

Artículo Original

Análisis con Micromatrices de la respuesta granulomatosa *in vitro* a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

Microarray analysis of the *in vitro* granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

Niradiz Reyes¹, Alfonso Bettin¹, Ismael Reyes², Jan Geliebter³

¹ Research Group of Genetics and Molecular Biology. University of Cartagena. Cartagena, Colombia

² Westchester Medical Center, Valhalla, NY, United States

³ New York Medical College, Valhalla, NY, United States

Reyes N, Bettin A, Reyes I, Geliebter J. Microarray analysis of the *in vitro* granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Colomb Med.* 2015; 46(1): 26-32.

© 2015 Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten

Historia

Recibido: 8 mayo 2014
Revisado: 29 octubre 2014
Aceptado: 24 febrero 2015

Palabras clave

Mycobacterium tuberculosis; granuloma; micromatrices de oligonucleotidos; quimiocinas

Keywords

Mycobacterium tuberculosis; granuloma; oligonucleotide microarrays; chemokines.

Resumen

Antecedentes: La marca histológica de la tuberculosis es el granuloma, una acumulación celular organizada que cumple funciones claves en la defensa del hospedero contra *Mycobacterium tuberculosis*. Estas estructuras secuestran y confinan a las micobacterias previniendo el desarrollo de enfermedad activa; el mantenimiento a largo plazo de los granulomas conlleva al establecimiento de latencia. Un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en la formación y mantenimiento del granuloma es necesario.

Objetivo: Monitorear la formación del granuloma y determinar los patrones de expresión génica inducidos durante la respuesta granulomatosa a *M. tuberculosis* (H37Ra).

Métodos: En este estudio se empleó un modelo *in vitro* humano previamente caracterizado. La agregación celular fue examinada diariamente mediante microscopía óptica y tinción de Wright por 5 días. Para analizar la expresión génica, los granulomas fueron colectados a las 24 h, se extrajo el RNA sometándolo a hibridación a micromatrices de Affymetrix.

Resultados: Se observó la formación gradual de granulomas en respuesta a la infección. Los granulomas persistieron por 96 h, y luego se desvanecieron.

Conclusiones: Se identificaron genes de la respuesta inmune innata y vías de presentación antigénica activadas durante la respuesta granulomatosa *in vitro* a células micobacteriales vivas, lo cual reveló alteraciones tempranas de la expresión génica en el inicio de la respuesta granulomatosa humana.

Abstract

Background: The hallmark of tuberculosis is the granuloma, an organized cellular accumulation playing a key role in host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. These structures sequester and contain mycobacterial cells preventing active disease, while long term maintenance of granulomas leads to latent disease. Clear understanding on mechanisms involved in granuloma formation and maintenance is lacking.

Objective: To monitor granuloma formation and to determine gene expression profiles induced during the granulomatous response to *M. tuberculosis* (H37Ra).

Methods: We used a previously characterized *in vitro* human model. Cellular aggregation was followed daily with microscopy and Wright staining for 5 days. Granulomas were collected at 24h, RNA extracted and hybridized to Affymetrix human microarrays.

Results: Daily microscopic examination revealed gradual formation of granulomas in response to mycobacterial infection. Granulomatous structures persisted for 96 h, and then began to disappear.

Conclusions: Microarray analysis identified genes in the innate immune response and antigen presentation pathways activated during the *in vitro* granulomatous response to live mycobacterial cells, revealing very early changes in gene expression of the human granulomatous response.

Autor de correspondencia:

Niradiz Reyes. University of Cartagena. Cartagena, Colombia. Associate Professor. Department of Basic Sciences. School of Medicine. University of Cartagena. Cartagena – Colombia. E-mail: nreyes@unicartagena.edu.co

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad altamente contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, que amenaza actualmente una proporción significativa de la población mundial, principalmente gracias a su capacidad para inducir una infección latente. Se ha estimado que esta enfermedad causa aproximadamente 9 millones de casos nuevos y 1.4 millones de muertes cada año, lo que ubica a la tuberculosis en el segundo lugar en mortalidad entre todas las enfermedades infecciosas en el mundo¹. Después de la infección, la tuberculosis activa se desarrolla en el 5% de los individuos mientras que el 90% porta la infección latente por el resto de sus vidas, ya que son incapaces de lograr la completa erradicación del patógeno^{2,3}. Durante el encuentro con el hospedero, los bacilos entran a los pulmones en partículas en aerosol, causando la infección y activando a los macrófagos alveolares y células dendríticas. Los macrófagos infectados liberan citoquinas y quimiocinas que disparan una fuerte respuesta inflamatoria que conduce a la formación de un granuloma.

El granuloma es una acumulación celular organizada que se forma alrededor de los bacilos⁴. Se ha sugerido que la respuesta inmune del hospedador es capaz de ajustarse y responder al estado fisiológico de la bacteria, causando una modulación en la expresión de genes directamente en el sitio de la infección⁵. La completa erradicación de los bacilos no se lleva a cabo, ya que la bacteria ha desarrollado estrategias que le permiten persistir dentro del granuloma por largo tiempo, pudiendo en algunas ocasiones escapar del granuloma y diseminarse local y sistémicamente⁶. Por lo tanto, bajo ciertas condiciones fisiológicas (desnutrición, envejecimiento, etc.) ó patológicas (infección por VIH, diabetes, cáncer, etc.), *M. tuberculosis* es capaz de reactivarse y escapar del granuloma y diseminarse⁷. Un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en la formación y mantenimiento del granuloma puede ayudar en el desarrollo de terapias dirigidas contra la tuberculosis⁴.

Diversos modelos animales^{8,9} y humanos *in vitro*¹⁰⁻¹² han sido desarrollados para tratar de entender la compleja secuencia de eventos moleculares tempranos involucrados en la formación del granuloma. Los modelos *in vitro* en particular representan un valioso instrumento para la identificación de los mecanismos implicados en la respuesta inmune temprana dirigida contra micobacterias definidas¹³. En el presente estudio hemos utilizado el modelo *in vitro* para el desarrollo del granuloma propuesto y caracterizado por Puissegur *et al.*¹¹, el cual ha demostrado su utilidad para el estudio de las interacciones moleculares entre la micobacteria y las células hospedadoras humanas usando micobacterias vivas y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs: peripheral blood mononuclear cells). Usando este modelo, en el presente estudio hemos determinado los perfiles globales de la expresión génica que se inducen durante la formación *in vitro* de granulomas en respuesta a la infección con la cepa *M. tuberculosis* H37Ra. El análisis de genes y vías alteradas durante el desarrollo de estos granulomas *in vitro* puede ser de gran utilidad para entender los eventos moleculares tempranos que tienen lugar durante la interacción hospedador-patógeno.

Materiales y Métodos

Células inmunes y bacteria

Se obtuvo sangre periférica a partir de donantes sanos luego que los mismos aceptaron participar del estudio y firmaron

un consentimiento informado. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron usando un gradiente de centrifugación en Ficoll-Hipaque 1077 (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) y luego se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células bacterianas de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* se cultivaron en el medio basal modificado de Lowenstein-Jensen. Las bacterias fueron recolectadas en caldo Middlebrook 7H9 (BD Difco Biosciences, Mountain View, CA, USA) y mezcladas extensivamente con agujas de jeringa, para ser posteriormente cultivadas con diluciones seriadas en medio Lowenstein-Jensen modificado. La viabilidad de las células se determinó mediante conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) en el medio basal.

Inducción de los granulomas *in vitro*

Las PBMCs se transfirieron a platos de cultivo celular de 24 pozos a una concentración de 1×10^5 células por pozo en RPMI 1640 suplementado con 10% FBS. Seguidamente se agregó a cada pozo una suspensión de células frescas de *M. tuberculosis* H37Ra o BCG con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1. Las células fueron de inmediato cultivadas a 37 °C y monitoreadas en periodos de 24 h durante 5 días. Se hizo recambio del medio de cultivo cada 48 h. Para evaluar la especificidad de la reacción del granuloma, se hicieron cultivos adicionales de PBMCs en presencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, con MOI de 0.1. También se incluyeron como controles PBMCs cultivadas en ausencia de bacterias.

Microscopía óptica y monitoreo celular

Para monitorear el progreso de la agregación celular, las células cultivadas fueron observadas bajo un microscopio invertido (Nikon, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan) y se tomaron fotografías con un sistema de captura Nikon. Cada 24 h durante un total de 5 días de cultivo, las células fueron sometidas a tinción Wright-Giemsa (W-G) modificada (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Microscopía de transmisión electrónica

A las 48 h post-infección, los agregados celulares fueron recolectados cuidadosamente, fijados por 4 h a 4 °C en 2% glutaraldehído en 0.1 M de bufer cacodilato con 6 mM CaCl_2 , pH 7.4. Después de lavar con bufer cacodilato, los granulomas fijados fueron tratados durante una hora con tetróxido de osmio al 1% en 0.1 M bufer cacodilato, luego se deshidrataron y se embebieron en una resina Epon-araldita. Secciones de 0.5 μm se obtuvieron en un microtomo y se montaron en rejillas de cobre, se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo al 3%, y se examinaron con un microscopio de transmisión electrónica Zeiss 10 C.

Perfiles de expresión con micromatrices

Para los estudios con micromatrices, los granulomas fueron preparados *in vitro* por triplicado, mediante infección de las PBMCs con Mtb H37Ra durante 24 h. Al cabo de este tiempo, los granulomas se recolectaron y se sometieron a extracción de ARN. Como control del experimento, PBMCs fueron también cultivadas por triplicado en las mismas condiciones. El ARN total de los granulomas inducidos por H37Ra y de las PBMCs controles fueron procesadas en las instalaciones de micromatrices del New York Medical College e hibridizadas en forma individual a chips de Affymetrix Human Genome GeneChip U133 plus2 (Affymetrix, Santa Clara, CA). Los archivos escaneados resultantes fueron analizados con el programa dChip v1.3 (www.dchip.org)

y con Affymetrix MicroArray Suite 5.0 (MAS 5.0). Los datos de las micromatrices fueron normalizados con el programa dChip v1.3 usando el método de normalización del grupo invariante¹⁴, y se obtuvieron los estimados de expresión génica basados en modelo y algoritmo de detección de “valores atípicos” de acuerdo al modelo “perfect-match-only” desarrollado por Li-Wong¹⁴; los transcritos considerados como “valores atípicos” fueron excluidos de los análisis subsiguientes. El programa Affymetrix MAS 5.0 fue usado para determinar si los transcritos fueron detectados como presentes, ausentes, marginal, o no detectados. Para el nivel de expresión significativo, se usó un punto de corte de 500 unidades. Los datos de ADN generados por las micromatrices a partir de los granulomas *in vitro* fueron comparados a los datos generados por las micromatrices a partir de PBMCs no infectadas usando el programa dChip v1.3 y los archivos de expresión resultantes fueron sometidos a análisis de vías biológicas y de grupos funcionales para determinar la significancia de los cambios en un contexto biológico. Todos los datos generados por las micromatrices siguieron las normas MIAME (Minimum Information about a Microarray Experiment) y los datos crudos fueron depositados en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus, Accession Number: Series GSE16250).

Análisis de las vías biológicas

Para identificar las vías biológicas afectadas durante la formación *in vitro* de los granulomas, los datos de micromatrices fueron analizados con los programas GenMAPP (Gene Map Annotator and Pathway Profiler) y MAPPFinder desarrollados en los Institutos Gladstone de la Universidad de California en San Francisco¹⁵ (www.genmapp.org). Los criterios usados para el análisis GenMAPP/MAPPFinder para la expresión aumentada fueron: una intensidad promedio mínima de 500 unidades, un porcentaje de detección de P (presente) de 100, un “fold change” ≥ 2.0 entre los granulomas comparados con las PBMCs no infectadas. Los criterios para la expresión disminuida fueron un mínimo de intensidad de 500 unidades, un porcentaje de P (presente) de 100, y un “fold change” de < -2.0 entre los granulomas comparados con las PBMCs no infectadas. Los programas generaron un valor Z basado en la distribución hiper-geométrica.

Validación de los datos de las micromatrices por PCR cuantitativa en tiempo real

Para validar los datos de expresión generados por las micromatrices, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para genes seleccionados utilizando los mismos RNAs individuales usados en los experimentos con las micromatrices¹⁶.

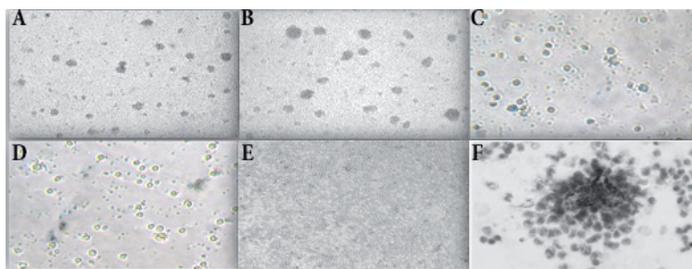


Figura 1. Infección de PBMC humanas con *Mycobacterium tuberculosis* resultó en la formación de granulomas microscópicos. PBMCs infectadas con: (A) H37Ra (x100), (B) BCG (x100), (C) *Escherichia coli* ATCC 25922 (x200), (D) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (x200), o (E) PBMCs no infectadas (x100). (F) Tinción Wright-Giemsa en la que se muestran los microgranulomas formados a las 24 h siguientes a la infección con H37Ra (x400).

Acido ribonucleico total (1 μ g) de cada muestra fue sometido a una transcripción inversa para generar cADN de primera cadena en un volumen de reacción de 20 μ L, usando QuantiTect Reverse Transcriptase kit (Qiagen) y la qRT-PCR se realizó con QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión génica fueron determinados en un termociclador StepOne (Applied Biosystems, Grand Island NY, USA). Se diseñaron cebadores específicos para los genes blanco seleccionados y para genes constitutivos usando el programa Primerblast software. Para estimar la reproducibilidad de los datos, cada muestra fue analizada en duplicado en la reacción de PCR.

Análisis estadístico

Para evaluar la reproducibilidad, todos los experimentos se realizaron en réplicas, y además también se realizaron experimentos independientes. Los cálculos de la expresión génica se efectuaron con el programa Sequence Detection System 2.1 (Applied Biosystems) usando el método comparativo CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$). β -actin e Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) se utilizaron como genes constitutivos de referencia. Los datos fueron analizados usando el programa SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). La significancia estadística de los cambios se determinó mediante la prueba *t* de Student.

Resultados

La infección de PBMCs humanas induce la formación de granulomas

Para replicar la formación de los granulomas en un modelo *in vitro*, se infectaron PBMCs humanas con *M. tuberculosis* H37Ra o BCG, y seguidamente se incubaron por 5 días. A las 24 h de incubación, las PBMCs tendieron a formar agregaciones celulares de linfocitos en presencia de H37Ra (Fig. 1A) o BCG (Fig. 1B). Las muestras controles correspondientes de los mismos donadores cultivadas en presencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o cultivadas en ausencia de bacterias no formaron

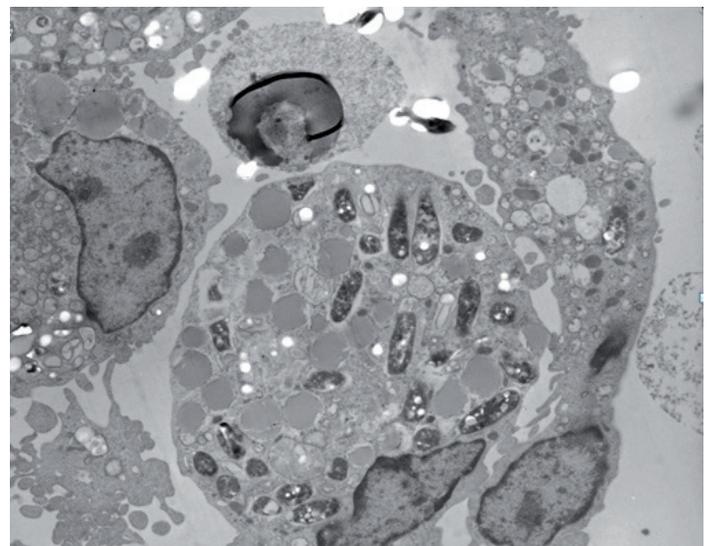


Figura 2. Microscopía de Transmisión electrónica de un granuloma inducido por H37Ra. Después de 48 h siguientes a la infección, las agregaciones celulares fueron recolectadas, fijadas y embebidas en una resina de Epon–araldite. Secciones de 0.5 μ m fueron obtenidas, teñidas y observadas bajo microscopio de transmisión electrónica (x4,000). Se pueden observar múltiples vesículas fagosomales conteniendo la bacteria H37Ra.

estos agregados (Figs. 1C, 1D, 1E) indicando que los agregados celulares se forman específicamente en respuesta a la infección con micobacterias. Estas acumulaciones celulares con forma similar a los granulomas, fueron confirmadas mediante tinción Wright-Giemsa a las 24 h siguientes a la infección con *M. tuberculosis* H37Ra (Fig. 1F). La microscopía de transmisión electrónica de estos agregados evidenció el atrapamiento de las micobacterias por los fagocitos presentes en las agregaciones celulares a las 48 h post-infección (Fig. 2). Las estructuras granulomatosas formadas *in vitro* persistieron por 96 h, y luego comenzaron a desvanecerse.

Perfiles de expresión con micromatrices de granulomas *in vitro* inducidos por H37Ra

Del total de 25,690 genes analizados con los microarreglos, 2,195 se encontraron sobreexpresados ("fold change" ≥ 2 , $p \leq 0.05$) y 106 subexpresados ("fold change" ≤ -2 , $p \leq 0.05$) en los granulomas *in vitro* comparados con las PBMCs no infectadas. Se encontró que el 60% de los genes alterados estuvieron relacionados con la respuesta inmune, tales como el procesamiento antigénico, vías de señalización (TLR2, TNF-, IL6-, IL-8, quimiocinas), 25% de los genes estuvieron relacionadas con procesos metabólicos y 15% estuvieron relacionados con estrés oxidativo y apoptosis (Tabla 1). Se encontró sobreexpresión de TLR2, CD14, CD86 y MyD88, los cuales corresponden a componentes principales de la vía de señalización de TLR2 de la respuesta inmune innata. También encontramos expresión aumentada de moléculas MHC-I y MHC-II involucradas en la presentación antigénica por células presentadoras de antígenos (APC), un proceso esencial para la contención de la infección por *M. tuberculosis*. En nuestro modelo del granuloma *in vitro*, a las 24 h post-infección con *M. tuberculosis* H37Ra, observamos una inducción significativa de un número de

transcritos implicados en las vías de señalización de la respuesta inmune proinflamatoria dependientes de quimiocinas, incluyendo XCL1(3.7), XCL2(5.1), CCL2(8.3), CCL4(10.0), CCL5(5.7), CCL7(5.6), CCL8(11.1), CCL18(10.3), CCL19(2.15), CCL20(8.9), CXCL1(2.1), CXCL2(8.3), CXCL5(11.6), CXCL10(7.7), y receptores de quimiocinas CCR2(3.8) y CXCR4(7.1). Se encontró además expresión aumentada de genes relacionados con apoptosis tales como caspasa-1 (5.0), caspasa-2 (2.2), caspasa-3 (3.7), caspasa-4 (4.5) y caspasa-9 (2.9). También se encontró expresión aumentada de granulinas y granzimas A, B y H, las cuales son componentes mayores de los gránulos citoplasmáticos de los linfocitos T citotóxicos y células NK, los cuales están involucrados en la apoptosis mediada por células. Adicionalmente observamos expresión aumentada de genes codificantes de las catepsinas A, C, D, y W, las cuales son un tipo de peptidasas implicadas en la activación de los linfocitos T CD8+. También se identificó la expresión alterada de un número de quimiocinas no previamente implicadas en la respuesta inmune a *M. tuberculosis*, tales como CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), XCL1 (linfotactina) y XCL2.

Validación por qRT-PCR de la expresión de genes seleccionados

Para validar los datos obtenidos con los microarreglos, se realizó qRT-PCR para un grupo de 10 genes, incluyendo las quimiocinas proinflamatorias (CCL2, IL8, CCL5, CCL18), moléculas efectoras involucradas en los mecanismos de muerte celular dependiente de células T citotóxicas (cistatina B, granzima B, granulinas), y metalotioneínas (1H, 1M, 1G). Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los valores positivos indican un aumento en la expresión génica en los granulomas *in vitro* a las 24 h posteriores a la infección con H37Ra comparado con PBMCs cultivadas por 24 h en ausencia de bacterias. Los niveles de expresión génica obtenidos por qRT-

Tabla 1. Vías biológicas alteradas identificadas en los granulomas *in vitro*

Identificación de la vía Biológica	Genes alterados*	Gen (fold change)
Interacción Hospedador-patógeno	11	TLR-2(2.7), TLR-6(-2.7), CD14 molecule A157(4.0), CD86(3.8), MYD88(3.4),STAT4(3.6),STAT1(16.7), STAT6(2.9), IL1R-associated kinase1(7.5), IL8(11.7), IL6(8.8)
Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC I/II)	10	MHC-IB(2.6), MHC-IC(5.3), MHC-IE(2.6), MHC-IF(3.9), MHC-IIDAlpha(3.7), MHC-IIDOalpha(7.6), MHC-IIDPalpa1(6.8), MHC-IIDPbeta1(8.2), MHC-IIDQalpha1(6.9), MHC-IIDRalpha(6.0)
Vía de señalización de la IL1	5	IL1-alpha(4.3), IL1-beta(4.4), IL1R-associated kinase1(7.5), SRPalpa(3.13), calpain small subunit1(5.6)
Vía de señalización TNF- α -NFkB	8	TNF-member2 (3.8), activador de NFkB TRAF-asociado (4,75), TNFRSF1A asociado-a través de dominio de muerte (9,0), TNFAIP3 protein2 interactuar (9.3), Factor5 TNFR-asociado (3.5), factor de TNFR-1 asociada (11.5), protein3 inducida por TNF-(3.5), TNFR-1B (3,0)
Vía de señalización del IFN γ	11	IFN (7,0), CathepsinA (3,0), CathepsinC (3,3), IFNgammaR1 (3,6), estimulada por IFN, TF3 gamma 48kDa (9,3), IFI44L (18,0), IL1beta (4,5), MHC-IB (3,5), NKp46 (3,6), NKTR (6,8), subfamilyB ABC-transporter1 (7,3)
Respuesta inflamatoria y quimiocinas	27	XCL1 (3.7), XCL2 (5.1), CCL2 (8.3), CCL4 (10.0), CCL5 (5.7), CCL7 (5.6), CCL8 (11.1), CCL18 (10.3), CCL19 (2,15), CCL20 (8.9), CD86 (3.8), CXCL1 (2.1), CXCL2 (8.3), CXCL5 (11.6), CXCL10 (7.7), CCR2 (3.8), CXCR4 (7.1), IL12p40 (IL12B) (- 3,3), IL15 (4,7), IL15Ralpha (5,8), IL2Ralpha (4,8), IL2Rgamma (4,6), IL4R (2,9), IL6 (8,8), de linfocitos específica de la proteína tirosina quinasa (2,9), secuencia de reconocimiento de NK-tumor (6,8), la adhesión molecule1 de regulación (7,2)
Apoptosis	26	Apoptosis factor de transcripción antagonizar (4,1), inhibidor de la activación de la caspasa apoptosis (2,7), factor mitocondria-associated2 inductor de apoptosis (2,4), domain1 TAF9-como inductor de apoptosis (2,1), baculoviral IAP repetición-containing2 (2,8), BCL2 (3,0), Componente3 vinculante BCL2 (5,6), X proteína BCL2-asociado (3,2), BCL2-like2 (3,7), BH3 agonista interactuar muerte de dominio (6,9), CASP8 y FADD-como regulador de la apoptosis (10,4), la caspasa-1 (5,0), caspasa-2 (2,2), la caspasa-3 (3,7), la caspasa-4 (4,5), la caspasa-9 (2,9), la cistatina-A (7,7), la cistatina-B (6,6), la cistatina-C (6,1), daño de ADN específico vinculante protein2 48kDa (7,4), el defensa contra muerte1 celda (3,5), el daño de ADN-inducible transcript3 (11,6), Fas (7,1), granulinas (6,9), granzymeA (4,4), granzymeB (9,6), granzymeH (3,2)
Estrés oxidativo	16	Activador de plasminógeno, receptor de uroquinasa (5,2), proteína de unión a ADN TAR (4,3), metalotioneína 1X (46,0), 1H metalotioneína (36,2), 1E metalotioneína (33,0), la metalotioneína 1G (32,5), la metalotioneína 1 M (30,9), 1F metalotioneína (29,8), inhibidor de peptidasa de serina, Kazal tipo 1 (30,8), MMP9 (10,8), la fosfolipasa A2 groupIVB (4,6), SOD1 (3,7), peroxidase1 glutatión (6,1), glutatión peroxidasa 4 (3,6), SOD2 (3,4), TP53 (3,0),

* Total numero de genes alterados

Tabla 2. Validación por PCR cuantitativo en tiempo real de un grupo seleccionado de genes

Gen	Forward/Reverse Primer*	PCR cuantitativo		Micromatrices	
		Fold change	valor p	Fold change	valor p
	5'-----3'				
CCL2	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC CAGATCTCCTTGCCACAAT	6.0	0.0005	+8.34	0.0001
Cistatina B	AGTCATTCAAGGCCAGGTG AGCTCATCATGCTTGGCTTT	96.1	0.0056	+6.58	0.0045
Granzima B	GGGGGACCCAGAGATTAATA GTGGCGTTTCATGTTTCTCT	76.0	0.0011	+9.6	0.0015
Interleuquina 8	GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT CTCTGCACCCAGTTTCTCTT	43.0	0.0001	+11.69	0.0001
Metalotioneina 1H	CTTGCAATGGACCCCAACT CAGCAGCTGCACTTCTCTGA	39.0	0.0386	+36.17	0.0000
Granulicina	CCAGGTCTGGTCTTCTCTCG TGGGCTTATCCACCATCTTC	41.0	0.0001	+6.94	0.0041
CCL4	GCTTCTCGCAACTTTGTGGTAG GGTCATACACGTACTCTGGAC	12.6	0.0001	+10.0	0.0045
CCL5	CCTGCTGCTTTGCTCATTGCG ACACACTTGGCGGTCTTTCGG	15.7	0.0020	+5.7	0.0015
Interleuquina 6	AGACAGCCACTCACCTTCTCAG TTCTGCCAGTGCCTTTGCTG	28.6	0.0001	+8.8	0.0001
CCL20	AAGTTGCTGTGTGCGCAAATCC CCATTCCAGAAAAGCCACAGTTT	17.9	0.0001	+8.9	0.0015

*Los cebadores fueron diseñados con el programa Primerblast y sintetizados por IDT technologies

PCR fueron concordantes con los niveles correspondientes observados con los experimentos con micromatrices.

Discusión

En este estudio se utilizó un modelo previamente descrito en la literatura para el desarrollo del granuloma tuberculoso *in vitro*, con el objetivo de determinar los perfiles de expresión génica asociados con este proceso. Usando este modelo, observamos que los linfocitos presentes en PBMCs humanas se agruparon alrededor de los bacilos infectantes semejando microagregados tipo granuloma (Fig. 1). Los microgranulomas se formaron específicamente en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*, ya que no hubo formación de estas estructuras cuando las PBMCs se cultivaron en presencia de células vivas de *E. coli* o *S. aureus* ni cuando las PBMCs se cultivaron en ausencia de bacterias. El desarrollo y mantenimiento de los granulomas en el pulmón es la principal defensa del hospedador contra la infección por *M. tuberculosis*^{17,18}. Los análisis con micromatrices de estos granulomas formados *in vitro* nos permitió un mejor entendimiento de las interacciones tempranas que tienen lugar entre el hospedador y el patógeno durante la formación del granuloma en respuesta a la infección por *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177). El reconocimiento inicial del *M. tuberculosis* por la respuesta inmune innata involucra la señalización a través de los TLR2, el cual está influenciado por varios receptores accesorios, principalmente CD14^{17,18}. Los lipomananos de las especies de micobacterias son agonistas de TLR2, los que luego de la unión del ligando inducen la activación de macrófagos, que se caracteriza por la expresión en la superficie celular de CD40 y CD86, producción de citoquinas y quimiocinas, presentación antigénica, entre otras características de la respuesta inmunes innata¹⁹. La activación de macrófagos está mediada a través de la proteína adaptadora MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88), pero de forma independiente del reconocimiento por

TLR4 o TLR6^{20, 21}. De manera consistente con esta información, en el presente estudio encontramos la sobreexpresión de TLR2, CD14, CD86 y MyD88, lo cual apoya la importancia de la vía de señalización TLR2 en la respuesta inmune innata a *M. tuberculosis* H37Ra. Las interacciones entre *M. tuberculosis* y las células de la respuesta inmune innata lleva a la secreción de quimiocinas y citoquinas, de las cuales el IFN γ y el factor de necrosis tumoral (TNF) son particularmente importantes en la TB. Un efecto importante del IFN γ es el de activar macrófagos y aumentar en los mismos la expresión de moléculas MHC clase II, conducentes a un aumento en la presentación de antígenos a células T, lo que constituye un evento crucial para la contención de la infección por la micobacteria²². En este trabajo encontramos que la infección por H37Ra resultó en un aumento en la expresión de moléculas MHC-I y MHC-II involucradas en la presentación antigénica de células presentadoras de antígenos (APC), un proceso esencial para contener la infección por *M. tuberculosis*.

El efecto más prominente observado en este estudio fue la inducción de muchos genes codificantes de quimiocinas y citoquinas. Se conoce que varias citoquinas juegan un papel importante en la inmunidad contra el bacilo de la tuberculosis. Se ha descrito previamente la expresión aumentada de transcritos para IFN γ TNF α , IL-6, IL-8 e IL-12 en el granuloma tuberculoso²³ y la secreción de citoquinas IL-1 β , TNF α e IL-6 en el lavado broncoalveolar en la tuberculosis pulmonar²⁴. El análisis transcriptómico de las lesiones granulomatosas tempranas en los pulmones de primates no-humanos con tuberculosis activa, reveló la presencia de un microambiente altamente inflamatorio, con niveles de expresión elevados de componentes de las vías de señalización inmunes, tales como IFN γ , TNF α , JAK, STAT y quimiocinas CC/CXC²⁵. En nuestro estudio en el que se utilizó un modelo *in vitro* del granuloma, a las 24 h posteriores a la infección con *M. tuberculosis* H37Ra, observamos una inducción significativa de un número de vías de señalización proinflamatorias dependientes de quimiocinas, IFN γ y TNF.

Ha sido ampliamente demostrado que las quimiocinas participan activamente en la respuesta inmune protectora contra la infección por *M. tuberculosis*²⁶, siendo muchas de ellas quimioatrayentes para leucocitos hacia los sitios de infección. Nuestro análisis de expresión global con microarreglos reveló diferencias significativas en la expresión de quimiocinas CXCL- y CCL- tales como CXCL1 (Gro- α), CXCL2 (Gro- β), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8) y CXCL10 (IP-10). Entre ellas, los transcritos para CXCL5 fueron los más altamente sobreexpresados. Esta quimiocina, junto con IL-8, es inducida en respuesta a citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 o TNF α , las cuales son potentes activadores de neutrófilos²⁷. Estudios previos han mostrado que CXCL5 conlleva a un aumento en el número de neutrófilos infiltrantes en carcinoma broncoalveolar y en la infección por *Rhinovirus*²⁸; sin embargo, su función en la tuberculosis no está esclarecida²⁹.

Este estudio nos permitió identificar niveles aumentados de transcritos para CCL19 y CCL20. Estas dos quimiocinas participan en el reclutamiento y activación de linfocitos a los sitios de inflamación. La inducción de numerosas quimiocinas en el granuloma *in vitro* temprano es un hallazgo esperado, ya que se conoce que los gradientes de quimiocinas guían diferentes células inmunes efectoras a los sitios de infección. Se ha demostrado que las quimiocinas están asociadas estrechamente con las infecciones por micobacterias, requiriéndose niveles apropiados de ellas para

prevenir la migración celular fuera del granuloma, contribuyendo así al mantenimiento de la estructura del granuloma³⁰.

La función ejercida por las vías de señalización inmunes proinflamatorias que implican al IFN γ y al TNF α en la protección contra la infección por *M. tuberculosis* está bien comprendida³¹. Entre los genes sobreexpresados encontrados en este trabajo están la IL15 e IL15R. Varios estudios han suministrado evidencia de que la vía activada por esta citoquina puede aumentar la respuesta inmune protectora contra la infección por *M. tuberculosis*³². Otra quimiocina altamente sobreexpresada encontrada en los granulomas *in vitro* de este estudio fue CXCL8 (IL8). Esta quimiocina ha sido implicada previamente en la formación del granuloma tuberculoso y en la inmunidad a *M. tuberculosis*³³.

El presente trabajo permitió identificar la expresión alterada de varios genes relacionados con apoptosis, incluyendo caspasas, granzimas, granzimas y catepsinas. Se ha reportado que la infección por *M. tuberculosis* causa apoptosis de neutrófilos³⁴ y monocitos/macrófagos^{34,35}. Los macrófagos son las células hospedadoras primarias para *M. tuberculosis* y como consecuencia hay extensa muerte celular en esta población celular. Específicamente se ha demostrado que cepas atenuadas o avirulentas de micobacterias, tales como BCG y H37Ra, principalmente inducen apoptosis de macrófagos, mientras que las cepas virulentas principalmente inducen necrosis. Estas observaciones han generado interés en el campo del desarrollo de vacunas contra la TB ya que cepas de micobacteria con actividad pro-apoptótica capaces de inducir una mayor apoptosis de los macrófagos estimularían una mejor respuesta cuantitativa de células T³⁶. La catepsina C, la cual se encontró sobreexpresada en este estudio, participa en la activación de granzimas y en el proceso de muerte celular mediado por células T citolíticas^{37,38}, mientras que la catepsina W se asocia con células NK. Por lo tanto estas moléculas juegan un papel esencial en la citotoxicidad³⁹. La expresión aumentada de todos estos genes pro-apoptóticos puede reflejar el intento del sistema inmune innato de limitar la infección al restringir el crecimiento del *M. tuberculosis*, y revela el rol que cumplen las diferentes caspasas, granzimas, y catepsinas en este proceso.

Además se encontró la inducción de metalotioneínas y metaloproteasas en los granulomas tempranos analizados en este estudio. Las metalotioneínas son proteínas ricas en cisteína, de unión a metales, de bajo peso molecular, (6 a 8 KDa), las cuales son inducidas por diferentes estímulos, incluyendo el estrés oxidativo generado durante el estallido respiratorio de los fagocitos⁴⁰. La metalotioneína 1H ha sido implicada en la inducción de quimiocinas *in vitro*⁴¹. En cuanto a las metaloproteasas, detectamos un aumento significativo en los niveles de transcritos de MMP9 y de varias cistatinas. MMP9 es estabilizada y protegida por miembros de la superfamilia de las cistatinas sin que se afecte su actividad⁴². Estudios recientes han mostrado la importancia de MMP9 en la interacción con proteínas secretadas por *M. tuberculosis* y en la inducción de la formación de las lesiones granulomatosas⁴³. Se ha reportado que el lipomano de las micobacterias induce la expresión de MMP9 en macrófagos humanos a través de un mecanismo dependiente de TLR2 y CD14⁴⁴. La importancia de las células Th1 en el control de la tuberculosis está ampliamente aceptado⁴⁵ y nuestro estudio claramente muestra que *M. tuberculosis* H37Ra induce una fuerte respuesta Th1, reflejada en el aumento en la expresión de citoquinas Th1 tales como IFN γ , TNF α , IL-6 e IL-1, las cuales median la exitosa resistencia contra la

infección por *M. tuberculosis*^{45,46}. Nuestros resultados soportan esta información, ya que observamos que muchos genes inducibles y regulados por IFN γ , tales como IFI-16, IFI-30, IFI-44, IRF-3, IRF-7 y IRF-1 estuvieron aumentados en los granulomas.

Finalmente, en este estudio identificamos la expresión alterada de un número de quimiocinas que no habían sido previamente implicadas en la respuesta inmune a *M. tuberculosis*, tales como CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), XCL1 (linfotactina) y XCL2. La función potencial ejercida por estas quimiocinas en el establecimiento del granuloma tuberculoso requiere de investigación adicional. Todos los cambios descritos aquí tuvieron lugar a las 24 h posteriores a la infección de PBMCs por la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra, lo que condujo a la formación temprana del granuloma. Por lo tanto, este modelo *in vitro* del granuloma en el que participan PBMCs humanas es adecuado para el estudio de los cambios muy tempranos que ocurren en la expresión génica durante la inducción de la formación del granuloma en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*. El modelo puede ser usado para determinar cambios asociados a diferentes tipos de cepas de *M. tuberculosis*, incluyendo aislamientos clínicos. Este modelo pudiera ser de utilidad en el diseño de vacunas, para decidir cuáles cepas serían mejores candidatos, tomando como base los perfiles específicos de expresión génica que ellas sean capaces de inducir.

Conflicto de interés:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Financiación:

Universidad de Cartagena, Investigación Intramural Grant.

Agradecimientos:

Este estudio fue apoyado por una beca de investigación intramural otorgado por la Universidad de Cartagena al Investigador Principal Niradiz Reyes, PhD. Estamos agradecidos al Instituto Nacional de Salud de Colombia por la amabilidad de ofrecer la cepa H37Ra utilizada en el estudio.

Referencias

1. WHO . Global Tuberculosis. Geneva, Switzerland: 2012.
2. Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol. 1998 ;6(3): 107–12.
3. Glickman MS, Jacobs WR Jr. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell. 2001; 104(4): 477–85.
4. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. Nat Rev Immunol. 2012; 12(5): 352–66.
5. Zhu G, Xiao H, Mohan VP, Tsen F, Salgame P, and Chan J. Gene expression in the tuberculous granuloma: analysis by laser capture microdissection and real-time PCR. Cell Microbiol. 2003; 5(7): 445–53.
6. Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. Cell. 2009;136(1):37–49.
7. Guirado E, Schlesinger LS. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma - the critical battlefield in host immunity and disease. Front Immunol. 2013; 4: 98.
8. Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW. Animal models of granulomatous inflammation. Semin Respir Infect. 1998; 13(3): 221–8.
9. Davis JMC, H Lewis, J. L. Ghorri, N. Herbomel, P. Ramakrishnan, L. Real-time visualization of *Mycobacterium*-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. Immunity. 2002; 17(6): 693–702.

10. Kapoor N, Pawar S, Sirakova TD, Deb C, Warren WL, Kolattukudy PE. Human granuloma *in vitro* model, for TB dormancy and resuscitation. *PLoS One*. 2013;8(1): e53657.
11. Puissegur MP, Botanch C, Duteyrat JL, Delsol G, Caratero C, Altare F. An *in vitro* dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cell Microbiol*. 2004; 6(5): 423–33.
12. Birkness KA, Guarner J, Sable SB, Tripp RA, Kellar KL, Bartlett J, et al. An *in vitro* model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85(2): 160–8.
13. Rivero-Lezcano OM. *In vitro* infection of human cells with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2012; 93(2): 123–9.
14. Li C, Hung Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol*. 2001; 2(8): RESEARCH0032.
15. Dahlquist KD, Salomonis N, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nat Genet*. 2002; 31(1): 19–20.
16. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*. 2001; 25(4): 443–51.
17. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(8): 569–77.
18. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(1): 39–47.
19. Drage MG, Pecora ND, Hise AG, Febbraio M, Silverstein RL, Golenbock DT, et al. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol*. 2009; 258(1): 29–37.
20. Vignal C, Guerardel Y, Kremer L, Masson M, Legrand D, Mazurier J, et al. Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF- α and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003; 171(4): 2014–23.
21. Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, Kremer L, Guerardel Y, Nigou J, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol*. 2004; 172(7): 4425–34.
22. Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(4): 296–307.
23. Bergeron A, Bonay M, Kambouchner M, Lecossier D, Riquet M, Soler P, et al. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations with histopathologic features of the granulomatous response. *J Immunol*. 1997; 159(6): 3034–43.
24. Law K, Weiden M, Harkin T, Tchou-Wong K, Chi C, Rom WN. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153(2): 799–804.
25. Mehra S, Pahar B, Dutta NK, Conerly CN, Philippi-Falkenstein K, Alvarez X, et al. Transcriptional reprogramming in nonhuman primate (*Rhesus macaque*) tuberculosis granulomas. *PLoS One*. 2010; 5(8): e12266.
26. Jo EK, Park JK, Dockrell HM. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; 16(3): 205–10.
27. Sachse F, Ahlers F, Stoll W, Rudack C. Neutrophil chemokines in epithelial inflammatory processes of human tonsils. *Clin Exp Immunol*. 2005; 140(2): 293–300.
28. Donniger H, Glashoff R, Haitchi HM, Syce JA, Ghildyal R, van Rensburg E, et al. Rhinovirus induction of the CXCL chemokine epithelial-neutrophil activating peptide-78 in bronchial epithelium. *J Infect Dis*. 2003; 187(11): 1809–17.
29. Jang S, Uzelac A, Salgame P. Distinct chemokine and cytokine gene expression pattern of murine dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Leukoc Biol*. 2008; 84(5): 1264–70.
30. Algood HM, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2005; 41(3): S189–93.
31. Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61(2): 54–8.
32. Lazarevic V, Yankura DJ, DiVito SJ, Flynn JL. Induction of *Mycobacterium tuberculosis*-specific primary and secondary T-cell responses in interleukin-15-deficient mice. *Infect Immun*. 2005; 73(5): 2910–22.
33. O’Kane CM, Boyle JJ, Horncastle DE, Elkington PT, Friedland JS. Monocyte-dependent fibroblast CXCL8 secretion occurs in tuberculosis and limits survival of mycobacteria within macrophages. *J Immunol*. 2007; 178(6): 3767–76.
34. Perskvist N, Long M, Stendahl O, Zheng L. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol*. 2002; 168(12): 6358–65.
35. Placido R, Mancino G, Amendola A, Mariani F, Vendetti S, Piacentini M, et al. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Pathol*. 1997; 181(1): 31–8.
36. Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan HX, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol*. 2011; 4(3): 279–87.
37. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev*. 2010; 235(1): 93–104.
38. Getachew Y, Stout-Delgado H, Miller BC, Thiele DL. Granzyme C supports efficient CTL-mediated killing late in primary alloimmune responses. *J Immunol*. 2008; 181(11): 7810–7.
39. Stoeckle C, Gouttefangeas C, Hammer M, Weber E, Melms A, Tolosa E. Cathepsin W expressed exclusively in CD8+ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs. *Exp Hematol*. 2009; 37(2): 266–75.
40. Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlagner T, et al. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(3): 6044–66.
41. Aydemir TB, Blanchard RK, Cousins RJ. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(6): 1699–704.
42. Ochieng J, Chaudhuri G. Cystatin superfamily. *J Health Care Poor Underserved*. 2010; 21(Suppl 1): 51–70.
43. Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, Davis JM, Rawls JF, Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*. 2010; 327(5964): 466–9.
44. Elass E, Aubry L, Masson M, Denys A, Guérardel Y, Maes E, et al. Mycobacterial lipomannan induces matrix metalloproteinase-9 expression in human macrophagic cells through a Toll-like receptor 1 (TLR1)/TLR2- and CD14-dependent mechanism. *Infect Immun*. 2005; 73(10): 7064–8.
45. Kaufmann SH. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(7): 491–504.
46. Martinez AN, Mehra S, Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Dis*. 2013; 207(8): 1253–61.