Mtb o PIM [Ishikawa et al., 2017].

La fagocitosis no mediada por opsoninas de microorganismo es iniciada por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos

(PAMP) por medio de los receptores de reconocimientos de patrones (PRR) o receptores no opsónicos. Estos PRR implicados en la interacción macrófago-Mtb son receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo Scavenger (SR), receptores tipo Nod (NLR), receptores de lectina tipo C (CLR o CTL), CD14, CD43, entre otros receptores [Bowdish DM et al., 2009] (Figura 4). La existencia de diversos tipos de receptores no opsónicos ayudan a identificar múltiples moléculas microbianas, los cuales a continuación se describirán algunos brevemente.

1.7 Tipos de receptores en macrófagos

1.7.1 Receptores Tipo Toll

La interacción entre Mtb-TLRs lleva a la activación de los fagocitos sin la ingestión inmediata de micobacterias. Se informó que TLR2 está involucrado en el reconocimiento de estructuras micobacteriana, como lipoproteínas de LM, LAM y PIM. LM tri- y tetra- acilados interactúan con TLR4, de hecho, estudios previos han encontrado que el LPS es agonista de TLR4 puede inducir la autofagia de macrófagos, también LPS induce autofagia en THP-1(línea celular leucémica humana similar a monocitos) infectado por *M. tuberculosis* [Płóciennikowska et al., 2015, Ai et al., 2013]. Mientras que TLR9 se une a motivos CpG no metilados de ADN micobacteriano. La estimulación de los TLR por ligandos micobacterianos lleva al inicio de cascadas de señalización intracelular por la molécula adaptadora intracelular factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) que culminan en la generación de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF) en macrófagos y células dendríticas a través de la activación de las vías NF- κ B y MAPK [Bowdish DM et al., 2009].

1.7.2 Receptores Tipo Nod

Los miembros de la familia NLR: NOD1, NOD2, NLRP3 y NLRC4, son proteínas intracelulares que participan en el reconocimiento de componentes microbianos, además de la activación de vías de señalización inflamatorias que protegen a la célula hospedera contra patógenos invasores. La proteína 2 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2), un dominio de reclutamiento de

caspasa (CARD) que contiene NLR, reconoce el muramil dipéptido (MDP) (el producto de degradación del peptidoglucano) un componente esencial de las paredes celulares de las micobacterias. NOD2 puede contribuir a la protección del huésped en la fase latente de la infección [Bowdish DM et al., 2009].

1.7.3 Receptores Tipo Scavenger

Los receptores Scavenger se expresan en la superficie celular de los monocitos y macrófagos de mamíferos, reconocen lipoproteínas oxidadas o acetiladas. Durante la infección por Mtb, el receptor de macrófagos con estructura colágena (MARCO) reconoce TDM y coopera con TLR2 para inducir la activación del factor transcripcional NF- κ B y la secreción de citocinas proinflamatorias [Queval CJ et al., 2017, Liu CH et al. 2017].

1.7.4 Receptores de Lectinas

CLR / CTL son una familia de receptores que se unen a ligandos ricos en azúcares en presencia de calcio a través de un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Uno de ellos es la molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas no asociada a integrina (DC-SIGN), cómo lo dice el nombre es un receptor específico de CD, se expresa más en M Φ de pacientes con TB [Bowdish DM et al., 2009, Liu CH et al., 2017]. Tanto DC-SIGN como el receptor de manosa (MR) reconocen moléculas de manosa / glicolípidos presentes en la superficie de Mtb, como LAM, ManLAM y PIM, induciendo una respuesta antiinflamatoria favorable al patógeno inhibiendo la activación de la respuesta oxidativa. Otros receptores que pertenecen a la subfamilia de CLR que inducen la respuesta inmune del huésped contra la infección de Mtb son: Mincle que reconoce específicamente TDM, Dectina-2 se une a ManLAM, Dectin-1 pueden activar la respuesta de pro-inflamatoria de macrófagos en la infección por Mtb [Liu CH et al., 2017]. La mayoría de los CLR emiten señales a través de motivo de activación inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) o motivo de inhibición inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM). Los ITAM fosforilados reclutan la tirosina quinasa del bazo (Syk), que inicia cascadas de señalización y activa el complejo CARD9-Bcl10-Malt1. Este complejo,

a su vez, activa el factor de transcripción como NF- κ B que produce citocinas proinflamatorias [Zanoni et al., 2013].

1.7.5 CD14

CD14, uno de los primeros PRR identificados, facilita el reconocimiento de lipopolisacárido (LPS), de ligandos por el TLRs, y la iniciación de la vía dependiente de MyD88; es necesario para reubicar del complejo receptor de LPS en el endosoma y la activación de la vía dependiente de dominio TIR que contiene un adaptador inductor de IFN- β (TRIF) e inicia la vía calcio / Factor nuclear de células T activadas (NFAT) [Queval C et al., 2017, Lin et al., 2005]. CD43 junto con sus ligandos serán descritos en las siguientes secciones.

1.7.6 F4/80

La glicoproteína F4/80, identificada como el antígeno del mAb F4/80, se ha establecido como uno de los marcadores de superficie celular más específicos para los macrófagos maduros de murinos. F4/80 tiene una expresión disminuida en los monocitos sanguíneos en comparación con los macrófagos maduros. Además, F4/80 se expresa a niveles más bajos en macrófagos activados aislados de animales infectados con BCG que en macrófagos en reposo no estimulados. De manera similar, la expresión de F4/80 está regulada negativamente en los macrófagos en respuesta a IFN- γ . Se ha demostrado que F4/80 participa en el contacto directo célula-célula entre macrófagos y células NK, lo que da como resultado la activación celular y la producción óptima de citocinas [Vergne et al., 2005].

1.7.7 CD43

CD43 está codificada en el gen gpL115 (leucosialina, sialomucina, sialoforina, W3 / 13) que se encuentra en el cromosoma 16 en humanos y 7 en ratones. Consta de dos exones y un intrón, pero toda la proteína está codificada en el segundo exón. CD43 es una sialoglicoproteína de superficie celular de tipo I, tiene carga negativa

y cuenta con tres dominios: uno extracelular de 235 aminoácidos (aa) (mide ~45nm) rico en S/T decorado con unas cadenas laterales con polisacáridos hidrofóbicos y un sitio de N-glicosilación (Asn), uno transmembrana de 23 aa y uno intracitoplásmico de 123 aa rico en prolinas que permite a CD43 activar la transducción de señales y con sitios muy conservados entre especies como humano, chimpancé y ratón [Pedraza-Alva et al., 2007].

La región extracelular de CD43 está fuertemente glicosilada, cargada negativamente y mide ~45 nm sugiere una tendencia de la molécula a repeler el contacto celular. De acuerdo con estas propiedades físicas, se ha demostrado que la expresión de CD43 provoca una disminución de la adhesión celular, por ejemplo, en la unión de células T mediada por antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), una interacción que se predice que ocurrirá dentro de una distancia intermembrana de 25-30 nm [McEvoy et al., 1997, Ardman et al., 1992, Ostberg et al. 1996, Hickey et al., 2009].

Se conocen dos formas diferencialmente glicosiladas de CD43. La isoforma de 130 kDa contiene principalmente el hexasacárido ramificado NeuAc (a2-3) -Gal (b1-3) [NeuAc (a2-3) Gal (b1-4) GlcNAc (b1-6) GalNac, mientras que la isoforma de 115 kDa contiene casi exclusivamente el tetrasacárido NeuAc (a2-3) -Gal (b1-3) [NeuAc (a2-6)] GalNac. Los linfocitos T CD4 + en reposo y las células precursoras eritroides expresan principalmente la forma de 115 kDa de CD43, mientras que las células T CD8 +, las células CD4 + activadas, los monocitos, los neutrófilos y las plaquetas expresan la forma de 130 kDa [Ostberg et al., 1998]. Se ha propuesto que CD43 es multifuncional, donde media las interacciones intercelulares a través de mecanismos pro-adhesivos y anti-adhesivos [Allenspach et al., 2001]. Además, CD43 participa en eventos de señalización celular, el dominio intracitoplasmático que una región rica en prolina le permite a CD43 transducir señales de activación [Ostberg et al., 1998], incluido el reordenamiento citoesquelético por medio de las proteínas ezrin / moesin / radixin (ERM) durante la polarización resultante del encuentro de una célula presentadora de antígeno (APC) con un linfocito T portador de un receptor de antígeno (receptor de células T, TCR) específico para ese antígeno, el CD43 se mueve fuera de la sinapsis inmunológica, la zona de contacto

entre APC y el linfocito T, y se reubica parcialmente en un complejo proteico opuesto a la sinapsis inmunológica [Fratuzzi et al., 2000], lo que sugiere que tiene tanto funciones extracelulares e intracelulares.

Se han descrito múltiples ligandos para CD43 como ICAM-1, MHC-I, galectina-1, seroalbúmina, Siglec-1, nucleolina de superficie celular y E-selectina. También CD43 actúa como receptor de microbios y proteínas derivadas de estos, por ejemplo: Cpn60.2 de *Mycobacterium tuberculosis*, la transialidasa del *Trypanosoma cruzi* y el virus de la influenza A interactúan con CD43 para generar una respuesta inmune. [Ostberg et al., 1998]. Además, los mAb anti-CD43 pueden inhibir la interacción celular, lo que respalda aún más las funciones adhesivas de CD43 [Ardman et al., 1992, Cifone NA et al.2013].

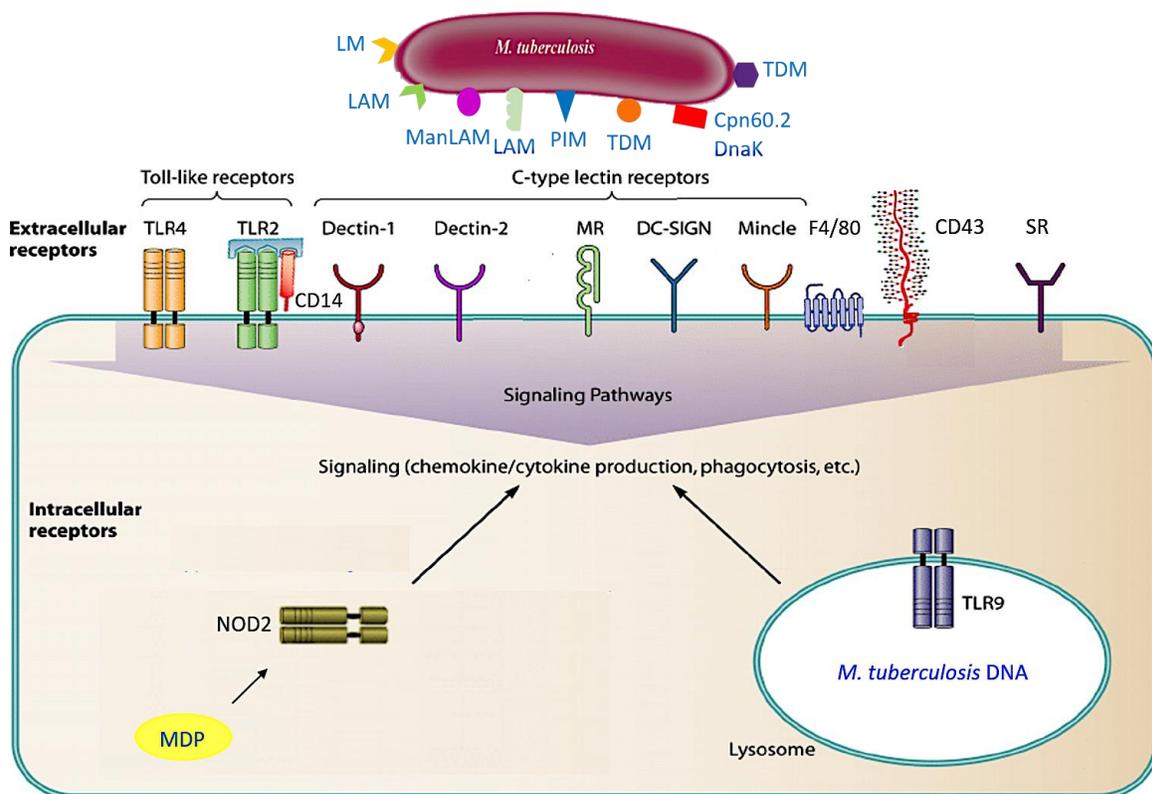


Figura 4 **Receptores involucrados en el reconocimiento de Mtb y sus posibles ligandos.** Los distintos receptores transducen señales positivas y negativas en las CPA modulando su respuesta. Mtb es capaz de inhibir los mecanismos efectoros (función bactericida, producción de CK, presentación antigénica, fagocitosis, etc) interactuando con receptores como los TLRs, NLRs, CLRs, SR, CD14 Y CD43. Las abreviaturas de los receptores son las mismas que se utilizan en el texto. Adaptado de Cheng et al. 2012.

1.8 Estrategias de Mtb para sobrevivir en los macrófagos

Muchos patógenos intracelulares han desarrollado estrategias para invadir células fagocíticas que les permita la supervivencia y persistencia intracelular. Parte de la estrategia de supervivencia de Mtb depende del modo inicial de interacción con las células huésped, donde el compartimento más externo de la envoltura celular micobacteriana juega un papel clave como se mencionó anteriormente en el texto. Otra estrategia de supervivencia ocurre después de la fagocitosis de macrófagos, Mtb despliega un ejército de factores (LAM, SapM, PtpA) que evaden las defensas de los macrófagos para poder replicarse dentro de estos y así ocasionando su muerte [Liu CH et al., 2017].

Tanto el LAM bacteriano como la fosfatasa acida secretada M (SapM) inhiben la actividad del fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), que juega un papel crítico en el proceso de autofagia, puede inducirse en macrófagos infectados mediante la activación con la citocina protectora IFN- γ . La inhibición de PI3P bloquea la biogénesis del fagolisosoma y el suministro de enzima hidrolítica de la red de Golgi [Queval CJ et al., 2017].

El bloqueo de la acidificación del fagosoma también es una característica clave para la supervivencia intracelular de patógenos. Mtb ha desarrollado al menos tres estrategias diferentes con el objetivo de inhibir el ensamblaje del complejo H + V-ATPasa y su posterior fusión con la membrana fagosómica para estabilizar el pH entre 6.2 y 6.5. De hecho, la proteína tirosina fosfatasa A (PtpA) secretada por Mtb inhibe el ensamble de la maquinaria H + V-ATPasa por interacción directa con las subunidades H de este complejo. Además, la interacción de TDM con el receptor de lectina de tipo C Mincle retrasa la maduración y acidificación del fagosoma [Abul Abbas et al., 2014].

1.9 Producción de citocinas por la infección con Mtb

Las citocinas proinflamatorias sirven como componentes importantes de la defensa antibacteriana de los macrófagos. La interacción macrófago-Mtb resulta en la

activación de la respuesta inmune, generando la secreción de citocinas y quimiocinas pro- y anti- inflamatorias, Mtb puede inhibir la secreción de citocinas proinflamatorias evitando así la eliminación efectiva por parte del sistema inmunológico del huésped. Las citocinas (TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6), y las quimiocinas secretadas en los sitios de infección o lesiones tisulares por células hematopoyéticas como los macrófagos, tienen múltiples efectos sobre células endoteliales vasculares, los leucocitos y la médula ósea, que aumentan la respuesta inmune local de células, ayudan a combatir infecciones y reparar los tejidos [Ruan et al., 2019].

IL-1 β está implicada en la respuesta inmune innata del huésped contra patógenos, es activada por la escisión de la caspasa-1 y promueve la maduración de los fagosomas y la eliminación efectiva de micobacterias. Mtb inhibe la formación del inflamasoma y el procesamiento de IL-1 β para evadir la respuesta inmune del huésped [Ladel et al., 1997]. IL-12 es una citoquina proinflamatoria crucial en la protección contra Mtb, ya que es esencial para la producción de IFN- γ , un factor importante en el control de la infección por Mtb. Además, un estudio mostró que los ratones tratados con IL-12 podían matar de forma efectiva a Mtb [Ladel et al., 1997]. IL-6 y TNF- α también son factores proinflamatorios involucrados en la respuesta inmune. La IL-6 puede activar la función antimicobacteriana de los macrófagos. Los ratones deficientes en IL-6 son extremadamente sensibles a la infección por Mtb [Randhawa et al., 2008].

1.9.1 TNF- α

El TNF- α limita el crecimiento intracelular de Mtb, ya que la eliminación o falta de TNF- α resulta en granulomas no estructurados y un gran aumento en la carga bacteriana total, también TNF- α induce la expresión de quimiocinas que potencian el reclutamiento de nuevos macrófagos no infectados y la regulación de la síntesis de IL-10 [Engele et al., 2002]. TNF- α induce la producción de intermediarios nitrogenados reactivos y, por tanto, promueve la destrucción de Mtb intracelular. TNF- α producida por la estimulación con Mtb suprimió la apoptosis de los macrófagos. Se demostró que TNF- α recupera los efectos bactericidas de los

macrófagos CD43 $-/-$ o CD43-KO [Hickey et al., 2010].

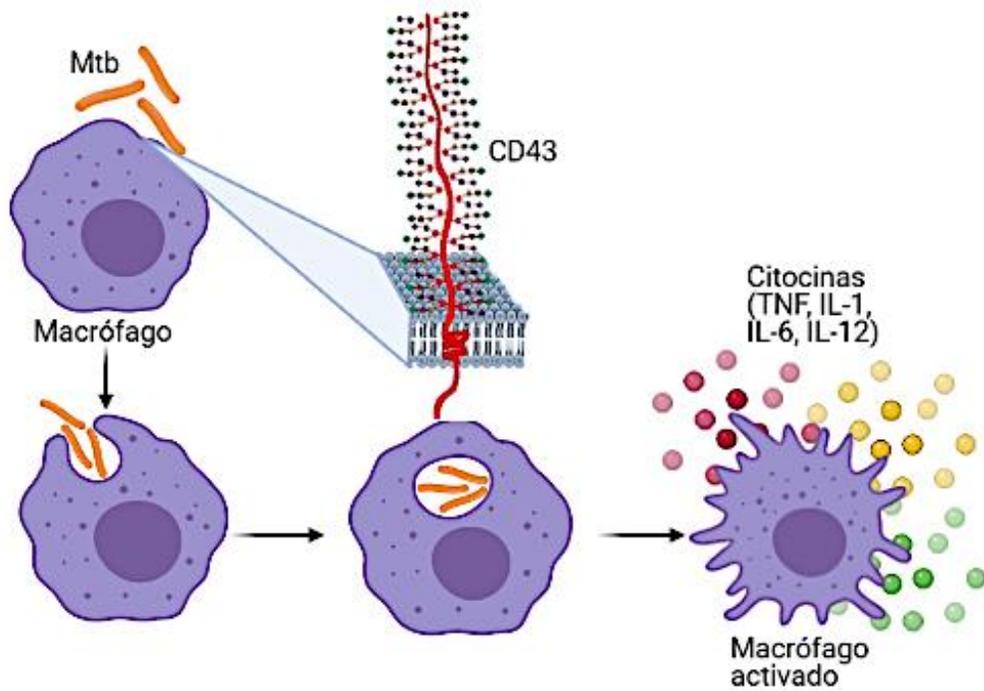


Figura 5 **Interacción de Mycobacterium tuberculosis con los macrófagos.** Cuando la micobacteria llega a su blanco biológico, los macrófagos donde hay un reconocimiento mediado por múltiples ligandos y receptores de los cuales uno de ellos es CD43 (una sialomucina con tres dominios), la micobacteria es absorbida, se forma el fagosoma y activa los macrófagos provocando la secreción de citocinas pro- y anti- inflamatorias como TNF, IL-1, IL-6 e IL-12. Creada con BioRender.com

2 Antecedentes

El inicio de una infección tuberculosa implica la adherencia y fagocitosis de Mtb por las células del huésped, principalmente los macrófagos alveolares. Para que estas interacciones ocurran, los ligandos en la superficie de la micobacteria deben entrar en contacto con los receptores de superficie de los macrófagos, uno de los cuales es la sialomucina CD43. Los macrófagos carentes de CD43 (CD43KO) tienen una capacidad reducida de unión a la micobacteria [Manjunath N et al., 1995]. Si bien hay una menor captación de Mtb por los macrófagos CD43KO, existe en ellos un mayor crecimiento bacteriano intracelular en comparación con macrófagos CD43WT [Fratuzzi et al. 2000, Randhawa et al., 2005].

Esto indica que CD43 puede desempeñar un papel doble en la infección por Mtb, ya que no solo está involucrada en la unión inicial con la bacteria sino también en la replicación dentro del macrófago. La interacción Mtb-macrófago también regula la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF- α [Fratuzzi et al. 2000, Randhawa et al., 2005]. TNF- α interviene en la restricción de la patogénesis micobacteriana, algunas de sus funciones son regular la formación de granulomas, reclutar macrófagos no infectados mediante la expresión de quimiocinas y matar las micobacterias presentes en los macrófagos por medio de perforina y granulicina [Engele et al., 2002].

Se ha encontrado que los ligandos de superficie micobacterianos que interactúan con CD43 son la chaperonina Cpn60.2 y la chaperona DnaK [Brennan et al., 2001]. Cpn60.2 es el principal ligando de Mtb para CD43, facilita y estabiliza la asociación entre Mtb y el macrófago [Hickey et al., 2010]. La falta de expresión de CD43 en macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMMs) de ratones C57BL/6 conduce a una reducción en la producción de TNF- α ante los estímulos de Cpn60.2 o BCG. Lo mismo ocurre en macrófagos derivados de la línea celular pro-monocítica humana THP-1 ante los estímulos Cpn60.2, DnaK y BCG [Torres-Huerta A et al., 2017, Alemán-Navarro E, tesis de Maestría, 2017].

Posiblemente la participación de CD43 y la respuesta inmune durante la infección

micobacteriana sean diferentes entre cepas de ratón como C57BL/6 y BALB/c. Las células de la respuesta inmune adaptativa de los ratones C57BL/6 producen preferentemente citocinas Th1 con un alto nivel de IFN- γ y un bajo nivel de interleucina IL-4, mientras que las de los ratones BALB/c favorecen la producción de citocinas Th2 con poco IFN- γ y alto nivel de IL-4. Por lo tanto, los ratones C57BL/6 y BALB/c se consideran cepas murinas predominantemente Th1 y Th2 respectivamente [Wakeham et al., 2000, Garcia-Pelayo et al., 2015]. Los linfocitos T CD4 + se activan con IL-12 e IFN- γ , convirtiéndose en Th1, y producen citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2. Los linfocitos T CD8 + se activan con IL-4 convirtiéndose en Th2 y producen citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 [Mosmann TR et al., 1989].

Se ha demostrado que los ratones BALB/c son capaces de desarrollar una respuesta inmune adaptativa Th1 completamente funcional después de una única inmunización con BCG [Wakeham et al., 2000]. La producción de TNF- α al día 3 de la vacunación con BCG es mayor en los ratones BALB/c en comparación con los C57BL/6 [Garcia-Pelayo et al., 2015].

En macrófagos de ratones C57BL/6 CD43KO se ha observado una disminución de la capacidad de unión de Mtb a los macrófagos y la fagocitosis de los mismos, resulta en una producción baja de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-12), fundamentales para controlar la infección en la fase aguda [Randhawa et al., 2008]. A pesar de que hay una reducción en la unión de macrófagos con la micobacteria se observó un aumento de la supervivencia y replicación intracelular de Mtb en macrófagos de ratones CD43KO [Randhawa et al., 2005]. Los ratones CD43KO infectados con Mtb tienen mayor carga bacteriana en los pulmones y el bazo durante las etapas aguda y crónica de la infección, además de una formación alterada de granulomas [Randhawa et al., 2005 y 2008].

3 Planteamiento del problema

3.1 Justificación

Desde 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la TB como una enfermedad que constituye un problema importante de salud pública a nivel mundial. La reducción de las tasas de mortalidad e incidencia representa un gran reto, ya que las infecciones con Mtb causan por lo menos 10 millones de casos y 1.4 millones de muertes anualmente. Esto señala a la TB como un problema ya no sólo de salud pública sino de seguridad global.

La TB se asocia a otra gran pandemia, la COVID-19, pues la interrupción de los servicios de salud derivada de esta retrasa el progreso en la reducción de casos de TB. Esta enfermedad afecta principalmente a la población que vive en países en desarrollo, impactando gravemente el sistema de salud y dificultando la obtención de los recursos médicos necesarios para su tratamiento. Una alta proporción de casos de TB podría evitarse, si se caracteriza detalladamente el proceso de infección y la respuesta inmune asociada, ya que esto permitiría desarrollar tratamientos más efectivos.

La interacción entre Mtb y los macrófagos es un paso fundamental en el inicio de la infección y en el establecimiento de la respuesta inmune subsecuente. El receptor CD43 participa en este proceso. Para profundizar en el conocimiento de la función de CD43 en la infección por Mtb, se va a evaluar la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF- α en respuesta a BCG, ya que esta citocina juega un papel importante en la restricción de la patogénesis micobacteriana. Esto se evaluará en macrófagos de ratones C57BL/6 y BALB/c, para conocer si el efecto de CD43 difiere según el tipo de respuesta inmunológica (Th1 o Th2). Se utilizarán macrófagos derivados de médula ósea (BMMs) de ratones silvestres (CD43WT) y CD43KO porque pueden obtenerse en grandes cantidades y representan un macrófago recientemente diferenciado, como los que se pueden encontrar ingresando a sitios de infección durante el curso de la patogenia de Mtb.

3.2 Hipótesis

La falta de CD43 impactará sobre la producción de TNF- α en respuesta a BCG en función del perfil inmunológico de los ratones C57BL/6 y BALB/c.

3.3 Objetivo

Comparar la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF- α ante el estímulo de BCG en BMMs de ratones CD43WT y CD43KO de las cepas C57BL/6 y BALB/c, como dos prototipos de respuesta Th1 y Th2 respectivamente.

4 Materiales y métodos

4.1 Uso de animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los estándares establecidos por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología-UNAM en lo referente a animales de laboratorio. Se utilizaron ratones silvestres (WT) y carentes de CD43 (CD43KO) de las cepas BALB/c y C57BL/6, machos, de 3-4 meses de edad. Los ratones se mantuvieron en una instalación libre de patógenos, en jaulas micro-aislantes, bajo condiciones adecuadas de distribución y alimentación, así como condiciones estándar de temperatura, humedad e iluminación, hasta ser utilizados en los experimentos.

4.2 Obtención de macrófagos derivados de la médula ósea (BMMs)

Los ratones se sacrificaron y se disectaron los fémures y tibias. En condiciones de esterilidad, los huesos se desinfectaron sumergiéndolos en EtOH al 70% por 5 segundos y se transfirieron a PBS. Para extraer la médula ósea se cortaron los extremos de cada hueso y, utilizando una jeringa de insulina, se hizo pasar un flujo de PBS hasta vaciar completamente el hueso. La médula ósea de cada ratón se recolectó en un tubo Falcon de 50 mL, se lavó llenando el tubo con PBS y se centrifugó a 1300 rpm por 7 minutos. El botón celular se resuspendió y los eritrocitos se lisaron incubándolo con 0.5 mL de Red Blood Cell Lysis Buffer (Sigma) por 1 minuto y 15 segundos. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron a las células 5 mL de DMEM Advanced (Gibco) suplementado con 5 % de suero bovino fetal (FBS), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 50 µg/mL y glutamina 2 mM (DMEM completo). Las células se centrifugaron nuevamente (1200 rpm, 7 minutos) y el botón celular se resuspendió en 10 mL de DMEM completo.

Se tomó una muestra de la suspensión y se tiñó con el colorante azul tripano para marcar las células muertas. El conteo de las células vivas se hizo con una cámara de Neubauer y las células de médula ósea se colocaron en cajas de cultivo celular.

Se plaquearon 5×10^6 células por caja en DMEM completo suplementado con 5 % adicional de FBS y 20 % de sobrenadante de cultivo de células L929 (SN-L929), que contiene el Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (M-CSF). Este factor es necesario para diferenciar los monocitos de la médula ósea hacia una población rica en macrófagos (BMMs). Las células se diferenciaron durante 7 días (37 °C, 5% CO₂), proporcionándoles al día 4 un refuerzo de 5 % FBS y 20 % de SN-L929.

Pasados los 7 días, a los BMMs se les retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con 5 mL de PBS. Se incubaron por 7 minutos (37 °C, 5% CO₂) con 3 mL de Versene (EDTA 0.48 mM en PBS) para despegarlos y se transfirieron a un tubo Falcon de 50 mL, se lavaron nuevamente con PBS, se centrifugaron (1300 rpm, 7 minutos) y el botón celular se resuspendió en 5 mL de DMEM completo. Las células se contaron para realizar la fenotipificación y el plaqueo para los ensayos de activación.

4.3 Fenotipificación de BMMs por inmunotinción

Las células se colocaron en tubos de FACS (2×10^5 células por tinción), se lavaron con 3 mL de solución de FACS (PBS con 2 % de FBS) y se centrifugaron a 1200 rpm por 7 minutos. El botón celular se resuspendió en 50 µL de solución de FACS con 20% de suero humano y 1 µg/mL del anticuerpo CD16/32 (clona 93, eBiosciences), y se incubó durante 30 min a 4°C para bloquear los receptores Fc. Para evaluar la expresión de los marcadores CD43, F4/80, TLR2 y TLR4, los BMMs se tiñeron con 2.5 µg/mL de anti-CD43 murino acoplado a PE (clona S11, BioLegend) y 1.25 µg/mL de anti-F4/80 (clona BM8, BioLegend), 5 µg/mL de anti-TLR2-PE (clona CD282, BioLegend) ó 2.5 µg/mL de anti-TLR4-PE (clona MTS510, BioLegend). Las células se incubaron con los respectivos anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C, protegidas de la luz. Como control se utilizó una muestra de células sin teñir. Pasado el tiempo de incubación las células se lavaron con 3 mL de solución de FACS, se centrifugaron (1200 rpm, 7 minutos) y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 µL de PFA al 2% para fijarlas.

Las muestras se procesaron con el citómetro de flujo BD FACSCanto II y el software

FACSDiva (BD Biosciences). El análisis se realizó con el software FlowJo V10; se seleccionó la población de interés de acuerdo con el tamaño y la complejidad celular, considerando los eventos individuales. Para los valores de fluorescencia, el cambio en la mediana de la intensidad de fluorescencia (Δ MFI) se calculó restando a los valores obtenidos para las muestras teñidas (Stained) el valor de fluorescencia de las células control (No teñidas). Se utilizó la mediana como medida de tendencia central porque es el estadístico más apropiado para analizar valores logarítmicos como la intensidad de fluorescencia, ya que no es afectada por valores extremos ni requiere que los datos sigan una distribución normal. Los valores del Δ MFI de los BMMs CD43KO se normalizaron respecto a los de las células CD43WT (Tabla 1, Anexos).

4.4 Acoplamiento de las proteínas Cpn60.2 y DnaK a perlas Ni-NTA

Las proteínas recombinantes Cpn60.2 y DnaK de Mtb fueron proporcionadas por la Dra. Clara Espitia (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Ambas proteínas contienen una etiqueta de histidinas (His) que permite acoplarlas a perlas de agarosa recubiertas de níquel (Ni-NTA Agarose, Qiagen). El acoplamiento se hizo un día antes de la activación, colocando en tubos Eppendorf siliconizados el volumen necesario de perlas para el control negativo y para el acoplamiento de Cpn60.2 ó DnaK. Las perlas se lavaron tres veces con PBS estéril, centrifugándolas entre cada lavado (1400 rpm, 3 minutos), y se resuspendieron en 1 mL de PBS. A los tubos correspondientes se les agregó Cpn60.2 ó DnaK (10 μ g/mL) y se incubaron en agitación constante por 14–16 horas a 4 °C.

Después de la incubación, las perlas se lavaron tres veces y se resuspendieron en 1.5 mL de PBS. Se utilizaron 100 μ L del sobrenadante recuperado antes del primer lavado para verificar por el método de Bradford que no hubiera quedado proteína sin acoplar, empleando como blanco el sobrenadante de las perlas sin proteína. Para eliminar contaminación por trazas de LPS, las perlas se incubaron con el antibiótico Polimixina B (Sigma, 50 μ g/mL) durante una hora a 37° C, agitando la muestra cada 10 minutos. Después de este tratamiento, las perlas se lavaron tres veces y se resuspendieron en el volumen de PBS requerido para el ensayo.

4.5 Activación de BMMs con BCG, Cpn60.2 y DnaK

Previo a la activación, se plaquearon 1×10^5 células por pozo en 200 μL de DMEM completo, en una placa de 96 pozos. Los macrófagos se dejaron reposar durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 para que se adhirieran a la placa. Los pozos circundantes se rellenaron con 200 μL de PBS estéril para evitar la evaporación de medio de cultivo en los pozos con células. Después de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y los macrófagos fueron ayunados en DMEM libre de suero (37°C , 5% CO_2) para sincronizarlos en la fase de reposo (G_0) del ciclo celular.

Para la activación, se retiró el medio de ayuno y los macrófagos se estimularon con Cpn60.2 ó DnaK (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) acopladas a las perlas Ni-NTA ó con la cepa Tokio 172 de BCG inactivada por calor (Vacuna Tuvax, Japan BCG Laboratory) a una multiplicidad de infección de 3 bacterias por macrófago (MOI 3:1). Como controles negativos se utilizaron macrófagos no estimulados (US) ó incubados con perlas sin proteína acoplada (Ni-NTA). Como control positivo se utilizó macrófagos estimulados con LPS (500 ng/mL). Cada tratamiento se realizó por triplicado en DMEM completo y los macrófagos permanecieron en incubación (37°C , 5 % CO_2) durante 24 ó 48 horas. En cada tiempo se recolectaron los sobrenadantes de cultivo, se centrifugaron (1300 rpm, 7 minutos) y se almacenaron en alícuotas a -70°C para después evaluar la producción de TNF- α por ELISA.

4.6 Cuantificación de TNF- α mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

La producción de TNF- α en los BMMs se cuantificó usando el kit Mouse TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go! (eBiosciences), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se recubrieron placas de 96 pozos con el anticuerpo de captura para TNF- α (Anti-Mouse/ Rat TNFa Purified, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante toda la noche a 4°C . Las placas se lavaron tres veces con una solución de PBS-Tween 0.05% durante 1 minuto y se bloquearon durante 1 hora con diluyente de ensayo (solución de BSA 1X). Se lavaron nuevamente 3 veces y se agregaron las muestras (DMEM 30 μL , US 30 μL , LPS 15 μL , BCG 30 μL de una dilución 1:10, Ni-NTA 35 μL , Cpn60.2 35 μL y DnaK 25 μL) en un volumen final de 100 μL con

diluyente de ensayo. También se hicieron diluciones seriadas de TNF- α para construir una curva estándar con un rango de detección de 8 - 1000 pg/mL.

Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente (TA) se hicieron 5 lavados y se aplicó el anticuerpo de detección (Anti-Mouse /Rat TNF- α , 1 μ g/mL) durante 1 hora a TA. Se hicieron 5 lavados, se agregaron 100 μ L de Estreptavidina-HRP y se hizo una incubación durante 30 min a TA. Pasado el tiempo de incubación se hicieron 7 lavados de 2 minutos, se agregaron 100 μ L del sustrato y se incubó 15 minutos a TA. Finalmente, se agregaron 50 μ L de solución de stop (H₂SO₄ 2N) y se incubó durante 5 minutos a TA. Las lecturas de absorbancia (450 nm) se realizaron con un lector de microplacas (Accuris, SMARTREADER™ 96).

A partir de los datos de absorbancia se interpolaron los valores con la curva estándar correspondiente a cada experimento con el software GraphPad Prism 8 obteniendo el valor que correspondía en [pg/mL] (Figura 11 A y B, Anexos), luego se multiplicó por el factor de dilución (F.D.) de cada estímulo, y se normalizaron los valores KO de todos los experimentos individuales con respecto a su WT para poder comparar la producción de TNF- α de cada muestra (Tabla 2, Anexos).

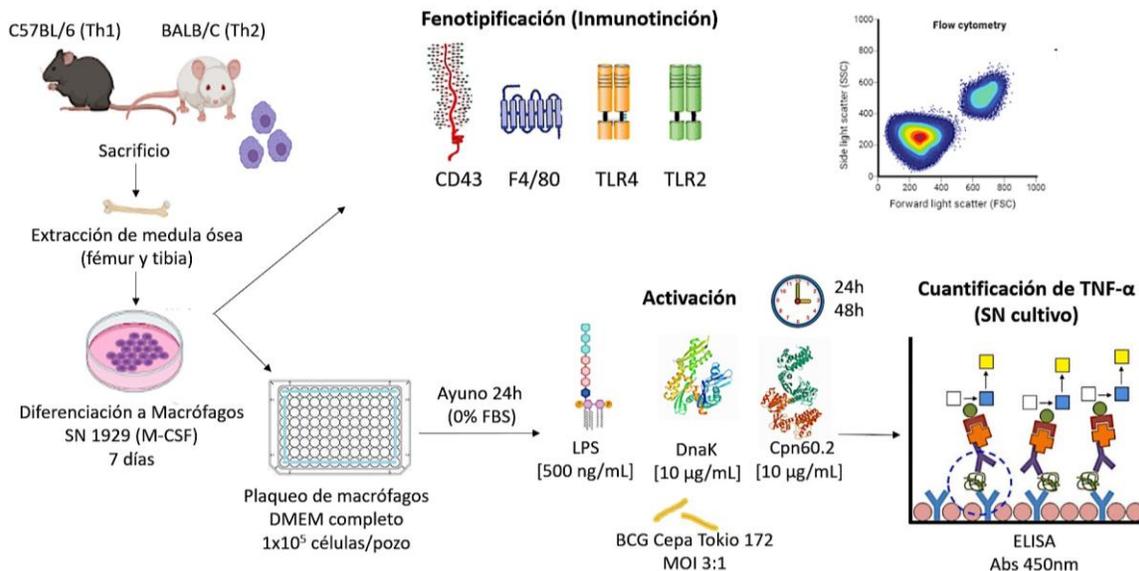


Figura 8 **Estrategia experimental.** De los ratones BALB/c (Th2) y C57BL/6 (Th1) se extrajeron el fémur y la tibia para obtener la médula ósea, de la cual se diferenciaron los monocitos con M-CSF a BMMs. Los BMMs se fenotipificaron para los marcadores CD43, F4/80, TLR4 y TLR2 y se procesaron por citometría de flujo. Los BMMs se plaquearon, ayunaron y activaron con BCG, Cpn60.2, DnaK, Ni-NTA y LPS durante 24 y 48 hrs para cuantificar la producción de TNF- α de los sobrenadantes por ELISA.

5 Resultados

5.1 CD43 no está involucrado en la maduración de los macrófagos. La ausencia de CD43 afecta diferencialmente la expresión de los TLRs 2 y 4 entre las cepas C57BL/6 y BALB/c.

A fin de evaluar el papel de CD43 en la producción de TNF- α ante los estímulos BCG, Cpn60.2 y DnaK en diferentes tipos de respuesta inmunológica se utilizaron BMMs de ratones CD43WT y CD43KO de las cepas C57BL/6 y BALB/c.

El primer paso fue determinar la expresión de los receptores moleculares CD43, F4/80, TLRs 2 y 4 en los BMMs CD43WT y CD43KO de ambas cepas de ratón. Para esto se hizo una inmunotinción y las muestras se procesaron mediante citometría de flujo. CD43 se evaluó para verificar el fenotipo WT o KO; F4/80 para corroborar la madurez de los macrófagos murinos [Dos Anjos Cassado A., 2017]; y TLR2 y TLR4 por ser receptores que también reconocen a Cpn60.2 y DnaK, los ligandos de Mtb compartidos con CD43 [Terry K. Means et al., 2001].

En el análisis de citometría, para ambas cepas de ratón se seleccionó la población de macrófagos (Figura 9 y 10 A) y se tomaron en cuenta los eventos individuales (Figura 9 y 10 B) para realizar los histogramas de cada uno de los marcadores (Figura 9 y 10 D-G). Los valores del cambio en la mediana de la intensidad de fluorescencia (Δ MF I) de los BMMs CD43KO se normalizaron respecto a los de los BMMs CD43WT.

Como se esperaba, la expresión de CD43 en los BMMs CD43KO de ambas cepas murinas es nula (Figura 9 y 10 D). Los niveles de expresión de F4/80 son equivalentes entre los BMMs CD43WT y CD43KO para ambas cepas (Figura 9 y 10 E). En la cepa BALB/c hay menor expresión de TLR2 en los BMMs CD43KO respecto a sus contrapartes silvestres (Figura 9 F); en cambio, el marcador TLR4 se expresa más en BMMs CD43KO (Figura 9 G). Por el contrario, en la cepa C57BL/6 hay mayor expresión de TLR2 en los BMMs CD43KO (Figura 10 F), sin embargo, la expresión de TLR4 no difiere significativamente entre los BMMs (Figura 10 G).

Estos resultados confirmaron que los BMMs CD43KO de ambas cepas no expresan CD43 y que CD43 no está involucrado en la maduración de los macrófagos, ya que el nivel de expresión de F4/80 en BMMs WT y KO es semejante. El efecto de la carencia de CD43 en la expresión de los TLRs 2 y 4 difiere entre las dos cepas de ratón.

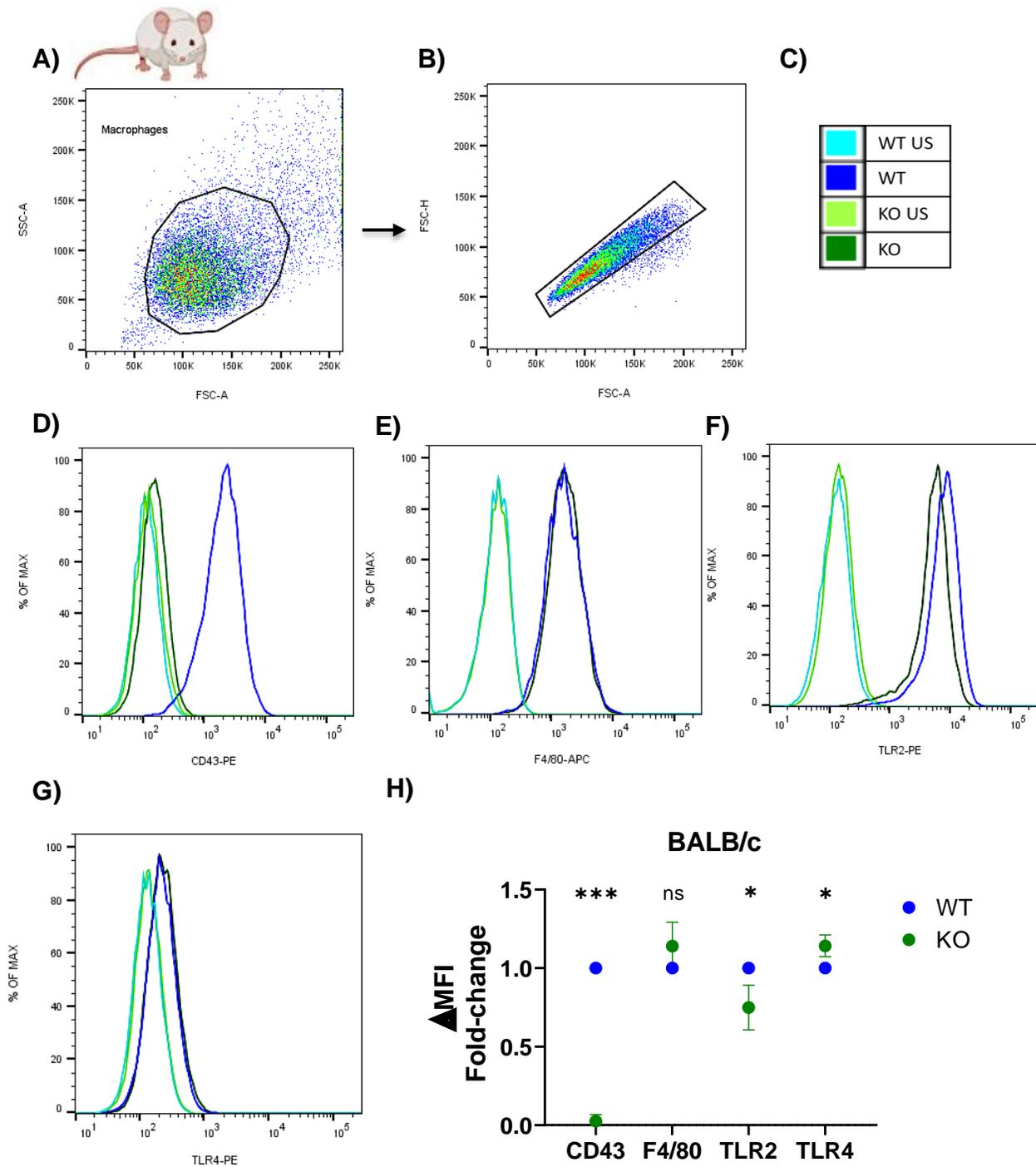


Figura 9 Los BMMs de ratones CD43KO expresan menos TLR2 pero más TLR4 que sus contrapartes WT. (A) Población de macrófagos en una gráfica de tamaño (FSC-A) vs complejidad (SSC-A) y (B) eventos individuales con base en los parámetros de tamaño (FSC-A) vs altura (FSC-H). (C) Código de colores que se utilizó en los histogramas, WT no teñido (NT; azul claro), WT (teñido; azul fuerte), KO no teñido (NT; verde claro) y KO (teñido; verde fuerte). Expresión de (D) CD43, (E) F4/80, (F) TLR2 y (G) TLR4 en los BMMs. (H) La representación cuantitativa del cambio en la mediana de la intensidad de fluorescencia (Δ MFI) para cada marcador; los datos de los BMMs CD43KO fueron normalizados respecto a los valores de los BMMs WT. Los histogramas son representativos de al menos tres experimentos independientes y el gráfico H muestra el promedio de estos experimentos. Análisis estadístico: prueba t no pareada. *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.0005$, ns, sin diferencia significativa.

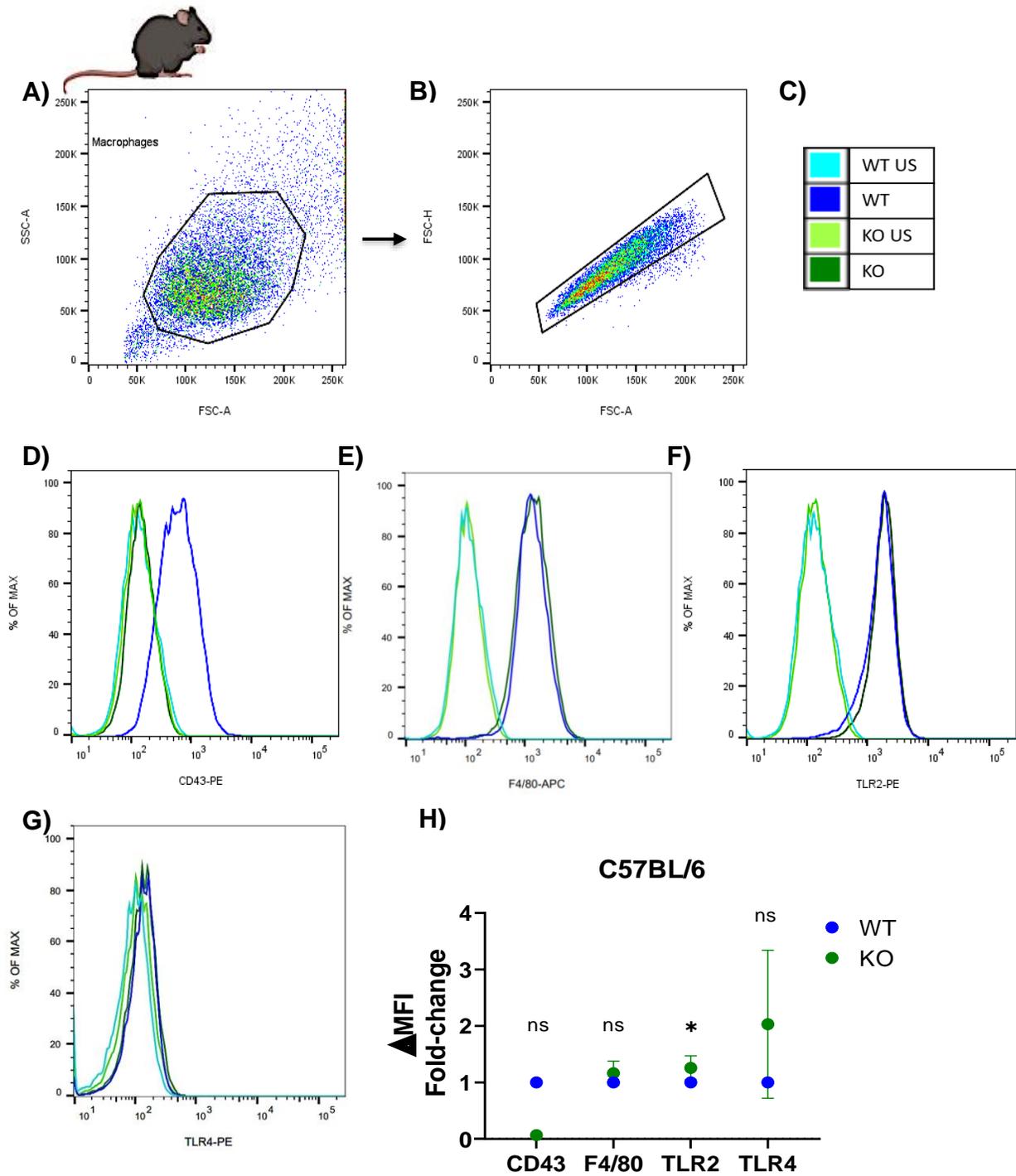


Figura 10 En ausencia de CD43 hay mayor expresión de TLR2 en BMMs de ratones C57BL/6. (A) Población de macrófagos en una gráfica de tamaño (FSC-A) vs complejidad (SSC-A) y (B) eventos individuales con base en los parámetros de tamaño (FSC-A) vs altura (FSC-H). (C) Código de colores que se utilizó en los histogramas, WT no teñido (NT; azul claro), WT (teñido; azul fuerte), KO no teñido (NT; verde claro) y KO (teñido; verde fuerte). Expresión de los marcadores celulares (D) CD43, (E) F4/80, (F) TLR2 y (G) TLR4. (H) Representación cuantitativa del cambio en la mediana en la intensidad de fluorescencia (Δ MFI) para cada marcador. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes y el gráfico H muestra el promedio de los valores KO que fueron normalizados respecto al WT de cada experimento. Análisis estadístico: prueba t no pareada. *, $p < 0.05$, ns, sin diferencia significativa.

5.2 La producción de TNF- α por BMMs de ratones C57BL/6 y BALB/c en respuesta a BCG, Cpn60.2 y DnaK depende parcialmente de CD43.

Después de hacer la fenotipificación para caracterizar la expresión de los marcadores de interés en los BMMs de ratones C57BL/6 y BALB/c CD43WT y CD43KO, se evaluó la capacidad de estas células para producir TNF- α ante los estímulos BCG, Cpn60.2 y DnaK a 24 y 48 horas. Esta citocina pro-inflamatoria tiene un rol central en la respuesta protectora contra Mtb mediante la formación de granulomas, la producción de intermediarios nitrogenados reactivos y el reclutamiento de células hematopoyéticas [Kindler, V. et al., 1989, Engele et al., 2002, Hickey et al., 2010].

Se utilizó BCG como modelo de *Mycobacterium tuberculosis* [Kindler, V. et al., 1989, Huygen et al., 1992]. Cpn60.2 y DnaK se emplearon como estímulos ya que son ligandos de CD43 presentes en la cápsula de Mtb [Hickey et al., 2009]. Además, Cpn60.2 funciona como adhesina necesaria para la interacción Mtb-macrófago que conduce a una respuesta pro-inflamatoria induciendo la producción de citocinas como TNF- α [Cehovin et al., 2010]. La producción de esta citocina en BMMs es dependiente de CD43 en ratones C57BL/6 [Torres-Huerta A et al., 2017].

El efecto de la interacción de CD43 con Cpn60.2 y DnaK a nivel producción de TNF- α se evaluó usando estas proteínas recombinantes, las cuales poseen una etiqueta de Histidinas que permite acoplarlas a perlas de agarosa recubiertas de níquel (Ni-NTA). Como control de estos estímulos se utilizaron las perlas Ni-NTA solas. Se realizó la estimulación durante 24 y 48 horas en los BMMs de ambas cepas de ratón.

Como control negativo se utilizaron BMMs no estimulados (US). Como controles positivos que inducen la producción de TNF- α de manera independiente a CD43, se utilizó el estímulo LPS. El objetivo de este control positivo es mostrar que la maquinaria de producción de TNF- α está intacta en los BMMs WT y KO. LPS es agonista de TLR4 e induce una respuesta pro-inflamatoria dependiente de la vía MyD88 en células hematopoyéticas [Fang, F. et al., 2020].

Se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo correspondientes a cada uno de los estímulos (BCG, Cpn60.2, DnaK, Ni-NTA y LPS) a 24 y 48 horas para las dos cepas

de ratón y se cuantificó la producción de TNF- α mediante un ELISA para poder compararlos. Como se esperaba, en los BMMs US de ambas cepas no hubo producción de TNF- α (Figura 12), y los BMMs de ambas cepas estimulados con las perlas Ni-NTA sin proteína produjeron cantidades mínimas de esta citocina (Figura 12).

En la cepa BALB/c los BMMs CD43KO producen menos TNF- α que los CD43WT en respuesta a BCG (48 horas, Figura 13 A), Cpn60.2 (24 y 48 horas, Figura 13 B) y DnaK (48 horas, Figura 13 C). Por otra parte, en respuesta a LPS, los BMMs WT y KO de la cepa BALB/c produjeron cantidades comparables de TNF- α (Figura 13 D). En la cepa C57BL/6 los BMMs CD43KO produjeron menos TNF- α que los CD43WT en respuesta a BCG, Cpn60.2, DnaK y LPS en ambos tiempos (Figura 13 E-H). Los ratones C57BL/6 CD43WT producen más TNF- α que los ratones BALB/c CD43WT en respuesta a BCG a ambos tiempos (no mostrado). En contraste con esto los ratones CD43KO de ambas cepas no difieren en la producción de TNF- α a las 24 y 48 horas (no mostrado).

Los BMMs WT de ratones C57BL/6 producen mas TNF- α en comparación con los BMMs WT de BALB/c. En contraste los BMMs de ratones CD43KO de ambas cepas producen niveles equivalentes de TNF- α . Esto podría deberse a que los ratones BALB/c CD43KO expresan más TLR4 y así contribuir a la producción de esta citocina. La producción de TNF- α en respuesta a BCG, Cpn60.2 y DnaK depende parcialmente de CD43 en ambas cepas de ratón. Sin embargo la producción de esta citocina es mayor en ratones C57BL/6, además de que la diferencia entre BMMs WT y KO es más marcada en esta cepa que en BALB/c. En concordancia con el tipo respuesta inmunológica de C57BL/6 que es predominantemente Th1 y que en ausencia de CD43 dirige a los macrófagos a una respuesta anti-inflamatoria. Además, la diferencia entre la producción de TNF α de los BMMs WT y KO en los controles podría deberse a un deterioro en la maquinaria celular de macrófagos.

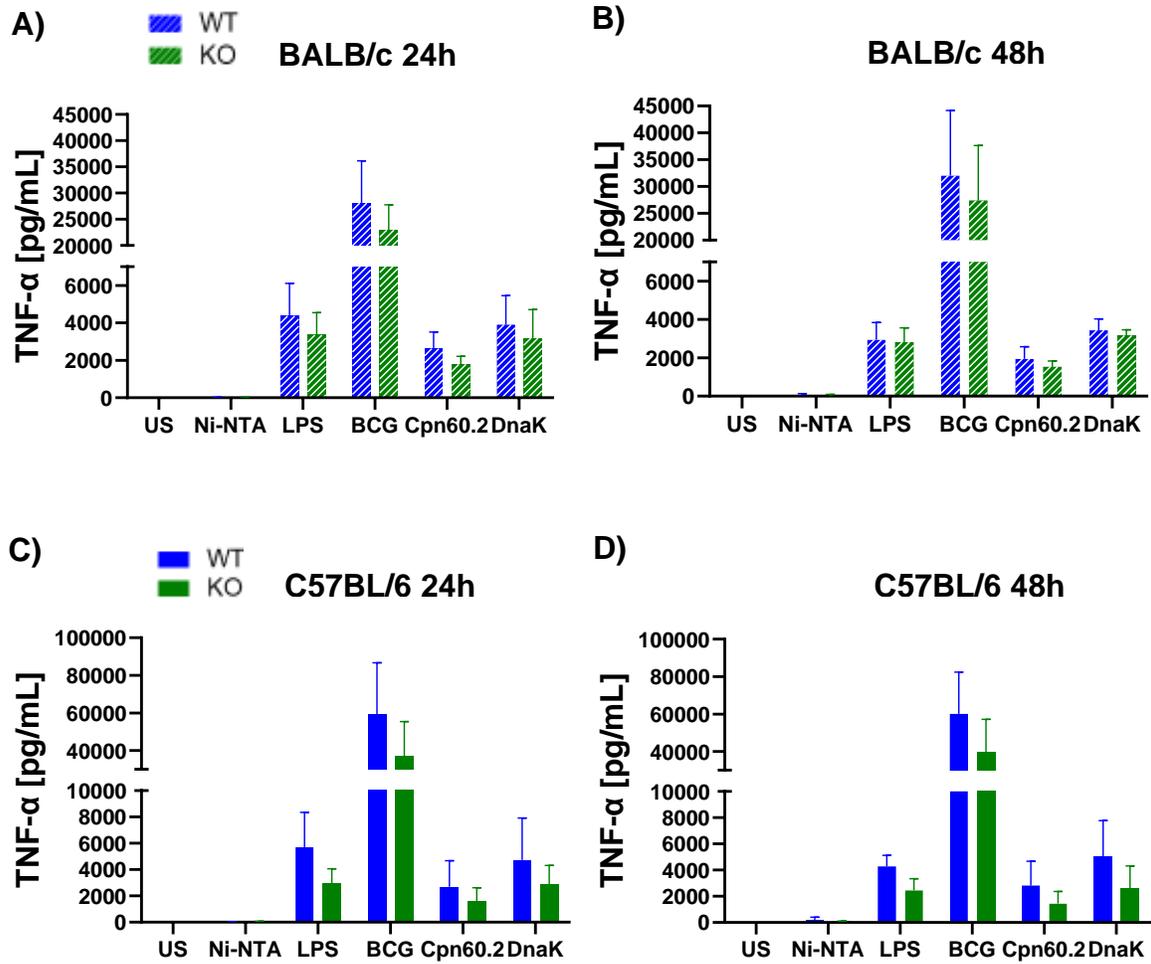


Figura 12 **Producción de TNF- α por BMMs de ratones BALB/c y C57BL/6.** La producción de TNF- α (pg/mL) en respuesta a diferentes estímulos (US, LPS, Ni-NTA, BCG, Cpn60.2 y DnaK) entre ambas cepas de ratón a 24 y 48 horas, BMMs WT (azul) y CD43KO (verde). (A) BALB/c a 24 horas y (B) a 48 horas. (C) C57BL/6 a 24 horas y (D) a 48 horas. Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes.

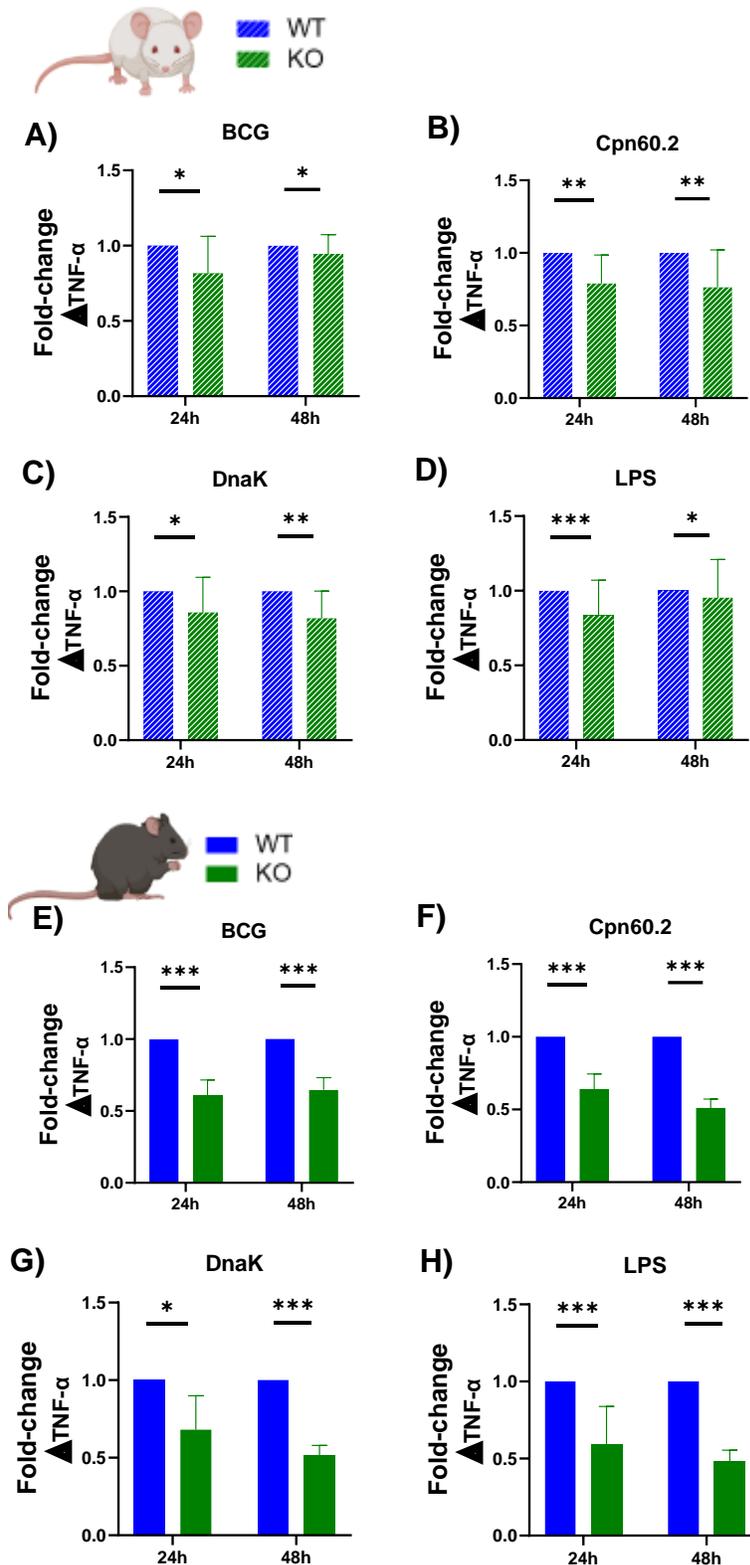


Figura 13 La producción de TNF- α por los BMMs de ratones BALB/c y C57BL/6 depende parcialmente de CD43. La tasa de cambio en la producción de TNF- α por los BMMs CD43WT (azul rayado) y CD43KO (verde rayado) de ratones BALB/c en respuesta a (A) BCG, (B) Cpn60.2, (C) DnaK, (D) LPS a 24 y 48 horas. Producción de TNF- α por BMMs CD43WT (azul) y CD43KO (verde) de ratones C57BL/6 en respuesta a (E) BCG, (F) Cpn60.2, (G) DnaK, (H) LPS a 24 y 48 horas. Se normalizaron los valores de los BMMs CD43KO respecto al WT y se graficó el promedio de la producción de TNF- α de al menos tres experimentos independientes. Análisis estadístico: prueba t no pareada. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$, ns, sin diferencia significativa.

6 Discusión

Es de gran importancia comprender la interacción de Mtb con los macrófagos para poder desarrollar nuevos tratamientos o mejorar las medidas preventivas contra la tuberculosis, ya que solo hay una vacuna disponible (BCG) y no impide la infección primaria [Kindler, V. et al., 1989, Huygen et al., 1992]. CD43 es una molécula importante en la asociación de micobacterias con los macrófagos [Fratuzzi et al., 2000; Randhawa et al., 2005] a través de ligandos como Cpn60.2 y DnaK [Hickey et al., 2009]. Además CD43 controla la supervivencia y el crecimiento del patógeno gracias a la producción de la citocina TNF- α [Randhawa et al., 2008]. Esta citocina juega un papel central en el macrófago iniciando la vía de apoptosis, así como la formación de granulomas para la protección del hospedero contra Mtb [Randhawa et al., 2008, Queval CJ et al., 2017, Torres-Huerta et al., 2017].

En este estudio nos centramos en evaluar el papel de CD43 en la producción de TNF- α por BMMs CD43 WT y CD43KO en ratones C57BL/6 y BALB/c, cuya respuesta inmunológica es predominantemente Th1 y Th2. En ratones C57BL/6 CD43KO se ha observado una disminución de la capacidad de unión de Mtb a los macrófagos y la fagocitosis de los mismos [Randhawa et al., 2008]. Esta ausencia de CD43 tanto en ratones C57BL/6 como en macrófagos THP-1 resulta en una reducción en la producción de TNF- α en respuesta a BCG y Cpn60.2 [Torres-Huerta A et al., 2017].

Comenzamos por examinar la expresión de los marcadores CD43, F4/80, TLRs 2 y 4, haciendo una inmunotinción de los BMMs WT y KO de ambas cepas de ratón. Se evaluó la expresión de CD43 para corroborar que los BMMs KO no expresaran la sialomucina; de F4/80 para confirmar que fueran macrófagos murinos maduros [Dos Anjos Cassado A., 2017]; y de los TLRs 2 y 4 porque participan en el reconocimiento de ligandos de Mtb (Cpn60.2 y DnaK) compartidos con CD43 [Terry K. Means et al., 2001]. Además, la interacción entre Mtb y estos TLRs lleva al inicio de cascadas de señalización intracelular por la vía de MyD88, que culminan en la generación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α en macrófagos [Bowdish DM et al., 2009].

Después se evaluó la producción de TNF- α por BMMs CD43WT y CD43KO de los ratones BALB/c y C57BL/6, incubando las células con distintos estímulos (BCG, Cpn60.2, DnaK, Ni-NTA y LPS) a 24 y 48 horas.

Confirmamos que los BMMs CD43KO de ambas cepas no expresan CD43. También demostramos que CD43 no está involucrado en la maduración de macrófagos, ya que los BMMs CD43WT y sus contrapartes KO expresan niveles equivalentes de F4/80 en ambas cepas de ratón.

En la cepa BALB/c los BMMs CD43KO expresan menos TLR2, en contraste con el marcador TLR4 que se expresa más. Lo cual nos podría indicar que la producción de TNF- α no solo depende de CD43 también participan los TLRs 2 y 4 que son receptores de Cpn60.2 y DnaK [Terry K. Means et al., 2001]. Esta producción de TNF- α en respuesta a BCG, Cpn60.2 y DnaK depende parcialmente de CD43 en ratones BALB/c. Puesto que los BMMs CD43KO producen menos TNF- α en respuesta a estos estímulos.

Por otra parte, los BMMs CD43KO de ratones C57BL/6 producen menos TNF- α en comparación con los WT en respuesta a BCG, Cpn60.2 y DnaK. Estos experimentos con la cepa C57BL/6 sugieren que CD43 es responsable de la producción de TNF- α y que, en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, la participación de la molécula TLR4 no fue significativo, ya que los BMMs WT y CD43KO expresaron cantidades equivalentes de estos marcadores. Al igual que como se informó anteriormente donde la producción de TNF- α depende de CD43 en esta cepa de ratón en respuesta a Cpn60.2 [Torres-Huerta et al., 2017]. Sin embargo, hay mayor expresión de TLR2 en los BMMs CD43KO esto podría indicarnos que CD43 interactúa con esta molécula para la producción de TNF- α .

Para evaluar si la ausencia de CD43 afectaba la maquinaria celular se estimularon los BMMs con LPS que induce actividad proinflamatoria de manera independiente a CD43 [Fang, F. et al., 2020, Chatila et al., 1989, Ai et al., 2013]. Los resultados de los experimentos con la cepa C57BL/6 con estos estímulos nos dicen que posiblemente la maquinaria celular en los macrófagos CD43KO está deteriorada.

Uno de los objetivos del estudio es comparar el papel que tiene CD43 en la producción de TNF- α entre los ratones C57BL/6 y BALB/c como dos prototipos de respuesta inmune Th1 y Th2 [Huygen et al., 1992]. Los BMMs WT de los ratones C57BL/6 producen más TNF- α que los BMMs WT de ratones BALB/c WT en respuesta a BCG. Por el contrario, en los BMMs CD43KO no se observa una diferencia en la producción de TNF- α entre cepas. Esto podría explicarse con que los BMMs CD43KO de ratones BALB/c expresan más TLR4 el cual promueve la producción de TNF- α o que en ausencia de CD43 dirige a los macrófagos a una respuesta anti-inflamatoria. De hecho, se sabe que los ratones C57BL/6 deficientes de TLR4 exhiben una mayor susceptibilidad a patógenos [Li et al., 2014, Flynn et al., 2001]. Nuestros resultados sugieren que la ausencia de CD43 en ratones C57BL/6 los vuelve más susceptibles a la infección por Mtb. Además, parece que CD43 por su tamaño (~45 nm) impedía que TLR4 tuviera una mayor interacción con ligandos de Mtb. De igual manera, estudios previos informaron una respuesta Th1 más baja en BALB/c después de una infección BCG sistémica o pulmonar en comparación con los ratones C57BL/6 que responden mejor ante la infección por micobacterias [Huygen et al., 1992, Wakeham et al., 2000].

En conjunto, los datos presentados demuestran que la producción de TNF- α en respuesta a BCG, Cpn60.2 y DnaK depende parcialmente de CD43 en ambas cepas. También los BMMs de ratones C57BL/6 CD43WT responden con más producción de TNF- α ante BCG que los BMMs de ratones BALB/c CD43WT. Por otro lado los BMMs de ratones CD43KO de ambas cepas producen niveles equivalentes de TNF- α .

7 Conclusiones

1. CD43 no está involucrado en la maduración de los BMMs, ya que en ambas cepas de ratón la expresión de F4/80 es equivalente.
2. En la cepa C57BL/6 la carencia de CD43 no influye significativamente en la expresión de TLR4 en los BMMs. Sin embargo, los BMMs CD43KO expresan más TLR2.
3. Los BMMs CD43KO de la cepa BALB/c expresan menos TLR2 y más TLR4 en contraste con sus contrapartes CD43WT.
4. La producción de TNF- α por BMMs depende parcialmente de CD43 en respuesta a BCG, Cpn60.2 y DnaK, independientemente del tipo de respuesta inmunológica.
5. La ausencia de CD43 podría deteriorar la producción de TNF- α de los BMMs de C57BL/6, ya que no responden igual los BMMs WT y KO en respuesta a LPS.
6. Los BMMs de ratones C57BL/6 WT producen más TNF- α que los BMMs de ratones BALB/c WT en respuesta a BCG.
7. La diferencia entre los BMMs WT y KO es más marcada en C57BL/6 que en BALB/c.

8 Perspectivas

1. Evaluar la producción de otras citocinas para la resolución de la infección por Mtb en BMMs de ratón y de humano.
2. Determinar la participación de los TLRs 2 y 4 en ausencia de CD43 en ratones BALB/c con un modelo de TLRs KO CD43KO.

9 Bibliografía

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: **World Health Organization; 2021**. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Tuberculosis en las Américas. **Informe regional 2020**. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://doi.org/10.37774/9789275324479>.
3. Dolin, P. J., Raviglione, M. C., & Kochi, A. (1994). Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bulletin of the World Health Organization*, 72(2), 213–220.
4. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. **Global Epidemiology of Tuberculosis: Morbidity and Mortality of a Worldwide Epidemic**. *JAMA*. 1995;273(3):220–226. doi:10.1001/jama.1995.03520270054031
5. World Health Organization. (1999). **The World health report 1999: Making a difference**. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42167>
6. Selwyn, P. A., Hartel, D., Lewis, V. A., Schoenbaum, E. E., Vermund, S. H., Klein, R. S., ... Friedland, G. H. (1989). **A Prospective Study of the Risk of Tuberculosis among Intravenous Drug Users with Human Immunodeficiency Virus Infection**. *New England Journal of Medicine*, 320(9), 545–550. doi:10.1056/nejm198903023200901
7. Borgdorff, M. W., Floyd, K., & Broekmans, J. F. (2002). **Interventions to reduce tuberculosis mortality and transmission in low- and middle-income countries**. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(3), 217–227.
8. Huebner, R. E., Schein, M. F., & Bass, J. B. (1993). **The Tuberculin Skin Test**. *Clinical Infectious Diseases*, 17(6), 968–975. doi:10.1093/clinids/17.6.968
9. Ellie J. C. Goldstein, Elsie Lee, Robert S. Holzman, **Evolution and Current Use of the Tuberculin Test**. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 34, Issue 3, 1 February 2002, Pages 365–370, <https://doi.org/10.1086/338149>
10. Cho S. N. (2007). **Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis**. *Yonsei medical journal*, 48(3), 347–359.

<https://doi.org/10.3349/ymj.2007.48.3.347>

11. Luca S, Mihaescu T. **History of BCG Vaccine**. *Maedica (Bucur)*. 2013 Mar;8(1):53-8. PMID: 24023600; PMCID: PMC3749764.
12. Vacunación Universal, 2014. **Programa Sectorial de Salud 2013-2018** Primera edición, México, D.F.
13. Agger, E. M., & Andersen, P. (2002). **A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure**. *Vaccine*, 21(1-2), 7–14. doi:10.1016/s0264-410x(02)00447-4
14. Santos, J. I. (2002). **El programa nacional de vacunación: orgullo de México**. *Rev Fac Med UNAM*, 45(3), 142-53.
15. Pérez GC. **Trascendencia de la vacunación con BCG en México**. *Salud Publica Mex*. 10 de noviembre de 2014 ;17(5):597_611.
16. Angelidou, A., Conti, M.-G., Diray-Arce, J., Benn, C. S., Shann, F., Netea, M. G., ... Levy, O. (2020). **Licensed Bacille Calmette-Guérin (BCG) formulations differ markedly in bacterial viability, RNA content and innate immune activation**. *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2019.11.060
17. Díaz-Ortega, José Luis et al. **Cobertura de vacunación y proporción de esquema incompleto en niños menores de siete años en México**. (2018) *Salud Pública de México*. 60 (3), 338-346. <https://doi.org/10.21149/8812>
18. Flores-Valdez M.A., Villalpando-Montoya A. (2014). **Drugs in Clinical Evaluation for the Treatment of Tuberculosis**. *RevSalJal*, 2(1), 42-51.
19. Ruiz, P., Rodríguez-Cano, F., Zerolo, F. J., & Casal, M. (2002). **Investigation of the In Vitro Activity of Streptomycin Against Mycobacterium tuberculosis**. *Microbial Drug Resistance*, 8(2), 147–149. doi:10.1089/107662902760190707
20. Takayama K, Wang L, David HL. (1972). **Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of Mycobacterium tuberculosis**. *Antimicrob Agents Chemother*. 2(1):29-35. doi: 10.1128/aac.2.1.29.
21. Bobrowitz, I. D. (1971). **Ethambutol Compared to Streptomycin in Original Treatment of Advanced Pulmonary Tuberculosis**. *Chest*, 60(1), 14–21. doi:10.1378/chest.60.1.14
22. McClure WR, Cech CL. **On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA**

- synthesis.** J Biol Chem. 1978 Dec 25;253(24):8949-56. PMID: 363713.
23. Njire, M., Tan, Y., Mugweru, J., Wang, C., Guo, J., Yew, W., ... Zhang, T. (2016). **Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: Review and update.** *Advances in Medical Sciences*, 61(1), 63–71. doi:10.1016/j.advms.2015.09.007
24. Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., & Mitchison, D. (2014). **Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance.** *Microbiology Spectrum*, 2(4). doi:10.1128/microbiolspec.mgm2-0023-2013
25. Dillon, N. A., Peterson, N. D., Rosen, B. C., & Baughn, A. D. (2014). **Pantothenate and pantetheine antagonize the antitubercular activity of pyrazinamide.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(12), 7258–7263. <https://doi.org/10.1128/AAC.04028-14>
26. **Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children.** This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. (2000). *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(4 Pt 1), 1376–1395. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.16141>
27. Wilkinson, R., Rohlwick, U., Misra, U. *et al.* **Tuberculous meningitis.** *Nat Rev Neurol* 13, 581–598 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.120>
28. Reinout van C., Tom H. M. Ottenhoff, and Jos W. M. (2002). **Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis.** *Clinical Microbiology Reviews*, p. 294–309 Vol. 15, No. 2 DOI: 10.1128/CMR
29. González-Martin, J. (2014). **Microbiología de la tuberculosis.** *Seminarios de La Fundación Española de Reumatología*, 15(1), 25–33. doi:10.1016/j.semreu.2014.01.001
30. Barkan, D., Liu, Z., Sacchettini, J. C., and Glickman, M. S. (2009). **Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance, and cell wall integrity of Mycobacterium tuberculosis.** *Chem. Biol.* 16, 499-509.
31. Brennan, P. J. (2003). **Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis.** *Tuberculosis. (Edinb.)* 83, 91-97
32. Henderson, B., Lund, P. A., & Coates, A. R. (2010). **Multiple moonlighting**

- functions of mycobacterial molecular chaperones.** *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 90(2), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.01.004>
33. Lewthwaite, J. C., Clarkin, C. E., Coates, A. R., Poole, S., Lawrence, R. A., Wheeler-Jones, C. P., Pitsillides, A. A., Singh, M., & Henderson, B. (2007). **Highly homologous Mycobacterium tuberculosis chaperonin 60 proteins with differential CD14 dependencies stimulate cytokine production by human monocytes through cooperative activation of p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein kinases.** *International immunopharmacology*, 7(2), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.10.005>
34. Lehner, T., Bergmeier, L. A., Wang, Y., Tao, L., Sing, M., Spallek, R., & van der Zee, R. (2000). **Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity.** *European journal of immunology*, 30(2), 594–603. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200002\)30:2<594::AID-IMMU594>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200002)30:2<594::AID-IMMU594>3.0.CO;2-1)
35. Daffé, M., Crick, D. C., & Jackson, M. (2014). **Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids.** *Microbiology Spectrum*, 2(4). doi:10.1128/microbiolspec.mgm2-0021-2013
36. Angala, S. K., Belardinelli, J. M., Huc-Claustre, E., Wheat, W. H., & Jackson, M. (2014). **The cell envelope glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis.** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(5), 361–399. doi:10.3109/10409238.2014.925420
37. Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs, W. R., Jr, Guerin, M. E., & Prados-Rosales, R. (2019). **The Mycobacterium tuberculosis capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis.** *The Biochemical journal*, 476(14), 1995–2016. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190324>
38. Chalut, C. (2016). **MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria.** *Tuberculosis*, 100, 32–45. doi:10.1016/j.tube.2016.06.004
39. Chatterjee D, Khoo KH. **Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects.**

- Glycobiology. 1998 Feb;8(2):113-20. doi: 10.1093/glycob/8.2.113. PMID: 9451020.
40. Gilleron, M., Bala, L., Brando, T., Vercellone, A., & Puzo, G. (2000). **Mycobacterium tuberculosis H37Rv Parietal and Cellular Lipoarabinomannans.** Journal of Biological Chemistry, 275(1), 677–684. doi:10.1074/jbc.275.1.677
41. Hickey, T. B., Thorson, L. M., Speert, D. P., Daffé, M., & Stokes, R. W. (2009). **Mycobacterium tuberculosis Cpn60.2 and DnaK are located on the bacterial surface, where Cpn60.2 facilitates efficient bacterial association with macrophages.** Infection and immunity, 77(8), 3389–3401. <https://doi.org/10.1128/IAI.00143-09>
42. Zuñiga, J., Torres-García, D., Santos-Mendoza, T., Rodriguez-Reyna, T. S., Granados, J., & Yunis, E. J. (2012). **Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis.** Clinical and Developmental Immunology, 2012, 1–18. doi:10.1155/2012/193923
43. Kaufmann, S., McMichael, A. **Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis.** Nat Med 11, S33–S44 (2005). <https://doi.org/10.1038/nm1221>
44. Watkins RE, Plant AJ. **Does smoking explain sex differences in the global tuberculosis epidemic?** Epidemiol Infect 2006; 134:333–9
45. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, et al. **The natural history of childhood intrathoracic tuberculosis: a critical review of literature from the prechemotherapy era.** Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8:392–402.
46. Fish EN. **The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses.** Nat Rev Immunol 2008; 8:737–44.
47. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. **The immune response in tuberculosis.** Annu Rev Immunol 2013; 31:475–527
48. Lotter H, Helk E, Bernin H, et al. **Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFN gamma secretion in natural killer T cells.** PloS One 2013; 8:e55694.
49. Martinez FO, Helming L, Gordon S. **Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.** Annu Rev Immunol. 2009;27:451-83. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532.

50. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. **Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis**. Clin Microbiol Rev. 2002 Apr;15(2):294-309. doi: 10.1128/CMR.15.2.294-309.2002. PMID: 11932234; PMCID: PMC118070.
51. Ishikawa, E., Mori, D., & Yamasaki, S. (2017). **Recognition of Mycobacterial Lipids by Immune Receptors**. Trends in Immunology, 38(1), 66–76. doi:10.1016/j.it.2016.10.009
52. Bowdish DM, Sakamoto K, Kim MJ, Kroos M, Mukhopadhyay S, Leifer CA, Tryggvason K, Gordon S, Russell DG. **MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis**. PLoS Pathog. 2009 Jun;5(6):e1000474. doi: 10.1371/journal.ppat.1000474.
53. Queval CJ, Brosch R and Simeone R (2017) **The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against Mycobacterium tuberculosis**. Front. Microbiol. 8:2284. doi: 10.3389/fmicb.2017.02284
54. Liu CH, Liu H, Ge B. **Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion**. Cell Mol Immunol. 2017 Dec;14(12):963-975. doi: 10.1038/cmi.2017.88. Epub 2017 Sep 11. PMID: 28890547; PMCID: PMC5719146.
55. Zanoni, I., & Granucci, F. (2013). **Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation**. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00032
56. Lin, H.-H., Faunce, D. E., Stacey, M., Terajewicz, A., Nakamura, T., Zhang-Hoover, J., ... Stein-Streilein, J. (2005). **The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance**. The Journal of Experimental Medicine, 201(10), 1615–1625. doi:10.1084/jem.20042307
57. Vergne, I., Chua, J., Lee, H. H., Lucas, M., Belisle, J., & Deretic, V. (2005). **Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(11), 4033–4038. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409716102>
58. Queval CJ, Brosch R and Simeone R (2017) **The Macrophage: A Disputed**

- Fortress in the Battle against Mycobacterium tuberculosis.** Front. Microbiol. 8:2284. doi: 10.3389/fmicb.2017.02284
59. Abul Abbas, Andrew Lichtman and Shiv Pillai (2014) **Cellular and Molecular Immunology** (8th Edition, pp. 72-80). Elsevier.
60. Ruan, C., Li, J., Niu, J., Li, P., Huang, Y., Li, X., ... Xie, J. (2019). **Mycobacterium tuberculosis Rv0426c promotes recombinant mycobacteria intracellular survival via manipulating host inflammatory cytokines and suppressing cell apoptosis.** Infection, Genetics and Evolution, 104070. doi:10.1016/j.meegid.2019.104070
61. Ladel, C. H., Blum, C., Dreher, A., Reifenberg, K., Kopf, M., & Kaufmann, S. H. (1997). **Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice.** Infection and immunity, 65(11), 4843–4849. <https://doi.org/10.1128/iai.65.11.4843-4849.1997>
62. Randhawa, A. K., Ziltener, H. J., & Stokes, R. W. (2008). **CD43 controls the intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis through the induction of TNF- α -mediated apoptosis.** Cellular Microbiology, 10(10), 2105–2117. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01194.x
63. Hickey, T. B. M., Ziltener, H. J., Speert, D. P., & Stokes, R. W. (2010). **Mycobacterium tuberculosis employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface.** Cellular Microbiology, 12(11), 1634–1647. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01496.x
64. Pedraza-Alva, G., & Rosenstein, Y. (2007). **CD43 – One molecule, many tales to recount.** Signal Transduction, 7(5-6), 372–385. doi:10.1002/sita.200700140
65. Ostberg, J. R., Barth, R. K., & Frelinger, J. G. (1998). **The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43.** Immunology Today, 19(12), 546–550. doi:10.1016/s0167-5699(98)01343-7
66. Allenspach, E. J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A. G., Cannon, J. L., Takahashi, S. M., Morgan, R., Burkhardt, J. K. and Sperling, A. I. (2001) **ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse.** Immunity 15: 739 –750.
67. Fratazzi, C., Manjunath, N., Arbeit, R. D., Carini, C., Gerken, T. A., Ardman, B., ... Remold, H. G. (2000). **A Macrophage Invasion Mechanism for**

- Mycobacteria Implicating the Extracellular Domain of Cd43.** The Journal of Experimental Medicine, 192(2), 183–192. doi:10.1084/jem.192.2.183
68. Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B. **Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43.** Nature. 1995 Oct 12;377(6549):535-8. doi: 10.1038/377535a0.
69. McEvoy, L. M., M. A. Jutila, P. S. Tsao, J. P. Cooke, and E. C. Butcher. 1997. **Anti-CD43 Inhibits Monocyte-Endothelial Adhesion in Inflammation and Atherogenesis.** Blood 90:3587.
70. Ardman, B., Sikorski, M. A., & Staunton, D. E. (1992). **CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(11), 5001–5005. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.5001>
71. Ostberg, J., L. Dragone, T. Driskell, J. Moynihan, R. Phipps, R. Barth, and J. Frelinger. 1996. **Disregulated expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) in the B cell lineage leads to immunodeficiency.** J Immunol 157:4876
72. Brennan, M. J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M., & Jacobs, W. R. (2001). **Evidence that Mycobacterial PE_PGRS Proteins Are Cell Surface Constituents That Influence Interactions with Other Cells.** Infection and Immunity, 69(12), 7326–7333. doi:10.1128/iai.69.12.7326-7333.2001
73. Torres-Huerta A, Villaseñor T, Flores-Alcantar A, Parada C, Alemán-Navarro E, Espitia C, Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. **Interaction of the CD43 Sialomucin with the Mycobacterium tuberculosis Cpn60.2 Chaperonin Leads to Tumor Necrosis Factor Alpha Production.** Infect Immun. 2017 Feb 23;85(3):e00915-16. doi: 10.1128/IAI.00915-16.
74. McEvoy, L. M., H. Sun, J. G. Frelinger, and E. C. Butcher. 1997. **Anti-CD43 Inhibition of T Cell Homing.** Journal of Experimental Medicine 185:1493
75. Cilfone NA, Perry CR, Kirschner DE, Linderman JJ. 2013. **Multi-scale modeling predicts a balance of tumor necrosis factor- and interleukin-10 controls the granuloma environment during Mycobacterium tuberculosis infection.** PLoS One 8:e68680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068680>

76. Engele, M., Stossel, E., Castiglione, K., Schwerdtner, N., Wagner, M., Bolcskei, P., ... Stenger, S. (2002). **Induction of TNF in Human Alveolar Macrophages As a Potential Evasion Mechanism of Virulent Mycobacterium tuberculosis.** *The Journal of Immunology*, 168(3), 1328–1337. doi:10.4049/jimmunol.168.3.1328
77. Randhawa, A. K., Ziltener, H. J., Merzaban, J. S., & Stokes, R. W. (2005). **CD43 Is Required for Optimal Growth Inhibition of Mycobacterium tuberculosis in Macrophages and in Mice.** *The Journal of Immunology*, 175(3), 1805–1812. doi:10.4049/jimmunol.175.3.1805
78. Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., & Matsukawa, A. (2004). **INNATE IMMUNE RESPONSE IN TH1- AND TH2-DOMINANT MOUSE STRAINS.** *Shock*, 22(5), 460–466. doi:10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9
79. Mosmann TR, Coffman RL. **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.** *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045. PMID: 2523712.
80. Garcia-Pelayo, M. C., Bachy, V. S., Kaveh, D. A., & Hogarth, P. J. (2015). **BALB/c mice display more enhanced BCG vaccine induced Th1 and Th17 response than C57BL/6 mice but have equivalent protection.** *Tuberculosis*, 95(1), 48–53. doi:10.1016/j.tube.2014.10.012
81. Wakeham, J., Wang, J., & Xing, Z. (2000). **Genetically determined disparate innate and adaptive cell-mediated immune responses to pulmonary Mycobacterium bovis BCG infection in C57BL/6 and BALB/c mice.** *Infection and immunity*, 68(12), 6946–6953. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6946-6953.2000>
82. Fang, F., Ge, Q., Li, R., Lv, J., Zhang, Y., Feng, A., ... Qian, Z. (2020). **LPS restores protective immunity in macrophages against Mycobacterium tuberculosis via autophagy.** *Molecular Immunology*, 124, 18–24. doi:10.1016/j.molimm.2020.05.001
83. Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K. et al. **Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling.** *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 557–581 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00018-014->

84. Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., & Chen, H. (2013). **Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment.** International journal of environmental research and public health, 10(9), 3834–3842. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093834>
85. Terry K. Means, Bryan W. Jones, Andra B. Schromm, Beth A. Shurtleff, Jason A. Smith, Joseph Keane, Douglas T. Golenbock, Stefanie N. Vogel and Matthew J. Fenton. **Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses.** J Immunol March 15, 2001, 166 (6) 4074-4082; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.4074>
86. Dos Anjos Cassado A. (2017). **F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen.** Results and problems in cell differentiation, 62, 161–179. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_7
87. Kindler, V., Sappino, A. P., Grau, G. E., Piguet, P. F., & Vassalli, P. (1989). **The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection.** Cell, 56(5), 731–740. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90676-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90676-4)
88. Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., & Geha, R. (1989). **Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin.** Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 143(4), 1283–1289. PMID: 2545785
89. Huygen, K., Abramowicz, D., Vandenbussche, P., Jacobs, F., De Bruyn, J., Kentos, A., Drowart, A., Van Vooren, J. P., & Goldman, M. (1992). **Spleen cell cytokine secretion in Mycobacterium bovis BCG-infected mice.** Infection and immunity, 60(7), 2880–2886. <https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2880-2886.1992>
90. Cehovin, A., Coates, A. R., Hu, Y., Riffo-Vasquez, Y., Tormay, P., Botanch, C., Altare, F., & Henderson, B. (2010). **Comparison of the moonlighting actions of the two highly homologous chaperonin 60 proteins of Mycobacterium tuberculosis.** Infection and immunity, 78(7), 3196–3206. <https://doi.org/10.1128/IAI.01379-09>
91. Li, JY., Liu, Y., Gao, XX. et al. TLR2 and TLR4 signaling pathways are required for recombinant Brucella abortus BCSP31-induced cytokine

- production, functional upregulation of mouse macrophages, and the Th1 immune response in vivo and in vitro. *Cell Mol Immunol* 11, 477–494 (2014).
<https://doi.org/10.1038/cmi.2014.28>
92. Flynn, J. L., & Chan, J. (2001). **Immunology of tuberculosis**. Annual review of immunology, 19, 93–129.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.93>
93. Cehovin, A., Coates, A. R., Hu, Y., Riffo-Vasquez, Y., Tormay, P., Botanch, C., ... & Henderson, B. (2010). **Comparison of the moonlighting actions of the two highly homologous chaperonin 60 proteins of Mycobacterium tuberculosis**. *Infection and Immunity*, 78(7), 3196-3206.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01379-09>
94. Huygen, K., Abramowicz, D., Vandenbussche, P., Jacobs, F., De Bruyn, J., Kentos, A., Drowart, A., Van Vooren, J. P., & Goldman, M. (1992). **Spleen cell cytokine secretion in Mycobacterium bovis BCG-infected mice**. *Infection and immunity*, 60(7), 2880–2886.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2880-2886.1992>

10 Anexos

Tabla 1. Resultados de intensidad media de fluorescencia de la fenotipificación

Cepa	Experimento	Marcador	MFI				RESTA NT-STAIN		Normalización respecto al WT
			WT NT	WT STAIN	KO NT	KO STAIN	WT	KO	
BALB/c	E1	CD43	122	10773	139	195	10651	56	0.01
		F4/80	103	1448	99.3	1685	1345	1585.7	1.18
		TLR2	122	7723	139	5268	7601	5129	0.67
		TLR4	122	185	139	210	63	71	1.13
	E2	CD43	141	13709	199	235	13568	36	0.00
		F4/80	115	998	114	975	883	861	0.98
		TLR2	129	4049	135	3311	3920	3176	0.81
		TLR4	129	210	135	220	81	85	1.05
	E3	CD43	128	420	150	182	292	32	0.11
		F4/80	111	769	121	1028	658	907	1.38
		TLR2	128	400	150	312	272	162	0.60
		TLR4	128	138	150	162	10	12	1.20
	E4	CD43	109	385	110	110	276	0	0.00
		F4/80	123	1503	123	1579	1380	1456	1.06
		TLR2	109	463	110	434	354	324	0.92
		TLR4	109	130	110	135	21	25	1.19
	E5	CD43	75	278	67.4	87.7	203	20.3	0.10
		F4/80	95.4	1331	87.7	1395	1235.6	1307.3	1.06
		TLR2	75	283	67.4	264	208	196.6	0.95
		TLR4	75	76.1	67.4	82.6	1.1	15.2	13.82
C57BL/6	E1	CD43	130	573	132	141	443	9	0.02
		F4/80	113	1288	113	1327	1175	1214	1.03
		TLR2	130	1631	132	1802	1501	1670	1.11
		TLR4	130	138	132	142	8	10	1.25
	E2	CD43	94.9	255	110	118	160.1	8	0.05
		F4/80	102	1272	118	1615	1170	1497	1.28
		TLR2	94.9	455	110	513	360.1	403	1.12
		TLR4	94.9	137	110	135	42.1	25	0.59
	E3	CD43	164	494	125	181	330	56	0.17
		F4/80	126	1138	168	1587	1012	1419	1.40
		TLR2	164	366	125	441	202	316	1.56
		TLR4	164	172	125	150	8	25	3.13
	E4	CD43	60.8	168	77	79.8	107.2	2.8	0.03
		F4/80	76.5	1525	93.7	1470	1448.5	1376.3	0.95
		TLR2	60.8	251	77	313	190.2	236	1.24
		TLR4	60.8	68.4	77	101	7.6	24	3.16

Tabla 1 Los resultados graficados la mediana de la intensidad de fluorescencia (Δ MFI) de cada experimento realizado de ambas cepas. WT NT (no teñido; azul claro), WT STAIN (teñido; azul fuerte), KO NT (no teñido; verde claro) y KO STAIN (teñido; verde fuerte).

Tabla 2. Resultados de ELISA

Cepa	Experimento	Estímulo	OD 450 nm				[pg/mL]				Normalización respecto al WT			
			WT 24h	KO 24h	WT 48h	KO 48h	WT 24h	KO 24h	WT 48h	KO 48h	WT 24h	KO 24h	WT 48h	KO 48h
BALB/c	E1	US	0.086	0.087	0.088	0.192	0.00	0.00	0.00	0.00	1	0	1	0
			0.081	0.079	0.142	0.201	0.00	0.00	0.00	0.00	1	0	1	0
			0.1	0.091	0.096	0.109	0.00	0.00	0.00	0.00	1	0	1	0
		LPS	1.255	0.89	1.14	0.894	3926.36	2546.83	3491.71	2561.94	1	0.65	1	0.73
			1.349	0.943	1.156	0.992	4281.63	2747.14	3552.18	2932.34	1	0.64	1	0.83
			1.73	0.896	1.068	0.934	5721.64	2569.50	3219.58	2713.13	1	0.45	1	0.84
		BCG	1.05	1.179	1.264	1.449	15901.01	18360.97	19981.88	23509.73	1	1.15	1	1.18
			1.289	1.289	1.055	1.112	20458.62	20458.62	15996.36	17083.32	1	1	1	1.07
			2.173	1.347	-	-	37316.04	21564.65			1	0.58		
	E3	US	0.111	0.256	0.13	0.189	0	947.27	47.71	468.93	1	0	1	0
			0.12	0.156	0.126	0.186	0	233.33	19.15	447.51	1	0	1	0
			0.096	0.23	0.119	0.215	0	761.65	0	654.56	1	0	1	0
		LPS	0.922	0.337	0.387	0.268	11404.22	3051.13	3765.06	2065.89	1	0.27	1	0.55
			0.419	0.393	0.308	0.283	4221.99	3850.74	2637.04	2280.07	1	0.91	1	0.86
			0.433	0.544	0.261	0.322	4421.89	6006.83	1965.94	2836.94	1	1.36	1	1.44
		BCG	1.506	0.799	0.775	0.681	98715.16	48239.63	46526.18	39815.15	1	0.49	1	0.86
			1.096	0.746	0.858	0.765	69443.64	44455.75	52451.87	45812.24	1	0.64	1	0.87
			0.747	0.981	0.768	0.768	44527.15	61233.33	46026.42	46026.42	1	1.38	1	1.00
		Ni-NTA	1.32	0.543	0.134	0.144	7312.08	2564.38	65.27	126.38	1	0.35	1	1.94
			0.394	1.193	0.164	0.141	1653.95	6536.07	248.58	108.04	1	3.95	1	0.43
			0.176	0.491	0.137	0.148	321.90	2246.65	83.60	150.82	1	6.98	1	1.80
		Cpn60.2	0.802	0.639	0.482	0.989	4146.95	3150.97	2191.65	5289.57	1	0.76	1	2.41
			0.655	1.066	0.423	0.846	3248.73	5760.07	1831.15	4415.80	1	1.77	1	2.41
		DnaK	1.424	0.545	0.472	0.417	11154.46	3616.28	2990.25	2518.58	1	0.32	1	0.84
0.812	1.144		0.495	0.489	5906.04	8753.22	3187.49	3136.04	1	1.48	1	0.98		

			0.63	1.347	0.494	0.521	4345.23	10494.12	3178.92	3410.46	1	2.42	1	1.07
E4	US		0.085	0.083	0.079	0.093	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.094	0.08	0.082	0.093	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.078	0.078	0.094	0.102	0	0	0	0	1	0	1	0
	LPS		0.355	0.374	0.311	0.391	1819.16	1957.19	1499.52	2080.69	1	1.08	1	1.39
			0.43	0.406	0.404	0.399	2364.01	2189.65	2175.13	2138.80	1	0.93	1	0.98
			0.401	0.323	0.409	0.691	2153.33	1586.69	2211.45	4260.07	1	0.74	1	1.93
	BCG		0.79	0.747	0.787	0.759	24896.35	23334.45	24787.38	23770.33	1	0.94	1	0.96
			0.893	0.645	0.738	0.683	28637.62	19629.50	23007.54	21009.77	1	0.69	1	0.91
			0.787	0.505	0.824	0.557	24787.38	14544.26	26131.33	16433.06	1	0.59	1	0.63
	Ni-NTA		0.105	0.127	0.124	0.11	1.29	69.68	60.35	16.83	1	54.20	1	0.28
			0.113	0.116	0.116	0.109	26.16	35.48	35.48	13.72	1	1.36	1	0.39
			0.123	0.115	0.123	0.111	57.24	32.37	57.24	19.94	1	0.57	1	0.35
	Cpn60.2		0.638	0.586	0.563	0.557	1658.24	1496.59	1425.09	1406.43	1	0.90	1	0.99
			0.798	0.627	0.53	0.508	2155.64	1624.04	1322.50	1254.11	1	0.75	1	0.95
			0.837	0.462	0.42	0.461	2276.88	1111.10	980.54	1107.99	1	0.49	1	1.13
	DnaK		0.606	0.651	0.484	0.411	2187.74	2384.08	1655.43	1336.92	1	1.09	1	0.81
			0.717	0.602	0.61	0.333	2672.04	2170.28	2205.19	996.60	1	0.81	1	0.45
			0.636	0.529	0.597	0.355	2318.63	1851.77	2148.47	1092.59	1	0.80	1	0.51
E5	US		0.103	0.13	0.105	0.376	0	28.65	0	1083.48	1	0	1	0
			0.101	0.145	0.113	0.106	0	92.97	0	0	1	0	1	0
			0.209	0.117	0.097	0.11	367.40	0.00	0	0	1	0	1	0
	LPS		0.478	0.405	0.293	0.336	5064.43	4022.08	2422.86	3036.85	1	0.79	1	1.25
			0.547	0.519	0.317	0.388	6049.67	5649.87	2765.55	3779.34	1	0.93	1	1.37
			0.412	0.363	0.373	0.305	4122.03	3422.37	3565.16	2594.20	1	0.83	1	0.73
E6	US		0.095	0.105	0.114	0.137	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.093	0.103	0.102	0.109	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.139	0.13	0.151	0.094	0	0	0	0	1	0	1	0
	LPS		0.673	0.628	0.674	0.586	2458.55	2236.77	2463.48	2029.78	1	0.91	1	0.82

			0.712	0.693	0.617	0.527	2650.76	2557.12	2182.56	1739.00	1	0.96	1	0.80
			0.674	0.614	0.55	0.511	2463.48	2167.78	1852.36	1660.15	1	0.88	1	0.90
		BCG	1.092	1.129	1.055	1.094	22617.87	23529.63	21706.11	22667.15	1	1.04	1	1.04
			1.037	1.164	1.046	1.043	21262.55	24392.11	21484.33	21410.40	1	1.15	1	1.00
			1.046	0.991	1.015	0.993	21484.33	20129.00	20720.42	20178.29	1	0.94	1	0.97
		Ni-NTA	0.124	0.126	0.108	0.155	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.144	0.128	0.13	0.142	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.128	0.115	0.135	0.111	0	0	0	0	1	0	1	0
		Cpn60.2	0.938	1.046	1.003	0.887	1610.97	1838.75	1748.06	1503.41	1	1.14	1	0.86
			1.012	0.93	1.034	0.849	1767.04	1594.10	1813.44	1423.27	1	0.90	1	0.78
			1.017	0.928	1.037	0.853	1777.59	1589.88	1819.77	1431.71	1	0.89	1	0.79
		DnaK	1.065	0.943	1.237	1.167	2636.94	2275.82	3146.07	2938.86	1	0.86	1	0.93
	1.158		0.909	1.2	1.162	2912.22	2175.18	3036.54	2924.06	1	0.75	1	0.96	
	1.061		1.211	1.192	1.18	2625.10	3069.10	3012.86	2977.34	1	1.17	1	0.99	
	E7	US	0.092	0.136	0.095	0.089	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.096	0.144	0.137	0.099	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.107	0.099	0.699	0.139	0	0	485.13	0	1	0	1	0
		LPS	1.289	1.172	1.052	0.915	5491.86	4915.37	4324.09	3649.06	1	0.90	1	0.84
			1.185	1.165	1.098	1.072	4979.42	4880.88	4550.75	4422.64	1	0.98	1	0.97
			1.211	0.982	1.059	0.981	5107.53	3979.18	4358.58	3974.26	1	0.78	1	0.91
BCG		1.828	1.708	1.493	1.437	40738.31	37781.94	32485.12	31105.48	1	0.93	1	0.96	
		1.741	0.814	1.6	1.378	38594.94	15757.01	35121.21	29651.93	1	0.41	1	0.84	
		1.814	1.632	1.57	1.486	40393.40	35909.57	34382.12	32312.66	1	0.89	1	0.94	
Ni-NTA		0.135	0.133	0.127	0.133	0	0	0	0	1	0	1	0	
		0.132	0.175	0.171	0.176	0	1.23	0	0	1	0	1	0	
		0.142	0.151	0.324	0.166	0	0	315.40	0	1	0	1	0	
Cpn60.2		1.441	1.202	1.304	1.076	2670.61	2166.68	2381.75	1901.00	1	0.81	1	0.80	
		1.694	1.273	1.56	1.094	3204.07	2316.38	2921.53	1938.96	1	0.72	1	0.66	
		1.653	1.262	1.576	1.015	3117.62	2293.19	2955.26	1772.39	1	0.74	1	0.60	

		DnaK	2.125	1.732	1.443	1.283	5772.41	4609.39	3754.15	3280.66	1	0.80	1	0.87
			1.796	1.876	1.617	1.471	4798.79	5035.54	4269.07	3837.01	1	1.05	1	0.90
			2.032	1.909	1.646	1.328	5497.19	5133.20	4354.89	3413.83	1	0.93	1	0.78
C57BL/6	E1	US	0.078	0.083	0.084	0.081	0	0	0	0	1	0	1	0
			0.086	0.082	0.086	0.109	0	0	0	16.03	1	0	1	0
			-	0.083	-	0.588	-	0	-	1755.91	1	0	1	0
		LPS	0.533	0.334	0.551	0.304	3112.26	1666.60	3243.02	1448.66	1	0.54	1	0.45
			0.568	0.373	0.562	0.305	3366.52	1949.92	3322.94	1455.93	1	0.58	1	0.44
			-	0.332	-	0.312		1652.07		1506.78	-	-	-	-
		BCG	1.09	0.605	1.21	0.875	35793.28	18176.57	40152.05	27983.81	1	0.51	1	0.70
			1.007	0.557	1.205	0.691	32778.46	16433.06	39970.43	21300.36	1	0.50	1	0.53
			0.928	0.538	1.331	0.606	29908.93	15742.92	44547.14	18212.89	1	0.53	1	0.41
	Ni-NTA	0.088	0.086	0.083	0.086	0	0	0	0	1	0	1	0	
		0.097	0.087	0.094	0.108	0	0	0	10.61	1	0	1	0	
		-	0.082	-	0.225	-	0	-	374.33	-	-	-	-	
	Cpn60.2	0.338	0.234	0.391	0.234	725.62	402.31	890.38	402.31	1	0.55	1	0.45	
		0.344	0.258	0.422	0.222	744.27	476.92	986.75	365.01	1	0.64	1	0.37	
		0.318	0.295	0.447	0.296	663.45	591.95	1064.47	595.05	1	0.89	1	0.56	
	DnaK	0.556	0.306	0.625	0.353	1969.58	878.79	2270.63	1083.86	1	0.45	1	0.48	
		0.454	0.25	0.684	0.343	1524.54	634.46	2528.06	1040.23	1	0.42	1	0.41	
		0.479	0.601	0.71	0.374	1633.62	2165.92	2641.50	1175.49	1	1.33	1	0.45	
	E2	US	0.125	0.106	0.143	0.126	7.21	0	84.40	11.50	1	0	1	0.14
			0.094	0.116	0.158	0.11	0	0	148.72	0	1	0	1	0
			0.105	0.132	0.128	0.16	0	37.23	20.08	157.29	1	0	1	7.83
LPS		0.288	0.352	0.44	0.302	2351.46	3265.31	4521.84	2551.37	1	1.39	1	0.56	
		0.517	0.395	0.475	0.297	5621.31	3879.30	5021.60	2479.97	1	0.69	1	0.49	
					5864.05	4578.96	4464.73	3236.75	1	0.78	1	0.72		
E3	US	0.115	0.147	0.093	0.118	0	0	0	0	1	0	1	0	
		0.097	0.117	0.153	0.094	0	0	0	0	1	0	1	0	

		0.097	0.132	0.087	0.234	0	0	0	34.03	1	0	1	0
	LPS	2.25	1.098	1.88	0.882	10230.72	4553.14	8407.19	3488.60	1	0.45	1	0.41
		2.034	0.968	1.755	0.953	9166.17	3912.45	7791.13	3838.52	1	0.43	1	0.49
		1.984	0.818	1.582	0.833	8919.75	3173.18	6938.51	3247.11	1	0.36	1	0.47
	BCG	2.692	1.926	2.499	1.724	62045.45	43169.49	57289.50	38191.76	1	0.70	1	0.67
		2.475	1.884	2.376	1.681	56698.08	42134.52	54258.50	37132.15	1	0.74	1	0.68
		2.41	1.817	2.224	1.799	55096.34	40483.49	50512.88	40039.93	1	0.73	1	0.79
	Ni-NTA	0.121	0.18	0.19	0.262	0	12.34	33.43	185.28	1	0	1	5.54
		0.186	0.189	0.156	0.15	24.99	31.32	0	0	1	1.25	1	0
		0.138	0.28	0.175	0.144	0	223.24	1.79	0	1	0	1	0
	Cpn60.2	2.528	1.173	2.433	1.249	4964.32	2106.59	4763.96	2266.88	1	0.42	1	0.48
		2.291	1.408	2.502	1.191	4464.48	2602.21	4909.48	2144.56	1	0.58	1	0.44
		2.342	1.387	2.257	1.366	4572.04	2557.92	4392.77	2513.64	1	0.56	1	0.57
	DnaK	2.994	1.321	2.836	1.729	8346.84	3394.71	7879.15	4602.40	1	0.41	1	0.58
		2.879	1.327	2.648	1.598	8006.43	3412.47	7322.67	4214.64	1	0.43	1	0.58
		2.823	1.43	3.05	1.727	7840.67	3717.35	8512.60	4596.48	1	0.47	1	0.54
E4	US	0.158	0.127	0.227	0.152	0	0	48.63	0	1	0	1	0
		0.152	0.122	0.132	0.133	0	0	0	0	1	0	1	0
		0.125	0.116	0.154	0.108	0	0	0	0	1	0	1	0
	LPS	0.892	0.437	0.747	0.37	6636.13	2428.34	5295.18	1808.73	1	0.37	1	0.34
		0.724	0.423	0.653	0.443	5082.48	2298.87	4425.88	2483.82	1	0.45	1	0.56
		0.687	0.428	0.701	0.385	4740.31	2345.11	4869.78	1947.45	1	0.49	1	0.40
	BCG	1.943	1.292	1.889	1.38	87142.98	55066.40	84482.25	59402.41	1	0.63	1	0.70
		1.838	1.205	1.982	1.237	81969.34	50779.67	89064.62	52356.40	1	0.62	1	0.59
		2.059	1.219	1.817	1.42	92858.62	51469.49	80934.61	61373.32	1	0.55	1	0.76
	Ni-NTA	0.192	0.15	0.153	0.22	65.04	0	0	168.62	1	0	1	0
		0.186	0.193	0.494	0.174	42.85	68.74	1182.19	0	1	1.60	1	0
		0.178	0.191	0.221	0.168	13.25	61.34	172.32	0	1	4.63	1	0
	Cpn60.2	0.857	0.654	1.143	0.602	2524.98	1774.05	3582.94	1581.70	1	0.70	1	0.44

DnaK	0.93	0.542	0.844	0.671	2795.02	1359.75	2476.89	1836.94	1	0.49	1	0.74
	0.949	0.89	0.786	0.519	2865.30	2647.05	2262.34	1274.67	1	0.92	1	0.56
	1.121	1.148	1.637	0.659	4664.08	4797.11	7206.55	2387.67	1	1.03	1	0.33
	1.059	0.94	0.902	0.621	4358.58	3772.24	3585.00	2200.44	1	0.87	1	0.61
	1.04	0.802	0.879	0.621	4264.97	3092.27	3471.67	2200.44	1	0.73	1	0.63

Tabla 2 Los resultados graficados de ELISA de cada experimento realizado de ambas cepas. Los [pg/mL] están multiplicados por su factor de dilución: E1 US (unstimulated, no estimulado) = 10, LPS = 10, BCG = 20, E2 y E3 US (unstimulated, no estimulado) = 3.33, LPS = 6.66, BCG = 33.3, Ni-NTA = 2.85, Cpn60.2 = 2.85 y DnaK = 4. Los valores en rojo fueron excluidos del análisis.

A)

[pg/mL]	OD (450 nm)
0	0.143
31.25	0.227
62.5	0.324
125	0.541
250	0.686
500	1.088
1000	1.943

B)

mTNF- α Std Curve

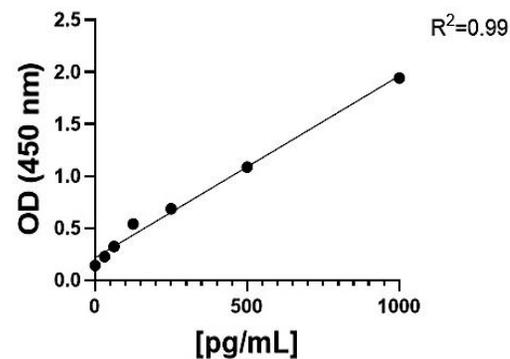


Figura 11 Curva estándar. (A) Valores obtenidos de absorbancia correspondientes a [pg/mL]. (B) Grafica de curva estándar representativa de al menos tres experimentos independientes.