

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Activación *in vitro* de LcB de pacientes con tuberculosis pulmonar inducida por la proteína PE_PGRS33

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

1942

Presenta:

David Ortega Tirado

Hermosillo, Sonora

Junio de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis profesional de **David Ortega Tirado**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.

Dra. Adriana Garibay Escobar
Directora de Tesis

Dr. Eduardo Ruíz Bustos
Secretario

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Vocal

M.C. Moisés Navarro Navarro
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas contribuyeron para hoy poder culminar este trabajo, fruto de mi esfuerzo y su ayuda y por eso a ello agradezco:

Primeramente a los integrantes y alumnos del Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica (CABB), por permitirme ser parte de su grupo y así poder culminar este proyecto.

A mi directora de tesis, la Dra. Adriana Garibay por haberme abierto las puertas de su grupo de trabajo y por siempre confiar en mí y por sus consejos.

Al Dr. Fernando Villegas y a las enfermeras del Centro de Salud Lomas de Madrid, así como al personal del área de epidemiología del Centro de Salud Los Naranjos por su invaluable ayuda en la consecución de los pacientes.

A la maestra Judith y a la maestra Lucila por su ayuda al proporcionarme todo lo necesario para realizar mi trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme salud y tenderme su mano para así poder alcanzar un logro más de los que confío haya muchos más.

A mis padres, **Ana Bella** y **David**, por ser un ejemplo de amor y dedicación, por brindarme su apoyo, cariño y comprensión, por poner su esfuerzo de corazón y alma en hacer que hoy alcanzara una de mis más grandes metas. A ellos, que en parte debo el hombre que ahora soy, pues sus valores y enseñanzas han sido mi más grande guía en el camino de la vida. A ellos, pues mejores padres Dios no pudo haberme concedido.

A mis queridos hermanos, **Saúl** y **Daisy**, con los que he compartido tantas alegrías, con los que a pesar de haber tenido nuestras diferencias nuestros caminos aún siguen unidos, ya que nuestro amor de hermanos ha sido más fuerte.

A mi tío **Florencio**, por cuidar y velar por mí y ayudarme de manera incondicional a alcanzar esta meta. A mi tía **Silvia (Piva)**, pues sé que siempre formo parte de sus pensamientos y oraciones. A mi tío **David (†)**, que si bien Dios decidió llamarlo a su lado, a cambio me concedió un ángel que cuida y vela mis pasos.

A mi directora de tesis, la **Dra. Adriana Garibay**, por darme su confianza y por ser un gran ejemplo de compromiso y dedicación.

A **Adriana Santeliz** por enseñarme todo lo necesario para lograr cumplir con este proyecto, por brindarme su gran e incondicional amistad y por tantas historias alegres y divertidas que compartimos en cada una de nuestras cesiones al frente del citómetro.

A mis queridos amigos **Carlos**, **Jorge** y **Erika** por compartir todos esos buenos momentos conmigo, por permitirme entrar en su vida y conocerlos. De manera especial a **Jorge**, quien se convirtió en un gran amigo y me enseñó a no juzgar a un libro por su portada.

A **Cinthya**, **Enrique** y **Marimar**, con quienes he reído y compartido inolvidables momentos y cuya amistad ha logrado resistir el paso del tiempo y la distancia.

A mi gran amiga del alma **Carolina Domínguez**, quién no sólo me abrió las puertas de su casa, sino también las puertas de su corazón y me permitió conocer a tan valiosa persona con la que he compartido momentos buenos y otros pocos malos, así como lágrimas y risas.

Finalmente, pero no menos importante, a mi especial y muy estimado amigo **Francisco Robles**, a quién le agradezco con el corazón el haberme brindado la oportunidad de conocer a tan gran ser humano de corazón noble y valiente, quien estoy seguro siempre será mi amigo, pues conmigo llevo y llevaré una enseñanza la cual es tal vez la más valiosa que pudo haberme dado: el verdadero significado de la fuerza y la perseverancia.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE TABLAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
OBJETIVOS	12
Objetivo General	12
Objetivos Particulares	12
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	16
Aspectos Generales de la Tuberculosis	16
Respuesta Inmune en Tuberculosis	19
Inmunidad Innata	19
Inmunidad Adaptativa	21
El Papel de las Células B en la Inmunidad contra <i>M. tuberculosis</i>	24
Factores de Virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	30
La Familia de Proteínas PE y PPE	33
Proteína PE_PGRS33 de <i>M. tuberculosis</i>	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Sujetos de estudio	39
Muestras	39
Activación a corto plazo	40
Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)	40
Estimulación de las PBMC	41

Evaluación de la Activación, Proliferación y Diferenciación de LcB	41
Medición de la Expresión de los Receptores CD69, CD38 y HLA-DR	42
Evaluación de la Proliferación	42
Índice de Estimulación	43
Análisis por Citometría de Flujo	43
Análisis de Datos	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Activación policlonal a corto plazo de LcB	45
Expresión de CD69 en LcB Estimulados con PE_PGRS33	48
Expresión de HLA-DR en LcB Estimulados con PE_PGRS33	51
Proliferación de LcB Estimulados con PE_PGRS33	53
Expresión de CD38 en LcB Estimulados con PE_PGRS33	56
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
CFP10	Proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa
CFSE	Éster de succinidimil de carboxifluoresceína
ChoD	Colesterol oxidasa
ESAT6	Antígeno de secreción temprana 6
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HBHA	Hemaglutinina de unión a heparina
IAC	Inmunidad adquirida celular
IFN-γ	Interferón gamma
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IMF	Intensidad media de fluorescencia
iNOS	Sintetasa de óxido nítrico inducible
IRAK	Cinasa asociada a receptor de interleucina
kDa	KiloDaltones
LcB	Linfocito B
LcT	Linfocito T
LXA4	Lipoxina A4
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica

PBS	Regulador de fosfatos salino
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridinin Chlorophyl Protein
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PHA	Fitohemaglutinina
pIgR	Receptor polimérico de inmunoglobulina.
PMA	Forbol miristato acetato
PPD	Derivado proteico purificado
PRRs	Receptores de patrones conservados
RI	Respuesta inmune
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
T7SS	Sistema de secreción de tipo 7
TB	Tuberculosis
TLR	Receptores de tipo Toll
TLR2	Receptor de tipo Toll 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidad formadora de colonia
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Relación de edad y sexo entre pacientes y sujetos control	44
2. Índice de estimulación de LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control	56

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i>	17
2. Presentación del antígeno por los LcB a los LcT cooperadores CD4 ⁺	26
3. Forma en que la célula B modula la respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i>	27
4. Estructura y constituyentes celulares del granuloma tuberculoso	29
5. Estructura de los genes codificantes de las familias de proteínas PE y PPE	35
6. Representación esquemática de tres miembros de la subfamilia PE_PGRS	37
7. Gráficos representativos de la expresión de CD69 y HLA-DR en LcB activados policlonalmente a corto plazo	46
8. Expresión de CD69 en LcB activados policlonalmente a corto plazo	47
9. Expresión de HLA-DR en LcB activados policlonalmente a corto plazo	47
10. Expresión de CD69 en LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control estimulados con PE_PGRS33	49
11. Expresión de HLA-DR en LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control estimulados con PE_PGRS33	52
12. Proliferación de LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control estimulados con PE_PGRS33	55
13. Expresión de CD38 en LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control estimulados con PE_PGRS33	58

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar por citometría de flujo la activación, proliferación y diferenciación de LcB de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar por la proteína PE_PGRS33.

Objetivos Particulares

- Medir la activación a corto plazo de LcB de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar (estimulados con PMA e ionomicina) mediante la expresión CD69 y HLA-DR.
- Evaluar la capacidad proliferativa de LcB de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar inducida por la proteína PE_PGRS33.
- Medir la activación y diferenciación de LcB de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar a través de la expresión de CD69, HLA-DR y CD38. Lo anterior mediante una cinética de activación antígeno-específica.

RESUMEN

La tuberculosis (TB) constituye una infección bacteriana cuyo principal agente etiológico es *M.tuberculosis*. Uno de los principales factores contribuyentes a la epidemiología de la TB lo constituye la falta de una profilaxis eficiente, ello debido a que la única vacuna usada contra la TB, la BCG, ha demostrado tener distintos niveles de eficacia (0 a 80%).

Varios trabajos han ilustrado la importancia de los mecanismos de la inmunidad adaptativa celular para la protección en contra de *M. tuberculosis* y se ha relegado el papel de los linfocitos B (LcB).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta de la población de células B de pacientes con TB pulmonar estimuladas por la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* para conocer su capacidad inmunogénica sobre los LcB y coadyuvar en el conocimiento para la creación de una vacuna más eficiente contra la TB. Para lograr este objetivo, se estimularon células mononucleares de pacientes con TB pulmonar con la proteína PE_PGRS33 y PPD, y se evaluó la activación de los LcB, midiendo la expresión de CD69 y HLA-DR; su diferenciación se estudió midiendo la expresión de CD38; y, su proliferación, utilizando una tinción con carboxifluoresceína (CFSE). Todo lo anterior mediante citometría de flujo.

Los LcB de pacientes con tuberculosis pulmonar, estimulados con la proteína PE_PGRS33 y PPD, tienen una expresión de CD69 y HLA-DR mayor que los sujetos control; la expresión de CD38 inducida en LcB, tanto por la proteína de estudio como por PPD, fue similar. Sin embargo, se observó que los LcB de pacientes estimulados con PPD se diferenciaron a las 72 h, en tanto aquellos estimulados con la proteína PE_PGRS33 no lograron diferenciarse. En cuanto a la proliferación, basados en un valor del índice de estimulación mayor o igual a 3, sólo se encontró proliferación positiva en la población de LcB de pacientes estimulados con PPD, mostrando un índice de 5.85. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el grupo control en ninguno de los resultados anteriormente mencionados ($p>0.05$).

De acuerdo a los resultados anteriores, puede verse que la respuesta inmune de LcB de pacientes con tuberculosis pulmonar no es diferente de aquella que presentan los LcB de individuos sanos inducida por PE_PGRS33 y PPD en las condiciones aquí utilizadas.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) constituye una infección bacteriana cuyo principal agente etiológico es *M. tuberculosis*, y se caracteriza principalmente por la presencia de estructuras formadas por agregados de células inmunes llamados granulomas. Esta enfermedad se contagia de manera fácil y rápida al ser esparcida en el aire cuando una persona enferma con TB pulmonar tose, estornuda o habla. Puede llegar a tener un resultado fatal si no se trata de manera adecuada.

En general, una proporción relativamente pequeña de personas infectadas con *M. tuberculosis* desarrollará la enfermedad; no obstante, la probabilidad de que lo anterior ocurra es mayor para aquellos individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

El origen de la tuberculosis es tan antiguo como la propia historia de la humanidad y, con el paso del tiempo, se ha convertido en un grave problema epidemiológico pues datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) revelan que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* de la cual sólo del 5 al 10% tendrá el riesgo de desarrollar la infección activa, mientras que el resto presentará la forma latente de la infección. Este grave problema epidemiológico se sustenta aún más en el hecho de que cada año se reportan 9 millones de nuevos casos y 1.4 millones de muertes, posicionando a la TB como la segunda causa de muerte por un agente infeccioso a nivel mundial después del VIH (García y col., 2009; WHO, 2012).

La tuberculosis permanece como una de las principales amenazas para la humanidad pues, al paso del tiempo, su situación epidemiológica se ha agravado debido a un conjunto de factores, entre los cuales podemos mencionar los siguientes: la falta de una adecuada profilaxis, la aparición de cepas resistentes a múltiples drogas (lo que constituye un serio problema de salud pública), la asociación de la TB con el VIH (que presenta efectos sinérgicos y causa un creciente número de casos y muertes) y el agravamiento de las condiciones socioeconómicas en muchas áreas del mundo (García y col., 2009).

De todos los factores responsables que hacen a la TB un grave problema de salud global, la falta de una medida profiláctica es uno de los más graves y preocupantes. La BCG, la

única vacuna actualmente en uso contra la TB, a pesar de brindar protección en contra de las formas más severas de tuberculosis infantil su eficacia en contra de la tuberculosis pulmonar adulta es variable a través del mundo. Debido a esto, importantes esfuerzos en la investigación están siendo dirigidos a desarrollar una vacuna más efectiva contra esta enfermedad. Sin embargo, para cumplir con este objetivo, resulta de vital importancia conocer la respuesta inmune (RI) del organismo en contra de *M. tuberculosis*. Varios trabajos cuya finalidad ha sido elucidar tal RI, han ilustrado la importancia de los mecanismos de la inmunidad adaptativa celular (IAC) para la protección en contra de *M. tuberculosis* y, base a esto, se ha relegado el papel de los linfocitos B en la RI a la TB. No obstante, estudios recientes han demostrado que los LcB, a través de una variedad de interacciones con la IAC, juegan papeles importantes en la defensa del hospedero en contra de patógenos no virales intracelulares, incluyendo a *M. tuberculosis* (Maglione y Chan, 2009; Sebina y col., 2012).

Igualmente importante son las características bioquímicas de esta micobacteria, tales como la expresión de ciertas proteínas de superficie dentro de las cuales destaca la proteína PE_PGRS33, por ser ésta una de las más estudiadas y presentar características inmunogénicas importantes. Teniendo en cuenta que muchas vacunas efectivas provocan respuestas de tipo humoral y una de las tendencias actuales es desarrollar vacunas basadas en el uso de subunidades micobacterianas, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta de la población de células B de pacientes con TB pulmonar estimuladas por la proteína PE_PGRS33 para así conocer los efectos inmunogénicos de la misma sobre los LcB y coadyuvar en el conocimiento para el desarrollo de una vacuna eficiente contra la TB.

ANTECEDENTES

Aspectos Generales de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el complejo *M. tuberculosis*, siendo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*) el principal agente etiológico. Típicamente afecta los pulmones (TB pulmonar), pero también puede afectar otros sitios del cuerpo (TB extrapulmonar). La enfermedad es propagada en el aire por la liberación de secreciones a través de la tos, el estornudo o el habla de una persona infectada hacia otra en contacto estrecho. La inhalación de estas secreciones en forma de aerosol, constituye un elevado riesgo para que se produzca la infección; las mismas permanecen en el aire durante un período de tiempo actuando como reservorios del microorganismo. La principal puerta de entrada de estas partículas es el tracto respiratorio y debido a su pequeño tamaño llegan a alcanzar la parte inferior del mismo. Para que tenga lugar el asentamiento y desarrollo de la TB pulmonar, el microorganismo pasa por varias etapas sucesivas y el paso por cada una de ellas puede conllevar a tres posibles escenarios a los cuales un individuo se enfrenta durante el proceso de infección por *M. tuberculosis* (figura 1): primero, que el bacilo sea inmediatamente destruido por mecanismos de la respuesta inmune innata, los cuales aún no se encuentran caracterizados; segundo, que el individuo desarrolle tuberculosis activa (10 % de los individuos infectados), producto de una insuficiente respuesta protectora, resultando en la presencia de sintomatología y patología asociadas; y, la tercera posibilidad (que ocurre en un 90 % de los individuos infectados) es que desarrolle la forma latente de la enfermedad, que eventualmente pudiera reactivarse después de mucho tiempo desde la infección, por algún factor como la edad avanzada, desnutrición, patologías que comprometan el sistema inmune (diabetes, falla renal, terapia inmunosupresora), entre otros. Esta reactivación ocurre en el 5-10 % de los casos (Padilla, 2013).

La primera etapa comienza con la inhalación del bacilo tuberculoso: los macrófagos alveolares ingieren el bacilo y frecuentemente lo destruyen. En esta etapa la destrucción de la micobacteria depende de la actividad microbicida de los fagocitos del hospedero y los factores de virulencia de la micobacteria ingerida.

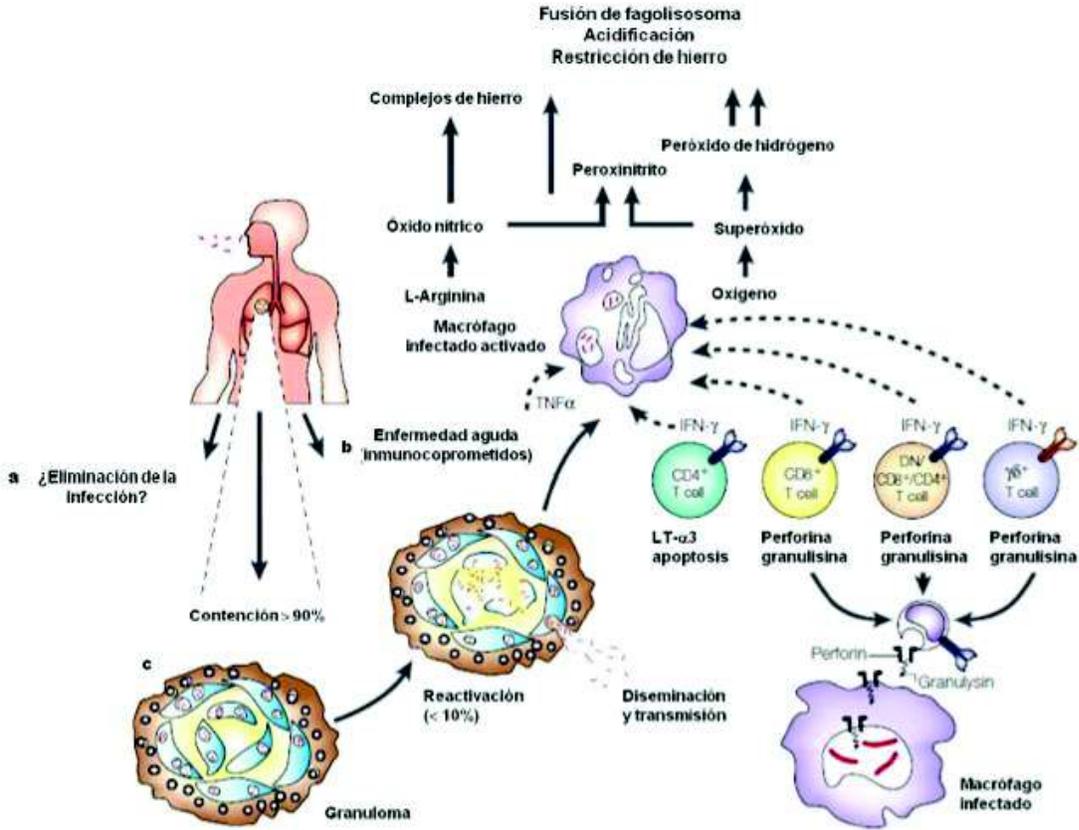


Figura 1. Respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. Existen tres posibles escenarios a los cuales un individuo se enfrenta durante el desarrollo de la infección. Que el individuo logre la destrucción del bacilo (a), que los sujetos inmunocomprometidos desarrollen la forma activa de la enfermedad (b), o que se presente la forma latente de la enfermedad (c) con la consecuente formación del granuloma y la posible reactivación de la enfermedad. Una variedad de distintas células inmunes interactúan y secretan diversas citocinas para activar los mecanismo bactericidas de los macrófagos y lograr así la eliminación del bacilo de la tuberculosis (Kaufmann, 2001).

En la segunda etapa, la micobacteria que escapa de la destrucción intracelular inicial se multiplicará dando lugar a la ruptura del macrófago. Cuando esto sucede los monocitos de la sangre y otras células inflamatorias son atraídas al pulmón; estos monocitos se diferenciarán en macrófagos y nuevamente ingerirán la micobacteria, pero no la destruirán. En esta etapa simbiótica la micobacteria crece logarítmicamente y se acumulan macrófagos provenientes de la sangre, pero prácticamente no ocurre daño tisular.

En la tercera etapa, dos a tres semanas después de la infección, se desarrolla la inmunidad mediada por linfocitos T (LcT), donde los LcT antígeno-específicos arriban y proliferan en las lesiones tempranas o tubérculos y entonces activan a los macrófagos para destruir a las micobacterias intracelulares. Subsecuentemente a esta fase, el crecimiento logarítmico de la bacteria cesa (van Crevel y col., 2002).

La necrosis sólida caseosa en estas lesiones primarias inhibe el crecimiento extracelular de la micobacteria y como resultado la infección se convierte en estacionaria o latente. La enfermedad puede progresar y la diseminación hematológica puede tener lugar después de la infección primaria, así como meses o años después (tuberculosis post-primaria), cuando el sistema inmune se debilita. La licuefacción del centro caseoso provee de excelentes condiciones para el crecimiento extracelular. La formación de la cavidad da lugar a la ruptura de los bronquios cercanos, permitiendo al bacilo diseminarse a través del espacio aéreo a otras partes del pulmón y fuera del medio pulmonar.

Finalmente, el resultado de la infección por *M. tuberculosis* dependerá del balance entre la muerte de la micobacteria y la extensión de la necrosis del tejido, su regeneración y la fibrosis.

Respuesta Inmune en Tuberculosis

Inmunidad Innata

M. tuberculosis es transmitida en forma de aerosol y, en gran parte, si no exclusivamente, habita en las células fagocíticas profesionales de los pulmones, incluyendo macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas. En ratones, la respuesta inmune innata temprana a *M. tuberculosis* se caracteriza por la acumulación progresiva de neutrófilos, monocitos inflamatorios, macrófagos intersticiales y células dendríticas profesionales. Conforme estas células son reclutadas, se infectan a causa de la población en expansión de la micobacteria y forman los granulomas tempranos. En otras enfermedades infecciosas, el reclutamiento de células fagocíticas restringe e inclusive elimina los patógenos invasores, mientras que el reclutamiento de fagocitos a los sitios de infección micobacteriana de hecho beneficia al patógeno durante los estadios tempranos de la infección, ya que proveen nichos celulares adicionales para la expansión de la población bacteriana (Ernst, 2012).

La primera línea de defensa del sistema inmune innato consiste en la captura del bacilo tuberculoso por los macrófagos alveolares. Esta interacción inicial se produce por el reconocimiento de los componentes de *M. tuberculosis* por múltiples receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) entre los cuales se encuentran los receptores del complemento, receptores de manosa, receptores de surfactantes, receptores tipo *Toll* y receptores *scavenger*. Estos PRRs están adaptados para reconocer componentes bioquímicos microbianos como lipoarabinomano manosilado (ManLam), trealosa dimicolato y N-glicolimuramil dipéptido, los cuales actúan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) desencadenando cascadas de señalización dentro del macrófago alveolar haciendo posible la actividad fagocítica que, de ser exitosa, culminará con la internalización de la micobacteria en los fagolisosomas y la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α (Mahboud, 2013).

La atención en el estudio de los PRRs ha sido enfocada hacia los receptores tipo *Toll* (TLR), mediadores filogenéticamente conservados de la inmunidad innata esenciales para el reconocimiento microbiano por parte de macrófagos y células dendríticas. Los miembros de

esta familia de receptores son proteínas transmembrana que contienen motivos repetidos ricos en leucina en sus dominios extracelulares, de manera similar a otras proteínas de reconocimiento de patrones del sistema inmune innato. El dominio citoplasmático de los receptores tipo *Toll* es homólogo al dominio de señalización del receptor de IL-1 y se une a IRAK, una serina cinasa que activa los factores de transcripción tales como NF- κ B (principal activador nuclear de citocinas proinflamatorias) para así lograr la señalización requerida para la producción de citocinas (Mahboud, 2013).

Dentro de la familia de receptores tipo *Toll*, el TLR2 tiene el mayor número de agonistas micobacterianos identificados, incluyendo lipoproteínas, fosfatidilinositol, mananos y lipomano; y es el responsable de reconocer, en mayor proporción, a *M. tuberculosis* en el pulmón (van Crevel y col., 2002; Ernst, 2012).

Aún con el previo conocimiento del papel sustancial que juegan los macrófagos como la primera y más importante línea de defensa de la inmunidad innata contra la TB, no puede dejar de ser resaltada la importante participación de otras células del sistema inmune innato durante el encuentro con el bacilo tuberculoso, como lo son los neutrófilos y las células NK. Los neutrófilos participan no sólo como células fagocíticas no específicas, sino como células secretoras de proteínas antibacterianas, principalmente la catelicidina LL-37. Además, los neutrófilos cargados con la bacteria fagocitada se vuelven apoptóticos, promoviendo la activación de los macrófagos. En lo que a las células NK se refiere, éstas se especializan en reconocer y destruir células infectadas del hospedero. Durante este proceso, secretan IFN- γ que activa a los macrófagos induciéndolos a producir IL-12, IL-15 e IL-18, las cuales activan a las células T CD8⁺ formando un enlace entre la respuesta inmune innata y el sistema inmune adaptativo.

El estadio inmune innato de la tuberculosis es dinámico, aunque basados en la evidencia, se ha indicado que es un estado de infección en el cual el patógeno domina y donde las respuestas inmunes innatas tienen muy poco efecto antibacteriano inmediato (Ernst, 2012). Por lo tanto, la importancia de la inmunidad innata puede ser atribuida a su papel en establecer un ambiente que permita el establecimiento de una consecuente respuesta inmune adaptativa.

Inmunidad Adaptativa

Cuando un individuo se enfrenta a la infección con *M. tuberculosis*, los mecanismos de defensa desarrollados por la inmunidad innata no son suficientes para controlar la infección ni el progresivo crecimiento de la población micobacteriana. Por lo tanto, se hace necesario el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa capaz de controlar la infección. Aun así, es importante mencionar la profunda influencia del sistema inmune innato sobre los tipos de mecanismos inmunes adquiridos que se generan, y viceversa, la respuesta inmune adquirida ejecuta varios de sus funciones efectoras a través de la activación de los componentes de la inmunidad innata.

La respuesta inmune adaptativa puede ser dividida en dos mecanismos mediados por células, por un lado la respuesta inmune celular que incluye la activación de las células T y sus mecanismos efectoras; y por otro la respuesta inmune humoral, donde se llevan a cabo la maduración de las células B con la consecuente producción de anticuerpos. Ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes, pues tanto las células T cooperadoras son requeridas para la maduración de los anticuerpos, cambio de isotipo y la memoria; así como las células B también funcionan como células presentadoras de antígeno activando a los linfocitos T de una manera antígeno-específica (Palomino, 2007).

La inmunidad celular se encuentra a cargo de las células T, pudiendo ser éstas de distintos tipos, como las células T $\alpha\beta$ (CD4⁺ y CD8⁺), células T restringidas a las moléculas CD1 y células T $\gamma\delta$. De estas estirpes celulares, son las células CD4⁺ las principales efectoras de la respuesta inmune celular (Padilla, 2013).

Los eventos correspondientes a la inmunidad celular comienzan cuando las células T CD4⁺ reconocen los antígenos proteicos de *M. tuberculosis* presentados por macrófagos o células dendríticas en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), esto gracias a que la residencia de la micobacteria dentro del fagosoma asegura que los antígenos tengan fácil acceso a la maquinaria de procesamiento de antígeno del MHC-II. Es así como los LcT CD4⁺ son activados y entran en un proceso de expansión clonal y migran fuera de los nódulos linfáticos hacia el sitio de infección en el pulmón, como células T efectoras. Este proceso es guiado por citocinas secretadas por varias células inflamatorias. Una vez en el

sitio de la infección, dichas células efectoras secretan IFN- γ , una citocina clave al promover la activación de la maquinaria microbicida de los macrófagos causando que éstos secreten IL-18, entre otras citocinas, que parecen ser parte de la respuesta protectora de tipo Th1 (Mahboud, 2013).

Debido a su localización intracelular, el bacilo tuberculoso no está expuesto a los anticuerpos y, por lo tanto, la respuesta inmune humoral es considerada como no protectora. Sin embargo, durante los pasos iniciales de la infección, los anticuerpos solos o en conjunción con las citocinas adecuadas pueden efectuar importantes funciones, tal como el bloquear la entrada de bacterias a nivel de mucosas (Palomino, 2007).

Los anticuerpos pueden ser explotados de dos maneras en el manejo clínico y control de la TB: como herramientas de diagnóstico serológico, y como activos participantes en la protección contra la enfermedad, papel en el cual centraremos nuestra atención.

Como armas de protección contra la TB, los anticuerpos podrían mejorar la inmunidad a través de varias vías incluyendo la neutralización de toxinas, opsonización, activación del complemento, la promoción de liberación de citocinas, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, y mejorando la presentación de antígeno. En este sentido, datos de varios laboratorios indican que los anticuerpos anti-micobacterianos juegan un papel importante en varios estadios de la respuesta del hospedero a la infección (Palomino, 2007).

Además de mejorar la protección en contra de la infección por *M. tuberculosis* por los mecanismos previamente mencionados, existe evidencia de la función estimuladora ejercida por anticuerpos específicos policlonales sobre la inmunidad celular. Tales pruebas encuentran su fundamento en el estudio, realizado por de Valliere y colaboradores (2005), donde se obtuvieron muestras de suero con anticuerpos específicos anti-micobacterianos a partir de voluntarios vacunados con BCG en dos ocasiones, por vía intradérmica. En estas muestras fueron encontrados títulos significativos de anticuerpos anti – lipidoarabinomano (LAM). En presencia de estos anticuerpos inducidos en respuesta a la BCG, se observó un aumento de los efectos microbicidas de macrófagos y neutrófilos sobre la micobacteria, así como una mejor internalización de ésta en células fagocíticas. Sumado a estos efectos, se encontró también el aumento en la producción de IFN- γ por células CD4⁺ y CD8⁺ (de Valliere y col., 2005).

Igualmente importante es citar el papel que los anticuerpos de tipo monoclonal pueden desempeñar en el control de la TB. Algunos de ellos como el 3941E4 y el 4058D2 (ambos de isotipo IgG), son capaces de impedir la diseminación de la micobacteria hacia otros tejidos al unirse a la hemaglutinina de unión a heparina (HBHA). Otros, como el TBA63, se les atribuye eficacia protectora a través de estudios experimentales realizados en ratones a los cuales se les administró dicho anticuerpo previamente a ser infectados por vía intranasal con *M. tuberculosis*. Los resultados mostraron un decremento significativo de las UFC en pulmones de los ratones infectados, lo que fue traducido en cambios histopatológicos menores y en una mejor organización y formación de los granulomas; hecho que sugiere fuertemente una cercana interacción entre la inmunidad mediada por anticuerpos y la inmunidad mediada por células para inducir protección en contra de patógenos intracelulares (Mahboud, 2013).

Existe una especial atención a los anticuerpos humanos secretados de isotipo IgA (hslgA) por ser éstos los que mayormente se asocian con la inmunidad protectora a nivel de mucosas, zonas con las que primeramente el bacilo tuberculosos interacciona una vez que infecta al hospedero. Un gran porcentaje de este isotipo de anticuerpo se encuentra en el calostro humano, sugiriendo así su papel en la protección inmune pasiva contra infecciones gastrointestinales y respiratorias. Por lo tanto, hallando su sustento en la información previa, se llevó a cabo un estudio donde primeramente se aislaron hslgA del calostro humano para posteriormente incubarlos con una cepa de *M. tuberculosis*, con la cual se inoculó un grupo de ratones. Los resultados obtenidos avalan la importancia de los hslgA en el combate hacia la infección por *M. tuberculosis*, ya que se mostró un decremento en el número de bacterias viables en el pulmón, así como también un incremento en la producción de iNOS (Álvarez y col., 2010). De manera consistente a estos resultados, también pudo apreciarse una mejor formación y organización de los granulomas junto con un mayor número de macrófagos activados en los pulmones.

Dentro de los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos de isotipo IgA brindan protección al hospedero contra la enfermedad, se encuentra la asociación de éstos con el plgR, que hace posible la neutralización intracelular de patógenos y antígenos durante su transporte de la zona basolateral a la apical de las células epiteliales. Otra vía de apoyo sugerida es aquella en la cual los anticuerpos IgA interactúan con Gal-3, logrando así interferir con la interacción de la micobacteria con la membrana fagosomal, lo que resulta en un decremento en la supervivencia bacteriana y su replicación en el fagosoma (Mahboud, 2013).

No hay duda de que la respuesta inmune humoral juega un papel más activo de lo que antes se pensaba en la inmunidad de la TB ya que, por medio de variados mecanismos, los anticuerpos pueden lograr interactuar de manera eficiente con la respuesta inmune celular para en conjunto orquestar una respuesta inmune adaptativa completa y eficaz mediante la cual el sistema inmune del hospedero logre atenuar la replicación de la micobacteria y con ello lograr controlar el progreso de la infección.

El Papel de las Células B en la Inmunidad contra *M. tuberculosis*

Varios trabajos ilustrando la importancia de los mecanismos de la inmunidad celular para la protección en contra de *M. tuberculosis* han relegado ampliamente la función de las células B en el campo de la TB. En contra de esto, estudios recientes han demostrado que los linfocitos B, a través de una variedad de interacciones con la respuesta inmune celular, juegan papeles previamente despreciados en la formación de la defensa del hospedero en contra de patógenos no virales intracelulares, incluyendo *M. tuberculosis* (Maglione y Chan, 2009).

La inmunidad adaptativa ha evolucionado en los vertebrados para incluir tanto componentes celulares como humorales, con las células T y B mediando estos efectos, respectivamente. Las células T promueven la destrucción apoptótica de células infectadas con patógenos ya sea directamente o mediante la liberación de citocinas de células inmunes vecinas, mientras que las células B producen anticuerpos que neutralizan la invasión y marcan a los agentes infecciosos para su destrucción. Sin embargo, existe una tendencia a separar estas dos armas de la respuesta inmune basada en el nicho biológico o ciclo de vida de los patógenos (si éste es intracelular o extracelular); pensando que solamente las células T pueden desarrollar una respuesta efectiva contra los patógenos intracelulares, incluyendo a *M. tuberculosis* (Divangahi, 2013). Aunque, la evidencia que soporta el hecho de que las células B también pueden ayudar a controlar patógenos intracelulares, sigue creciendo.

Estudios emergentes apoyan el papel de las células B y la respuesta humoral en la protección y formación de una respuesta inmune contra patógenos cuyos ciclos de vida requieren un ambiente intracelular como *Chlamydia trachomatis*, *Salmonella enterica*,

Leishmania major, *Francisella tularensis*, *Plasmodium spp* y *Ehrlichia chaffeensis* (Divangahi, 2013).

Ya se conoce la importancia del linfocito B como célula secretora de anticuerpos en la respuesta inmune contra la tuberculosis, no obstante, esta población de linfocitos juegan otros papeles en la defensa contra la tuberculosis, como lo son el interaccionar con las células T a través de mecanismos como la presentación de antígeno, la secreción de citocinas; y como piezas clave en el correcto mantenimiento y formación de los granulomas, agregados organizados y compactos de células inmunes que surgen en respuesta a un estímulo persistente (Ramakrishnan, 2012).

Los LcB son células presentadoras de antígeno profesionales con un notable impacto sobre las respuestas de las células T. Para llevar a cabo el proceso de presentación de antígeno, se necesita primeramente el procesamiento del mismo por parte de las células presentadoras de antígeno; esta fase comienza con la internalización del patógeno y sus productos vía endocitosis, incluyendo tanto fagocitosis como pinocitosis, después se ejecuta el catabolismo de las proteínas del patógeno a fragmentos peptídicos, que serán unidos a moléculas intracelulares del MHC de clase II para formar complejos péptido-MHC-II. Estos complejos serán expresados en la superficie de la membrana plasmática para su presentación a las células T CD4⁺ (Bobadilla y col., 2012).

El linfocito B inicia su activación una vez que éste captura antígenos a través de sus receptores de superficie (Maglione y Chan, 2009). Durante el proceso de presentación de antígeno se establece una cooperación entre células B y células T CD4⁺ antígeno-específicas. Esto es posible gracias a que las células B antígeno-específicas son capaces de presentar antígeno a las células T con un alto grado de eficiencia; primeramente las células B capturan el antígeno a través de sus inmunoglobulinas de superficie y posteriormente lo presentan como péptidos unidos a moléculas del MHC de clase II (figura 2). Como resultado de este proceso, los linfocitos B que interactúan con las células T antígeno-específicas comienzan su proceso de activación, trayendo como consecuencia el desarrollo de células B de memoria, así como de células plasmáticas secretoras de anticuerpos de alta afinidad (figura 3).

Como célula profesional presentadora de antígeno, las células B pueden influir en la respuesta de los linfocitos T hacia la infección, pues existe evidencia de que las células B

regulan la proliferación de linfocitos T en respuesta a antígenos, influyendo, por lo tanto, en el desarrollo de linfocitos T de memoria, tal como puede ser constatado en el estudio de un modelo de infección murino donde las células B fueron necesarias para el desarrollo de memoria por parte de los linfocitos T hacia patógenos intracelulares como *F. tularensis* y *L. monocytogenes*. Se sabe también, gracias al estudio de un modelo de infección viral, que las células B son capaces de prevenir la reactivación de la enfermedad a través de la presentación de antígeno al linfocito T.

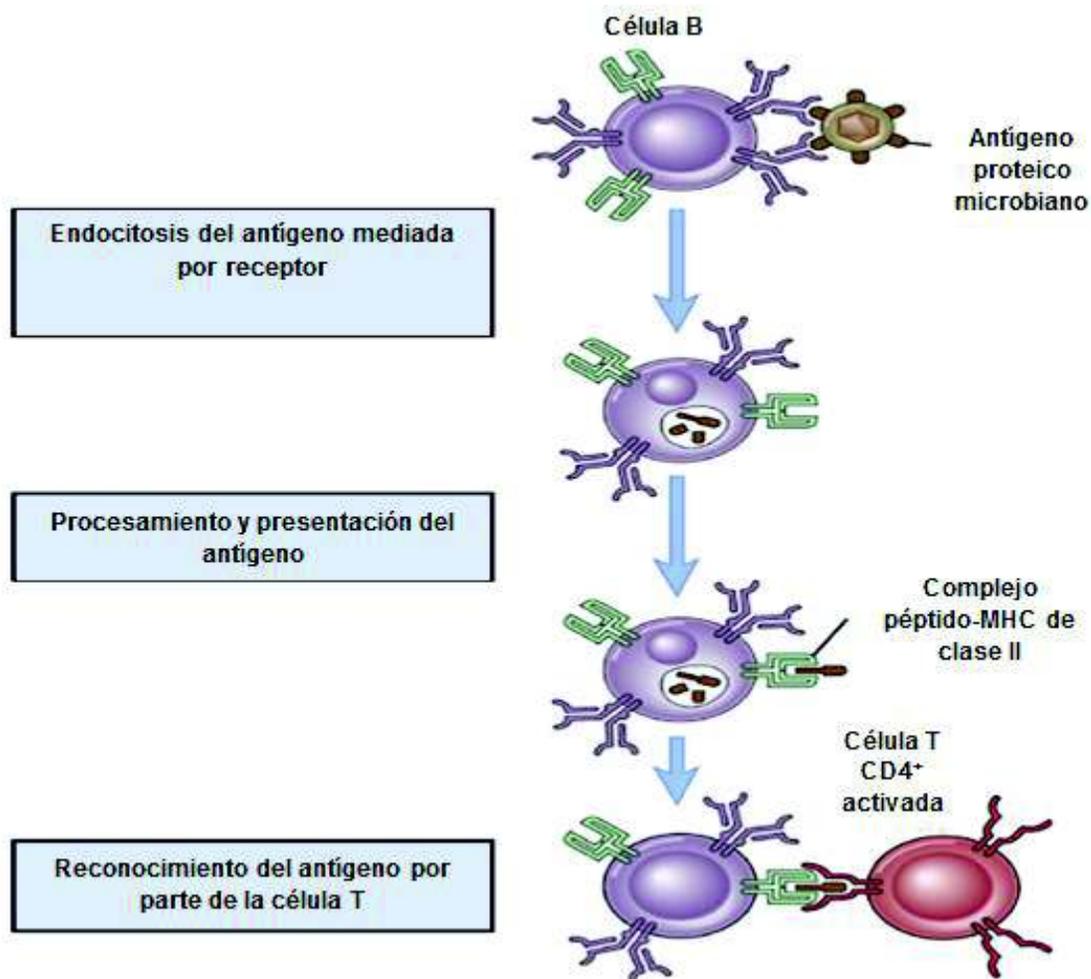


Figura 2. Presentación del antígeno por los LcB a los LcT cooperadores CD4⁺ (Abbas, 2006)

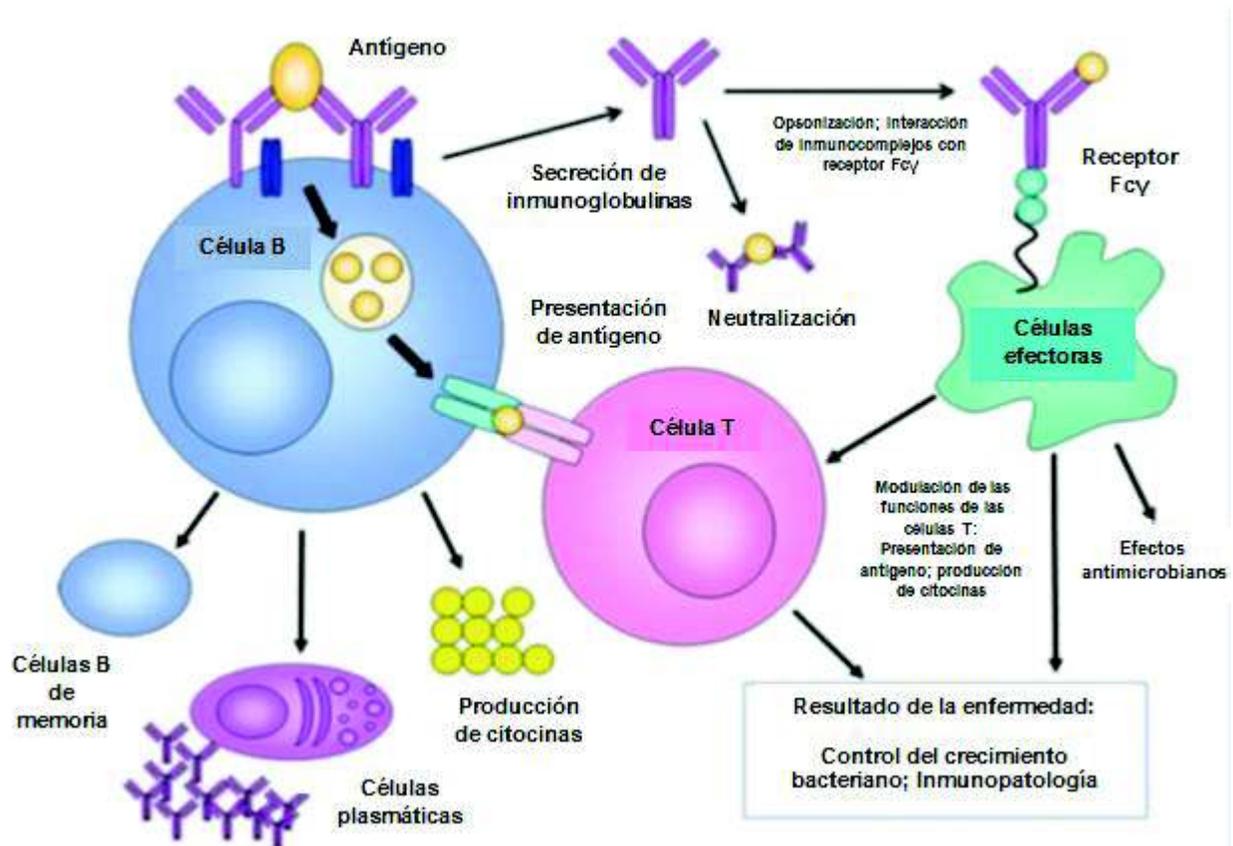


Figura 3. Forma en que la célula B modula la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. La producción de anticuerpos específicos para *M. tuberculosis* puede mediar la formación de un inmunocomplejo capaz de modular las funciones de células efectoras como células dendríticas y macrófagos. Las células B pueden servir como células presentadoras de antígeno e influir en la activación, polarización, funciones efectoras y en el establecimiento de memoria por parte de las células T. Los linfocitos B también pueden modular las funciones de células inmunes granulomatosas. En conjunto, estas funciones dependientes y no dependientes de anticuerpos de las células B, juegan un importante papel en determinar el resultado de la enfermedad en términos de la eliminación y control de la bacteria, así como también en el desarrollo de inmunopatología que pudiera dañar los tejidos y promover la diseminación (Divangahi, 2013).

La composición del medio ambiente inmunológico en el cual las células T CD4⁺ interactúan con las células presentadoras de antígeno, para así entrar en un proceso de expansión clonal, juega un papel crítico en determinar el camino del desarrollo del linaje celular. Las citocinas presentes en el sitio de interacción de las células T con las células presentadoras de antígeno influyen de manera considerable en el desarrollo de los linfocitos T CD4⁺. En este contexto, los LcB producen una amplia variedad de citocinas, ya sea de manera constitutiva o en presencia de antígenos, ligandos de receptores de tipo *Toll*, o células T. Basados en el patrón de citocinas que producen, los LcB han sido divididos en diferentes subpoblaciones efectoras: células B efectoras de tipo 1 (Be1), efectoras de tipo 2 (Be2) y células regulatorias (B10). Durante su interacción inicial con los LcT y el antígeno, los LcB estimulados dentro de un ambiente de citocinas de tipo Th1 se vuelven células efectoras de tipo 1 capaces de producir IFN- γ e IL-12, así como también TNF- α , IL-10 e IL-6. En cambio, aquellas células B estimuladas en un ambiente de citocinas Th2, se transformarán en células B efectoras de tipo 2 con la habilidad de secretar IL-2, linfotoxina, IL-4 e IL-13; además, TNF- α , IL-10 e IL-6. Por lo tanto, en base al patrón de citocinas que secreten, estas subpoblaciones efectoras de LcB puede influir en el tipo de respuesta desarrollada por parte de las células T. La subpoblación Be1 inducirá la diferenciación de LcT a LcT Th1; mientras que la subpoblación Be2 provocará una respuesta de tipo Th2 por parte de los linfocitos T (Divangahi, 2013).

Con base en lo previamente discutido, se pone de manifiesto un papel más activo para la célula B en la respuesta inmune del hospedero contra *M. tuberculosis*, pues, además de cumplir con la función de secretar anticuerpos, los LcB son capaces de interactuar e influir en el tipo de respuesta presentada por parte de los linfocitos T.

Dentro de las primeras etapas que conllevan al desarrollo de la TB pulmonar se encuentra la inhalación de *M. tuberculosis* y su posterior fagocitosis por los macrófagos; enseguida, se ejecuta el transporte del bacilo a través del epitelio alveolar hacia los pulmones. Allí, los macrófagos infectados reclutan macrófagos adicionales y otras células inmunes para formar estructuras organizadas llamadas granulomas, las insignias patológicas de la tuberculosis (Davis y Ramakrishnan, 2009; Ramakrishnan, 2012). Los granulomas son estructuras encargadas de brindar protección al hospedero al impedir la diseminación de la infección hacia otros tejidos del organismo; y en cuya formación y mantenimiento de su arquitectura participan distintas células inmunes entre las cuales podemos destacar a los LcB (figura 4).

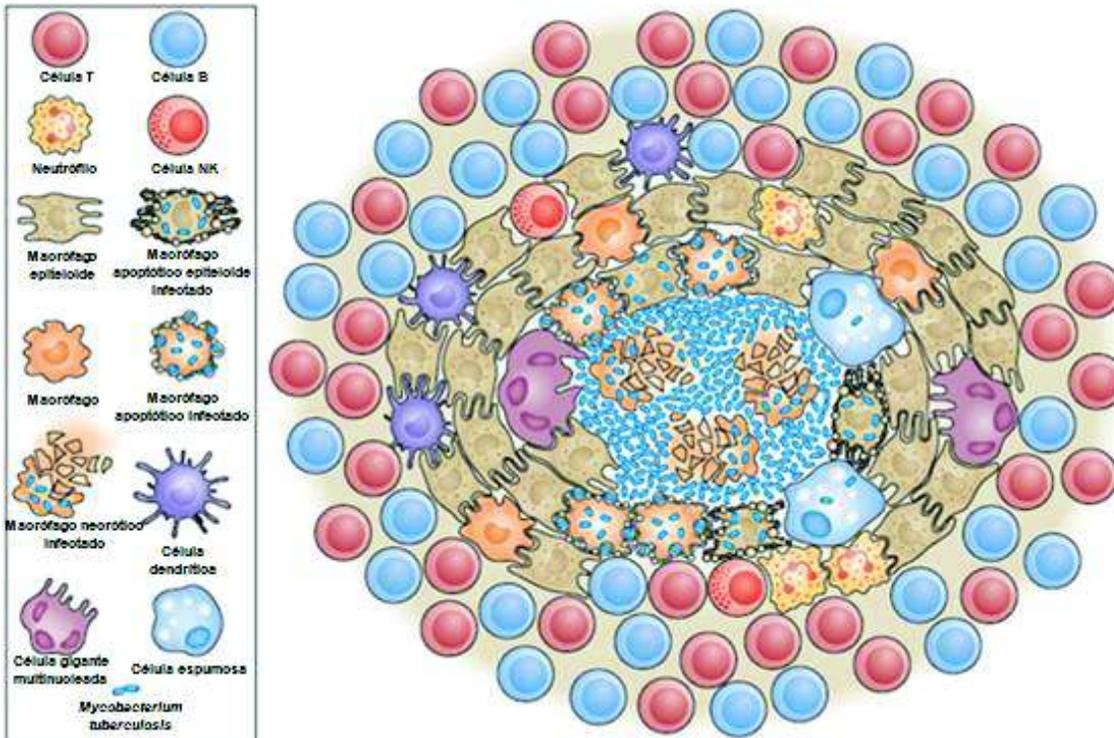


Figura 4. Estructura y constituyentes celulares del granuloma tuberculoso. El granuloma tuberculoso en su forma más básica, es un agregado compacto y organizado de células epiteloideas-macrófagos que han sufrido una transformación especializada para tener membranas interdigitadas que se unen herméticamente a células adyacentes. Los macrófagos del granuloma pueden también fusionarse y formar células gigantes multinucleadas o diferenciarse en células espumosas, que se caracterizan por acumular lípidos. Las bacterias están más comúnmente presentes en las áreas necróticas centrales. Muchos otros tipos celulares también pueblan el granuloma, como neutrófilos, células dendríticas, células B y T, células NK, fibroblastos y células que secretan componentes de la matriz extracelular. Finalmente, se cree que las células epiteliales que rodean el granuloma (no mostradas), también participan en su formación (Ramakrishnan, 2012).

Las células B son importantes componentes en la formación y mantenimiento adecuado de los granulomas, de acuerdo con estudios realizados en ratones *knock out* de células B donde se aprecia una deficiente formación del granuloma y una ruptura prematura del mismo (Maglione y Chan, 2009). Además, se ha observado la existencia de predominantes agregados de células B en los pulmones de pacientes con TB pulmonar; debido probablemente a que las células B migran desde la sangre periférica hacia el sitio de la infección en el pulmón

(Hernández y col., 2010), estos cúmulos de LcB han sido también observados en otras enfermedades inflamatorias crónicas como la esclerosis y la artritis reumatoide, así como en infecciones causadas por el virus de la influenza y por *Helicobacter*.

La influencia de la célula B en la adecuada formación y mantenimiento del granuloma recae principalmente en su capacidad de servir como célula profesional presentadora de antígeno, pues se ha visto que las células T pueden ser dispersadas alrededor de los cúmulos de LcB en el pulmón, convirtiéndolos en sitios potenciales para los procesos de presentación de antígeno y maduración de las células B.

Factores de Virulencia de *M. tuberculosis*

La virulencia de un microorganismo se define por su capacidad de superar o evadir las defensas del hospedero. *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular que presenta estrategias muy sofisticadas de infección y puede persistir en los macrófagos del hospedero. Generalmente, en el 90% de las personas inmunocompetentes, la infección es asintomática y el bacilo puede permanecer viable en estado de latencia. El desarrollo de la enfermedad en forma activa en estos pacientes, se puede deber a que el bacilo pudo evadir la respuesta inmune protectora del hospedero, y la micobacteria continuó replicándose, y se estableció la infección con la aparición de los síntomas clínicos propios de la enfermedad (Gastélum, 2005).

A través de los años, una parte considerable del esfuerzo de muchos investigadores se ha dirigido a estudiar y buscar mejorar la comprensión acerca de los factores que le brindan a *M. tuberculosis* sus ya conocidas patogénesis, virulencia y persistencia. Dicho esfuerzo se enfoca en analizar los distintos elementos que conforman la estructura de la micobacteria; entre éstos, podemos citar los lípidos y lipoproteínas que conforman su pared celular, algunos sistemas de secreción de proteínas así como sus respectivos productos, la propia composición genética de la micobacteria, entre otros.

La secreción de proteínas, mediante distintos sistemas, es un mecanismo muy importante para el funcionamiento bacteriano y para la adaptación y sobrevivencia de la bacteria. Por otra parte, estos sistemas son también esenciales para la interacción con las

células del hospedero a través de la exportación de toxinas o proteínas señal que le permiten a las distintas especies bacterianas causar patología. Aún más, los sistemas de secreción se han duplicado, evolucionado y diversificado para realizar funciones específicas, algunos de ellos están implicados en la patogenicidad. Varios grupos de genes codificantes para proteínas que son secretadas al medio circundante a través de vías específicas han sido identificados en la micobacteria; por lo tanto, son considerados importantes para la patogénesis micobacteriana (Forrellad y col., 2013).

La existencia de estos sistemas de secreción no es ajena a *M. tuberculosis*, pues reciente evidencia afirma que la micobacteria ha desarrollado un sistema de secreción especializado en el transporte de proteínas extracelulares a través de su altamente hidrófoba e impermeable pared celular; este sistema recibe el nombre de T7SS. *M. tuberculosis* contiene un total de cinco T7SS, también llamados ESX, los cuales muestran semejanza en su contenido genético. De éstos, dos miembros, denominados ESX-1 y ESX-2, se les ha reconocido su participación como factores de virulencia al influir en la migración célula-célula de la micobacteria patógena.

De los 5 sistemas de secreción T7SS encontrados en *M. tuberculosis*, especial atención se centra en el ESX-1, conocido también como sistema de secreción 1 ESAT6. Este sistema se caracteriza por secretar dos proteínas de gran importancia para la virulencia de la micobacteria, que son ESAT6, llamado también ESXA; y CFP10, también conocido como ESXB. Los genes encargados de codificar estas dos proteínas, necesarias para una virulencia completa de todas las especies del complejo *M. tuberculosis*, se localizan en la región RD1.

Los efectos de las proteínas ESAT6 y CFP10 sobre las células eucariotas aún no son del todo claros. Los reportes más frecuentes señalan que ESAT6 provoca lisis celular y daño a la membrana plasmática; así como el impedimento de la función de presentación de antígeno mediante la inhibición de las vías de señalización de TLR, lo que trae como consecuencia la reducción en la producción de IL-12 por parte de los macrófagos, además de inhibir su apoptosis; asimismo, se sabe que ESAT6 inhibe la producción de IFN- γ por parte de las células T (Wang y col., 2009). En común, tanto ESAT6 como CFP10, participan en la traslocación de *M. tuberculosis* desde el fagosoma hacia el citoplasma de la célula hospedera durante estadios tardíos de la infección.

Los lípidos forman igualmente parte del arsenal de virulencia de *M. tuberculosis*, quien se diferencia de otros patógenos bacterianos en el hecho de que posee un arreglo único de lípidos y lipoglicanos sobre su superficie celular. Es conocida ya la habilidad de la micobacteria de adaptar su metabolismo, de uno basado en carbohidratos a uno basado en ácidos grasos, lo que a su vez le permite utilizar el colesterol del ambiente intracelular como fuente de energía y para la biosíntesis de lípidos asociados a virulencia.

Para que el bacilo tuberculoso sea capaz de metabolizar el colesterol, es de vital importancia la presencia de la enzima colesterol oxidasa (ChoD). A esta enzima le han sido atribuidos ciertos factores de virulencia, pues se conoce su habilidad de provocar un aumento en los niveles de IL-10 por parte de los macrófagos, lo que más tarde desencadenará una disminución en la producción de NO y ROS en el macrófago (Klink y col., 2013). Asimismo, esta enzima es capaz de interrumpir la vía de señalización activada por el TLR2, originando una inhibición de las respuestas anti-micobacterianas de los macrófagos y facilitando así el crecimiento intracelular y la supervivencia de la micobacteria dentro de dichas células fagocíticas.

Una de las características de *M. tuberculosis* es su capacidad de inducir procesos de muerte celular en las células que infecta, promoviendo la necrosis e inhibiendo la apoptosis o muerte celular programada, considerada como uno de los principales mecanismos del sistema inmune innato en contra de un patógeno.

La apoptosis es un mecanismo de defensa innato por el cual el hospedero elimina el nicho del crecimiento bacteriano. La apoptosis de macrófagos infectados genera vesículas que contienen antígenos bacterianos, estas vesículas pueden ser ingeridas por células dendríticas para estimular células T antígeno-específicas (Behar y col., 2011). De esta manera, este proceso de muerte celular programada promueve la inducción de una respuesta inmune adaptativa; por esta razón, *M. tuberculosis* ha desarrollado ciertos mecanismos que le permiten impedir la inducción de apoptosis. Entre estos mecanismos podemos citar el bloqueo del proceso de reparación de la membrana plasmática del macrófago, lo que desencadena un proceso de necrosis. La micobacteria logra este objetivo regulando de manera negativa, en macrófagos infectados, la producción de PGE₂ la cual es un eicosanoide esencial para la reparación de la membrana plasmática y para evitar un daño mitocondrial. La inhibición en la

producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) es ocasionada por un aumento en la producción de Lipoxina A₄ (LXA₄) en los macrófagos (Divangahi y col., 2009).

Para finalizar, cabe resaltar otra característica de este patógeno, la capacidad de causar una infección de por vida en individuos a través de su alojamiento dentro de las lesiones granulomatosas que se forman como consecuencia de la respuesta inmune producida. Con el fin de lograr tal cometido, la micobacteria sufre un proceso de adaptación al ambiente creado en el granuloma, que consiste en un reprogramamiento transcripcional en respuesta al reconocimiento de estímulos, incluyendo baja tensión de oxígeno, falta de nutrientes, presencia de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, cambios de pH, fracciones de lípidos tóxicas, agentes que alteran la pared celular, entre otras señales del ambiente (Forrellad y col., 2013).

La Familia de Proteínas PE y PPE

Desde hace tiempo, se han realizado estudios experimentales dedicados a descubrir y caracterizar las propiedades bioquímicas que le confieren a *M. tuberculosis* sus ya conocidas propiedades de patogénesis y habilidad para evadir la respuesta inmune. Al parecer la clave para encontrar el origen de dichas características bioquímicas se encuentra en el análisis del acervo genético micobacteriano, debido a ello se emprendió un proyecto dedicado a estudiar el genoma de *M. tuberculosis*. Una de las más interesantes características del genoma de *M. tuberculosis* es la presencia de dos familias multigénicas que juntas representan casi el 10% del potencial codificante de su cromosoma. Estas dos familias de proteínas, nombradas PE y PPE, se caracterizan por poseer dominios N-terminal altamente conservados de alrededor de 100 y 180 aminoácidos, respectivamente. El nombre PE se deriva del motivo característico Pro-Glu, mientras PPE representa el motivo Pro-Pro-Glu usualmente presente dentro de los primeros 10 aminoácidos de estas proteínas (Cascioferro y col., 2007).

Estas grandes familias de proteínas son especialmente abundantes en micobacterias patógenas, con alrededor de casi 200 genes *pe/ppe* tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis* y, recientes trabajos, muestran que son expresadas tanto *in vivo* como *in vitro* bajo condiciones de estrés. Las especulaciones acerca de la función de estas proteínas son abundantes, pero es sugerido que las proteínas PE/PPE podrían actuar como fuente de variación antigénica. Por

variación antigénica usualmente nos referimos al fenómeno de conmutación regulada entre miembros funcionalmente conservados, pero inmunológicamente distintos, de una familia multigénica, lo que ayuda a evitar la selección inmune antígeno-específica (Vallecillo y Espitia, 2009; Vordermeier y col., 2012). También se conoce, por otro lado, la capacidad de algunos miembros de estas familias de proteínas de inducir respuestas celulares y/o humorales en hospederos infectados, sugiriendo su posible uso como candidatos vacunales y para desarrollar nuevos métodos de diagnóstico.

Las proteínas PE y PPE se dividen en subfamilias basándose en su dominio C-terminal (figura 5) (Padilla, 2013). La familia PE se divide en las subfamilias PE, con 34 miembros; y PE_PGRS, con 65 miembros (Cadieux y col., 2011). Las proteínas PE_PGRS contienen en el extremo N-terminal un dominio PE altamente conservado de alrededor de 100 aminoácidos, que es encontrado en todas las proteínas PE; seguido se encuentra un dominio de unión compuesto entre 38 y 40 aminoácidos y que contiene el motivo conservado GRPLI, presente solamente en las proteínas PE_PGRS; por último, se encuentra el dominio PGRS, con las típicas repeticiones Gly-Gly-Ala, las cuales pueden variar en tamaño desde unas pocas decenas hasta 1500 aminoácidos. En algunas proteínas PE_PGRS, se ha encontrado que este dominio C-terminal único puede ser de una longitud de 100-300 aminoácidos (Zumbo y col., 2013). Además, la serie de polimorfismos presentes en el dominio PGRS, hace que sea sugerido un papel crítico de este dominio en generar diversidad antigénica y en ayudar a la micobacteria a evadir la respuesta inmune (Bansal y col., 2010).

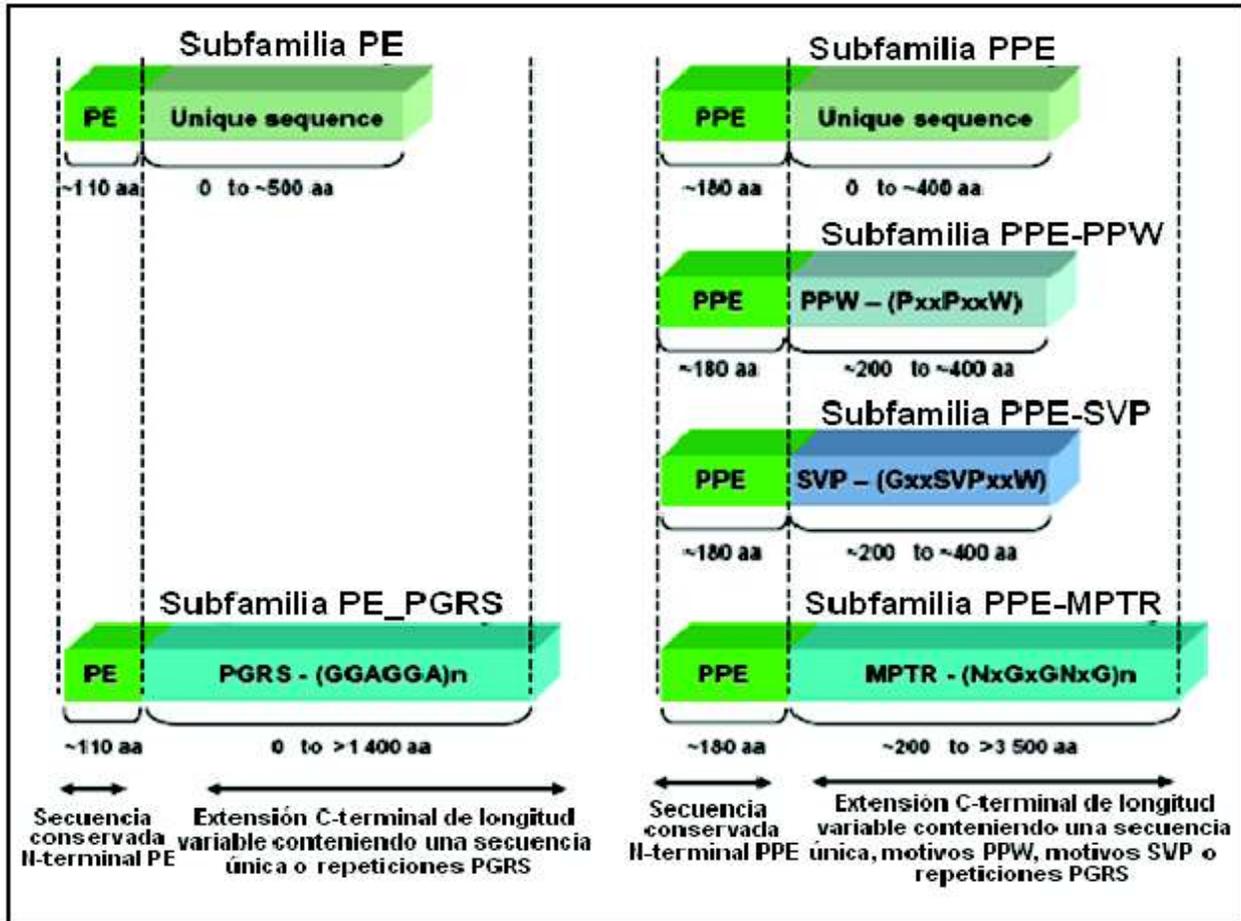


Figura 5. Estructura de los genes codificantes de las familias de proteínas PE y PPE. Representación esquemática de la estructura génica de los miembros de la familia de genes PE y PPE, mostrando los dominios N-terminal conservados, posiciones de motivos y diferencias entre las subfamilias de las dos familias (Gey van Pittius y col., 2006).

El interés en el estudio de la subfamilia de proteínas PE_PGRS ha crecido, pues se sabe que sus miembros se localizan solamente en genomas micobacterianos y están principalmente restringidos a micobacterias patógenas, por ende, se ha convertido en tarea vital el comprender la función, localización, regulación y la respuesta inmune contra estas proteínas con la finalidad de conocer el papel de éstas en la patogénesis micobacteriana. A la fecha, la evidencia indica que las proteínas PE_PGRS pueden ser expresadas de manera específica en los granulomas, pueden ser localizadas en la superficie de la micobacteria, donde podrían ejercer influencia en la infectividad de las células del hospedero. Asimismo, otros datos señalan la capacidad de estas proteínas de inducir procesos de muerte celular en las células infectadas, ya sea por vía apoptótica o necrótica (Singh y col., 2008). Por otro lado, se ha reportado la

presencia de inserciones/deleciones en el marco de lectura de ciertos genes *pe_pgrs* en aislados clínicos de *M. tuberculosis*, concentrándose la gran mayoría de estas mutaciones dentro del dominio PGRS, apoyando así la teoría de que los genes *pe_pgrs* constituyen una fuente de variación antigénica para *M. tuberculosis*. No obstante, aún permanece mucho por ser revelado acerca de la expresión y función individual de los miembros de la subfamilia PE_PGRS.

Aunado a lo ya previamente mencionado, se tiene conocimiento sobre la relación de ciertos genes *pe_pgrs* con la supervivencia de la micobacteria dentro de las células del hospedero. Esto proviene de un estudio comparativo, realizado por Singh y colaboradores (2008), entre tres miembros de esta subfamilia: PE_PGRS16, PE_PGRS26 y PE_PGRS33, quienes comparten características similares en cuanto a estructura (figura 6). Se utilizaron cepas recombinantes de *M. smegmatis* que expresaban cada una de las tres proteínas, los resultados mostraron que las cepas que expresaron las proteínas PE_PGRS33 y PE_PGRS26, presentaron una persistencia mayor dentro de los macrófagos infectados; y aquellas cepas que expresaron el miembro PE_PGRS16, tuvieron los índices más bajos de supervivencia. La infección de macrófagos con estas cepas recombinantes no sólo puso de manifiesto la capacidad de estos tres miembros de alterar la supervivencia de la micobacteria. Dicha infección también resultó en una disminución de la secreción de IL-12 y NO y en un aumento en la secreción de IL-10 por parte de los macrófagos estimulados con las proteínas PE_PGRS33 y PE_PGRS26; en cambio, aquellos macrófagos estimulados con la proteína PE_PGRS16, presentaron un patrón inverso de secreción de estas moléculas. Lo anterior pone de manifiesto la habilidad de ciertos miembros PE_PGRS de modular la diferenciación de la respuesta inmune, ya sea a tipo Th1 o Th2.

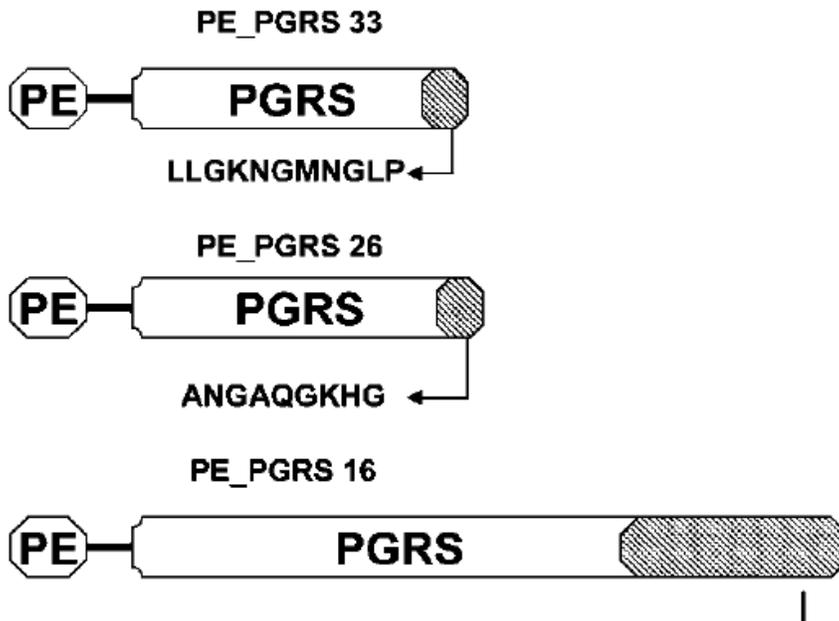


Figura 6. Representación esquemática de tres miembros de la subfamilia PE_PGRS. PE_PGRS33 y PE_PGRS26, que son 53% idénticas tanto en el dominio PE como PGRS, son similares en tamaño (491 y 498 aa) y contienen una pequeña secuencia única en el extremo C-terminal de 9-11 aa. PE_PGRS16 es una proteína más grande (923 aa) con un dominio PE y PGRS similares pero contiene una región C-terminal extendida única de 270 aa (Singh y col., 2008).

Proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*

Esta proteína es uno de los miembros más extensamente estudiados de la subfamilia PE_PGRS, compuesta en 41% de glicina y 20% de alanina. El gen Rv1818c codifica esta proteína de 499 aminoácidos, cuya región PE en el extremo amino-terminal demuestra alta homología con miembros de la familia PE (Vallecillo y Espitia, 2008; Padilla, 2013).

La proteína PE_PGRS33, que puede ser considerada un modelo para la familia, se localiza en la superficie celular micobacteriana. Su dominio PE se encuentra anclado en la

pared celular de la micobacteria dejando al dominio PGRS disponible para interactuar con los componentes del hospedero (Zumbo y col., 2013).

Se tiene conocimiento sobre el hecho de que esta proteína es capaz de inducir procesos de muerte celular por apoptosis al interactuar con la mitocondria de células infectadas por *M. tuberculosis* (Cadieux y col., 2011). Otros estudios revelan que este miembro de la subfamilia PE_PGRS, es igualmente capaz de causar apoptosis al provocar la liberación de TNF- α por parte de los macrófagos cuando interacciona con el receptor de tipo *Toll 2* (Basu y col., 2007; Zumbo y col., 2013).

En un estudio realizado por Talarico y colaboradores (2007), se reportó el impacto de las variaciones genéticas naturales de la proteína PE_PGRS33 sobre la virulencia de distintos aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Se encontró que, dependiendo de las mutaciones en la secuencia de la proteína, la función de ésta podría o no verse comprometida; influyendo así en la persistencia del bacilo tuberculoso en el hospedero. El tipo y número de mutaciones varió de acuerdo con la cepa clínica de *M. tuberculosis*.

Por ser *M. tuberculosis* un patógeno de carácter intracelular, la respuesta humoral hacia esta proteína en la TB ha sido escasamente estudiada. Pese a esto, se ha determinado que la proteína PE_PGRS33 presenta diferentes tipos de inmunorreactividad a anticuerpos IgG e IgM entre pacientes con TB pulmonar y TB extrapulmonar, siendo mayor en los pacientes con TB pulmonar (Narayana y col., 2007). Lo anterior resalta el hecho de que la proteína PE_PGRS33 es expresada *in vivo* durante la infección por *M. tuberculosis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos de Estudio

Criterios de Inclusión

Pacientes con tuberculosis pulmonar.

Criterios de No Inclusión

Pacientes con HIV, diabetes, embarazo o insuficiencia renal.

Controles

Individuos sanos

Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre total de 25 mL con heparina, como anticoagulante, utilizando el sistema Vacutainer. Dos mL fueron usados para realizar una activación policlonal a corto plazo (4 h) utilizando forbol miristato acetato (PMA) e ionomicina, a concentraciones de 25 ng/mL y 1 µg/mL, respectivamente. Del resto, se separaron las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante su estratificación en Histopaque (Sigma-Aldrich). Con las PBMC se realizó un ensayo de activación *in vitro* a largo plazo estimulándolas con la proteína PE_PGRS33 a concentración de 5 µg/mL. Como activadores control, se utilizó PMA a concentración de 1 ng/mL en conjunto con ionomicina a concentración de 0.04 µg/mL. Además, se utilizó PPD (derivado proteico purificado) en concentración de 5 µg/mL también como control de activación.

Activación a Corto Plazo

Se realizó una activación a corto plazo utilizando 500 µL de sangre total tanto de pacientes con tuberculosis pulmonar como de sujetos control. La activación se llevó a cabo utilizando PMA a concentración de 25 ng/mL junto con el ionóforo de calcio ionomicina a concentración de 1 µg/mL.

Después de cuatro horas de incubación a 37° C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda, se realizó una tinción de superficie. La tinción se realizó de la siguiente manera: se tomaron 50 µL de sangre total tanto de pacientes como de sujetos control y se tiñeron con una mezcla de anticuerpos monoclonales fluoromarcados. Los anticuerpos utilizados se enlistan a continuación: anti-CD19-FITC (BioLegend) a concentración de 0.9 µg/mL, como marcador de linaje de linfocitos B; anti-CD69-PE (Becton Dickinson) y anti-HLADR (BioLegend) a concentración de 0.015 µg/mL y 0.48 µg/mL respectivamente, como marcadores de activación (Avgustin y col., 2005).

Las células teñidas y sin teñir, se incubaron 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 4 mL de solución de lisis, las muestras se incubaron 5 minutos en la oscuridad para luego ser centrifugadas a 448 xg por 5 minutos a 25 °C. El sobrenadante se descartó y se procedió a dar un segundo lavado con 4 mL de PBS1X a 448 xg por 5 minutos. Habiendo descartado el sobrenadante, las células se fijaron con 200 µL de p-formaldehído al 2% y 200 µL de PBS 1X, y finalmente se filtraron con tela de organza para su adquisición en un citómetro de flujo.

Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)

Se obtuvieron las muestras de pacientes así como de controles sanos mediante punción venosa a través del sistema Vacutainer utilizando tubos con heparina (Becton Dickinson).

La muestra de sangre total, se diluyó 1:2 con regulador de fosfatos salino (PBS) a concentración 1X y posteriormente se llevó a cabo la estratificación de la sangre sobre

Histopaque (Sigma-Aldrich) en relación 1:3. La separación de las células mononucleares de sangre periférica se realizó centrifugando a 448 xg durante 40 minutos a 25 °C.

De la muestra separada en sus componentes, se aspiró la capa de PBMC con una pipeta Pasteur. Las PBMC fueron a continuación lavadas de dos veces con PBS 1X estéril, centrifugando a 448 xg por 10 minutos a temperatura ambiente.

Las PBMC lavadas se resuspendieron en un mililitro de medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). A continuación, se midió la viabilidad celular con azul de tripano en dilución 1:10 y de manera paralela se contaron las células en una cámara de Neubauer.

Estimulación de las PBMC

Las PBMC de los pacientes y sujetos control se estimularon con PMA (Sigma) a una concentración de 1 ng/mL, conjuntamente con PMA; también se les añadió ionomicina a una concentración de 0.04 µg/mL. De igual manera, las PBMC también fueron estimuladas con PPD a una concentración de 5 µg/mL y con la proteína PE_PGRS33 a una concentración de 5 µg/mL.

Posteriormente, las células se incubaron durante 144 horas a 37 °C y 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda en placas de 12 pozos, donde una parte de las células se tiñeron con carboxifluoresceína a concentración de 5 µM para evaluar la proliferación de linfocitos B (Caruso y col., 1997; Padureanu y col., 2003).

Evaluación de la Activación, Proliferación y Diferenciación de LcB

Con el objetivo de evaluar la activación y diferenciación de LcB por la proteína PE_PGRS33, se efectuó una cinética de expresión de los marcadores CD69, HLA-DR y CD38 a las 24, 48, 72 y 144 horas de estimulación. Para la evaluación de la proliferación, se elaboró una tinción con carboxifluoresceína, la cual se evaluó a las 120 horas de haber sido estimuladas las células.

Medición de la Expresión de los Receptores CD69, CD38 y HLA-DR

Para evaluar la expresión de los receptores se hicieron tinciones de superficie de las PBMC de los pacientes y sujetos control tanto de PBMC estimuladas como no estimuladas (Hernandez y col., 2010). La tinción se realizó de la siguiente manera: las células se cosecharon y centrifugaron a 448 xg por 5 minutos a 25 °C, se desechó el sobrenadante. Los botones celulares se tiñeron con una mezcla de anticuerpos monoclonales fluoromarcados. Los anticuerpos utilizados se enlistan a continuación: anti-CD19-FITC (BioLegend) a concentración de 0.9 µg/mL, como marcador de linaje de linfocitos B; anti-CD69-PE (Becton Dickinson) y anti-HLADR (BioLegend) a concentración de 0.015 µg/mL y 0.48 µg/mL respectivamente, como marcadores de activación y anti-CD38-PE (BioLegend) a concentración de 0.1 µg/mL, como marcador de diferenciación.

Las células teñidas y sin teñir, se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido, las células se lavaron con 4 mL de PBS 1X y se centrifugaron a 448 xg por 5 minutos a 25 °C. El sobrenadante se descartó, las células se fijaron con 200 µL de p-formaldehído al 2 % y 200 µL de PBS 1X, y finalmente se filtraron con tela de organza para su adquisición en un citómetro de flujo.

Evaluación de la Proliferación

Para evaluar la proliferación de las PBMC de pacientes y sujetos control, las células teñidas y no teñidas con carboxifluoresceína, se cosecharon y centrifugaron a 448 xg por 5 minutos a 25 °C. Enseguida, el sobrenadante se desechó y los botones celulares fueron teñidos con el anticuerpo monoclonal anti-CD19-PE a una concentración de 0.05 µg/mL.

Las células se incubaron en la oscuridad 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron con 4 mL de PBS 1X y fueron centrifugadas a 448 xg por 5 minutos a 25 °C. El sobrenadante se descartó, las células se fijaron con 200 µL de p-formaldehído al 2 % y 200 µL de PBS1X, y finalmente se filtraron con tela de organza para su adquisición en un citómetro de flujo (Padilla, 2013).

Índice de Estimulación

Se calculó el índice de estimulación para determinar un criterio de positividad en la proliferación de LcB, basado en la relación de porcentaje de células en proliferación estimuladas y porcentaje de células en proliferación sin estimular (Padilla, 2013).

Análisis por Citometría de Flujo

La adquisición de las muestras se realizó en el citómetro de flujo FACS CANTO II (BD Biosciences) y el análisis de datos con el programa FACSDiva v6.1.1 (BD Biosciences). Para la evaluación de la expresión de los marcadores CD69, HLA-DR y CD38, se adquirió un total de 10000 eventos y, para la proliferación, un total de 100000.

Análisis de Datos

El análisis estadístico de los resultados, se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism versión 5.01 basándose en la prueba U de Mann-Whitney para el estudio de datos no paramétricos. Los gráficos fueron hechos utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la activación, proliferación y diferenciación de LcB, se llevó a cabo con la participación de 5 pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar, así como con 5 individuos sanos que fungieron como controles. Todos los pacientes fueron del sexo masculino, con edades comprendidas entre los 30 y 44 años; todos los individuos sanos, al igual que los pacientes con TB pulmonar, fueron del sexo masculino con edades comprendidas entre los 26 y 46 años (tabla 1).

Tabla 1. Relación de edad y sexo entre pacientes y sujetos control.

	Intervalo de edad (años)	Media (años)	Sexo
No. de pacientes: 5	30-44	41.2	Masculino
No. de controles: 5	26-46	38.6	Masculino

Activación policlonal a corto plazo de LcB

La activación a corto plazo de los LcB de pacientes con tuberculosis pulmonar, así como de individuos sanos, se realizó con el objetivo de obtener un resultado preliminar concerniente a la capacidad de las células B de activarse ante la presencia de PMA, un estímulo de tipo policlonal (figura 7).

La evaluación de la activación de los LcB a corto plazo se basó en la medición de la expresión del marcador de activación temprana CD69 y de la expresión de la molécula de clase II HLA-DR. Los resultados obtenidos muestran que, después de una estimulación de 4 horas con PMA e ionomicina, los LcB tanto de pacientes como de individuos sanos, presentan un incremento en la expresión de CD69 y HLA-DR en comparación con las células no estimuladas (figuras 8 y 9). En el caso de CD69, su expresión en LcB de pacientes aumentó en un 88.8% y en controles lo hizo en un 94.9%; para HLA-DR, se suscitó un incremento de 10691 unidades de fluorescencia (IMF) mientras que para los sujetos control fue de 23700 unidades.

Con base en los resultados previamente mostrados, es posible definir que las células B de pacientes con TB pulmonar y las de individuos sanos poseen la capacidad de activarse a corto plazo en presencia de un estímulo policlonal; estos datos resultan ser de gran importancia puesto que si la población de células B es capaz de ser activada por un agente policlonal, podría esperarse que dicha estirpe celular pudiera entrar en un proceso de activación cuando es estimulada de manera antígeno-específica a largo plazo. Es decir, en una activación policlonal se evalúa la capacidad de activación del 100% de las distintas clonas, incluidas las específicas para un determinado antígeno, por ende, si todas las clonas tienen la capacidad de activarse de manera policlonal, esto asegura la capacidad de las clonas antígeno-específicas de ser susceptibles de entrar en un proceso de activación.

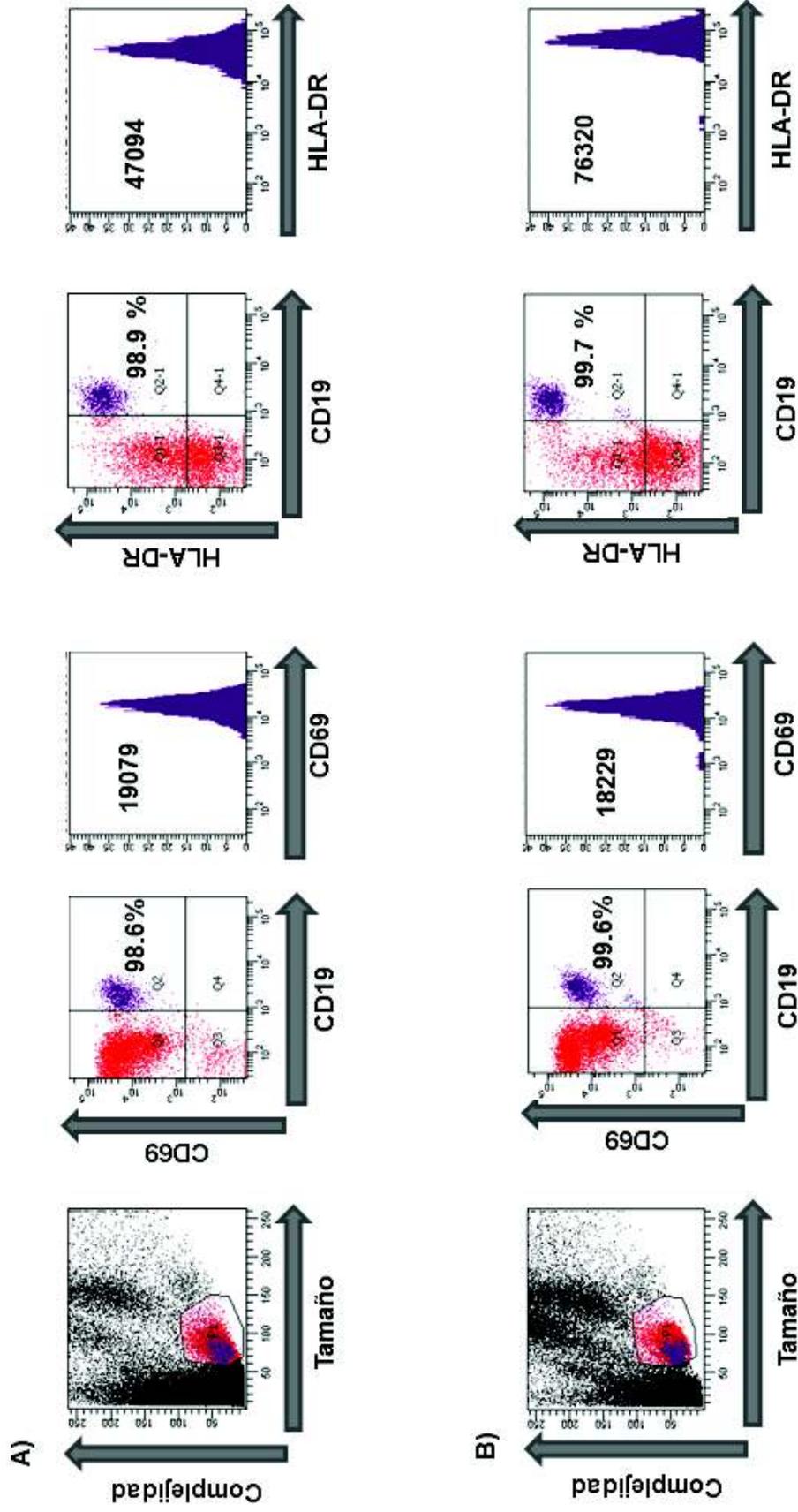


Figura 7. Gráficos representativos de la expresión de CD69 y HLA-DR en LcB activados policlionalmente a corto plazo. A) Individuo sano. B) Paciente con TB pulmonar.

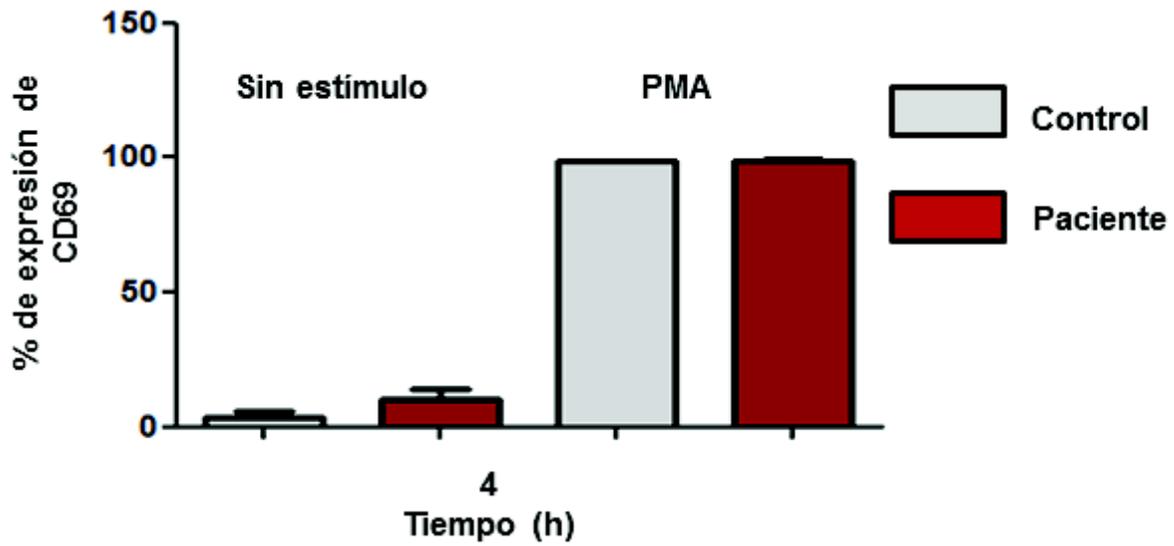


Figura 8. Expresión de CD69 en LcB activados policlonalmente a corto plazo.

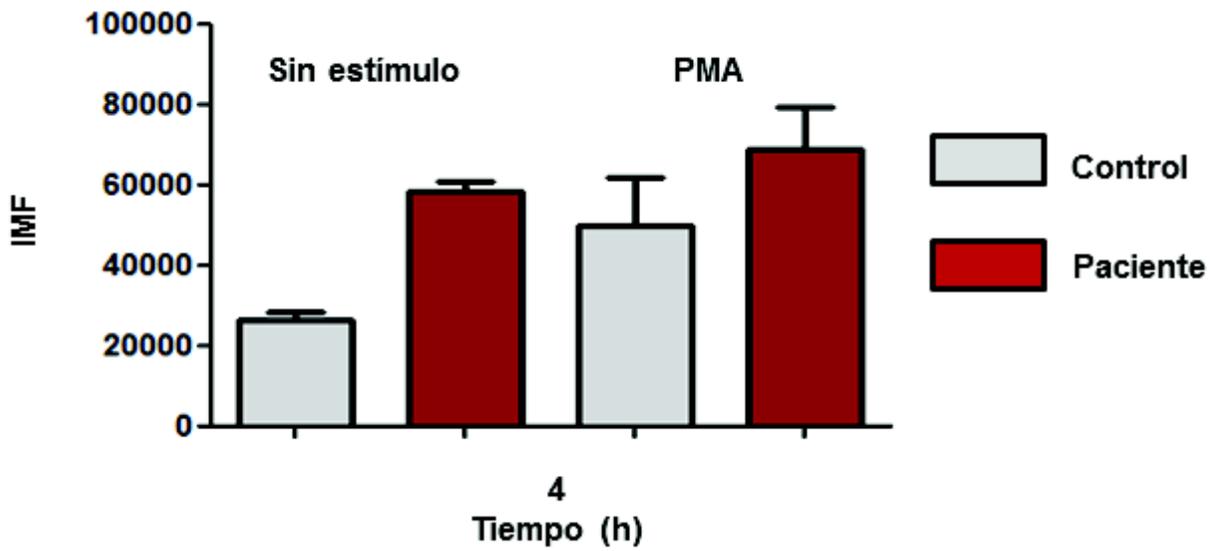


Figura 9. Expresión de HLA-DR en LcB activados policlonalmente a corto plazo. IMF: Intensidad media de fluorescencia.

Expresión de CD69 en LcB Estimulados con PE_PGRS33

La medida de la función linfocitaria y la activación pueden proveer información útil para la evaluación del nivel de reactividad inmune en investigación y aplicaciones clínicas o en casos en los cuales la capacidad de respuesta del sistema inmune podría ser importante (Simms y Ellis, 1996). El antígeno de activación temprana CD69 ha generado interés como marcador en ensayos de citometría de flujo para evaluar la activación celular debido a su pronta expresión en la membrana celular y a su fácil detección por ensayos de inmunofluorescencia o citometría de flujo.

La evaluación de la expresión de CD69 en LcB tanto de pacientes como de sujetos control en células estimuladas y no estimuladas, se llevó a cabo realizando tinciones de superficie con anticuerpos monoclonales fluoromarcados una vez que se llevó a cabo su estimulación, posteriormente se analizaron por citometría de flujo. Los resultados generados muestran que los LcB del 100 % de los pacientes estimulados con la proteína PE_PGRS33 y PPD muestran una mayor expresión de CD69 (figura 10) en su membrana con respecto a los sujetos control. Para el caso de las células estimuladas con PE_PGRS33 se muestra un aumento de 1.9 % mientras que para PPD fue de 4.3%. Este aumento es debido a la previa sensibilización de las células B de los pacientes hacia antígenos de *M. tuberculosis* por manifestar la forma activa de la enfermedad, tal y como se puede constatar a través de estudios *in vitro* donde se evaluó la expresión de CD69 en células CD4⁺ de pacientes que manifestaron la forma activa de la enfermedad contra aquellas de individuos sanos con reacción intradérmica positiva o negativa a la tuberculina, los ensayos se llevaron a cabo utilizando PPD como agente estimulante (Avgustin y col., 2005).

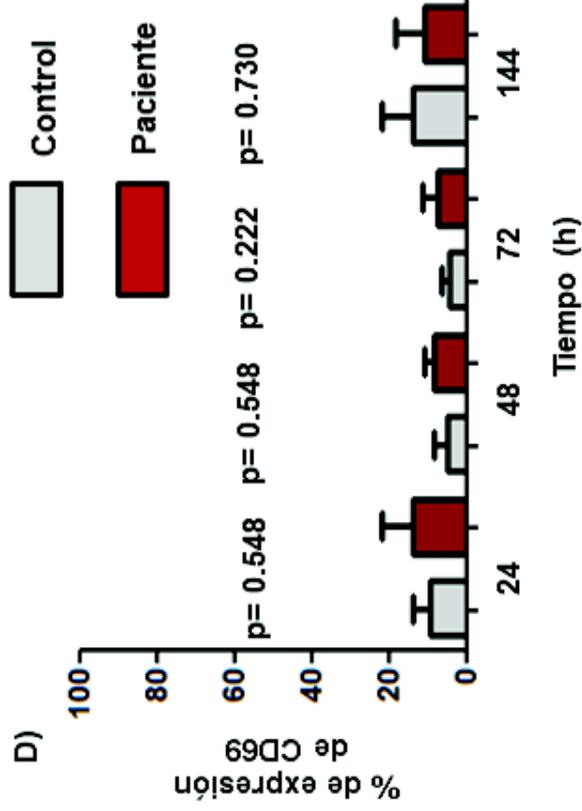
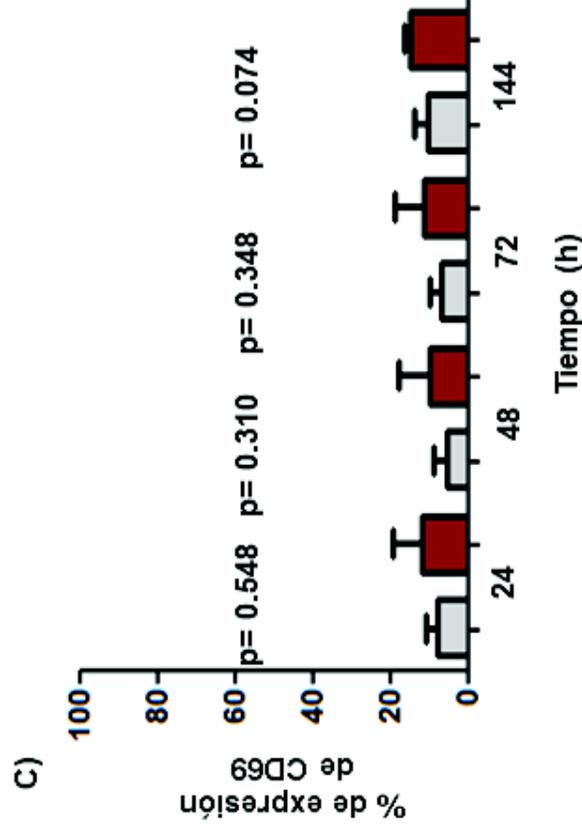
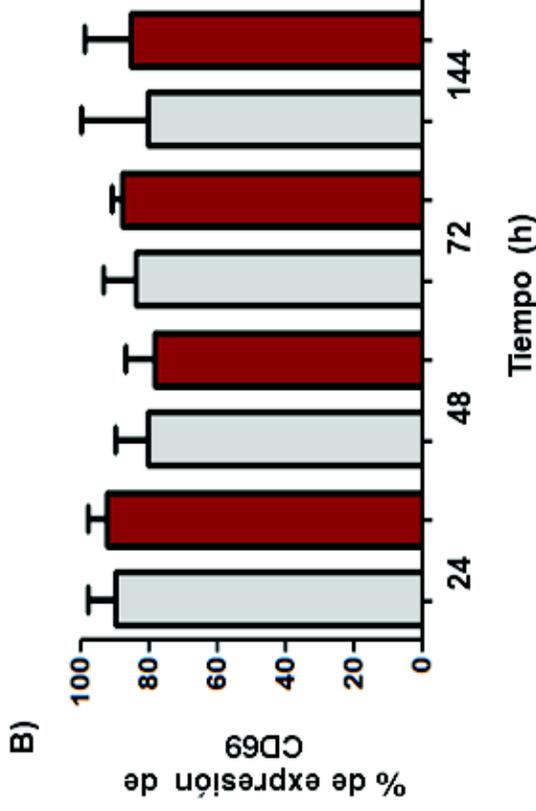
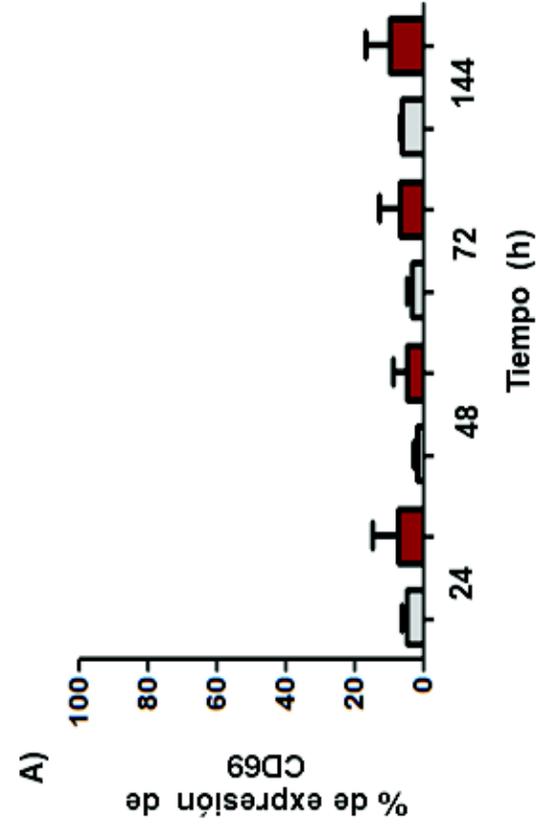


Figura 10. Expresión de CD69 en LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control estimulados con PE_PGRS33. A) Células sin estímulo. B) Células estimuladas con PMA. C) Células estimuladas con PPD. D) Células estimuladas con PE_PGRS33.

Los resultados obtenidos muestran, además, que la expresión de CD69, tanto en células estimuladas con PE_PGSR33 y PPD, se sigue observando a tiempos mayores de 72 h pese al hecho de ser un marcador de activación temprana del cual se tienen pocos estudios donde se evalúe a tiempos mayores de 4 horas. Uno de los pocos es el trabajo de Caruso y colaboradores (1997), en el cual midieron la expresión de CD69 en células T y observaron que la expresión de este marcador podía ser evaluada a tiempos de entre 96 y 144 h, ya que de acuerdo con los datos obtenidos, la expresión de marcadores de activación temprana puede ser estudiada a tiempos mayores a 4 horas cuando la estirpe celular recibe un estímulo de naturaleza antígeno-específica. Asimismo, se analizó el hecho de que la expresión de marcadores de activación está condicionada no sólo a la naturaleza del estímulo, sino también a su concentración, explicando así, el hecho de poder medir marcadores de activación temprana a largo plazo.

Con respecto a los resultados del presente estudio, es posible visualizar que no sólo están sujetos a la naturaleza del estímulo y su concentración. Esto se observa al analizar los gráficos de CD69 (figura 10), tanto en LcB estimulados con PE_PGSR33 y PPD, donde se aprecia que este marcador se hace visible desde las 24 h, descendiendo su expresión a las 48 y 72 h. Sin embargo, a las 144 h es posible apreciar un pico de *novo* en la expresión de CD69; lo cual puede deberse, muy probablemente, a que se hayan originado nuevas clonas de LcB que se están activando y por tanto expresando dicho marcador. El comportamiento mencionado anteriormente, se observó en células B tanto de pacientes como de sujetos control. De igual manera, para el caso de los enfermos, se debe tomar en cuenta si está recién diagnosticado, si han recibido o no terapia antituberculosa; y en el caso de los sujetos sanos, tomar en consideración si éstos han estado o no en previo contacto con antígenos de *M. tuberculosis*. Lo anterior sustentado en el hecho de que, a través de ciertos estudios, ha sido comprobado que la expresión de ciertos marcadores, entre ellos CD69, puede variar según las características clínicas de los sujetos de estudio.

Cabe mencionar que no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el grupo de pacientes y el grupo control en la expresión CD69 en las condiciones aquí utilizadas.

Expresión de HLA-DR en LcB Estimulados con PE_PGRS33

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) es una familia multigénica del sistema inmune de los vertebrados que comprende un *loci* altamente polimórfico. El papel principal del MHC es reconocer proteínas extrañas, presentarlas a células inmunes especializadas e iniciar una respuesta inmune. Los genes del MHC codifican glicoproteínas de superficie que unen y presentan péptidos antigénicos a células T. Los genes del MHC de clase II (MHC-II) son expresados en células presentadoras de antígeno y presentan antígenos exógenos procesados a los linfocitos T CD4⁺ (Fernández-de-Mera y col., 2009). Dentro de los genes del MHC-II se ubica el responsable de codificar la síntesis de la molécula HLA-DR cuya función es presentar antígeno a las células CD4⁺ y, que además, ha sido utilizada en trabajos de investigación como marcador de activación en poblaciones de linfocitos T.

Con el objetivo de evaluar la activación de los LcB, se midió la expresión de la molécula de clase II HLA-DR mediante citometría de flujo a través de una tinción de superficie con anticuerpos monoclonales fluoromarcados, por ser HLA-DR una proteína constitutiva de la membrana de las células B, los resultados obtenidos fueron evaluados en base a los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF). Los resultados generados muestran valores mayores de IMF por parte de las células B del 100% de los pacientes con TB pulmonar comparados con los sujetos control (figura 11), esto se observó a las 24 y 48 h tanto en las células estimuladas con PE_PGRS33 como con PPD, recalcando que los valores de IMF fueron mayores en la población de células que se pusieron en contacto con PPD debido muy probablemente a la composición del PPD, la cual consiste en un conjunto de diferentes proteínas de *M. tuberculosis* que le brindan la capacidad de activar un mayor número de clonas de LcB. No obstante, también es importante destacar que desde las 24 h y hasta las 144 h se puede ver un descenso gradual en la expresión de HLA-DR en las células B de los pacientes, pudiendo estar esto relacionado con el aumento en la expresión de CD38, evento que marca la diferenciación de las células B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Esto a su vez, nos dice que la expresión de HLA-DR define la capacidad de activación de los LcB así como su habilidad de presentar antígeno a los linfocitos T CD4⁺. Dicha capacidad cesa una vez que el LcB se diferencia a célula plasmática, lo que bien podría explicar la relación observada entre el descenso de la expresión de HLA-DR con la expresión de CD38.

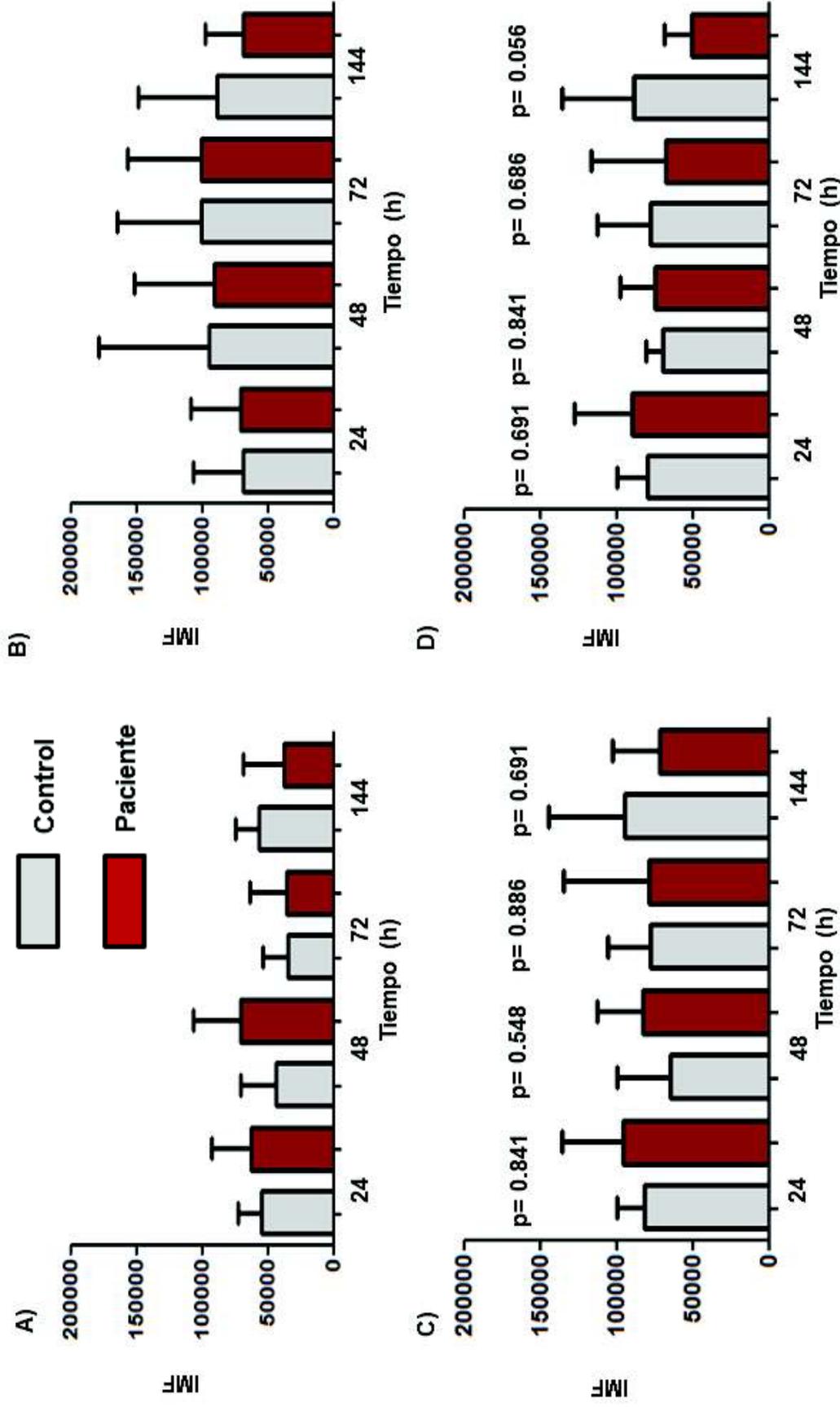


Figura 11. Expresión de HLA-DR en LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control estimulados con PE_PGRS33. A) Células sin estímulo. B) Células estimuladas con PMA. C) Células estimuladas con PPD. D) Células estimuladas con PE_PGRS33. IMF: Intensidad media de fluorescencia.

Hasta el momento no hay publicaciones en las cuales se evalúe la expresión de HLA-DR sobre células B de pacientes con TB pulmonar. Sin embargo, existen algunas donde se ha estudiado a esta molécula precisamente como marcador de activación sobre poblaciones de linfocitos T, entre éstas, se encuentra el trabajo de Wergeland y colaboradores (2011), donde se midió la capacidad de activación de células CD4⁺ y CD8⁺ mediante la expresión de HLA-DR; el estudio se realizó en PBMC de pacientes con TB pulmonar activa y tuberculosis latente, obteniendo como resultado que un mayor porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ procedentes de pacientes con TB activa expresaron HLA-DR en su membrana. Por su parte, Caruso y colaboradores (1997), analizaron la expresión de distintos marcadores de activación sobre células T, entre ellos HLA-DR, encontrando que las células T expresan dicho marcador a partir de las 4 h cuando se les estimula de manera policlonal (PHA), y a partir de las 15 h cuando el estímulo es de naturaleza antígeno-específica (enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*).

En este trabajo no se encontró diferencia significativa entre el grupo de pacientes y el grupo control con las condiciones utilizadas ($p > 0.05$) en lo que a la expresión de HLA-DR se refiere.

Proliferación de LcB Estimulados con PE_PGRS33

La prueba de transformación de linfocitos es uno de los ensayos más comunes utilizados en estudios inmunológicos para evaluar la respuesta inmune a diferentes estímulos (Padureanu y col., 2003). La medición de la dilución de CFSE por citometría de flujo es una poderosa herramienta experimental para medir la proliferación de linfocitos, ya que la CFSE es un fluorocromo con propiedades que lo hacen ser una gran opción para la tinción de linfocitos. Dentro de estas características destacan dos: la primera, son los grupos acetato que le permiten al colorante atravesar fácilmente la membrana plasmática de las células y, la segunda, es su grupo succinimidil, el cual es responsable de la retención del colorante dentro de las células al unirse covalentemente a las proteínas celulares (Quah y col., 2012).

La evaluación de la proliferación de LcB de pacientes con TB pulmonar se llevó a cabo a través de la evaluación de una tinción con CFSE por citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que las células B de los pacientes estimuladas con PE_PGRS33

proliferaron en un menor porcentaje (1.68 %) que las de los sujetos control (2.46%). Por otro lado, las células B de pacientes estimuladas con PPD presentaron un mayor porcentaje de proliferación (6.2 %) que aquellas de los sujetos control (3.98%) (figura 12), esto a causa del porcentaje de proliferación arrojado por un paciente el cual sobresalió (15.1%), los LcB de este paciente presentaron el mismo comportamiento en la proliferación obtenida con PE_PGRS33, es decir, el valor de su porcentaje de proliferación fue mucho mayor que el del resto de los pacientes (2.6%). Esto pone de manifiesto que la respuesta de las células B puede variar y llegar a ser diferente según sea el individuo, dicho de otra manera, la respuesta inmune presentada por un grupo de individuos hacia un mismo antígeno, puede presentar diferencias.

Adicionalmente, se calculó el índice de estimulación (IE) determinando así un criterio de positividad basado en la relación de porcentaje de células en proliferación estimuladas y porcentaje de células en proliferación sin estimular (Padilla, 2013). En la tabla 2 se muestran los índices de estimulación para cada condición en ambos grupos de estudio, un valor mayor o igual a 3 se considera positivo.

Basados en los valores obtenidos del IE, vemos como los LcB de pacientes y sujetos control estimulados por la proteína PE_PGRS33 no lograron proliferar, mientras que los LcB de pacientes estimulados con PPD, si lo lograron.

Cuando se trabaja con el método de dilución de CFSE, se deben de tomar en consideración ciertas variables tanto experimentales como biológicas, esto debido a que pueden ejercer cierta influencia en los resultados obtenidos. Una de las principales variables experimentales es la concerniente a la concentración de CFSE utilizada, puesto que la concentración determina el nivel de fluorescencia de las células y, por lo tanto, la resolución o números de picos de división celular que podrán ser detectados; relacionado también al número de divisiones detectadas, se encuentra la cantidad de células a teñir pues, a menor cantidad de células, será más difícil observar dichos picos de división. Dentro de las variables biológicas, podemos citar la capacidad de las células de tomar colorante extra de aquellas a su alrededor con lo que incrementa la variabilidad entre los picos de división y disminuye la resolución; esta capacidad de las células de tomar colorante es especialmente fuerte en LcB.

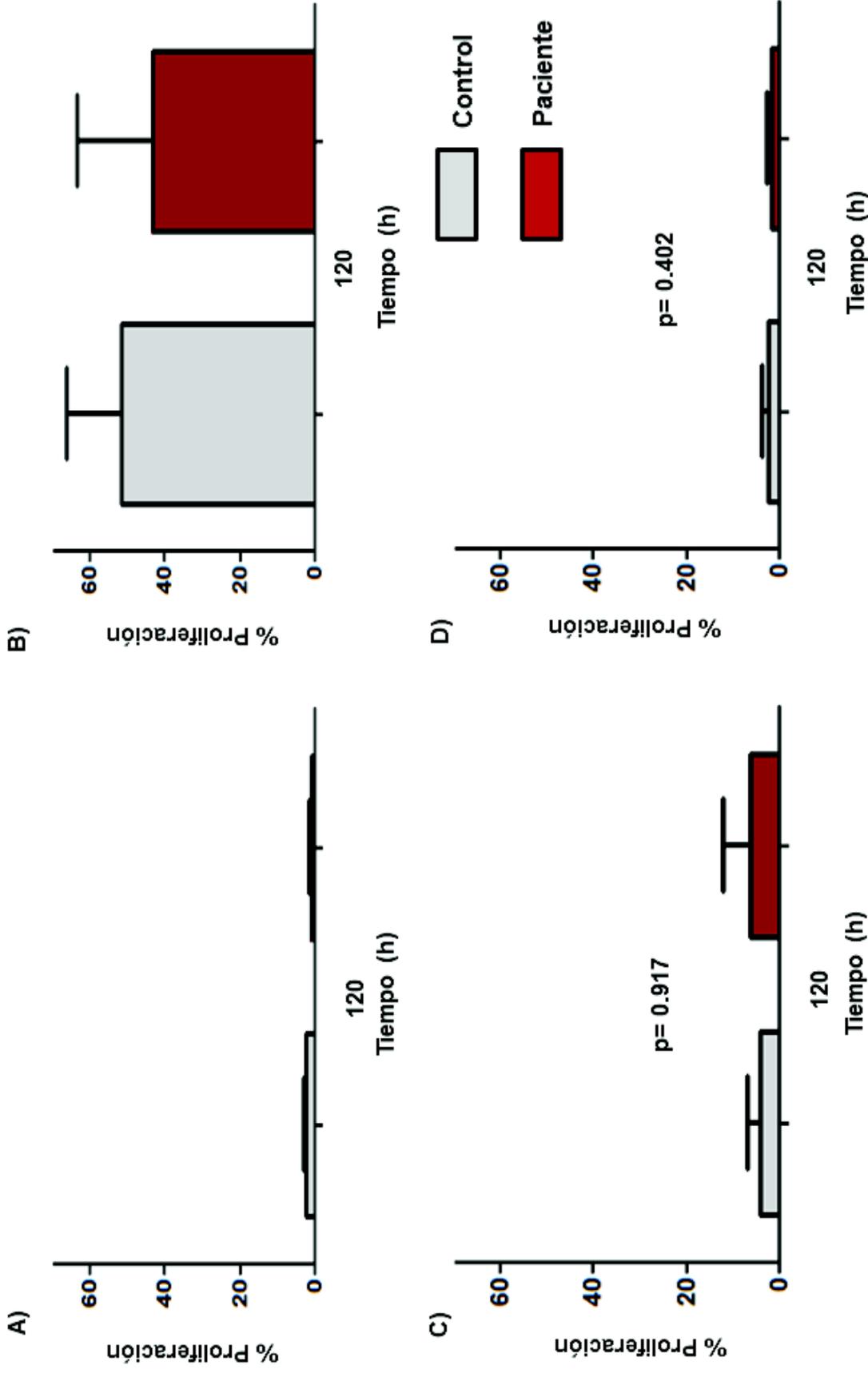


Figura 12. Proliferación de LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control estimulados con PE_PGRS33. A) Células sin estímulo. B) Células estimuladas con PMA. C) Células estimuladas con PPD. D) Células estimuladas con PE_PGRS33.

Cabe mencionar que no se obtuvo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los grupos de estudio con ninguno de los dos estímulos: PE_PGRS33 ($p = 0.402$) y PPD ($p = 0.917$) en lo que se refiere a la proliferación. Esto mismo se observó en el trabajo de investigación de Padilla (2013), donde se llevó a cabo la evaluación de la respuesta inmune de células T CD4⁺ de contactos de pacientes con TB pulmonar con los estímulos PPD y PE_PGRS33.

Tabla 2. Índice de estimulación de LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control.

Estímulo	Controles	Pacientes
PMA	23.66	40.98
PPD	1.83	5.85
PE_PGRS33	1.13	1.58

Un valor ≥ 3 se considera positivo

Expresión de CD38 en LcB Estimulados con PE_PGRS33

CD38 es una glicoproteína transmembranal con una masa molecular de 45 kDa. Esta molécula posee dos funciones biológicas: tiene actividad de enzima, como adenosin difosfato (ADP) ribosil ciclasa, dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD) glicohidrolasa y adenosin difosfato ribosa cíclico (ADPRc) hidrolasa (Vallejo, 2010). Su segunda función consiste en ser un receptor, dicha propuesta basada en estudios de incubación de linfocitos B esplénicos con anticuerpos agonistas anti-CD38 donde se indujeron diversos efectos, como proliferación, movilización de calcio, fosforilación de proteínas, migración y apoptosis. CD38 es expresado desde estadios tempranos en médula ósea, y su nivel de expresión es regulado durante la maduración de linfocitos B o T tanto en humanos como en ratones. Por esta razón, CD38 es considerado un marcador de diferenciación y activación de linfocitos T y B (Rodríguez-Alba y col., 2008).

La evaluación de la expresión de CD38 en LcB de pacientes con TB pulmonar se llevó a cabo a través de citometría de flujo mediante una tinción de superficie con anticuerpos monoclonales fluoromarcados. Al igual que HLA-DR, CD38 se expresa de manera constitutiva

en la célula, por lo que los resultados se muestran como los valores de la intensidad media de fluorescencia. Los resultados obtenidos muestran que las células B tanto de pacientes como de sujetos control comienzan a expresar CD38 desde las 24 h (figura 13), este comportamiento puede verse en células estimuladas con PE_PGRS33 y con PPD recalando que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el efecto inducido por ambos estímulos. El hecho de que este marcador comience a aumentar su expresión desde las 24 h se sustenta en observaciones realizadas en trabajos como el de Rodríguez y colaboradores (2002), quienes realizaron la caracterización inmunofenotípica y evaluaron la capacidad de activación (midiendo como marcadores de activación CD38 y HLA-DR) de linfocitos T periféricos de individuos sanos, de diagnosticados con TB activa y de aquellos que recibieron terapia antituberculosa durante 6 meses; observando que los LcT CD8⁺ de pacientes con TB activa expresaron los mayores porcentajes del marcador CD38 en respuesta a su activación durante la forma activa de la enfermedad. Esto nos revela que el marcador en cuestión aumenta su expresión también como respuesta a la activación celular.

En la figura 13, se pueden visualizar los valores medios de IMF relativos a la expresión de CD38 en LcB de pacientes y sujetos control a las 24, 48, 72 y 144 h de estimulación con PE_PGRS33 y PPD. Al analizar estos valores podemos ver que las células B de los pacientes estimuladas con PPD comienzan a diferenciar a células plasmáticas a un tiempo corto de 72 h, es decir, las células B están proliferando de manera más rápida. Este hecho es característico de una respuesta inmune secundaria o de memoria, siendo así, es posible inferir la presencia de células B de memoria a PPD. Lo anterior puede visualizarse en el estudio de Sebina y colaboradores (2012) donde evaluaron la presencia de células B de memoria a PPD en individuos sanos vacunados y no vacunados con BCG, encontrando la presencia de dichas células en ambos grupos de individuos, pero siendo mayor en el grupo de personas vacunadas. Con respecto a la proteína PE_PGRS33, como ya se mencionó anteriormente, ésta no fue capaz de inducir un proceso de proliferación (índice de estimulación < 3) en los LcB en ninguno de los grupos de estudio, lo que consecuentemente provoca que éstos no diferencien a células plasmáticas; por lo tanto, la expresión de CD38 en los LcB estimulados con PE_PGRS33 se debe al proceso de activación de las células, porque como ya se ha indicado, CD38 también se expresa en respuesta a un proceso de activación.

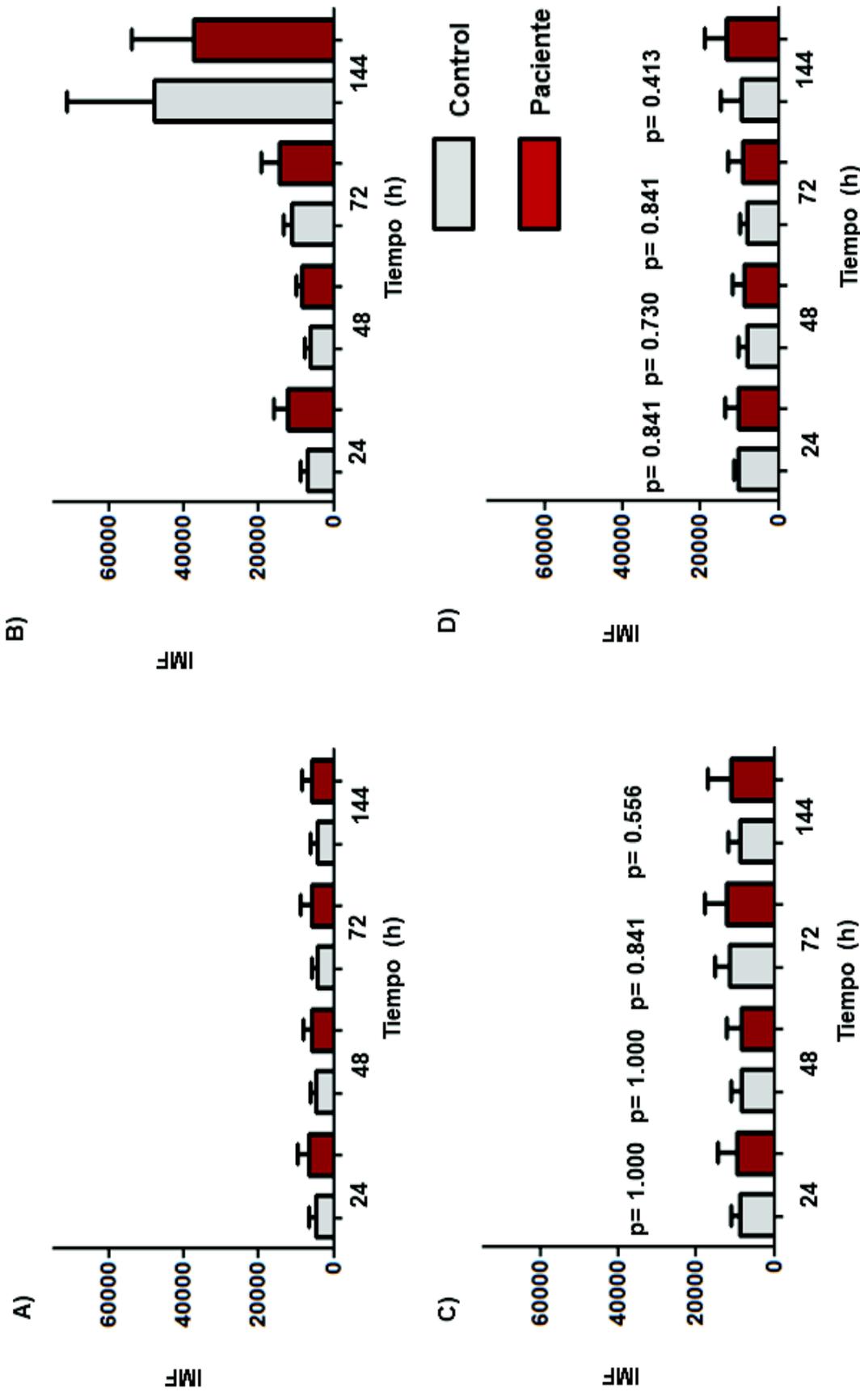


Figura 13. Expresión de CD38 en LcB de pacientes con TB pulmonar y sujetos control estimulados con PE_PGRS33. A) Células sin estímulo. B) Células estimuladas con PMA. C) Células estimuladas con PPD. D) Células estimuladas con PE_PGRS33. IMF: Intensidad media de fluorescencia.

Dicho proceso de activación inducido por PE_PGRS33 no fue suficiente para promover la proliferación y diferenciación de las células B. El aumento en la IMF, relativo a la expresión de CD38 en LcB estimulados con la proteína de estudio a las 144 h, podría encontrar su sustento en la misma explicación que el pico de *novo* en CD69, es decir, hay generación de nuevas clonas que a su vez están activándose.

Por último, es importante mencionar que no hubo diferencia significativa en la expresión de CD38 entre el grupo de pacientes y el grupo control ($p > 0.05$) con ninguno de los antígenos evaluados, pese a que la expresión del marcador de diferenciación fue ligeramente mayor en los pacientes que en los sujetos control a lo largo de toda la cinética de evaluación antígeno-específica tanto con PE_PGRS33 como con PPD.

CONCLUSIONES

La expresión de los marcadores CD38, CD69 y HLA-DR en LcB de pacientes con TB pulmonar, en presencia de PE_PGRS33 y PPD, es mayor que la de los controles debido a una previa sensibilización hacia antígenos de *M. tuberculosis*.

Los LcB de pacientes con TB pulmonar se activan en presencia de la proteína PE_PGRS33, ya que expresan CD69 y HLA-DR.

La proteína PE_PGRS33 no es capaz de inducir una respuesta de LcB en pacientes con TB pulmonar, no se observa ni proliferación ni diferenciación.

Los LcB de pacientes con TB pulmonar se activan, proliferan y diferencian en presencia de PPD.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio (expresión de CD69, HLA-DR, CD38 y proliferación), se establece la conclusión de que la respuesta inmune de LcB de pacientes con TB pulmonar no es diferente de aquella que desarrollan los LcB de individuos sanos inducida por los estímulos PE_PGRS33 y PPD en las condiciones aquí utilizadas.

RECOMENDACIONES

Incrementar el número de sujetos de estudio, puesto que resulta de vital importancia seguir realizando estudios de evaluación de la respuesta inmune basados en un modelo humano.

Establecer un estudio utilizando distintos grupos de individuos: aquellos con TB activa que no hayan recibido tratamiento, con TB inactiva (después de 6 meses de tratamiento) e individuos sanos.

Evaluar la interacción LcB-LcT midiendo la expresión de CD40 y CD40L.

Evaluar la presencia de anticuerpos anti-PE_PGRS33 tanto en el suero de pacientes con TB pulmonar como en el sobrenadante de los ensayos *in vitro* aquí realizados.

Evaluar la presencia de LcB de memoria mediante marcadores como CD27 y su respuesta a PE_PGRS33.

Estandarizar las condiciones de evaluación del presente ensayo *in vitro* con la proteína PE_PGRS33.

Estandarizar las concentraciones adecuadas de CFSE a utilizar en los ensayos de proliferación de células B.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez N, Otero O, Falero G, Cádiz A, Marcet R, Carbonell AE, Sarmiento ME, Norazmi MN, Acosta A. 2010. Purificación de inmunoglobulina A secretora a partir de calostro humano. *VacciMonitor*. 19: 26-29.
- Avgustin B, Kotnik V, Skoberne M, Malovrh T, Skralovnik-Stern A, Tercej M. 2005. CD69 Expression on CD4⁺ T lymphocytes after *in vitro* stimulation with tuberculin is an indicator of immune sensitization against *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12: 101-106.
- Bansal K, Elluru SR, Narayana Y, Chaturvedi R, Patil SA, Kaveri SV, Bayry J, Balaji KN. 2010. PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis* induce maturation and activation of human dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 184: 3495-3504.
- Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, Talarico S, Kundu M, Basu J. 2007. Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 1039-1050.
- Behar SM, Martin CJ, Nunes-Alves C, Divangahi M, Remold HG. 2011. Lipids, apoptosis, and cross-presentation: links in the chain of host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*. 13: 749-756.
- Bobadilla K, Sada E, Jaime ME, González Y, Ramachandra L, Rojas RE, Pedraza-Sánchez S, Michalak C, González-Noriega A, Torres M. 2012. Human phagosome processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigens is modulated by interferon- γ and interleukin-10. *Immunology*. 138: 34-46.
- Cadieux N, Parra M, Cohen H, Maric D, Morris SL, Brennan MJ. 2011. Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 protein. *Microbiology*. 157: 793-804.
- Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A. 1997. Flow cytometric of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*. 27: 71-76.

- Cascioferro A, Delogu G, Colone M, Sali M, Stringaro A, Arancia G, Fadda G, Palu G, Manganeli R. 2007. PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell wall. *Molecular Microbiology*. 66: 1536-1547.
- Davis JM, Ramakrishnan L. 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculosis infection. *Cell*. 136: 37-49.
- de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infection and Immunity*. 73: 6711-6720.
- Divangahi M, Chen M, Huixian G, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM, Fortune S, Behar SM, Remold HG. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nature*. 460: 899-906.
- Divangahi M. 2013. The new paradigm of immunity to tuberculosis. 1st ed. New York: Springer. 292 p.
- Ernst JD. 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature*. 485: 581-591.
- Fernandez-de-Mera IG, Vicente J, Naranjo V, Fierro Y, Garde JJ, de la Fuente J, Gortazar C. 2009. Impact of major histocompatibility complex class II polymorphisms on Iberian red deer parasitism and life history traits. *Infection, Genetics and Evolution*. 9: 1232-1239.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, Santagelo MP, Cataldi AA, Bigi F. 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 4: 1-64.
- García MA, Sarmiento ME, Acosta A. 2009. La inmunidad antituberculosa y su aplicación en el desarrollo de candidatos vacunales. *VaccinMonitor*. 18: 25-34.
- Gastélum PC. 2005. Producción de IL-12 y expresión de su receptor en pacientes con tuberculosis pulmonar crónica. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. 2006. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evolutionary Biology*. 6: 1-31.

- Hernandez J, Velazquez C, Valenzuela O, Robles Zepeda R, Ruiz-Bustos E, Navarro M, Garibay-Escobar A. 2010. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunological Investigations*. 39: 197-205.
- Kaufmann SHE. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nature*. 1: 20-30.
- Klink M, Brzezinska, Szulc I, Brzostek A, Kielbik M, Sulowska Z, Dziadek J. 2013. Cholesterol oxidase is indispensable in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos One*. 8: 1-12.
- Maglione PJ, Chan J. 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Immunology*. 39: 676-686.
- Mahboud BH. 2013. Tuberculosis-current issues in diagnosis and management. 1st ed. Croatia: InTech. 489 p.
- Narayana Y, Joshi B, Katoch VM, Mishra KC, Balaji KN. 2007. Differential B-cell responses are induced by *Mycobacterium tuberculosis* PE antigens Rv1169c, Rv0978c, and Rv1818c. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14: 1334-1341.
- Padilla EI. 2013. Evaluación de la respuesta de linfocitos T CD4+ de sangre periférica ante la proteína PE_PGRS33 y sus péptidos en individuos sensibilizados hacia antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad de Sonora.
- Padureanu L, Cozmei C, Sorete-Arbore A, Gramada D, Arama S, Mihaescu T, Carasevici E. 2003. Flow-cytometric analysis of specific-proliferation in tuberculosis using the CFSE dye dilution technique. *The Journal of Preventive Medicine*. 11: 67-74.
- Palomino JC. 2007. Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. 1st ed. Brasil: TuberculosisTextbook.com. 687 p.
- Quah BJC, Lyons AB, Parish CR. 2012. The use of CFSE-like dyes for measuring lymphocyte proliferation: Experimental considerations and biological variables. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*. 7: 53-64.
- Ramakrishnan L. 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature*. 12: 352-366.

- Rodríguez DSS, Medeiros EAS, Weckx LY, Bonnez W, Salomao R. 2002. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 128: 149-154.
- Rodríguez-Alba JC, Moreno-García ME, Sandoval-Montes C, Rosales-García VH, Santos-Argumedo L. 2008. CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen. *Blood*. 111: 3644-3652.
- Sebina I, Cliff JM, Smith SG, Nogaro S, Webb EL, Riley EM, Dockrell HM, Elliot AM, Hafalla JCR, Cose S. 2012. Long-lived memory B-cell responses following BCG vaccination. *Plos One*. 7: 1-7.
- Simms PE, Ellis TM. 1996. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 3: 301-304.
- Singh PP, Parra M, Cadieux N, Brennan MJ. 2008. A comparative study of host response to three *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS proteins. *Microbiology*. 154: 3469-3479.
- Talarico S, Cave MD, Foxman B, Marrs CF, Zhang L, Bates JH, Yang Z. 2007. Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 polymorphism with clinical and epidemiological characteristics. *Tuberculosis*. 87: 338-346.
- Vallecillo AJ, Espitia C. 2009. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 is repressed during stationary phase and stress conditions, and its transcription is mediated by sigma factor A. *Microbial Pathogenesis*. 46:119-127.
- Vallejo Flores G. 2010. Caracterización histológica de las células que expresan CD38 en el bazo de ratones de la cepa C57BL/6. Tesis de Maestra en Ciencias en Inmunología. Instituto Politécnico Nacional.
- van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 294-309.
- Vordermeier HM, Hewinson RG, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Gideon HP, Young DB, Sampson SL. 2012. Conserved immune recognition hierarchy of mycobacterial PE/PPE proteins during infection in natural hosts. *Plos One*. 7: 1-15.

- Wang X, Barnes PF, Dobos-Elder KM, Townsed JC, Chung Y, Shams H, Weis SE, Samten B. 2009. ESAT-6 inhibits production of IFN- γ by *Mycobacterium tuberculosis*-responsive human T cells. *The Journal of Immunology*. 182: 3668-3677.
- Wergeland I, ABmus J, Dyrhol-Riise AM. 2011. T regulatory cells and immune activation in *Mycobacterium tuberculosis* infection and the effect of preventive therapy. *Scandinavian Journal of Immunology*. 73: 234-242.
- World Health Organization. 2012. Global Tuberculosis Report.
- Zumbo A, Palucci I, Cascioferro A, Sali M, Ventura M, D Alfonso P, Iantomasi R, Di Sante G, Ria F, Sanguinetti M, Fadda G, Manganelli R, Delugo G. 2013. Functional dissection of protein domains involved in the immunomodulatory properties of PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathogenesis and Disease*. 69: 232-239.

ANEXO 1

Separación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)

1. Obtener una muestra de sangre venosa con heparina.
2. Diluir la muestra sanguínea en relación 1:2 con PBS 1X.
3. Estratificar la sangre en Histopaque (Sigma-Aldrich) en relación 1:3 en tubos cónicos de 15 mL.
4. Centrifugar la muestra a 448 xg durante 40 minutos a 25 °C.
5. Con ayuda de una pipeta Pasteur, separar la capa de PBMC y colocarla en un tubo cónico de 15 mL.
6. Agregar un volumen máximo de PBS 1X.
7. Centrifugar a 448 xg por 5 minutos a 25 °C. Después, descartar el sobrenadante.
8. Repetir los pasos 6 y 7 dos veces.
9. Resuspender el botón celular en 1 mL de medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich).
10. Realizar una cuenta de viabilidad celular con azul de tripano diluyendo las células en relación 1:10.

ANEXO 2

Tinción de Superficie de Células Mononucleares

1. Cosechar las células en tubos FACS.
2. Centrifugar las células a 448 xg por 5 minutos a 25°C.
3. Descartar el sobrenadante y teñir el botón celular con el/los anticuerpos fluoromarcados requeridos.
4. Agitar en vortex por unos segundos.
5. Almacenar las muestras 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
6. Agregar 4 mL de PBS 1X.
7. Agitar en vortex por unos segundos.
8. Centrifugar a 448 xg por 5 minutos a 25°C.
9. Desechar el sobrenadante y fijar las células agregando 200 μ L de p-formaldehído al 2% y 200 μ L de PBS 1X.
10. Filtrar las muestras con tela de organza.
11. En caso de que las muestras no sean adquiridas inmediatamente, almacenarlas a 4 °C en ausencia de luz.

ANEXO 3

Tinción de Superficie en Sangre Total

1. Obtener una muestra de sangre venosa con anticoagulante.
2. Tomar 50 μ L de sangre, colocarlos en un tubo FACS y agregar el/los anticuerpos fluoromarcados requeridos.
3. Almacenar las muestras 30 minutos en ausencia de luz a temperatura ambiente.
4. Agregar 4 mL de solución de lisis a cada muestra.
5. Agitar en vortex por unos segundos.
6. Almacenar las muestras en oscuridad a temperatura ambiente por 5 minutos.
7. Centrifugar a 448 xg por 5 minutos a 25°C. Posteriormente, descartar el sobrenadante.
8. Agregar 4 mL de PBS 1X a cada muestra.
9. Agitar en vortex por unos segundos.
10. Centrifugar a 448 xg por 5 minutos a 25°C. Enseguida, descartar el sobrenadante.
12. Fijar las muestras agregando 200 μ L de p-formaldehído al 2% y 200 μ L de PBS 1X.
11. Filtrar las muestras con tela de organza.
12. En caso de que las muestras no sean adquiridas inmediatamente, almacenarlas a 4 °C en ausencia de luz.

ANEXO 4

Preparación de Medio RPMI

Para preparar un volumen de 250 mL de medio de cultivo:

- 2.6 gr de medio RPMI
 - 0.5 gr de NaHCO_3
 - 2.5 mL de piruvato
 - 2.5 mL de penicilina
 - 12.5 mL de suero fetal bovino (SFB)
 - 232.5 mL de H_2O
1. Pesar el medio RPMI y el NaHCO_3 y disolverlos en 232.5 mL de agua destilada.
 2. Ajustar entre 7.2 y 7.4 de pH.
 3. Agregar los suplementos (SFB, piruvato, penicilina) en condiciones de esterilidad.
 4. Filtrar (0.22 μm)

ANEXO 5

Preparación de PBS 10X

Para preparar un volumen de un litro:

- 1.9 gr de NaH_2PO_4
- 12 gr de Na_2HPO_4
- 85 gr de NaCl

1. Disolver las tres sales en un litro de agua destilada.
2. Ajustar el pH a 7.2
3. Filtrar (0.22 μm)

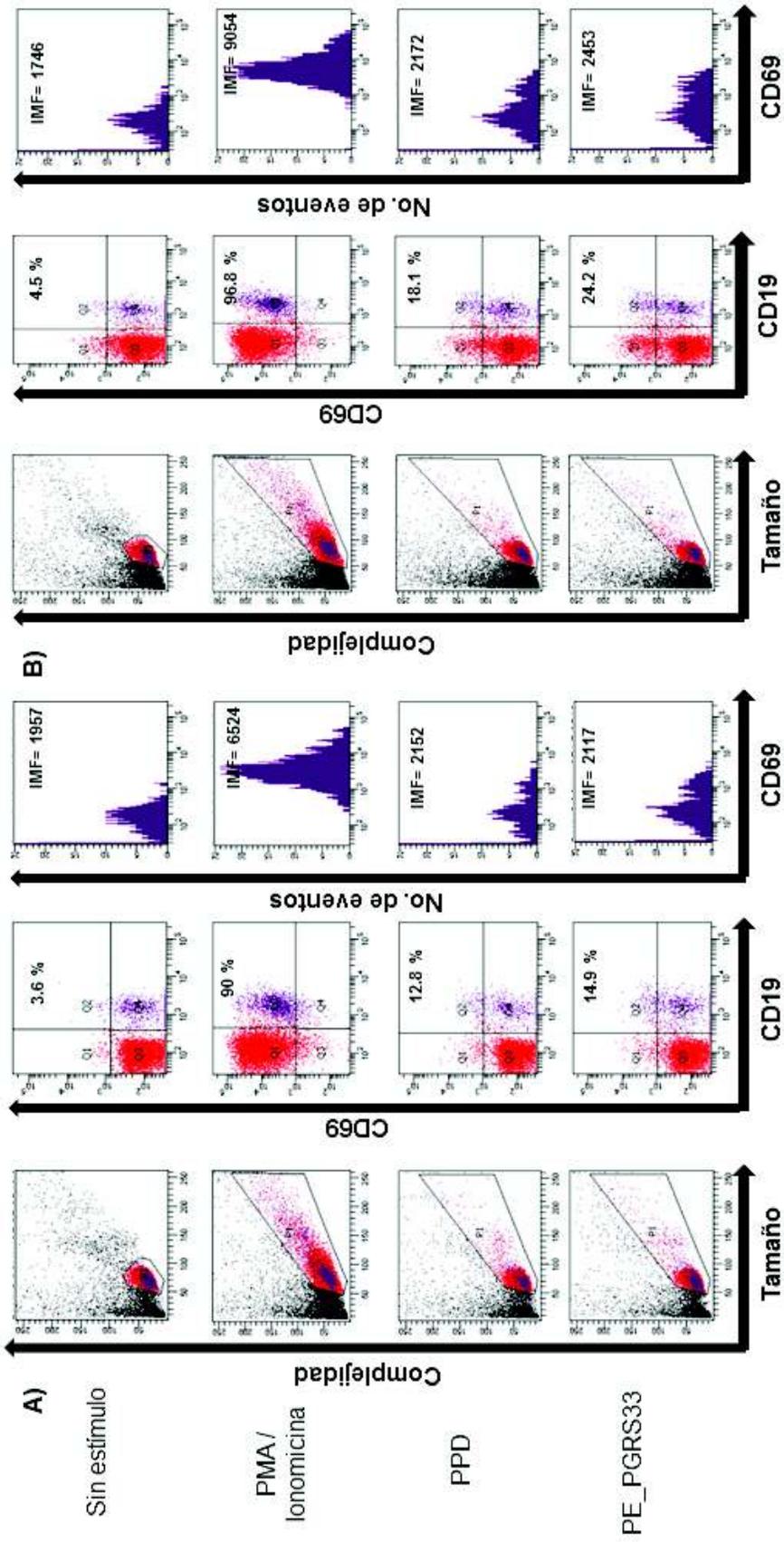
ANEXO 6

Preparación de Solución de Lisis

- 2.10 gr de NH_4Cl
- 0.25 gr de KHCO_3
- 9.3 mg de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1. Llevar a 250 mL con agua destilada y ajustar el pH entre 7.2 y 7.4
2. Filtrar (0.22 μm).

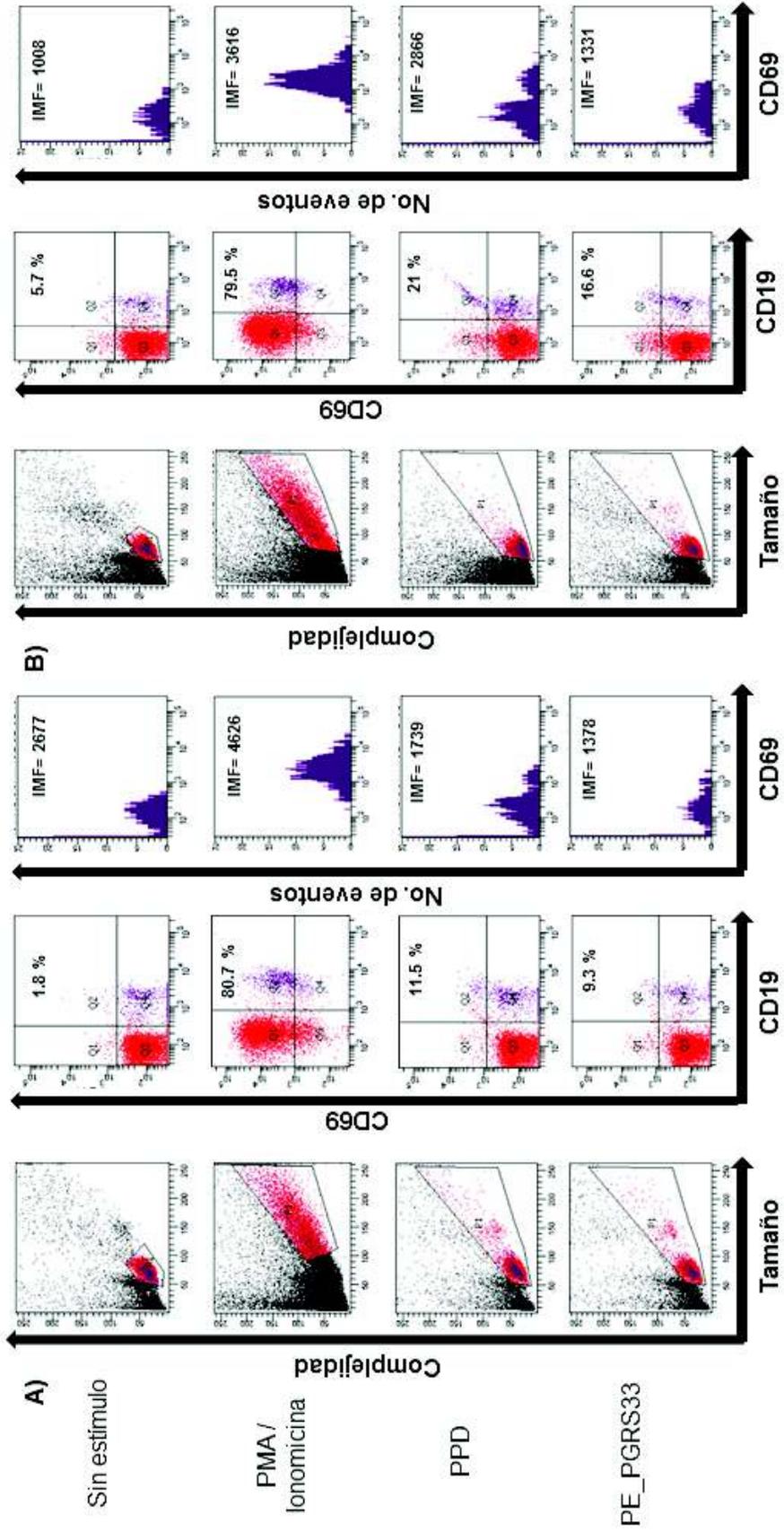
ANEXO 7



IMF: Intensidad media de fluorescencia

Gráficos representativos de la expresión de CD69 en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 24 h. A) Control. B) Paciente

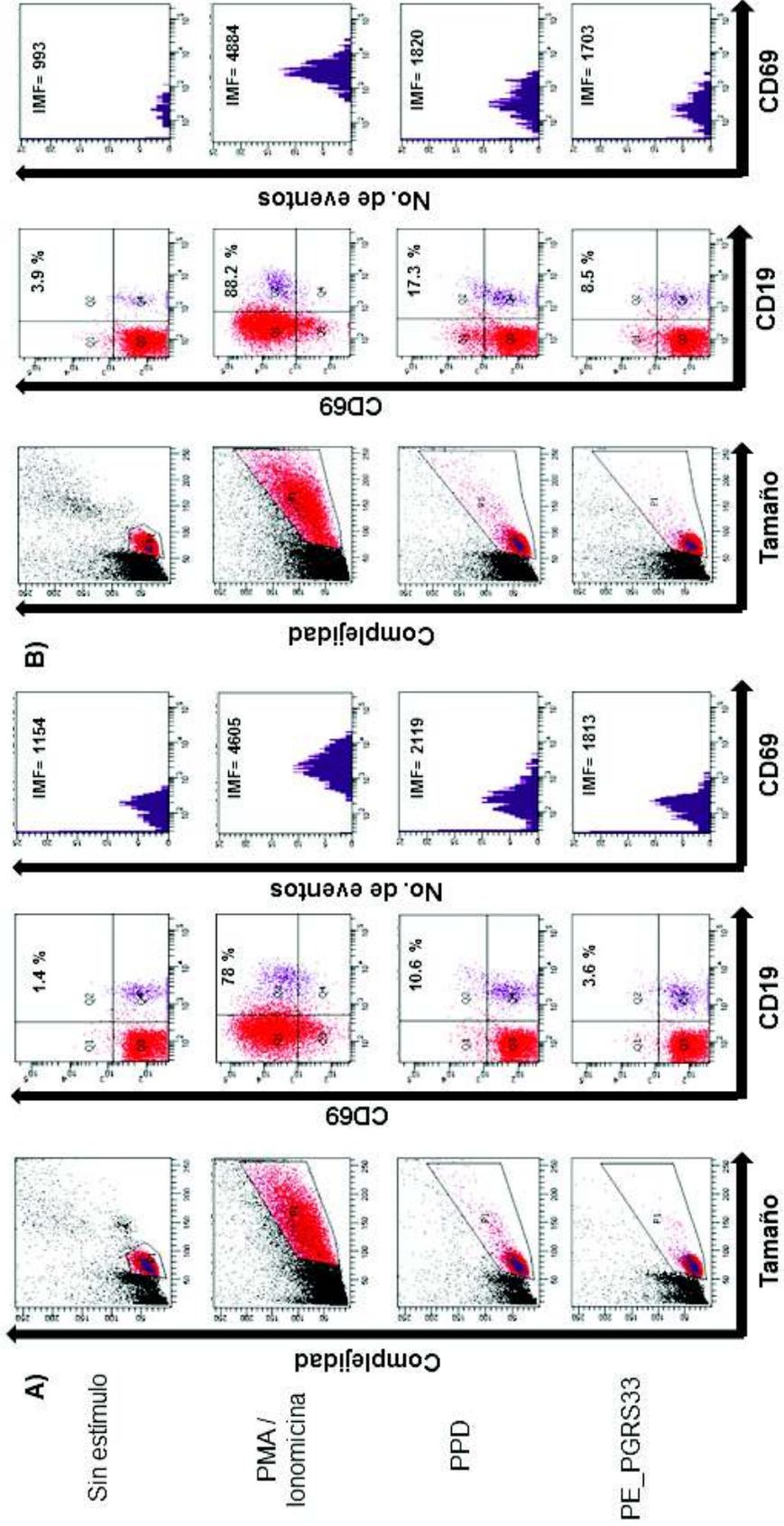
ANEXO 8



IMF: Intensidad media de fluorescencia

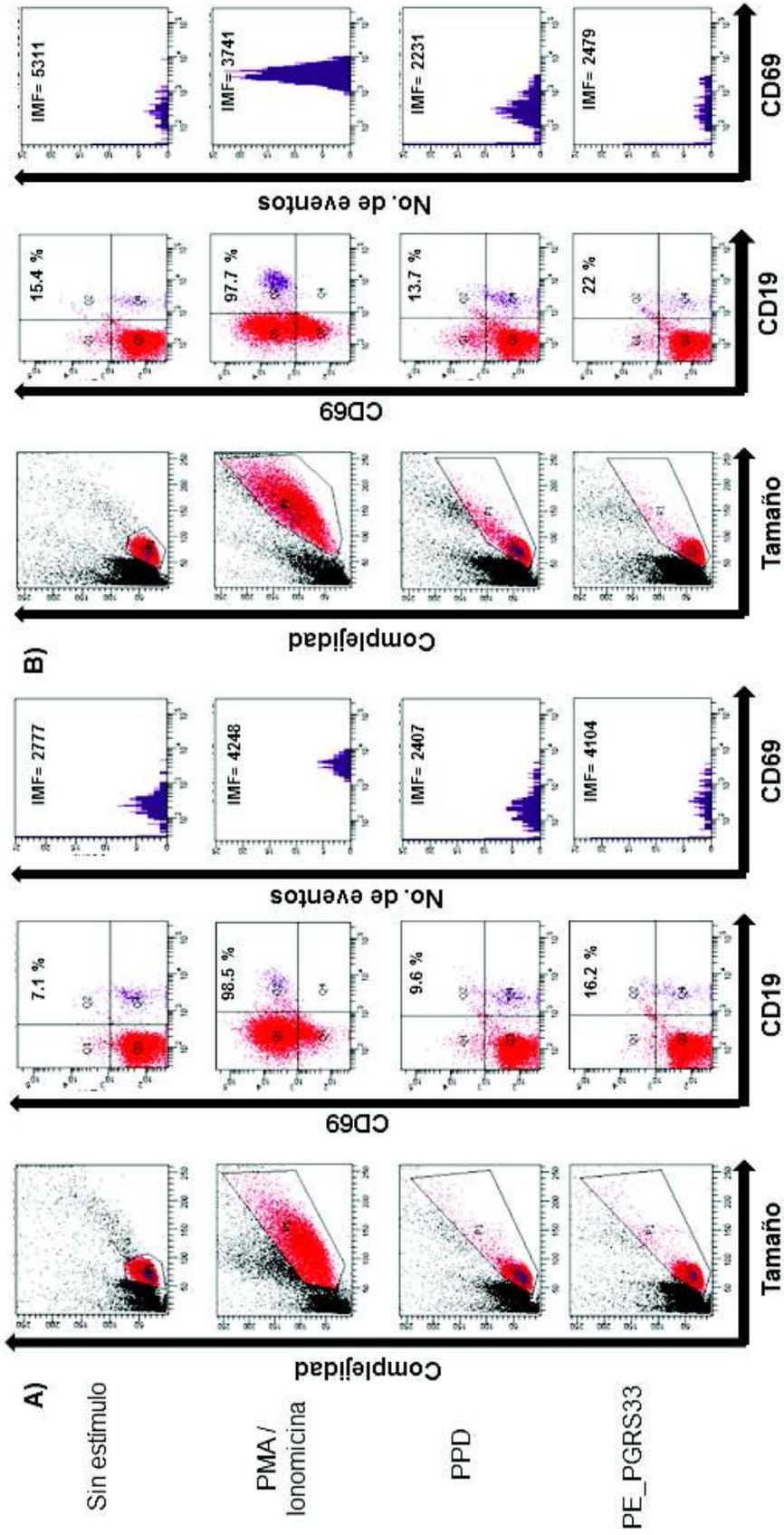
Gráficos representativos de la expresión de CD69 en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 48 h. A) Control. B) Paciente

ANEXO 9



Gráficos representativos de la expresión de CD69 en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 72 h. A) Control. B) Paciente

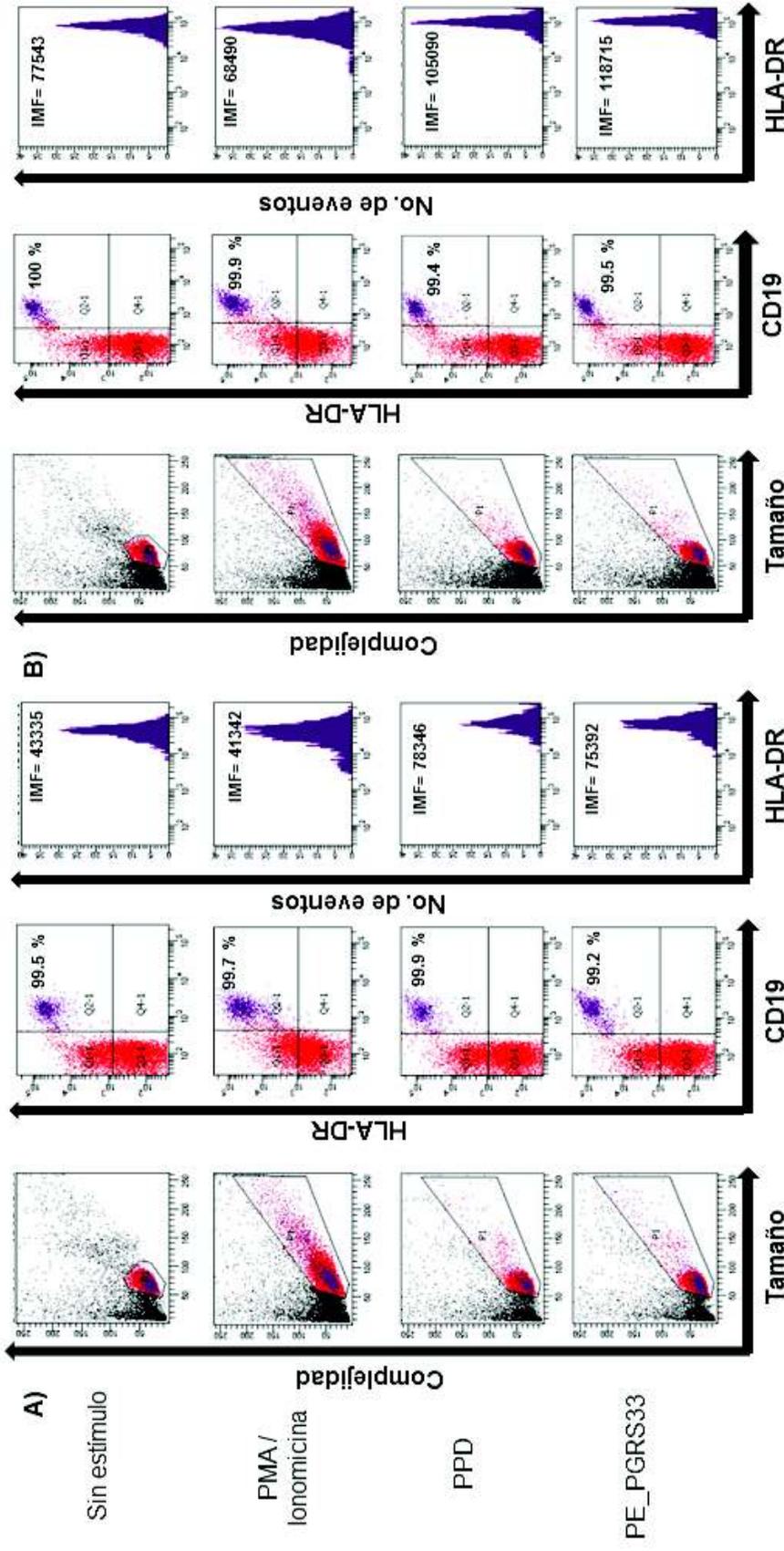
ANEXO 10



IMF: Intensidad media de fluorescencia

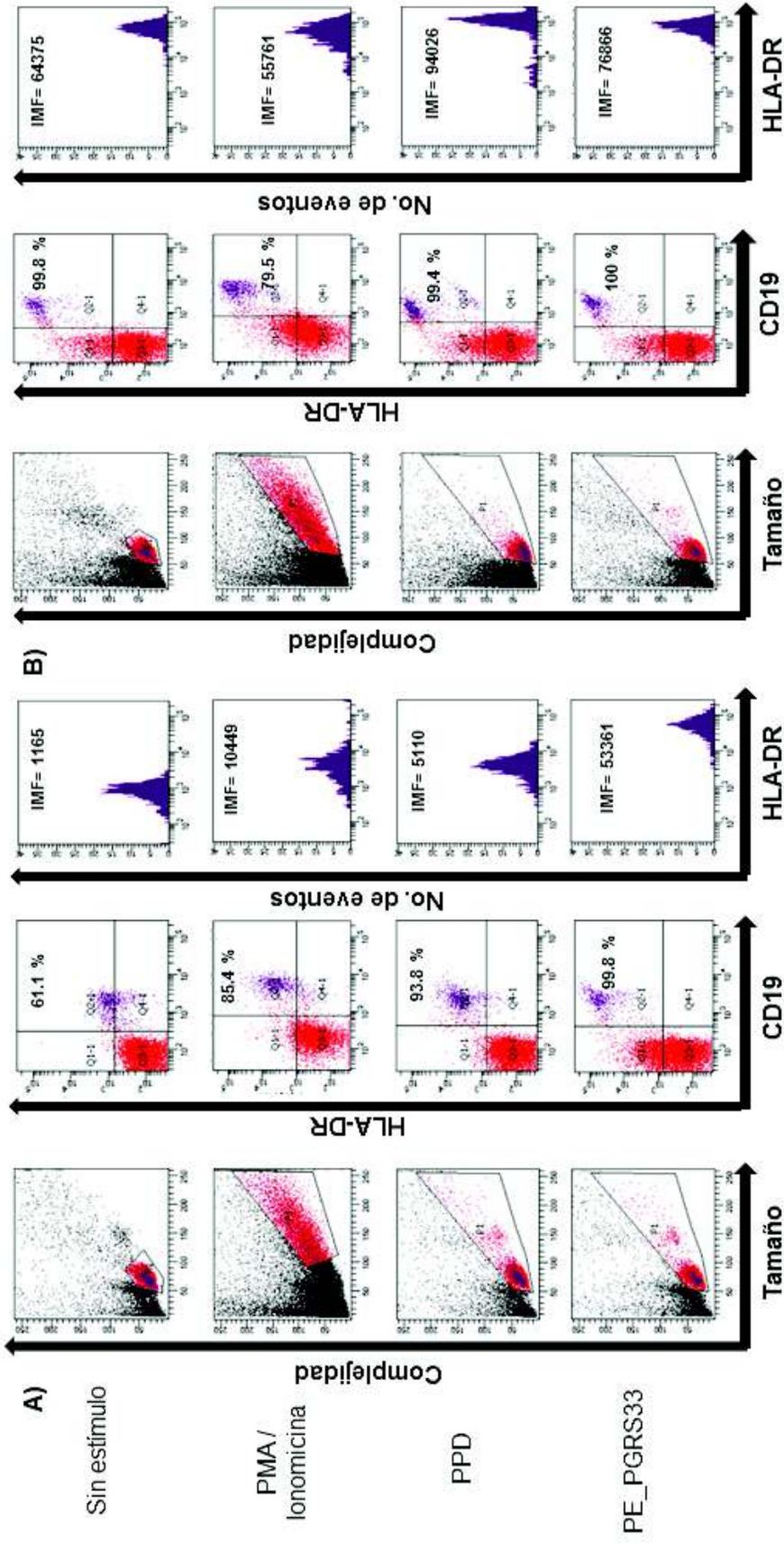
Gráficos representativos de la expresión de CD69 en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 144 h. A) Control. B) Paciente

ANEXO 11



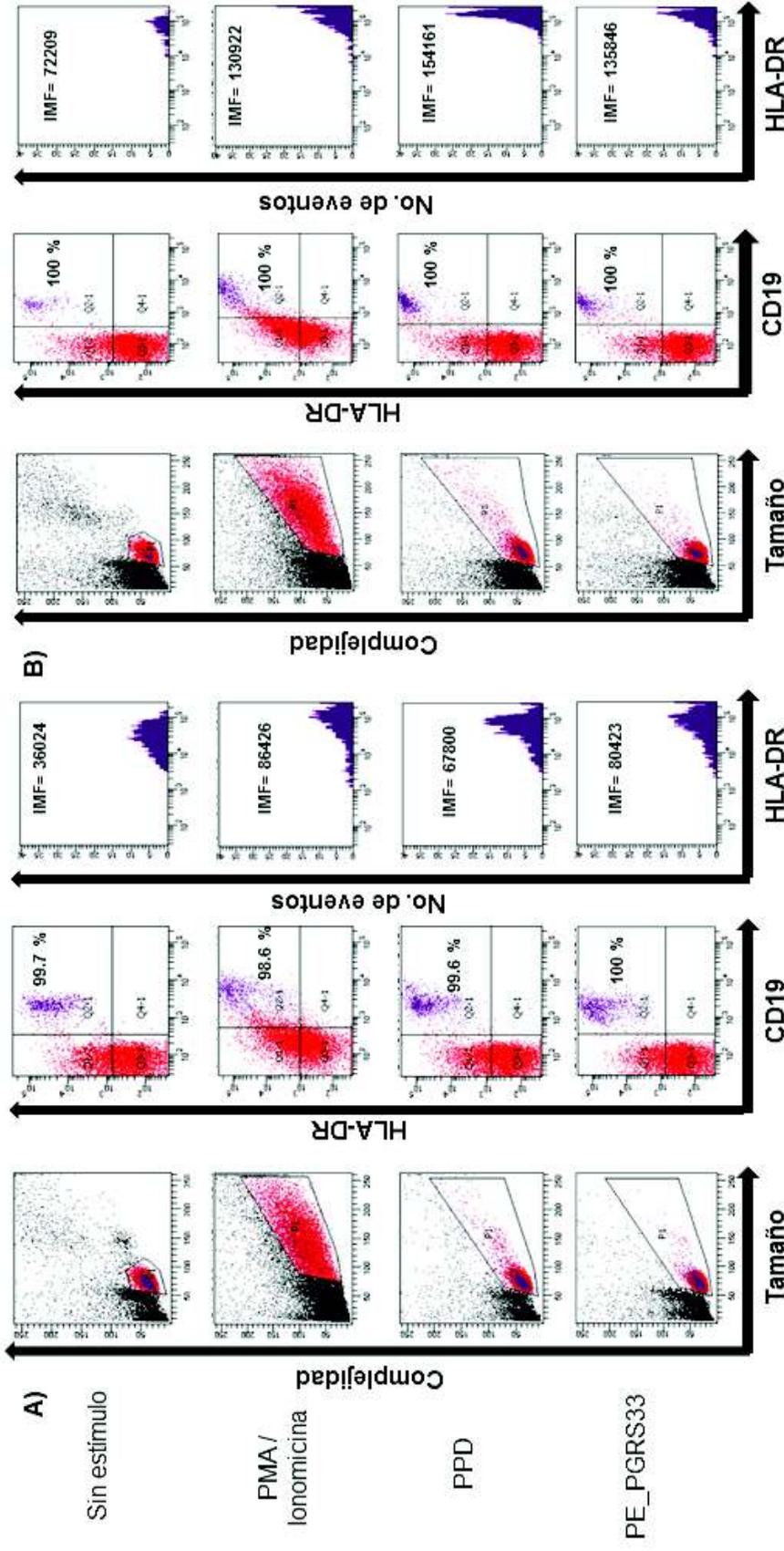
IMF: Intensidad media de fluorescencia
 Gráficos representativos de la expresión de HLA-DR en LcB estimulado con PE_PGRS33 a las 24 h. A) Control. B) Paciente

ANEXO 12



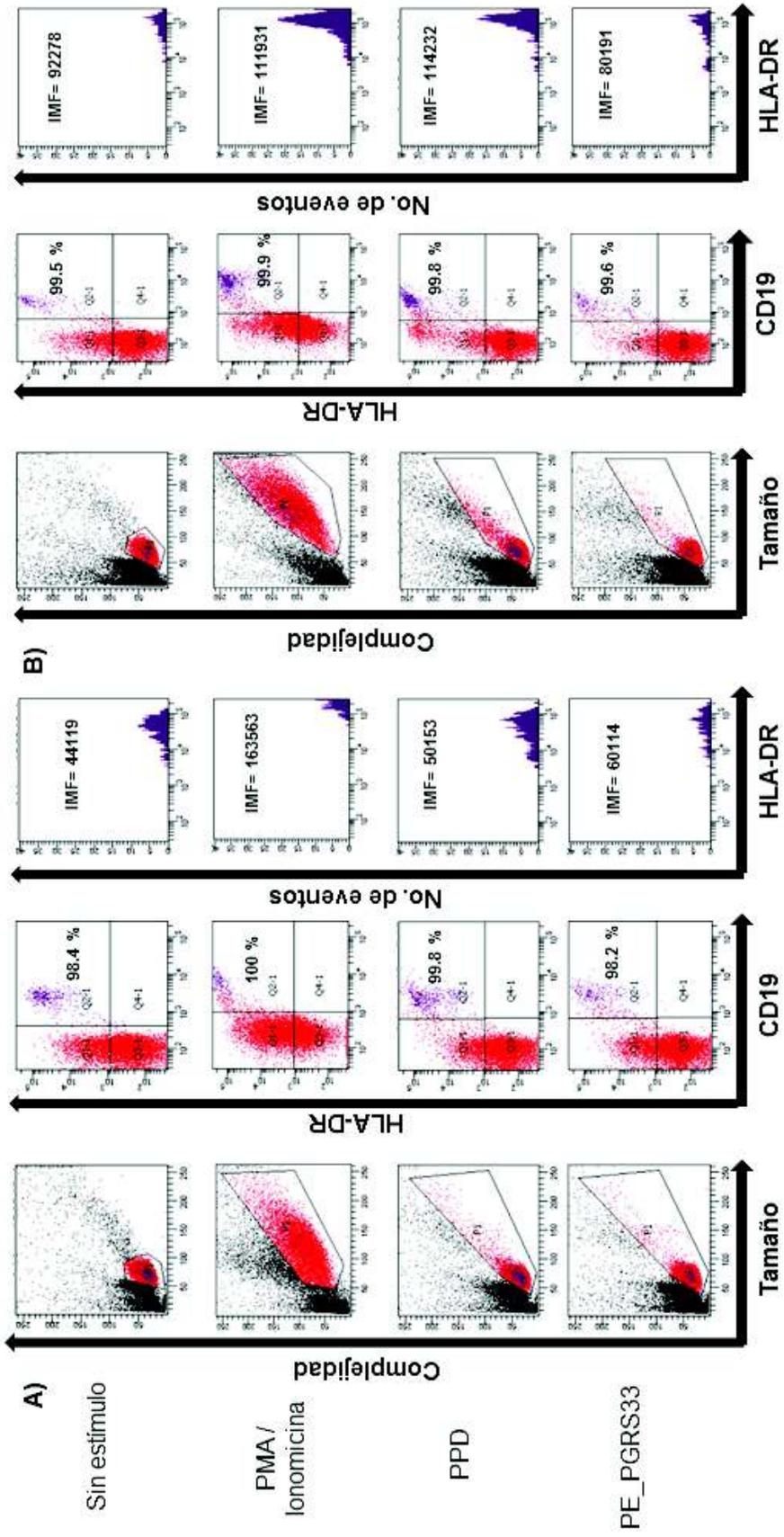
IMF: Intensidad media de fluorescencia
 Gráficos representativos de la expresión de HLA-DR en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 48 h. A) Control. B) Paciente

ANEXO 13



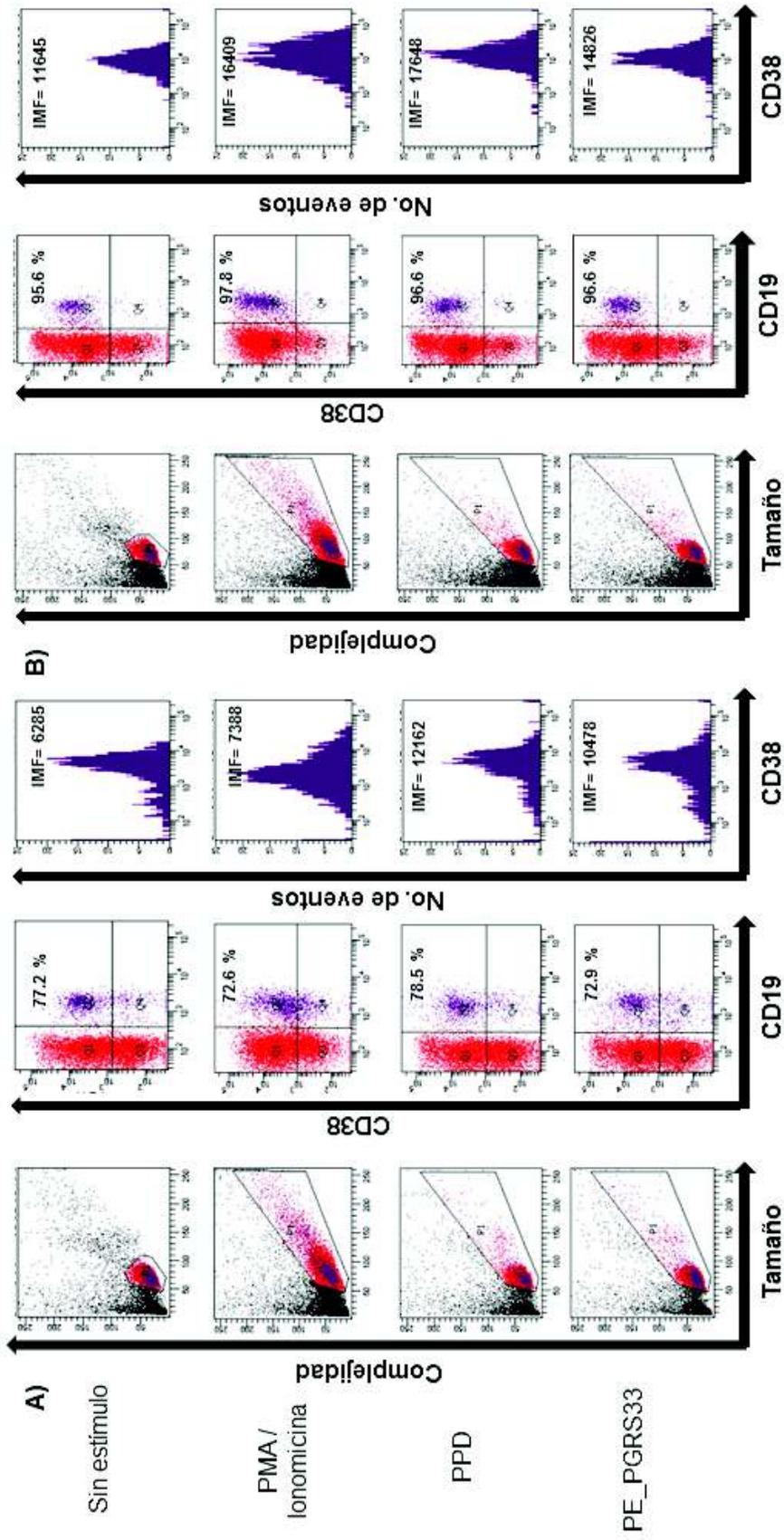
IMF: Intensidad media de fluorescencia
 Gráficos representativos de la expresión de HLA-DR en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 72 h. A) Control. B) Paciente

ANEXO 14



IMF: Intensidad media de fluorescencia
 Gráficos representativos de la expresión de HLA-DR en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 144 h. A) Control. B) Paciente

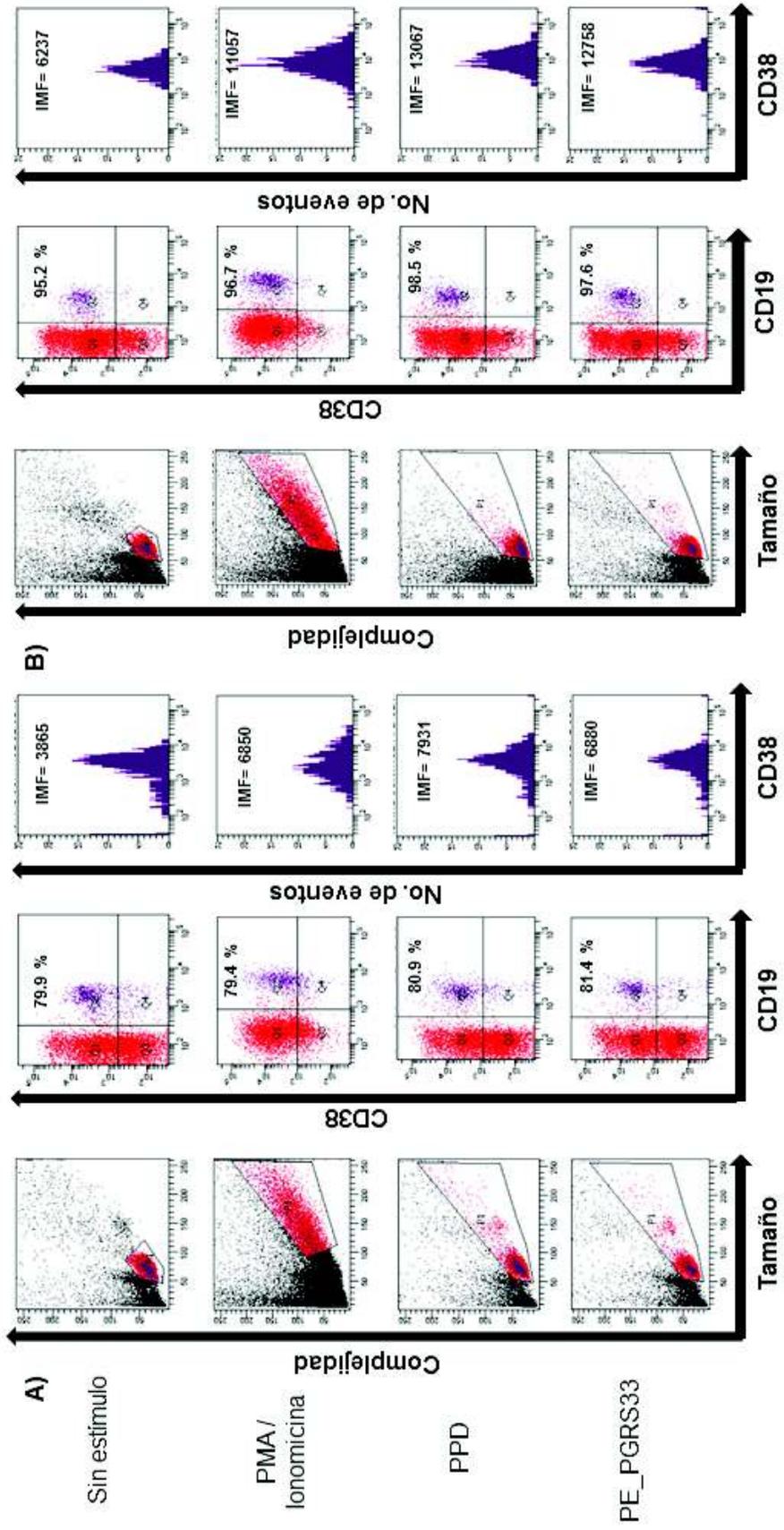
ANEXO 15



IMF: Intensidad media de fluorescencia

Gráficos representativos de la expresión de CD38 en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 24 h. A) Control. B) Paciente

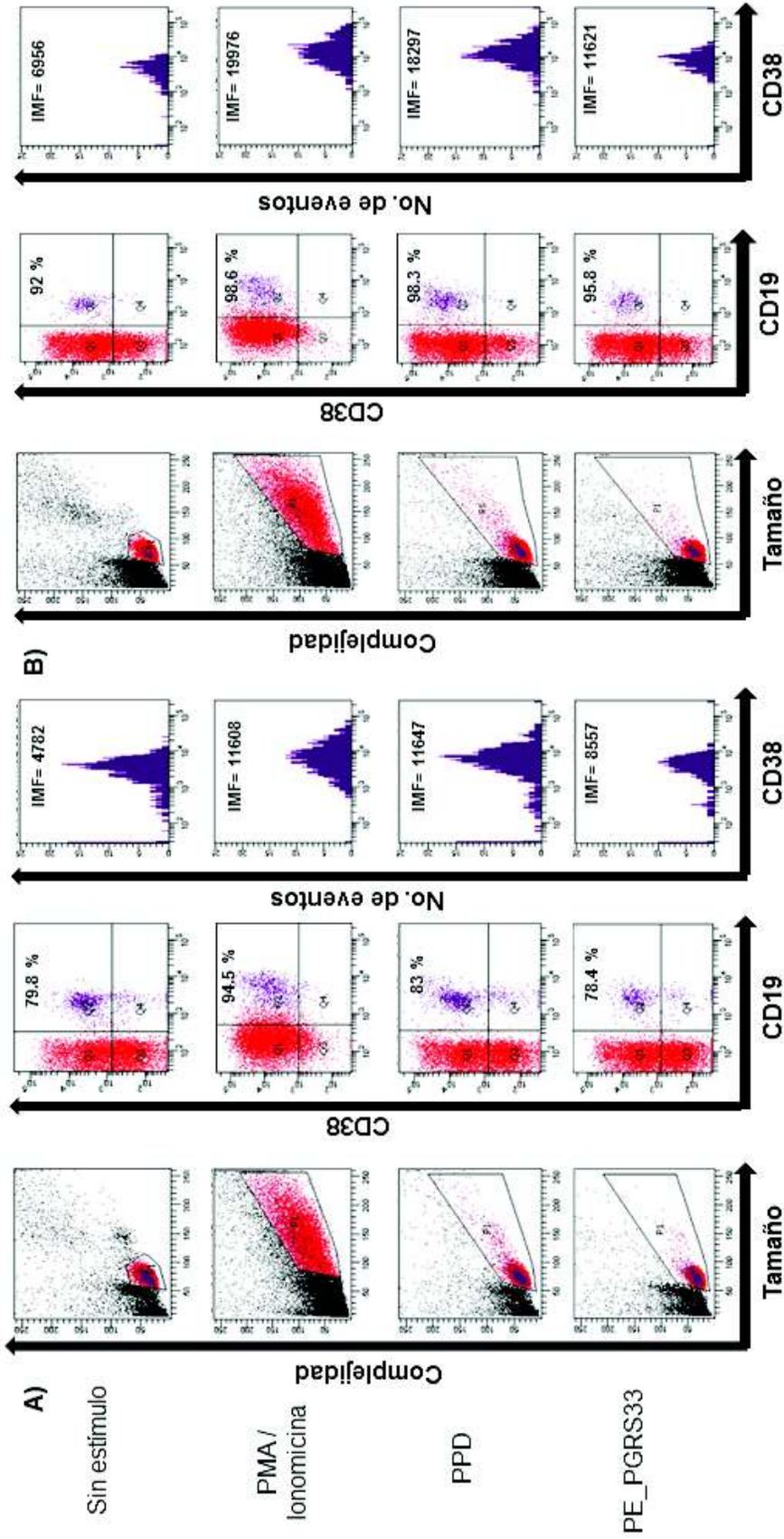
ANEXO 16



IMF: Intensidad media de fluorescencia

Gráficos representativos de la expresión de CD38 en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 48 h. A) Control. B) Paciente

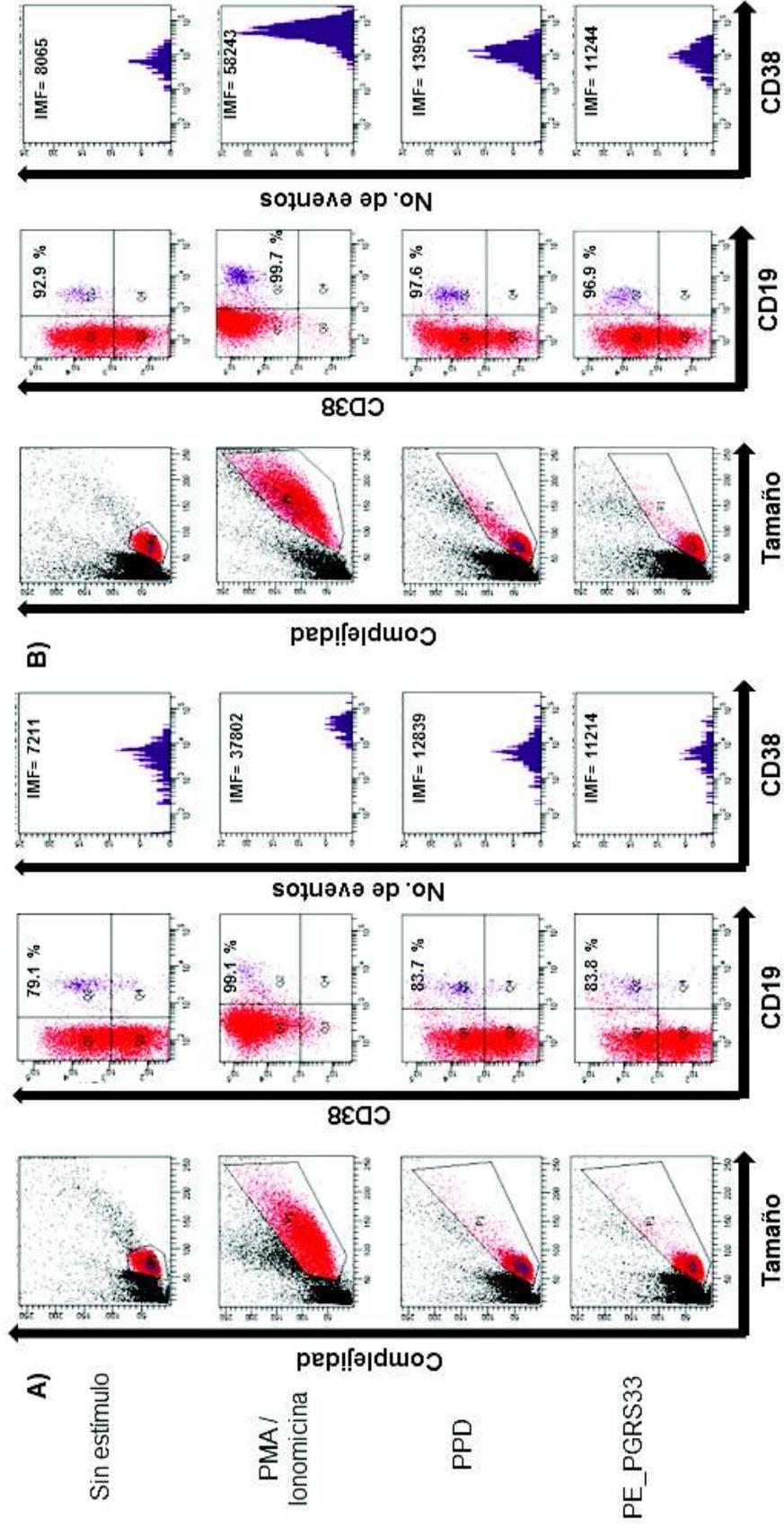
ANEXO 17



IMF: Intensidad media de fluorescencia

Gráficos representativos de la expresión de CD38 en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 72 h. A) Control. B) Paciente

ANEXO 18



IMF: Intensidad media de fluorescencia

Gráficos representativos de la expresión de CD38 en LcB estimulados con PE_PGRS33 a las 144 h. A) Control. B) Paciente