

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DEL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL  
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS A LA PROFESIÓN

“Estudio de la respuesta inmune innata y adquirida en células humanas infectadas con la cepa mutante *Mycobacterium bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c, candidata a vacuna contra la tuberculosis”

Que para obtener el título de:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

Presenta:

**ROBERTO CARLOS ANTONIO PABLO**

**Matrícula: 2192032716**

Asesores:



Dra. María del Carmen Monroy Dosta (Interno), UAM Xochimilco (28906)



Dra. María Teresa Herrera Barrios (Externo), Investigadora en Ciencias Médicas “D” (13693735)

Departamento de Investigación en Microbiología, INER

# ÍNDICE

<b>1. Características generales de apoyo a la investigación</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Ubicación geográfica</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Marco institucional</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Objetivo del proyecto</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3.1. Antecedentes</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Fundamento de las actividades</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Actividades realizadas durante el Servicio Social</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1 Curso departamentales y cursos institucionales</b> .....	<b>8</b>
<b>3.2 Preparación y marcaje de reactivos y material para desarrollo experimental</b> .....	<b>8</b>
<b>3.3 Purificación de células mononucleares de sangre periférica</b> .....	<b>8</b>
<b>3.4 Purificación de monocitos (MN)</b> .....	<b>10</b>
<b>3.5 Determinación de pureza de monocitos por citometría de flujo</b> .....	<b>11</b>
<b>3.6 Obtención de macrófagos derivados de monocitos (MDM)</b> .....	<b>11</b>
<b>3.7 Expresión de genes</b> .....	<b>11</b>
<b>3.7.1. Ensayo de infección</b> .....	<b>12</b>
<b>3.7.2. Extracción de RNA</b> .....	<b>12</b>
<b>3.7.3. Síntesis de cDNA</b> .....	<b>13</b>
<b>3.7.4. PCR en tiempo real (qPCR)</b> .....	<b>15</b>
<b>3.8 Captura y análisis de resultados experimentales</b> .....	<b>19</b>
<b>3.9 Actividades extra</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Resultados</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Purificación de células mononucleares y MN</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2 Expresión de genes y producción de citocinas</b> .....	<b>22</b>
<b>4.3 Expresión de péptidos antimicrobianos (PAM)</b> .....	<b>25</b>
<b>5. Discusión</b> .....	<b>27</b>
<b>6. Metas alcanzadas</b> .....	<b>30</b>
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>30</b>
<b>8. Referencias</b> .....	<b>32</b>
<b>9. Anexos</b> .....	<b>35</b>

## Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual constituye un problema de salud pública mundial. Es considerada la decimotercera causa de muerte, después del COVID-19. De acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud 2023, en el 2022 se reportaron 10.6 millones de nuevos casos de TB en el mundo y en México 28 mil casos. Actualmente, la única medida preventiva contra la TB es la aplicación de la vacuna BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) creada a partir del cultivo atenuado de *M. bovis* por los investigadores Albert Calmette y Camille Guérin. Esta vacuna protege durante la infancia de formas severas de la enfermedad (TB meníngea y diseminada), sin embargo, no protege contra la TB pulmonar en los adultos, debido a que dicha protección se pierde aproximadamente en 10-20 años post-inmunización, aumentando el riesgo de enfermar por TB, por lo que se ha vuelto una prioridad el desarrollo de una vacuna que mejore la BCG. Actualmente existen varias vacunas candidatas en ensayos clínicos que se enfocan en aumentar la eficacia y la protección a largo plazo, y una alternativa es la cepa mutante *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c, en la cual, se ha eliminado el gen *BCG1419c* que codifica para una fosfodiesterasa que tiene actividad sobre bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP (c-di-GMP), lo que causa la acumulación intracelular y favorece el crecimiento de la cepa mutante en biopelícula. Estudios en modelo murino de la cepa mutante han demostrado que es más segura que la BCG debido a que reduce los daños en pulmón y la producción de citocinas inflamatorias, por ello se propuso investigar la respuesta inmune innata en macrófagos humanos infectados con *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c (1419c). Se estudiaron macrófagos de 14 voluntarios sanos infectados con BCG o con la mutante 1419c y se analizó la expresión de genes de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) y péptidos antimicrobianos (BPI y LL-37) por qPCR y se determinó la producción de la proteína por ELISA. Los resultados mostraron que la expresión y producción de citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos inducida por la infección con las micobacterias es similar. Conclusiones: La inmunidad innata no es diferente entre BCG y la mutante, por lo que es necesario evaluar la inmunidad adquirida para determinar si la cepa mutante puede proporcionar ventaja sobre la vacuna actual.

**Palabras clave:** *Tuberculosis, Micobacterias, Macrófagos, Vacuna, BCG, Expresión de genes.*

## **1. Características generales de apoyo a la investigación**

### **1.1 Ubicación geográfica**

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas, está ubicado en Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, 14080, Ciudad de México.

### **1.2 Marco institucional**

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), es un organismo descentralizado de la Administración Pública Federal, con personalidad jurídica y patrimonio propios, agrupado en el Sector Salud. Su MISIÓN es “Mejorar la salud respiratoria de los individuos y las comunidades a través de la investigación, la formación de recursos humanos y la atención médica especializada y con la VISIÓN de “Ser la entidad nacional normativa en salud respiratoria y el principal sitio de enseñanza, investigación, promoción y atención de alta especialidad, con competitividad nacional e internacional”.

En el Departamento de Investigación en Microbiología (DIM) se realiza investigación relacionada a la tuberculosis (TB) pulmonar humana, abarcando diferentes aspectos como son: diagnóstico, respuesta inmune del hospedero, multi-farmacorresistencia, caracterización de exosomas en TB. Así como también se estudia la diabetes mellitus que incrementa la susceptibilidad a la TB. Se abarcan otras áreas de investigación como las inmunodeficiencias primarias, influenza y COVID-19. Actualmente, a través de la colaboración con un investigador del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), se ha iniciado una línea de investigación que se centra en el estudio de una cepa mutante generada a partir de la de micobacteria BCG silvestre como una candidata a vacuna contra la TB.

### **1.3 Objetivo del proyecto**

#### **1.3.1. Antecedentes**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual afecta a millones de personas en el mundo y constituye un problema de salud pública. Esta enfermedad es la decimotercera causa de muerte, y después del COVID-19 es la segunda causa de muerte por un solo agente infeccioso. De acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud 2023, en el año 2022, se reportaron 10.6 millones de nuevos casos de TB (5.8 millones de hombres, 3.5 millones de mujeres y 1.3 millones de niños) y 1.3 millones de muertes. Se ha estimado que la

cuarta parte de la población mundial se encuentra infectada, pero solamente del 5-10% desarrollará la TB activa, mientras que el resto de la población (90-95%) presentará la forma latente de la enfermedad (TB latente) no siendo capaz de transmitir la enfermedad (WHO, 2023).

La forma más frecuente de la enfermedad es la TB pulmonar relacionada con la vía de entrada de *Mycobacterium tuberculosis* que es la vía aérea. Esta enfermedad es curable con los tratamientos anti-TB actuales (en un promedio de duración de 4-6 meses) permitiendo que cerca del 85% de los pacientes se curen (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, 2012; IMSS, 2022). Sin embargo, la falta de tratamiento causa más del 50% de muertes. Existen múltiples factores que aumentan la susceptibilidad a la TB entre los que destacan: la diabetes mellitus, VIH, y la desnutrición (Álvarez & Placeres, 2016).

En México en el año 2022 se registraron 28 mil casos, de los cuales, el 30% se encontraron asociados a la diabetes mellitus, el 8.4 % a VIH/SIDA (Secretaría de Salud, 2023), los datos coinciden con el reporte mundial que muestran que existe mayor susceptibilidad a TB en los hombres que en mujeres (Peralta, 2022). Actualmente, la única medida preventiva de la TB en el mundo es la aplicación de la vacuna BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) la cual fue creada a partir del cultivo de *M. bovis* y atenuada por 231 pases *in vitro* durante 13 años por los investigadores Albert Calmette y Camille Guérin. Su aplicación se inició en 1921. La vacuna BCG protege durante la infancia de las formas severas de la enfermedad como son la TB meníngea y diseminada (miliar); sin embargo, no protege de la TB pulmonar en la edad adulta (Fatima *et al.*, 2020). Después de más de 100 años la vacuna BCG se sigue utilizando a pesar de sus limitaciones y grandes variaciones en su eficiencia, y se estima que ha sido aplicada a 4 mil millones de niños en más de 180 países (Barcat *et al.*, 2021). La protección que brinda la vacuna se pierde aproximadamente 10-20 años post-inmunización, y es cuando las personas están en el mayor riesgo de exposición a adquirir la enfermedad (Fatima *et al.*, 2020; Sable *et al.*, 2019).

Debido a que la vacuna atenuada de BCG ha mostrado protección limitada surgen las preocupaciones de seguridad por el alto riesgo de volverse virulenta, por lo que es necesario el desarrollo de una vacuna que mejore la BCG.

Actualmente, existen varias vacunas candidatas en ensayos clínicos que se enfocan en mejorar la vacuna a través de la manipulación de la respuesta inmune con la finalidad de aumentar la eficacia y generar una respuesta inmune de memoria de larga duración, enfocada en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ya que se diferencian a células T de memoria central (TCM) que residen en los pulmones, y ante la

reexposición antigénica se diferencian a células T de memoria efectora (TEM) y T efectoras (TEFF) que migran al sitio de infección.

Actualmente existen 16 vacunas que están en desarrollo en la Fase 1, fase 2a, Fase 2b y Fase 3; clasificadas en vacunas con bacterias vivas completas, vacunas con bacterias completas inactivadas, vacuna con antígenos proteicos/adyuvante y vacuna con vectores virales (Fatima *et al.*, 2020; Sable *et al.*, 2019).

En la protección contra la TB, se ha propuesto la revacunación con BCG y existen dos estudios en niños de 7-14 años en Brasil que demuestran que se incrementa débilmente la protección en subgrupos selectos, y la eficiencia es modificada por la prevalencia de micobacterias no tuberculosas (Barreto *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2005).

Una alternativa de vacuna contra la TB es la cepa mutante *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c construida a partir de la *M. bovis* BCG. Esta cepa tiene deletado el gen *BCG1419c* que codifica para una fosfodiesterasa que actúa sobre bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP (c-di-GMP), esto ocasiona que haya acumulación intracelular del c-di-GMP, que promueva que la cepa mutante muestre crecimiento en biopelícula (Flores-Valdez *et al.*, 2015). Los estudios en modelo murino con la cepa mutante *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c han demostrado que tiene la capacidad de proteger contra la TB pulmonar y extrapulmonar mostrando ser más segura que la BCG (Aceves-Sánchez *et al.*, 2021).

Además de reducir los daños en el pulmón y la producción de citocinas inflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  junto con IL-10 durante la infección crónica de TB (Flores-Valdez *et al.*, 2018).

Con las evidencias experimentales en el modelo murino, se propuso investigar la respuesta inmune en los leucocitos de sangre periférica infectada con *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c o *M. bovis* BCG. Como primera etapa de la investigación se abordará el estudio de mecanismos bactericidas de la inmunidad innata como la fagocitosis, control del crecimiento intracelular, producción de Trampas Extracelulares de Macrófagos (MET's) y expresión-producción de citocinas y péptidos antimicrobianos (LL-37, BPI, defensinas). Además, en la segunda etapa se abordará el estudio de algunos aspectos de la inmunidad adquirida como los ensayos de proliferación, determinación de células de memoria y perfil de citocinas.

En conjunto, el resultado final de la investigación permitirá tener el panorama global de la respuesta inducida por la cepa mutante candidata a vacuna, para determinar si proporciona una ventaja de protección en comparación con BCG.

## **2. Fundamento de las actividades**

Las labores a realizar dentro del DIM se encuentran acorde con una de las visiones de formación de la Licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, la cual es formar biólogos cuyas habilidades, competencias y conocimientos les permitan participar en el estudio, diagnóstico y generación de soluciones a las problemáticas nacionales y mundiales relacionadas con los procesos biológicos fundamentales que rigen las interrelaciones de los seres vivos y su medio ambiente, enfatizando el proceso salud-enfermedad enmarcado dentro del contexto social vigente (UAM Xochimilco, 2019).

Por lo que todas las actividades estarán encaminadas a responder los objetivos establecidos en el protocolo de investigación **“Estudio de la respuesta inmune innata y adquirida en células humanas infectadas con la cepa mutante *Mycobacterium bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c, candidata a vacuna contra la tuberculosis”** con registro institucional B12-22.

### **OBJETIVO GENERAL**

Investigar algunos aspectos de la inmunidad innata e inmunidad adquirida en las células humanas infectadas con la cepa mutante *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c candidata a vacuna contra la Tuberculosis.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Integración a un grupo multidisciplinario de trabajo y participación en algunas actividades:

1. Obtener células mononucleares a partir de sangre periférica.
2. Purificar monocitos a partir de las células mononucleares.
3. Analizar la pureza de la población de monocitos por citometría de flujo.
4. Apoyar en la realización de experimentos de infección con la cepa mutante y con BCG.
5. Analizar la expresión de genes.
6. Comparar la expresión de genes inducida por la cepa mutante vs. BCG.

### **3. Actividades realizadas durante el Servicio Social**

#### **3.1 Curso departamentales y cursos institucionales**

Al inicio de las actividades del servicio social, personal del Departamento de Investigación en Microbiología (DIM) realizó un recorrido de reconocimiento y presentación de las instalaciones que lo conforman, así como de los laboratorios. Sumado a esto, el DIM impartió cursos de “Introducción a la protección civil” y “Bioseguridad” necesarios para poder iniciar trabajos en laboratorio ya que permite inculcar valores de prevención y respuesta ante situaciones de peligro o riesgo tanto biológico como naturales.

Además, se me ofreció la oportunidad de asistir a cursos institucionales entre los que destacan: “Bioseguridad para el personal de laboratorio y bioterio”, “Concientización sobre la Ciberseguridad en Laboratorios” y “Curso de protección civil en caso de derrames”. Se anexan probatorios.

#### **3.2 Preparación y marcaje de reactivos y material para desarrollo experimental**

Como actividades introductorias para trabajo de laboratorio, inicie desempeñando tareas básicas como: marcaje de material requerido para técnicas experimentales, por ejemplo, marcaje de tubos de 5 ml 2063 y 2058, Tubos Eppendorf de 1.7 y 1.5 ml, cajas Petri, etc. Sumado a ello, apoyé en la preparación de medios de cultivo 7H9 y 7H10 para las micobacterias y la preparación de cajas Petri con el medio agar 7H10.

#### **3.3 Purificación de células mononucleares de sangre periférica**

La purificación celular es una técnica de biología celular que ayuda a separar una población celular de interés de otras que no son de importancia para la investigación, permitiendo así realizar estudios en células especializadas para posteriormente determinar su viabilidad. Existen gran variedad de técnicas, sin embargo, el que nosotros hemos empleado para células mononucleares es la separación por gradiente de densidad y para los monocitos (MN) es una separación inmunomagnética. La separación inmunomagnética consiste en emplear anticuerpos (Ac) específicos unidos a unas perlas magnéticas. Los Ac se unen específicamente a un antígeno exclusivo de la célula a estudiar, posteriormente es separada a través de un campo magnético. Existen dos sistemas de separación celular inmunomagnética conocidos: Dynabeads© y MACS© (Universidad del País Vasco, 2022).

Para la obtención de células mononucleares de sangre se tomó una muestra de sangre con heparina de los voluntarios sanos que ingresaron al protocolo por voluntad propia firmando una carta de consentimiento. Como criterios de inclusión, a los voluntarios se les realizó estudios de química sanguínea, biometría hemática, perfil de lípidos y radiografía de tórax. Además, el voluntario debía contar con la vacuna BCG en su esquema de vacunación. La sangre fue extraída por un médico pasante que cumple con protocolos correspondientes durante dicho procedimiento. Tras obtener 60-120 ml de sangre periférica, comenzamos con la purificación de PBMC.

El trabajo se llevó a cabo dentro de un Gabinete de Bioseguridad (GBS), el cual, es previamente expuesto a rayos UV durante 15 minutos para la eliminación de agentes biológicos contaminantes. Durante este tiempo se comenzó con el marcaje de un tubo cónico de 50 ml con información de la muestra (voluntario IIA-X) y preparación de material como lo pueden ser micropipetas, puntas para micropipetas de 10, 100, 200 y 1000  $\mu$ l, bolsas de desecho biológico (rojas), bote para desechos punzocortantes, pipetas serológicas de 10 ml, pipetas Pasteur, pipetas de transferencia de 3 ml, medio de cultivo RPMI-suplementado con L-glutamina (RPMI+G), solución para separar linfocitos, solución de lisis para eritrocitos, azul de tripano, cámara de Neubauer y bote para desechos.

Para comenzar, se agregaron 20 ml de medio RPMI al tubo de 50 ml, posteriormente se añadieron 20 ml de sangre desde la jeringa al tubo con medio y colocando una pipeta Pasteur hasta el fondo del tubo, posteriormente se agregaron 10 ml de solución de separación de linfocitos a través de la pipeta Pasteur.

A continuación, se centrifugaron los tubos a 1200 rpm, a temperatura ambiente (25°C) durante 45 minutos sin freno. Transcurrido este tiempo, se separó el anillo leucocitario por medio de aspiración empleando pipeta de transferencia y colocándolo en un tubo de 50 ml.

Seguido a las células se les añadió RPMI+G hasta alcanzar los 50 ml del tubo, mezclamos y centrifugamos durante 15 minutos a 1200 rpm, a 4°C con aceleración 9 y desaceleración 6. Seguido se decantó el sobrenadante, para posteriormente se resuspendió el paquete celular y lavar nuevamente con RPMI+G, repitiendo las condiciones de centrifugación, y se hizo otro lavado adicional.

Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso de medio con una punta de 1 ml, se resuspendió el botón celular y se adicionaron 5 a 10 ml de medio RPMI+G.

Para determinar la concentración y viabilidad de las células mononucleares, mezclamos 10  $\mu$ l de la suspensión celular un volumen equivalente de azul de tripano sobre papel parafilm bajando y

subiendo de 3 a 5 veces con la micropipeta. Agregamos 10  $\mu$ l de la mezcla en la cámara de Newbauer y se procedió a realizar un conteo de las células con el que se determinó la viabilidad.

### **3.4 Purificación de monocitos (MN)**

#### **a) Preparación de células**

Todo este procedimiento se realizó empleando en todo momento materiales y reactivos fríos (4°C) contenidos en hielo.

La purificación de monocitos (MN) se debe realizar inmediatamente después de la purificación de las células mononucleares, para ello se necesitaron Ac anti CD14<sup>+</sup>-microbeads human, Buffer de Miltenyi, MACS MS Separation Column, MACS Pre-Separation Filter, soporte y magneto para columna LS, tubos cónicos de 50 ml marcados (voluntario IIA-X), tubos de 14 ml y de 15 ml marcados (voluntario IIA-X), puntas estériles para micropipetas 10, 200 y 1000  $\mu$ l y pipetas serológicas de 10 ml.

Para comenzar con la técnica, las células mononucleares purificadas se centrifugan 10 minutos a 1500 rpm a 4°C, después se eliminó por completo el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió al mezclar en el vórtex y se agregaron 80  $\mu$ l de buffer de Miltenyi por cada 10 millones de células; se disgregaron totalmente con la micropipeta.

Posteriormente se agregaron 10  $\mu$ l de Ac anti CD14<sup>+</sup>-microbeads por cada 10 millones de células y se mezcló vórtex para después incubar durante 15 minutos a 4°C.

Transcurrido el tiempo se realizó un lavado de las células con buffer de Miltenyi agregando 2 ml por cada 10 millones células totales y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm a 4°C.

A continuación, se eliminó completamente el sobrenadante y las células las resuspendimos en 500  $\mu$ l de buffer de Miltenyi. Ahora las células están listas para ser separadas en la columna.

#### **b) Separación de monocitos en columna por selección positiva**

Se montó la columna LS en el soporte magnético y luego se colocó el pre-filtro sobre la columna. Todo el sistema de la columna se pre-humedecido por la adición de 3 ml de buffer de Miltenyi hasta que dejó de gotear. Se agregaron las células en el pre-filtro para que pasen a la columna, recolectando las células CD14<sup>+</sup> en un tubo.

Después se hicieron 5 lavados de la columna con 3 ml de buffer de Miltenyi cada uno.

Finalmente se removió la columna del magneto y se colocó en un tubo nuevo, le agregamos 5 ml de buffer de Miltenyi precediendo a eluir los MN (CD14<sup>+</sup>) con ayuda del émbolo de la columna. Centrifugamos los monocitos CD14<sup>+</sup> durante 10 minutos a 1500 rpm a 4°C y eliminamos completamente el sobrenadante. Después los MN se resuspendieron en medio RPMI+G+10% PSH descomplementado, y posteriormente se determinó la concentración y la viabilidad de los MN.

### **3.5 Determinación de pureza de monocitos por citometría de flujo**

Para conocer la pureza de la población de MN purificados, se hizo una tinción para el análisis por citometría de flujo. Para ello se necesitaron: la suspensión de monocitos, Ac anti-humano CD14PETexas Red, solución de lavado, paraformaldehído al 1%, 2 Tubos de poliestireno de 4 ml, micropipetas, puntas y papel aluminio.

Iniciamos marcando 2 tubos de 5 ml como: tinción y sin tinción. A cada tubo se le agrega de 200 µl de la suspensión de monocitos. Al tubo marcado con “tinción” le agregamos 1.5 µl del Ac anti-humano CD14PETexas Red. Posteriormente mezclamos ambos tubos en vórtex e incubamos 15 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz con papel aluminio.

Transcurrido el tiempo lavamos cada tubo con 1 ml de solución de lavado (PBS-Suero fetal-Azida de sodio) y los centrifugamos a 1500 rpm por 5 min a 4°C. Concluida la centrifugación se eliminó el sobrenadante y resuspendimos las células en 250 µl de paraformaldehído al 1%. Para concluir nos dirigimos al Core de citometría y adquirimos 100,000 eventos de cada muestra en el citómetro FACS Aria (BD). Posteriormente analizamos la pureza utilizando el software FlowJo y reportamos la pureza en porcentaje de células CD14<sup>+</sup>.

### **3.6 Obtención de macrófagos derivados de monocitos (MDM)**

Los MN purificados y resuspendidos en medio RPMI+G+10% PSH se agregaron a diferentes tipos de placas de cultivo: 8 pozos (0.2x10<sup>6</sup>/pozo), 24 pozos de adherencia estándar (1x10<sup>6</sup>/pozo) y 24 pozos de baja adherencia (1x10<sup>6</sup>/pozo). Se incubaron durante siete días para permitir su diferenciación a macrófagos (MDM).

### **3.7 Expresión de genes**

El análisis de la expresión de genes es el área principal donde me desempeñe.

La expresión de genes es un mecanismo interruptor de modulación funcional que emplean las células para controlar la producción de moléculas mediante la decodificación del código genético almacenado en el DNA y transcrito desde una molécula de RNA. Este mecanismo está regulado por diversas

condiciones que si se ven alteradas podrían generar una mar de respuestas, resultado de la regulación que ejercen las proteínas en la expresión de otros genes (National Human Genome Research Institute, 2024).

Este análisis está conformado de la extracción de mRNA, molécula importante pues almacena información importante sobre mecanismos y funciones. Esta molécula de mRNA servirá de plantilla (templete) para la enzima transcriptasa inversa que bajo condiciones óptimas sintetiza una molécula de cDNA (DNA complementario). Aquí es donde entra la qRT PCR, pues permite analizar la expresión génica a través del uso de oligonucleótidos específicos denominados Primers como cebadores de la polimerasa lo que permitirá amplificar los genes de interés y conocer si hay expresión del gen (cualitativo) y cuánto hay de cada gen estudiado (cuantitativo) (Universidad Complutense de Madrid, 2019).

### **3.7.1. Ensayo de infección**

En el cultivo de los MDM, eliminamos el medio del cultivo para después agregar 1 ml de medio infectante a cada pozo. Seguido, infectamos a los macrófagos con *M. bovis* BCG (BCG) o *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c (1419c) a MOI 5 incluyendo un pozo sin infección e incubamos 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, se lavó tres veces cada uno de los pozos con 1 ml de RPMI+G para eliminar las micobacterias no fagocitadas.

Después agregamos 1 ml a cada pozo de RPMI+G+10% PSH descomplementado, se incuba la placa durante 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Recuperamos los sobrenadantes en tubos Eppendorf de 1.5 ml marcados con la información (voluntario IIA-X Medio; BCG o 1419c) y almacenamos a -20°C para la determinación de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 por medio de la prueba de ELISA. Reportando los resultados en pg/ml.

Después de recuperar los sobrenadantes, se lisaron los macrófagos agregando 350  $\mu$ l /pozo de la solución de lisis RLT. Se mezcló y se recuperaron los lisados en tubos 1.5 ml previamente marcados (voluntario IIA-X Medio; BCG o 1419c) para almacenarlos a -20°C y posteriormente realizar extracción de RNA.

### **3.7.2. Extracción de RNA**

Se realizó la purificación o extracción de RNA total por columna, rescatado el material genético contenido en los lisados celulares. Esto se hace empleando un kit de RNase (Qiagen) y todo el

procedimiento a temperatura ambiente, utilizando bata blanca abotonada y guantes. Limpiando las superficies de trabajo con RNase ZAP para prevenir la degradación del RNA.

El procedimiento es el siguiente: Marcamos los tubos y columnas con la correspondiente información del voluntario (voluntario IIA-X Medio; BCG o 1419c).

Permitimos que los lisados celulares estén a temperatura ambiente, y agregamos 350  $\mu$ l de etanol al 70% al lisado celular y mezclamos bien en vórtex. Después, de esta mezcla transferimos 700  $\mu$ l en la columna con tubo de procesado para posteriormente centrifugar 30 segundos a 12000 rpm.

Eliminamos el sobrenadante del tubo de procesado en un contenedor de desechos CRETI (Corrosivo, Reactivo, Explosivo, Tóxico, Inflamable) para volver a utilizar el tubo con columna. Se realiza un lavado en la columna añadiendo 350  $\mu$ l de la solución de lavado RW1 y posteriormente centrifugamos durante 30 segundos a 12000 rpm; eliminamos el sobrenadante del tubo de procesado en un contenedor CRETI para volver a utilizar el tubo con columna. Agregamos 500  $\mu$ l de tampón RPE en la columna y centrifugamos 30 segundos a 12000 rpm y se vuelve a eliminar el sobrenadante del tubo de procesado en un contenedor CRETI para volver a emplear el tubo con columna.

Nuevamente agregamos 500  $\mu$ l de tampón RPE en la columna, ahora centrifugamos 2 minutos a 12000 rpm para eliminar completamente el etanol.

Posteriormente se desechó el sobrenadante en el contenedor CRETI y transferimos la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml. Eluimos de la columna el RNA agregando directamente sobre la membrana 20  $\mu$ l de agua libre de RNAsas (agua-DEPC) y se centrifuga durante 1 minuto a 8000 rpm; repetimos este paso nuevamente recolectando el RNA en el mismo tubo. Finalmente, tenemos 40  $\mu$ l de RNA total purificado y lo almacenamos a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriormente realizar síntesis cDNA.

### **3.7.3. Síntesis de cDNA**

El RNA previamente purificado proveniente de los PBMC fungirá como un molde, el cual apoyado por la enzima transcriptasa inversa (RT) viral, permitirá la síntesis de una molécula de DNA complementario (cDNA).

Para realizar este procedimiento se utilizó el kit Superscript First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

Se permitió la descongelación de todos los reactivos y se centrifugaron para después iniciar el procedimiento. En tubos en tira con tapa libres de DNAsas y RNAsas de 0.2 ml previamente marcados

con su correspondiente información (voluntario IIA-X Medio; BCG o 1419c), agregamos en el siguiente orden cada componente para cada tubo y llevamos el procedimiento en 3 etapas:

#### Etapa 1

Preparamos la mezcla de RNA-primer dentro del GBS

- 1) 1  $\mu$ l de Hexámeros
- 2) 1  $\mu$ l de Mezcla 10 mM dNTP
- 3) 8  $\mu$ l de RNA total

Mezclamos en vórtex y centrifugamos. Posteriormente incubamos las muestras de RNA-primer a 65°C durante 5 minutos en un termociclador Verity (AB), y después las transferimos a hielo durante al menos 1 minuto.

#### Etapa 2

Realizamos la siguiente mezcla de reacción para la enzima RT, agregando los componentes en un tubo de 1.7 ml previamente marcado, en el siguiente orden:

Para ello previamente realizamos el cálculo del número de muestras que se van a trabajar y tomamos como base estas cantidades que corresponden a una reacción de síntesis de cDNA

- 1) 10X RT buffer      2  $\mu$ l / Reacción
- 2) 25 mM MgCl<sub>2</sub>      4  $\mu$ l / Reacción
- 3) 0.1 M DTT          2  $\mu$ l / Reacción
- 4) RNaseOUT recombinant Ribonuclase inhibitor 1  $\mu$ l / Reacción

Al final de la preparación de la mezcla, el volumen contenido en el tubo de 1.7 ml debe coincidir con el previamente calculado. A continuación, agregamos 9  $\mu$ l de la mezcla a cada una de las muestras de RNA/primer, mezclamos y centrifugamos. Procedemos a incubar a 25°C por 2 minutos. Transcurrido el tiempo añadimos 1  $\mu$ l de SuperScript II RT a cada una de las muestras, mezclamos y centrifugamos.

Las muestras se colocan nuevamente en el termociclador Verity (AB) para comenzar con la síntesis

- 1) 25°C durante 10 minutos
- 2) 42°C durante 50 minutos
- 3) 70°C durante 10 minutos

Al terminar la síntesis transferimos las muestras a hielo durante 1 minuto y centrifugamos. Posteriormente agregamos 1 µl de la enzima RNase H a cada una de las muestras y volvemos a incubar en el termociclador por 20 minutos a 37 °C con el propósito de remover el RNA utilizado como template durante la síntesis del cDNA.

El volumen final es de 21 µl de cDNA el cual deberemos almacenar a -20°C hasta ser utilizado para amplificación por PCR en Tiempo.

#### **3.7.4. PCR en tiempo real (qPCR)**

La prueba qPCR en tiempo real permite la amplificación de genes de interés, en este caso son seis genes de importancia para la respuesta inmune contra la tuberculosis: IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, BPI y LL-37.

La técnica se realiza con las muestras de cDNA previamente sintetizadas, universal master mix (Thermo), ensayos Taqman (Applied Biosystem), placa de 96 pozos para PCR, film para placas de PCR, micropipetas, puntas para micropipetas y cabina de bioseguridad.

En una plantilla experimental (Figura 1) anotamos los genes y las muestras que se van analizar por triplicado.

Comenzamos marcando los tubos de 1.7 ml, cada uno correspondiente al gen de interés (ejem: TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8, BPI y LL-37), después se realizan cálculos para la mezcla de reactivos que contendrá cada tubo.

Experimento#

Fecha:

Objetivo: Amplificación dúplex de

VF= 20 µl

Master Mix for Gene Expression

Reactivo	Concentración	Volumen (µl) por reacción	No. de reacciones	Volumen final
Agua DEPC		3.0		
2X Universal Master Mix	2X	10.0		
Taqman assay (18s-VIC)	20X	1.0		
Taqman assay (BPI, TNF-α, LL-37, IL-1B-FAM))	20X	1.0		
cDNA		5.0		
Total				

Mezclar:

48 µl de master Mix + 15 µl de cDNA (Dilución 1:5)

Preparar 100 µl de la dilución 1:5 de la muestra (20 µl cDNA/ 80 µl de Agua)


Figura 1. Plantilla experimental de ensayo qPCR.

Suponiendo que tenemos 3 muestras de cDNA de un voluntario: IIA-X Medio, IIA-X BCG y IIA-X 1419c entonces: 3 reacciones \* 3 muestras= 9 reacciones para cada uno de los 6 tubos (TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8, BPI y LL-37, por lo tanto...

- 1) Agua DEPC 3 µl \* 9 reacciones= 27 µl
- 2) 2x Universal Master Mix 10 µl \* 9 reacciones= 90 µl
- 3) Taqman assay 18s (VIC) 1 µl \* 9 reacciones= 9 µl
- 4) Taqman assay BPI o TNF-α o LL-37 o IL-1β o IL-6 o IL-8 (FAM) 1 µl \* 9 reacciones= 9 µl

Lo que da un total de 135 µl para cada tubo, dependiendo del gen a analizar (Figura 2)

Este procedimiento se realiza en el gabinete de bioseguridad.

Iniciamos preparando la muestra de cDNA realizando una dilución 1:5 de la siguiente forma: A cada una de las muestras de cDNA (20  $\mu$ l) se le agregan 80  $\mu$ l de agua-DEPC, se mezcla y se centrifuga con un volumen final de 100  $\mu$ l. A continuación, marcamos la placa de 96 pozos de acuerdo al diseño experimental (muestra, gen y triplicado) y dentro del GBS comenzamos añadiendo 15  $\mu$ l de mezcla de reacción a cada pozo que corresponda al gen a analizar. Al terminar nos movemos a la mesa de extracción donde agregaremos 5  $\mu$ l de la dilución de cDNA a cada pozo de acuerdo al diseño experimental (muestra, gen y triplicado). Sellamos la placa con la película especial para qPCR para posteriormente eliminar cualquier burbuja agitando la placa. Finalmente, colocamos la placa en el termociclador StepOne Plus (AB) para placas de 96 pozos que contiene la configuración necesaria para realizar los ciclos de amplificación durante 2 horas.

**Experimento# 1**

Fecha:

**Objetivo:** Amplificación dúplex de BPI, TNF- $\alpha$ , LL-37, IL-1 $\beta$ , IL6 e IL8

VF= 20  $\mu$ l

**Master Mix for Gene Expression**

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu$ l) por reacción	No. de reacciones (9)	Volumen final
Agua DEPC		3.0	9	27 $\mu$ l
2X Universal Master Mix	2X	10.0	9	90 $\mu$ l
Taqman assay (18s-VIC)	20X	1.0	9	9 $\mu$ l
Taqman assay (BPI, TNF- $\alpha$ , LL-37, IL-1 $\beta$ , IL6 e IL8)	20X	1.0	9	9 $\mu$ l
cDNA		5.0		
<b>Total</b>				135 $\mu$ l

Mezclar:

48  $\mu$ l de master Mix + 15  $\mu$ l de cDNA (Dilución 1:5)

**Preparar 100  $\mu$ l de la dilución 1:5 de la muestra (20  $\mu$ l cDNA/ 80  $\mu$ l de Agua)**

<b>BPI</b>			<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			<b>LL-37</b>			<b>IL-1<math>\beta</math></b>		
IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio
IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG
IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c
IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio	IIA-X Medio						
IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG	IIA-X BCG						
IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c	IIA-X 1419c						

**IL-6**

**IL-8**

**Figura 2.** Ejemplo de experimento qPCR de genes codificantes para BPI, LL-37, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8.

La información adquirida por el termociclador es almacenada en una computadora para su posterior análisis.

### 3.8 Captura y análisis de resultados experimentales

Se realizó la captura de la información en una base de datos, así como cálculos manuales en hojas de Excel que permitiera corroborar y conocer el procedimiento que realiza el software del termociclador.

Para ello se empleó la fórmula sugerida por Applied Biosystem (2001).

**Tabla 1.** Cálculo de Relative Quantification

Cuantificación relativa (RQ) mediante el método de $C_T$ comparativo					
CONDICIÓN	Promedio Gen $C_T$	Promedio 18s $C_T$	$\Delta C_T$ pGen-p18s	$\Delta \Delta C_T$ $\Delta C_T - \Delta C_T$ Medio	Relación de Gen con el Medio
MEDIO					
BCG					
1419c					

Condiciones de infección: Medio, BCG y 1419c. pGen corresponde al promedio del gen evaluado, p18s corresponde al promedio del gen constitutivo ribosomal 18s. El valor  $\Delta C_T$  se determina restando el valor promedio del gen constitutivo ribosomal 18s  $C_T$  del valor promedio de Gen  $C_T$ . El cálculo de  $\Delta \Delta C_T$  implica la resta del valor del calibrador ( $\Delta C_T$  Medio)  $\Delta C_T - \Delta C_T$  Medio. El rango dado para Gen evaluado en relación con el Medio se determina calculando la expresión:  $2^{-\Delta \Delta C_T}$  con  $\Delta \Delta C_T + s$  y  $\Delta \Delta C_T - s$ , donde  $s$  = la desviación estándar del valor de  $\Delta \Delta C_T$ .

Como nuestros resultados no presentan normalidad se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas. En el caso de la expresión de genes se aplicó la prueba de Wilcoxon, mientras que en el caso de la producción de citocinas se realizó la prueba de Friedman. Los análisis de resultados y demás estadística se hicieron empleando el programa Prism de GraphPad®.

### 3.9 Actividades extra

A demás de lo experimental, también participe en la preparación de los resúmenes de los carteles científicos como: “La cepa mutante *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c induce menor producción de trampas extracelulares de macrófagos (MET’s) en comparación con la cepa parental” y “BCG $\Delta$ BCG1419c candidata a vacuna contra la tuberculosis, induce la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)” presentados en el VII en el Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Investigadores de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (AMIINSHAE) realizado el 5 y 6 de diciembre del 2023 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## 4. Resultados

### 4.1 Purificación de células mononucleares y MN

En total se reclutaron 14 voluntarios sanos (Tabla 2) que se encontraban dentro los parámetros considerados normales, con una mediana de 25 años y en un rango de 23 a 59 años, los cuales fueron vacunados con BCG; presentaban una mediana de índice de masa corporal de 25.64 Kg/m<sup>2</sup> lo que corresponde a una población con sobrepeso. Ninguno mostró alteraciones en la radiografía de tórax. Además, los resultados de la biometría hemática, química sanguínea y perfil de lípidos realizados para cada paciente, mostraron resultados dentro de los valores de referencia (Tabla 3).

A los voluntarios se les tomó de 50 a 120 ml de sangre para la purificación de MN por selección positiva. Se reportó una mediana de pureza de monocitos de 97.5% (Tabla 4).

**Tabla 2.** Características demográficas de la población de estudio

<b>Variables</b>	<b>Población (n=14) Mediana [Rango]</b>	<b>Valores de referencia</b>
<b>Sexo</b> (Mujeres/Hombres)	5 / 9	---
<b>Edad</b> (años)	25 [23-59]	---
<b>IMC</b> (Kg/m <sup>2</sup> )	<b>25.64</b> [19.4-31.9] *	18.5-24.99
<b>BCG</b> (Si/No)	14 / 0	---
<b>Radiografía de tórax</b> (N/A)	14/0	---

Descripción de nuestra población de estudio donde se muestra sexo, edad, Índice de Masa Corporal (IMC), si están vacunados con BCG y si se les aplicó radiografía de tórax.

**Tabla 3.** Resultados de laboratorio de la población de estudio

<b>Variables</b>	<b>Población (n=14) Mediana [Rango]</b>	<b>Valores de referencia</b>
<b>Leucocitos</b> ( $\times 10^9/l$ )	6.18 [4.2-10.8]	4.5-11
<b>Neutrófilos</b> (%)	57.35 [47.6-71.4]	55-62
<b>Linfocitos</b> (%)	31.2 [21-38.6]	20-40
<b>Monocitos</b> (%)	6.8 [4.5-10.3]	4-10
<b>Eosinófilos</b> (%)	1.7 [0.5-7.4]	1-3
<b>Basófilos</b> (%)	0.65 [0-1.2]	0-1
<b>Eritrocitos</b> ( $\times 10^9/l$ )	5.1 [4.6-6.1]	4.5-5.5
<b>Hemoglobina</b> (gr/dl)	15.1 [12.9-17.6]	13.5-16.5
<b>Hematocrito</b> (%)	45.6 [40-53.2]	40.5-49.5
<b>Plaquetas</b> ( $\times 10^9/l$ )	262.7 [193-348.3]	140-400
<b>Glucosa</b> (mg/dl)	88 [76-122]	70-99
<b>Urea</b> (mg/dl)	28.5 [20-41]	13-56
<b>Ácido úrico</b> (mg/dl)	5.8 [4.1-7.8]	2.4-7.16
<b>Creatinina</b> (mg/dl)	0.8 [0.6-1.3]	0.6-1
<b>Colesterol total</b> (mg/dl)	165 [139-247]	< 200
<b>Triacilglicerolos</b> (mg/dl)	121.5 [69-250]	< 150
<b>HDL</b> (mg/dl)	39.5 [29-56]	41-59
<b>LDL</b> (mg/dl)	114 [87-166]	100-129 subóptimo

Resultados de Química sanguínea, biometría hemática y perfil de lípidos de los voluntarios ingresados al protocolo con sus respectivos valores de referencia.

**Tabla 4.** Porcentaje de la pureza de monocitos (MN)

Pureza de MN	
Voluntarios	Pureza %
IIA-01	98.6
IIA-02	98.8
IIA-03	96
IIA-04	56
IIA-05	N/A
IIA-06	98.8
IIA-07	97.5
IIA-08	97.5
IIA-09	N/A
IIA-10	99.4
IIA-11	N/A
IIA-12	94.4
IIA-13	98.1
IIA-14	97.5
<b>MEDIANA</b>	<b>97.5%</b>

Se muestra el porcentaje de pureza de MN obtenido para cada voluntario dándonos una mediana de 97.5%. Los N/A no se pudieron analizar por diversos contratiempos.

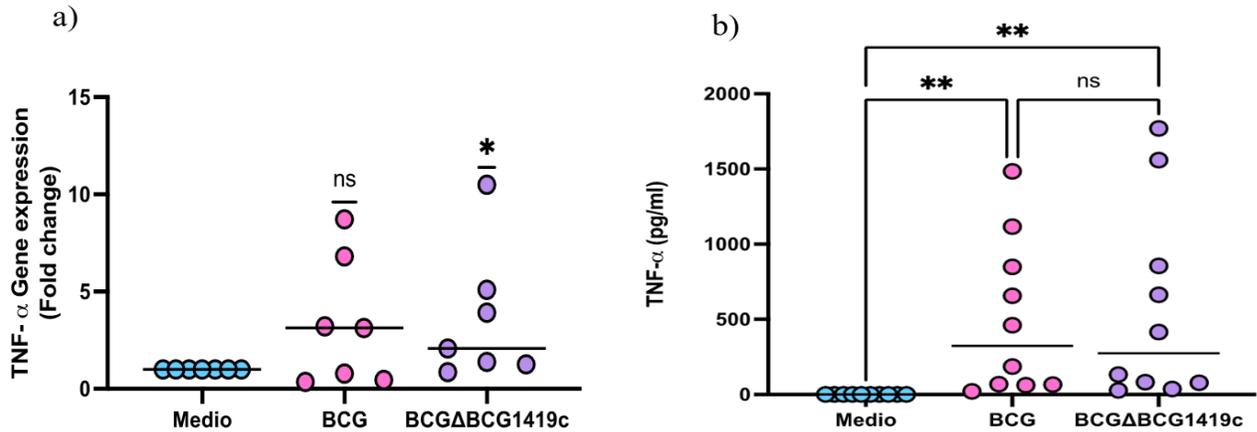
#### 4.2 Expresión de genes y producción de citocinas

Se analizó la expresión de genes de los lisados de MDM's por medio de PCR en tiempo real (qPCR), evaluando genes codificantes para citocinas proinflamatorias importantes para la respuesta inmune contra la tuberculosis: (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8), y péptidos antimicrobianos (BPI y LL-37). Del mismo modo, a través de los sobrenadantes de MDM's y empleando la técnica de ELISA, se pudo analizar la producción de tres citocinas proinflamatorias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8. Todo esto con el motivo de comparar la expresión de genes y producción de citocinas ante la infección con BCG y 1419c.

Los MDM's infectados con BCG y con 1419c fueron capaces de expresar TNF- $\alpha$  mostrando que la cepa 1419c induce mayor expresión de TNF- $\alpha$  con respecto al medio ( $p < 0.05$ ). Entre BCG y medio no hay diferencia, pero sí una tendencia de mayor expresión del gen en los MDM's infectados con BCG en comparación con el medio (Figura 3a). En cuanto a la producción de TNF- $\alpha$ , tanto los MDM's

infectados con BCG como los infectados con 1419c, producen mayor cantidad de TNF- $\alpha$  que el medio ( $p < 0.009$ ). Mientras que entre BCG y 1419c, los MDM infectados con BCG tienden a secretar mayor cantidad de TNF- $\alpha$  con respecto a los infectados con 1419c (Figura 3b).

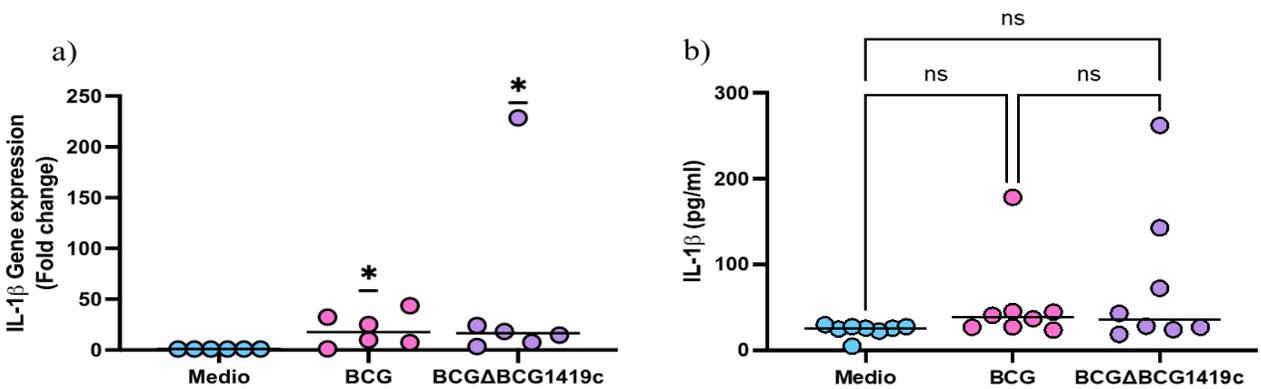
## Expresión de genes y producción citocinas inflamatorias



**Figura 3.** Expresión y producción de TNF- $\alpha$  por parte de los MDM infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c. a) Expresión de TNF- $\alpha$ . Prueba de Wilcoxon (Respecto al medio con valor de 1).  $n=7$ . y b) Producción de TNF- $\alpha$ . Prueba de Friedman.  $n=10$ . La línea horizontal representa la mediana. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.009$ ).

Para IL-1 $\beta$  vemos que hay mayor expresión en los MDM's infectados con BCG que el medio ( $p < 0.05$ ). Lo mismo ocurre con la cepa 1419c quien expresa más IL-1 $\beta$  que el medio ( $p < 0.05$ ). Entre la cepa vacunal BCG y 1419c no observamos diferencia significativa en la expresión (Figura 4a). Por otro lado, los MDM's infectados con BCG y los infectados con 1419c, producen cantidades semejantes de IL-1 $\beta$ , sin embargo, parece haber una mayor producción de IL-1 $\beta$  por parte de BCG y 1419c con respecto al medio (Figura 4b).

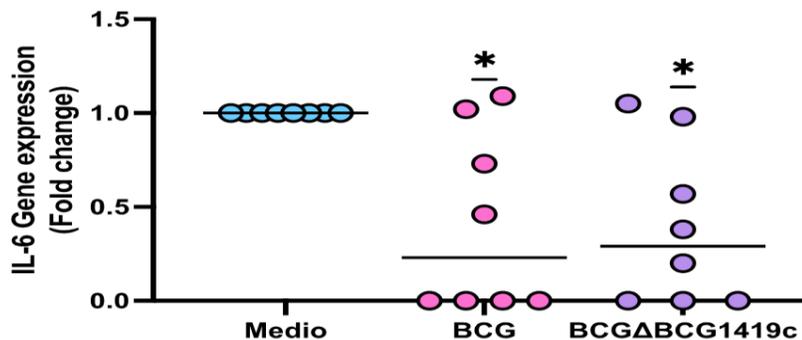
## Expresión de genes y producción citocinas inflamatorias



**Figura 4.** Expresión y producción de IL-1 $\beta$  por parte de los MDM infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c. a) Expresión de IL-1 $\beta$ . Prueba de Wilcoxon (Respecto al medio con valor de 1). n=6. y b) Producción de IL-1 $\beta$ . Prueba de Friedman. n=8. La línea horizontal representa la mediana (\* p<0.05).

Respecto a la IL-6 observamos disminución significativa en la expresión en los MDM's infectados con la cepa vacunal BCG y con la mutante 1419c en comparación con el medio (p<0.05). Además observamos que la expresión de IL-6 es semejante en los MDM's infectados con BCG y los infectados con 1419c (Figura 5).

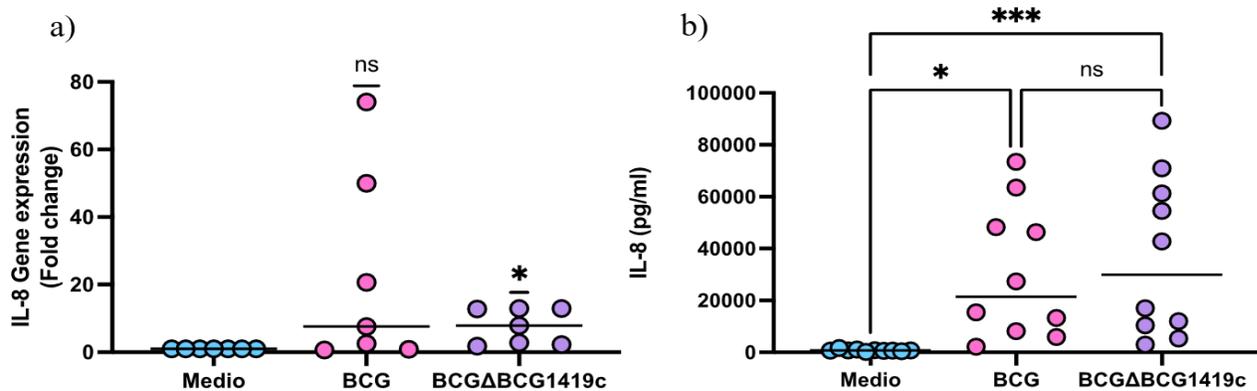
## Expresión de genes inflamatorias



**Figura 5.** Expresión de IL-6 en lisados celulares de los MDM infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c. Prueba de Wilcoxon (Respecto al medio con valor de 1). n=8. La línea horizontal representa la mediana. (\*p<0.05).

Vemos un aumento significativo en la expresión de IL-8 en los MDM's infectados con 1419c que el medio. Mientras que en los MDM's infectados con BCG, se observó una tendencia de mayor expresión comparado al medio, similar con 1419c (Figura 6a). Respecto a la producción de la citocina (Figura 6b), se observó que tanto los MDM's infectados con BCG como los infectados con 1419c producen significativamente mayor cantidad de IL-8 comparado con el medio. Por otro lado, los MDM's infectados con 1419c muestran una ligera tendencia a producir más cantidad de IL-8 con respecto a los infectados con BCG, sin embargo, no es significativa.

## Expresión de genes y producción citocinas inflamatorias

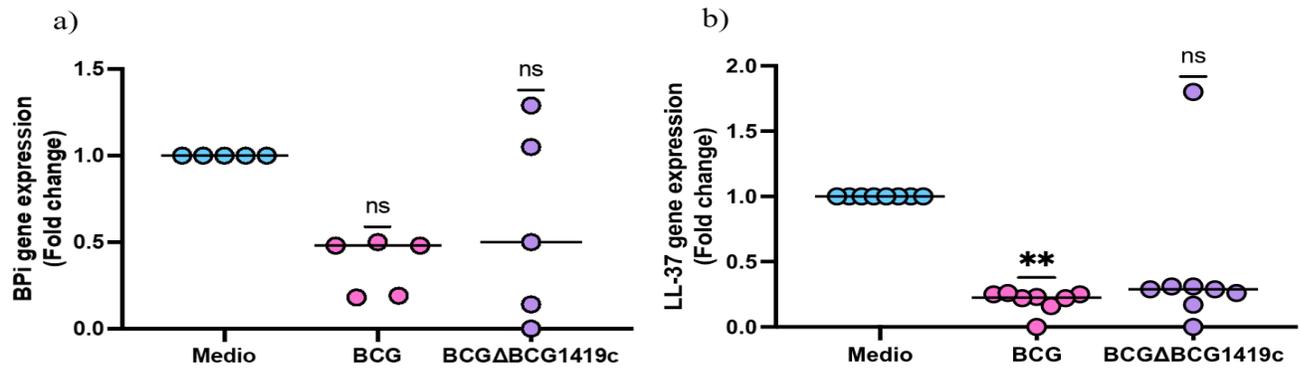


**Figura 6.** Expresión y producción de IL-8 por parte de los MDM infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCGΔBCG1419c. a) Expresión de IL-8. Prueba de Wilcoxon (Respecto al medio con valor de 1). n=7 y b) Producción de IL-8. Prueba de Friedman. n=10. La línea horizontal representa la mediana. (\*  $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.0009$ ).

### 4.3 Expresión de péptidos antimicrobianos (PAM)

Se analizaron los PAM: BPI y LL-37 donde se observó una similar reducción en la expresión para BPI en los MDM's infectados con la cepa vacunal BCG y con la cepa 1419c en comparación con el medio (Figura 7a). Ahora, para LL-37 se observa una reducción significativa en MDM's infectados con BCG ( $p<0.09$ ). Mientras que en los MDM's infectados con 1419c hay una tendencia a reducir la expresión. Ambas cepas inducen a la baja la expresión del gen LL-37 destacando que entre BCG y 1419c no se observaron diferencias (Figura 7b).

## Expresión de genes de péptidos antimicrobianos (PAM)



**Figura 7.** Expresión de péptidos antimicrobianos: BPI y LL-37 en los lisados de MDM infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCGΔBCG1419c. a) Expresión de BPI y b) Expresión de LL-37. Prueba de Wilcoxon (Respecto al medio con valor de 1). a) n=5 y b) n=8. La línea horizontal representa la mediana. (\*\* p<0.009).

## 5. Discusión

Tras la infección con *M. tuberculosis*, la primera barrera de defensa del organismo, es el sistema inmune innato conformado por un conjunto de células efectoras como lo son los macrófagos, células dendríticas, células NK, neutrófilos, cuya interacción es mediada por citocinas que regulan su funcionalidad y promueven su activación. Dentro de las citocinas que participan en la modulación inmune, destacan las citocinas proinflamatorias que son importantes en el control de la infección (Luke *et al.*, 2022) además de ser componentes esenciales en la respuesta inmune adaptativa.

Es así que después de la infección por *M. tuberculosis*, las células fagocíticas y citolíticas se activan y producen un conjunto de citocinas proinflamatorias que modulan la actividad celular de defensa, como es el caso de las células NK que son activadas mediante la producción de IL-12 secretadas por los neutrófilos, monocitos y macrófagos tras la fagocitosis. Las células NK se encargan de producir IFN- $\gamma$ , que estimula la fagocitosis de los macrófagos para la eliminación de *M. tuberculosis* (Junqueira-Kipnis *et al.*, 2020). Tras la activación, los macrófagos fagocitan a las micobacterias, induciendo la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, pero principalmente, resultado de la actividad fagocítica, los macrófagos producen TNF- $\alpha$ , una citocina moduladora de la defensa (Luke *et al.*, 2022). Esto se cumple ya que como observamos en la Figura 3, ante la infección con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c, los MDM's inducen mayor expresión y producción de TNF- $\alpha$  en comparación con el control negativo, desencadenando una respuesta inmune inflamatoria con alta expresión de TNF- $\alpha$  (Wu *et al.*, 2018; Silvestre *et al.*, 2004). Se ha descrito que la bioactividad de TNF- $\alpha$  inicia durante las primeras horas alcanzando su pico máximo de 4 a 8 horas y decayendo en las próximas 16 a 24 horas post actividad (Strieter *et al.*, 1990) como respuesta al contacto con proteínas bacterianas durante la fagocitosis (Luke *et al.*, 2022) lo que estimula funciones de apoptosis celular, formación y mantenimiento del granuloma que contiene y previene la diseminación de *M. bovis* (Wu *et al.*, 2018). Además de promover la producción de otras citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, y otras anti-inflamatorias como IL-10, mostrando un carácter dual (Silvestre *et al.*, 2004).

En el caso de IL-1 $\beta$ , los resultados arrojaron que ambas cepas (*M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c) inducen la expresión y producción de IL-1 $\beta$ , lo que está relacionado con la producción post infección de TNF- $\alpha$  (Silvestre *et al.*, 2004). Sin embargo, hay una diferencia en la expresión y una ligera mayor producción de IL-1 $\beta$  en los MDM's infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c en comparación con el medio (Figura 4) esto se puede deber a que la vida media de IL-1 $\beta$  es de 2.5 horas, mientras que su pico máximo de producción es a las 24 horas

(Hinostroza *et al.*, 2015) desencadenando así su función durante las primeras etapas de la infección, participando en la respuesta inflamatoria y en la generación de granulomas (Sarkar *et al.*, 2015), además de activar a los péptidos antimicrobianos para proteger los tejidos de lesiones, desempeñando un papel protector (Wu *et al.*, 2018).

IL-6 es otra interleucina proinflamatoria inducida durante la respuesta contra la tuberculosis, la cual participa en la hematopoyesis, desarrollo y maduración de macrófagos y linfocitos T durante la infección, promoviendo respuestas protectoras Th1 (Martínez *et al.*, 2013). Además de también desempeñar una respuesta antiinflamatoria en casos concretos, inhibiendo la secreción de otras citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Saavedra *et al.*, 2011). En nuestro caso observamos que ambas cepas inducen la expresión de IL-6 a la baja (Figura 5) lo que se podría deber al tiempo máximo de su actividad biológica que se encuentra entre las primeras 4 a 48 horas (Moris *et al.*, 2014) alcanzando su pico máximo a las 2 horas en caso de infecciones graves y disminuyendo posteriormente (Beceiro *et al.*, 2009) lo que es un indicativo de la severidad de la infección (Lansionbio, 2020). Aunque esto también podría estar relacionado a que los macrófagos estarían modulando la producción de IL-6 lo que evitaría un aumento severo de la temperatura corporal, además de prevenir el secuestro del sistema de defensa por las micobacterias, ya que se ha reportado que IL-6 es un factor esencial empleado por *M. tuberculosis* para inhibir la producción y reconocimiento de IFN- $\gamma$ , citocina importante para la diferenciación y función de los macrófagos, obstaculizando la respuesta inmune (Martínez *et al.*, 2013) e induciendo el aumento de la inflamación mediante la tormenta de citocinas, promoviendo así una infección grave (Boni *et al.*, 2022).

Sobre IL-8, nuestros resultados muestran que se producen altas concentraciones de IL-8 en MDM's infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c (Figura 6) esto podría estar asociado a su cinética de producción-actividad la cual comienza 4 horas después de la infección, alcanzando su pico máximo de actividad a las 8 horas y cayendo después de las 24 horas de activación (Goldstein *et al.*, 1996). Sin embargo, también podría indicar una mayor actividad fagocítica de los macrófagos ya que de acuerdo con Plowes-Hernández *et al.*, (2021) además de inducir una respuesta inflamatoria y disminuir el crecimiento intracelular, IL-8 potencia la fagocitosis de agentes como *M. tuberculosis* en los macrófagos.

Otra parte analizada fue la expresión de genes de dos péptidos antimicrobianos: la proteína Bactericida Aumentadora de Permeabilidad (BPI) y LL-37, que son componentes esenciales del sistema inmune innato y modulador importante de la adaptativo (Holweg *et al.*, 2011).

BPI se encarga de destruir agentes bacterianos que infectan tanto intracelular como extracelularmente inhibiendo la actividad de las endotoxinas secretadas por agentes infecciosos y erradicándolas del sistema, activa su función citotóxica y coopera con las células presentadoras de antígenos para que estas cumplan su función y hagan la entrega de antígenos (Schultz & Weiss, 2007). Nuestros resultados muestran que la expresión de BPI va a la baja en MDM's infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c con respecto al medio (Figura 7a), lo que se puede asociar con una de las funciones destacadas de BPI que es la prevención de inflamación sistémica a través del control de la infección y de la respuesta inflamatoria por medio de la modulación de citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  evitando daño tisular (Schultz & Weiss, 2007). Por ejemplo, se ha documentado en estudios de células monocíticas que la alta expresión de BPI pueden inducir una reducción en la producción de TNF- $\alpha$  mediada por LPS, disminuyendo la inflamación (Guerra-Ruíz *et al.*, 2010). Esto ocurre mediante el reconocimiento inmediato de LPS por parte de BPI, lo que desencadena la unión de la proteína-bacteria deteniendo su desarrollo y generando un deterioro de la membrana celular asesinando al parásito intracelular y controlando la inflamación (Elsbach, 1998). Algo semejante ocurre con LL-37.

LL-37 es un péptido antimicrobiano que desempeña múltiples funciones ante una infección por microorganismos como *M. tuberculosis*, encargándose de la eliminación de micobacterias mediante la formación de poros en la membrana, además de regular la respuesta inflamatoria, mediante la disminución de TNF- $\alpha$  y estimulación de secreción de IL-10, también controla la proliferación celular y la apoptosis (Ma *et al.*, 2021). Se ha reportado que valores altos de LL-37 podrían inhibir las funciones de TNF- $\alpha$  obstaculizando la respuesta inflamatoria inicial necesaria ante una infección (Mookherjee *et al.*, 2006) a esto se puede deber que nosotros hayamos encontrado una expresión a la baja del gen codificante de LL-37 al igual que de BPI (Figura 7a y 7b), ya que se está promoviendo una respuesta inflamatoria importante tras la infección con ambas cepas, por lo que las cantidades de LL-37 deben ser reguladas para evitar así la inhibición de TNF- $\alpha$  que promuevan una respuesta de control eficiente. Sin embargo, también una sobre disminución en la producción de este péptido antimicrobiano genera que exista predisposición a presentar tuberculosis activa (Ma *et al.*, 2021). Por lo que es recomendable medir las cantidades en cuanto a la producción de la proteína ya que nosotros no pudimos debido a que una de las primeras limitantes con la que nos encontramos fue que en el momento no contábamos con los reactivos necesarios para evaluar la producción de los PAM.

## 6. Metas alcanzadas

El trabajo desempeñado durante el servicio social me permitió conocer aspectos importantes sobre inmunología humana, principalmente, sobre la respuesta inmune innata y adquirida desarrollada contra la tuberculosis. Esto gracias a la formación que obtuve en técnicas de laboratorio realizadas en células humanas infectadas con la cepa vacunal *M. bovis* BCG y con la cepa mutante a evaluar: *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c candidata a vacuna contra la tuberculosis. Estas técnicas permiten analizar distintos aspectos inmunológicos, entre los que destaca para este reporte, la expresión de genes. Todo esto da un panorama sobre los efectos que podría generar el prospecto a vacuna contra la enfermedad y que, en un futuro no muy lejano, servirán para comparar dichos efectos con respecto a los generados por la vacuna BCG y determinar si brinda o no más beneficios.

El apoyo desempeñado y los aprendizajes adquiridos siempre estuvieron encaminados a responder los objetivos establecidos en el protocolo de investigación “Estudio de la respuesta inmune innata y adquirida en células humanas infectadas con la cepa mutante *Mycobacterium bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c, candidata a vacuna contra la tuberculosis” y se lograron gracias al trabajo y apoyo de compañeros y personal adscrito al departamento pertenecientes a otras disciplinas entre las que destacan químicos farmacéuticos biólogos, inmunólogos, químicos parasitólogos, biólogos y médicos pasantes, lo que me permitió formar parte de un equipo de trabajo multidisciplinario.

Se logró la creación de la base de datos con información referente a la expresión de los genes de interés donde se irán almacenando los resultados de futuros experimentos. Esto permitió y permitirá realizar análisis comparativos sobre los niveles de expresión de los genes tras la infección de MDM's con ambas cepas.

## 7. Conclusiones

Se comprendieron aspectos generales y específicos de la inmunidad innata y adquirida en las células humanas infectadas con la cepa mutante *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c candidata a vacuna contra la Tuberculosis.

Se logró la separación de las células mononucleares a partir de sangre periférica y purificación de MN de 14 voluntarios sanos (5 mujeres y 9 hombres), a los cuales posteriormente se les realizó análisis de pureza de monocitos por citometría de flujo, obteniendo una mediana de pureza del 97.5%. Se realizaron experimentos de infección con la cepa *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c y con *M. bovis* BCG en macrófagos diferenciados de monocitos. Posteriormente se analizó la expresión de genes,

expresión de péptidos antimicrobianos y producción de citocinas proinflamatorias para poder realizar una comparación sobre su respuesta ante la infección.

Los resultados de la expresión de genes y la producción de citocinas indican que no existe diferencia en la inmunidad innata inducida entre *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c y *M. bovis* BCG, pues los MDM's infectados con la cepa *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c mostraron una expresión de genes proinflamatorios: IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 semejante a los MDM's infectados con la cepa vacunal *M. bovis* BCG, a excepción de TNF- $\alpha$  que se vio es más expresada por las células infectadas con la cepa vacunal.

En cuanto a la producción de citocinas, los MDM's infectados con la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c tienden a inducir mayor producción de IL-8 en comparación con aquellas infectadas con la cepa vacunal BCG las cuales producen mayor cantidad de TNF- $\alpha$ . No obstante, estos aumentos no son significativos. Por otro lado, ambas cepas generan una producción semejante de IL-1 $\beta$ .

De igual manera, la expresión de genes de los péptidos antimicrobianos: BPI y LL-37 en los MDM's infectados con la cepa *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c fue de forma semejante que en las células infectadas con *M. bovis* BCG.

Los resultados hasta ahora expuestos permiten realizar una comparación temprana sobre la inmunidad innata (expresión de genes y producción de citocinas) inducida por la cepa *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c contra *M. bovis* BCG, dando así un panorama inicial que ayudará a comprender la respuesta del sistema inmune innato y adquirido estimulado con esta nueva candidata a vacuna. Sin embargo, para poder divisar con mayor certeza esta disimilitud, es necesario aumentar la población de estudio y continuar realizando más experimentos para así observar de forma más clara y contundente las diferencias en la respuesta de los MDM's ante la infección con las cepas *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c.

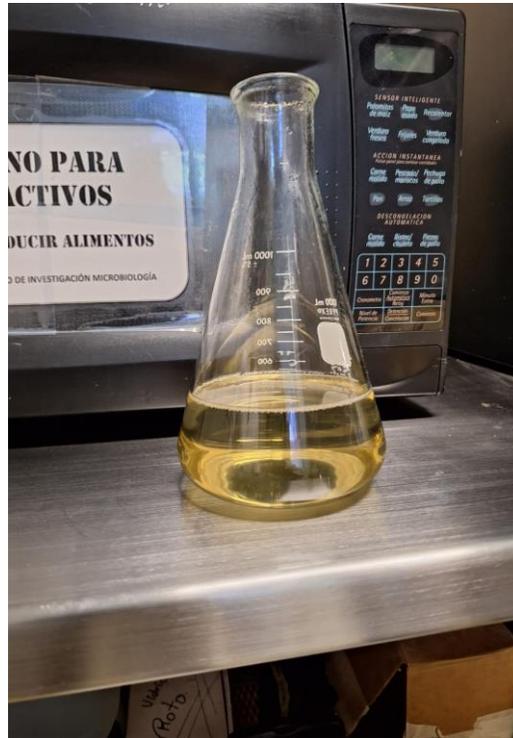
## 8. Referencias

- Álvarez, T. Placeres, J. F. (2016). Tuberculosis pulmonar y diabetes mellitus. Presentación de dos casos. *Revista Médica Electrónica*, 38(3), 417-423. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1684-18242016000300012&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242016000300012&lng=es&tlng=es).
- Aceves-Sánchez, M. de J. Flores-Valdez, M. A. Pedroza-Roldán, C. Creissen, E. Izzo, L. Silva-Angulo, F. Dawson, C. Izzo, A. Bielefeldt-Ohmann, H. Segura-Cerda, C. A. López-Romero, W. Bravo-Madrigal, J. Barrios-Payán, J. A. de la Cruz, M. Á. Ares, M. Jorge-Espinoza, M. G. (2021). Vaccination with BCGΔBCG1419c protects against pulmonary and extrapulmonary TB and is safer than BCG. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-91993-8>
- Applied Biosystem.(2001). User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms\\_040980.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_040980.pdf)
- Barcat, J. Kantor, I. Ritacco, V. (2021). Cien años de vacuna BCG. *Medicina (Argentina)*, 81, 1007-1014. <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v81n6/1669-9106-medba-81-06-1007.pdf>
- Barreto, M. L. Pereira, S. M. Pilger, D. Cruz, A. A. Cunha, S. S. Sant'Anna, C. Ichihara, M. Y. Genser, B. Rodrigues, L. C. (2011). Evidence of an effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: Second report of the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Vaccine*, 29(31), 4875–4877. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.023>
- Beceiro, J. Sivera, C. L. Oria de Rueda, O. Olivas, C. Herbozo, N. C. (2009). Utilidad de un test rápido de interleuquina-6 sérico combinado con proteína C reactiva para predecir la sepsis en recién nacidos con sospecha de infección. *Anales de Pediatría*, 71(6):483-8. doi: 10.1016/j.anpedi.2009.07.027.
- Boni, F. G. Hamdi, I. Koundi, L. M. Shrestha, K. Xie, J. (2022). Cytokine storm in tuberculosis and IL-6 involvement. *Infection, Genetics and Evolution*, 97:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105166>
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2012). Tuberculosis. <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/tuberculosis.pdf>
- Elsbach, P. (1998). The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense, *Journal of Leukocyte Biology*, 64:14–18, <https://doi.org/10.1002/jlb.64.1.14>
- Fatima, S. Kumari, A. Das, G. Dwivedi, V. P. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sciences*, 252, 117594. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117594>
- Flores-Valdez, M. A. De Jesús Aceves-Sánchez, M. Pedroza-Roldán, C. Vega-Domínguez, P. J. Prado Montes De Oca, E. Bravo-Madrigal, J. Laval, F. Daffé, M. Koestler, B. Waters, C. M. (2015). The Cyclic Di-GMP Phosphodiesterase Gene Rv1357c/BCG1419c Affects BCG Pellicle Production and In Vivo Maintenance. *IUBMB Life*, 67(2), 129–138. <https://doi.org/10.1002/IUB.1353>
- Flores-Valdez, M. A. Pedroza-Roldán, C. Aceves-Sánchez, M. de J. Peterson, E. J. R. Baliga, N. S. Hernández-Pando, R. Troudt, J. L. Creissen, E. Izzo, L. Bielefeldt-Ohmann, H. Bickett, T. Izzo, A. A. (2018). The BCGΔBCG1419c Vaccine Candidate Reduces Lung Pathology, IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10 During Chronic TB Infection. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01281>
- Guerra-Ruiz, A. Casafont, F. Cobo, M. Terán, A. de-la-Peña, J. Estebanez, A. Pons-Romero, F. (2010). Increased bactericidal/permeability increasing protein in patients with cirrhosis. *Liver International*, 30(1):94-101. Doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02121.x.
- Hinostroza, S. R. Manchego, S. A. Sandoval, C. N. Chiok K. More J. (2015). Expresión de Citocinas Pro-Inflamatorias de Leucocitos de Alpaca (Vicugna pacos) Inducidos por el Extracto de Macroquistes de

- Sarcocystis aucheniae. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 26(2):328-341. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i2.11007>
- Goldstein, L. A. Strieter R. M. Evanoff H. L. Kunkel S. L. Lukacs N. W. (1996). TNF-induced IL-8 and MCP-1 production in the eosinophilic cell line, EOL-1. *Mediators Inflamm*, 5(3):218-23. Doi: 10.1155/S0962935196000312.
- Holweg, A. Schnare, M. Gessner, A. (2011). The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the innate defence of the lower airways. *Biochemical Society Transactions*, 39(4):1045–1050. Doi:10.1042/bst0391045
- IMSS. (2022). La tuberculosis es curable si se detecta a tiempo; hay diversas formas para prevenir su aparición: IMSS. [http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/202203/144#:~:text=La%20tuberculosis%20es%20una%20enfermedad,del%20Seguro%20Social%20\(IMSS\)](http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/202203/144#:~:text=La%20tuberculosis%20es%20una%20enfermedad,del%20Seguro%20Social%20(IMSS))
- Junqueira-Kipnis, A. P. Trentini, M. M. Marques, L. M. Kipnis, A. (2020). Live Vaccines Have Different NK Cells and Neutrophils Requirements for the Development of a Protective Immune Response Against Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 11:1-16. doi: 10.3389/fimmu.2020.00741
- Lansionbio. (2020). Manual de usuario del kit de Prueba IL-6 (Interleucina-6). <https://obteam.com.pe/archivos-soporte/manuales/6.4%20Inflamaci%C3%B3n%20-%20IL-6%20-%20Manual%20de%20Usuario%20Espa%C3%B1ol.pdf>
- Luke, E. Swafford, K. Shirazi, G. Venketaraman, V. (2022). TB and COVID-19: An Exploration of the Characteristics and Resulting Complications of Co-infection. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, 14(1):6. <https://doi.org/10.31083/j.fbs1401006>
- Ma, L. Chen, X. Weng, S. Yang, X. (2021). Evaluation of the T-SPOT. TB test, oxidation-related factors, and antimicrobial peptide LL-37 in the diagnosis of pulmonary tuberculosis with type 2 diabetes. *Journal of International Medical Research*, 49(12). Doi:10.1177/03000605211064418
- Martinez, A. N. Mehra, S. Kaushal, D. (2013). Role of interleukin 6 in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of infectious diseases*, 207(8):1253-61. doi: 10.1093/infdis/jit037.
- Moris, D. N. Kontos, M. I. Mantonakis, E. I. Athanasiou, A. K. Spartalis, E. D. Bakoyiannis, C. N. Georgopoulos, S. E. (2014). Concept of the aortic aneurysm repair-related surgical stress: a review of the literature. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(9): 2402.
- Mookherjee, N. Brown, K, L. Bowdish, D. M. Doria, S. Falsafi, R. Hokamp, K. Roche, F. M. Mu, R. Doho, G. H. Pistolic, J. Powers, J. P. Bryan, J. Brinkman, F. S. Hancock, R. E. (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *The Journal of Immunology*, 176(4):2455-2464. Doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2455.
- National Human Genome Research Institute. (2024). Expresión génica [web]. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Expresion-genica#:~:text=La%20expresi%C3%B3n%20g%C3%A9nica%20act%C3%BAa%20como,de%20esos%20materiales%20se%20produce.>
- Peralta, C. (2022). En México, la tuberculosis ataca más a población joven. Universo sistema de noticias de la UV. <https://www.uv.mx/prensa/ciencia/en-mexico-la-tuberculosis-ataca-mas-a-poblacion-joven/>
- Plowes-Hernández, O. Prado-Calleros, H. Arroyo-Escalante, S. Zavaleta-Villa, B. Flores-Osorio, J. Ibarra, A. Romero-Valdovinos, M. Olivo-Díaz, A. (2021). Cervical lymph node tuberculosis and TNF, IL8, IL10, IL12B and IFNG polymorphisms. *New Microbiological*, 44(1):24-32. PMID: 33582825.

- Rodrigues, L. C. Pereira, S. M. Cunha, S. S. Genser, B. Ichihara, M. Y. De Brito, S. C. Hijjar, M. A. Dourado, I. Cruz, A. A. Sant'Anna, C. Bierrenbach, A. L. Barreto, M. L. (2005). Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC clusterrandomised trial. *Lancet (London, England)*, 366(9493), 1290–1295. [https://doi.org/10.1016/S01406736\(05\)67145-0](https://doi.org/10.1016/S01406736(05)67145-0)
- Saavedra Ramírez, P. G. Vásquez Duque, G. M. González Naranjo, LA (2011). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*, 24 (2):157-166.
- Sable, S. B. Posey, J. E. Scriba, T. J. (2019). Tuberculosis Vaccine Development: Progress in Clinical Evaluation. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00100-19>
- Sarkar, S. L. BF, Carranza C. S. Rivas-Santiago C. Porter A. Ryan, M. P. Gow, A. Chung, K. F. Tetley, T. Zhang, J. Georgopoulos, P. G. Ohman-Strickland, P. Schwander, S. (2015) Modulation of Human Macrophage Responses to Mycobacterium tuberculosis by Silver Nanoparticles of Different Size and Surface Modification. *Plos One*, 10(11): e0143077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143077>
- Schultz, H. Weiss, J. P. (2007). The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clinica Chimica Acta*, 384(1-2):12-23. doi: 10.1016/j.cca.2007.07.005.
- Secretaría de Salud. (2023). En 2022 se registran más de 28 mil casos de tuberculosis en México. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud/prensa/079-en-2022-se-registran-mas-de-28-mil-casos-detuberculosis-enmexico#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20se%20registran%20m%C3%A1s,la%20comunidad%20a%20trav%C3%A9s%20de>
- Silvestre S, Betlloch, I. Vergara G. (2004). Fármacos anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en dermatología: aplicaciones actuales y efectos adversos. *Piel*, 19(3): 168-174.
- Strieter, R. M. Remick, D. G. Ham, J. M. Colletti, L. M. Lynch, J. P. Kunkel, S. L. (1990). Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Expression in Human Whole Blood. *Journal of Leukocyte Biology*, 47(4):366–370. doi:10.1002/jlb.47.4.366
- UAM Xochimilco. 2019. Plan de estudios biología. [http://www2.xoc.uam.mx/oferta-educativa/divisiones/cbs/licenciaturas-posgrados/pplic/biologia/plan/plan\\_biologia\\_2019.pdf](http://www2.xoc.uam.mx/oferta-educativa/divisiones/cbs/licenciaturas-posgrados/pplic/biologia/plan/plan_biologia_2019.pdf)
- Universidad Complutense de Madrid. (2019). Diseño experimental y análisis de datos en la técnica de la qRTPCR (quantitive Real Time-Polymerasa Chain Reaction) [Práctica]. [https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2019-03-22-pr%C3%A1ctica%204\\_DISE%C3%91O%20EXPERIMENTAL%20Y%20AN%C3%81LISIS%20DE%20DATOS%20EN%20LA%20T%C3%89CNICA%20DE%20LA%20RT%20qPCR%20\(1\).pdf](https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2019-03-22-pr%C3%A1ctica%204_DISE%C3%91O%20EXPERIMENTAL%20Y%20AN%C3%81LISIS%20DE%20DATOS%20EN%20LA%20T%C3%89CNICA%20DE%20LA%20RT%20qPCR%20(1).pdf)
- Universidad del País Vasco. (2022). Separación de células [Práctica]. [https://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/separar\\_celulas.pdf](https://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/separar_celulas.pdf)
- WHO. (2023). Tuberculosis. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- Wu, S. Wang, Y. Zhang, M. Shrestha, SS. Wang, M. He, JQ. (2018). Genetic Polymorphisms of IL1B, IL6, and TNF $\alpha$  in a Chinese Han Population with Pulmonary Tuberculosis, *BioMed Research International*, 2018: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/3010898>

## 9. Anexos

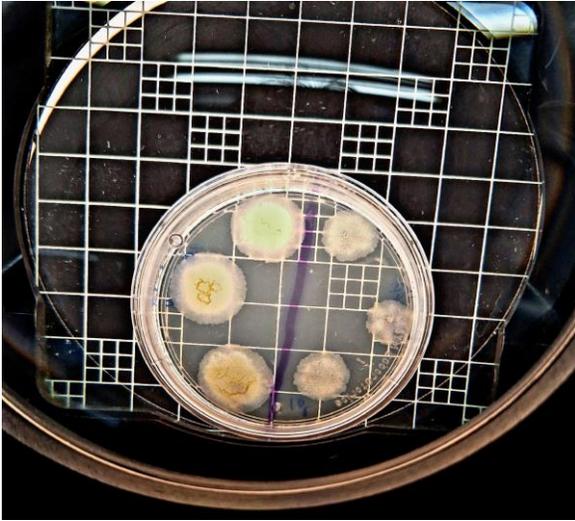


**Figura 8.** Preparación de Medio 7H10.

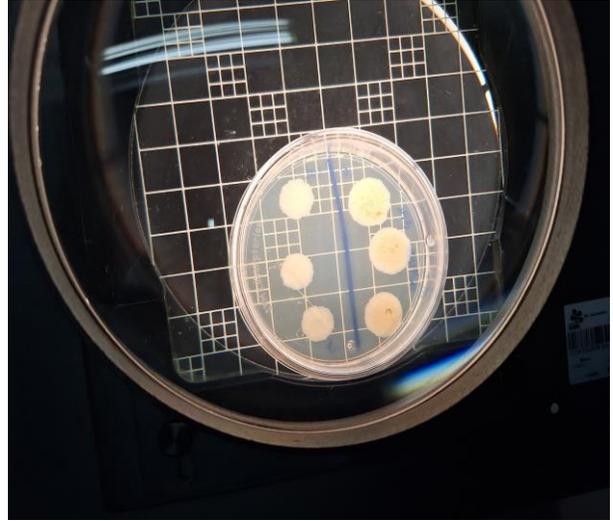


**Figura 9.** Preparación de cajas Petri con Medio 7H10 para micobacterias.

a)



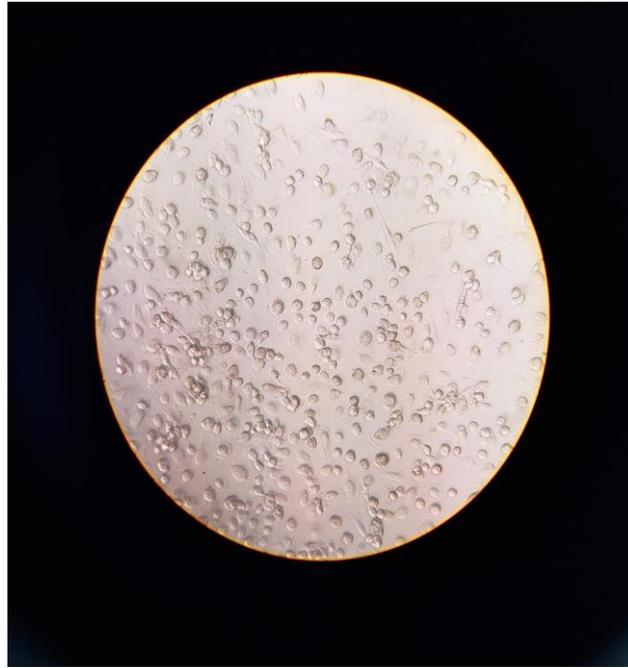
b)



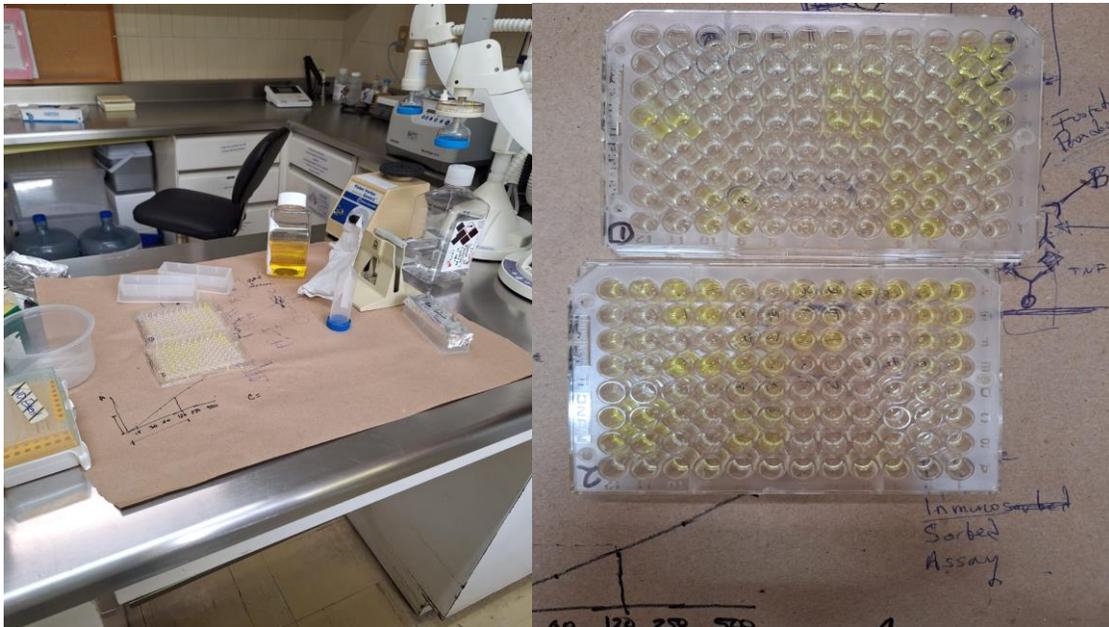
**Figura 10.** Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para *M. bovis* BCG (a) y *M. bovis* BCGΔBCG1419c (b).



**Figura 11.** Campana de flujo laminar con equipo necesario para purificación de células mononucleares y MN.



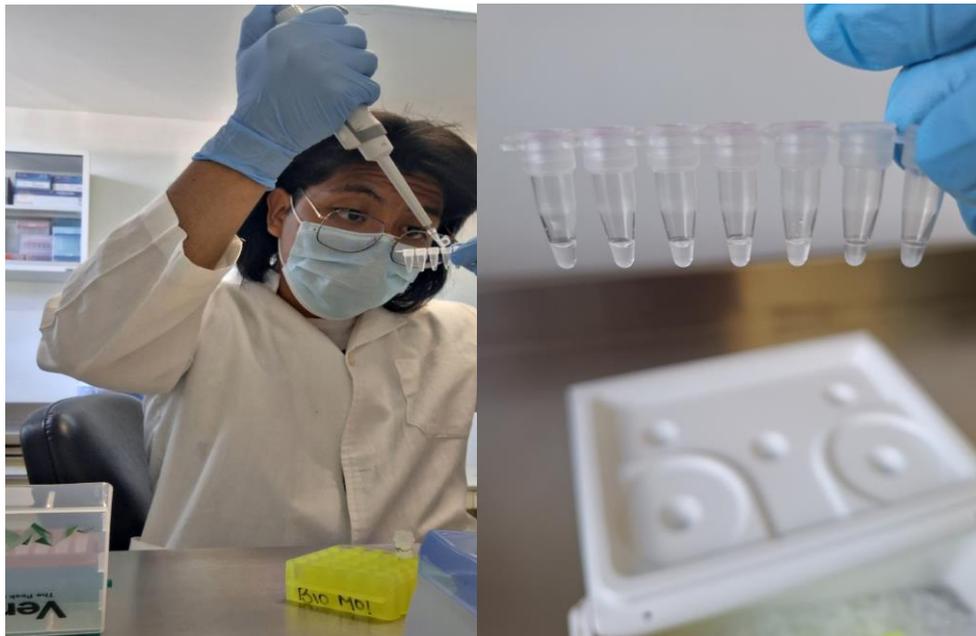
**Figura 12.** Monocitos (MN) obtenidos de sangre de un voluntario sano observados en el microscopio invertido.



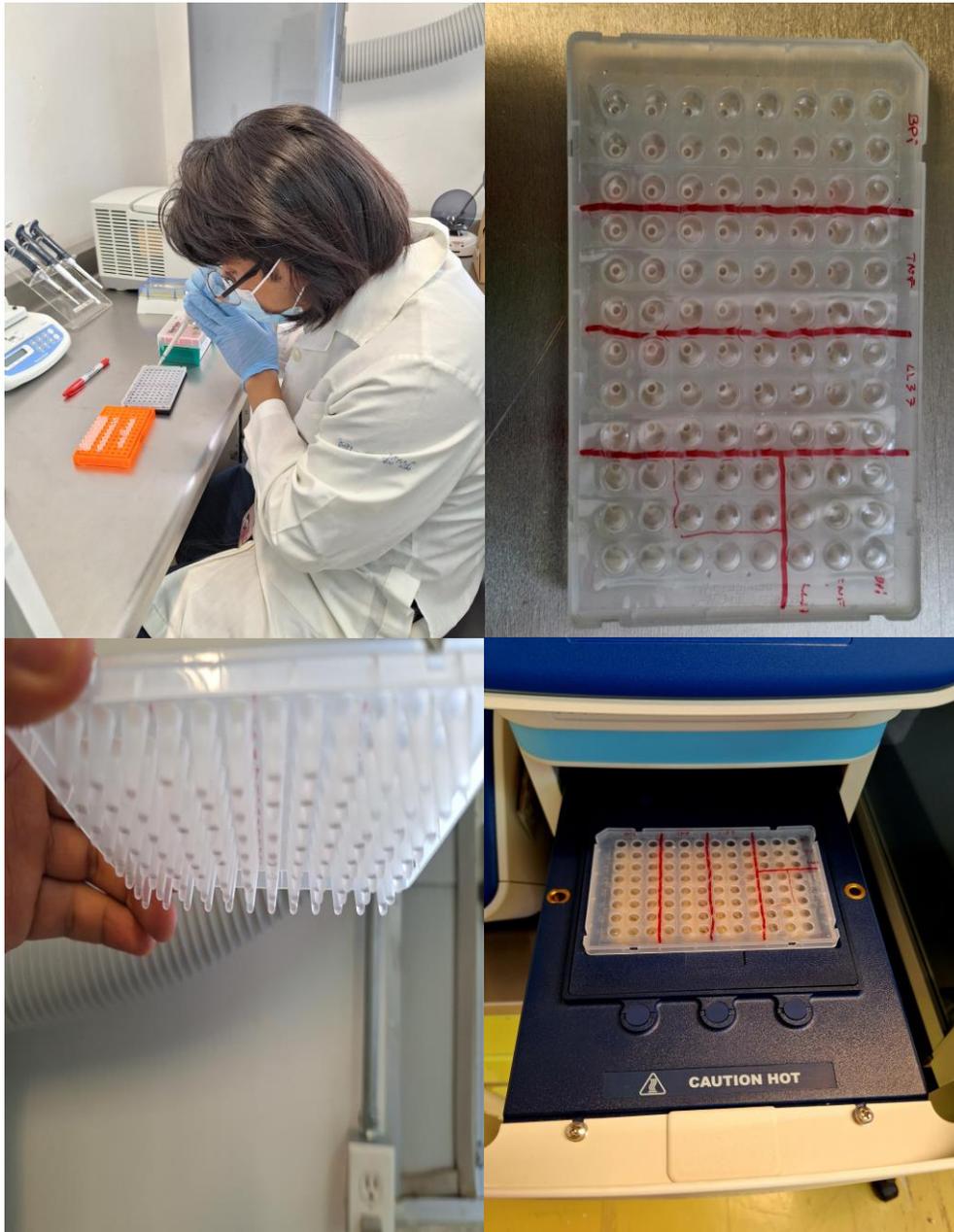
**Figura 13.** Determinación de las citocinas proinflamatorias mediante técnicas de ELISA en sobrenadantes de MDM infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c.



**Figura 14.** Extracción de RNA total a partir de lisados celulares.

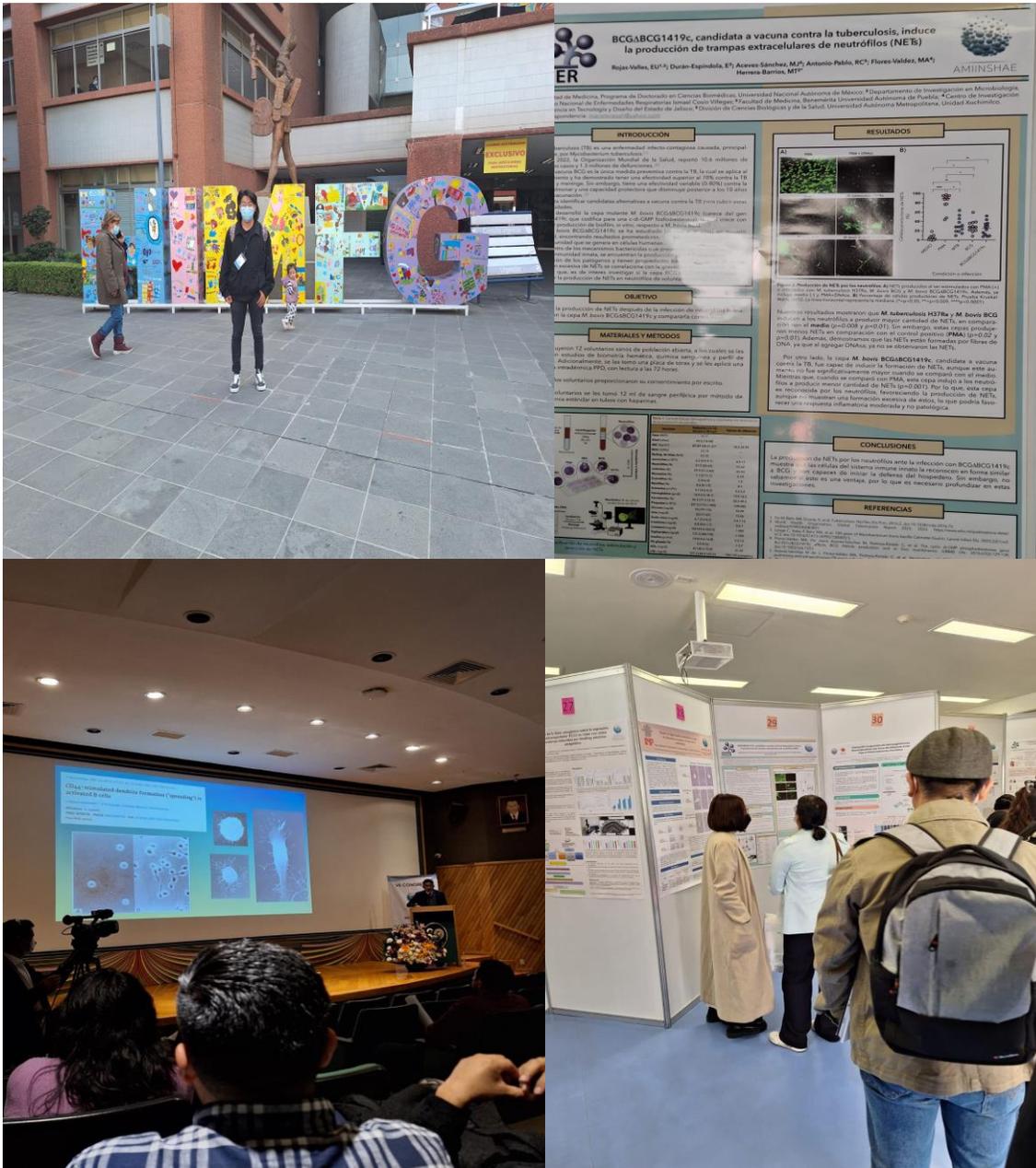


**Figura 15.** Realización de Síntesis de DNA complementario (cDNA).



**Figura 16.** Realización de ensayo PCR en tiempo real (qPCR) para analizar la expresión de genes en los MDM infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG $\Delta$ BCG1419c.

## Actividades extra



**Figura 17.** Asistencia al Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Investigadores de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (AMIINSHAE) realizado el 5 y 6 de diciembre del 2023 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México.



**Figura 18.** Asistencia al curso institucional de Protección Civil para Derrames Químicos.