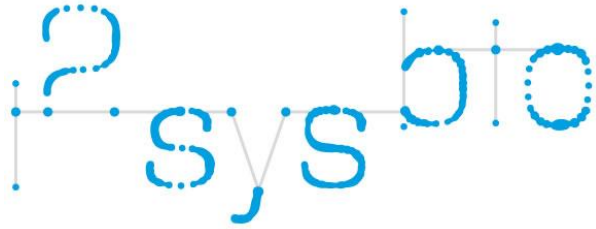




UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



GALLERIA MELLONELLA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA TUBERCULOSIS

Marta Caballer Gual

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor Académico: Dr. Javier Capilla Luque (javier.capilla@urv.cat)
Departamento de ciencias Médicas Básicas

En cooperación con: Instituto de Biología Integrativa de Sistemas
(I2SYSBIO) Consejo Superior de Investigaciones
Científicas – Universitat de Valencia

Supervisora: Dra. Mireia Coscollá Devís (mireia.coscolla@uv.es)

Tarragona, Julio 2020

Jo, Marta Caballer Gual amb DNI 20959634X, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 21 de Juny de 2020

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal line and a small vertical stroke.

Índice

Datos del centro	4
Abreviaturas.....	5
1. Resumen	6
2. Introducción	7
2.1. Tuberculosis	7
2.2. Respuesta inmune a la infección por <i>M. tuberculosis</i>	10
2.3. Modelos animales para el estudio de la tuberculosis	12
2.4. Modelos alternativos para el estudio de la tuberculosis.....	14
2.5. <i>Galleria mellonella</i>	15
2.5.1. Características de <i>G. mellonella</i>	15
2.5.2. Sistema inmunitario de <i>G. mellonella</i>	17
3. Objetivos	20
4. Materiales y métodos.....	20
4.1. Búsqueda bibliográfica	20
4.2. Condiciones de cultivo de <i>M. smegmatis</i>	21
4.3. Cría de larvas de <i>G. mellonella</i>	22
4.4. Infección de las larvas de <i>G. mellonella</i>	22
4.5. Análisis de similitud de genes entre <i>H. sapiens</i> y <i>G. mellonella</i>	23
5. Resultados.....	25
5.1. Puesta a punto del modelo experimental	25
5.2. Expresión génica en respuesta a la infección por <i>M. tuberculosis</i>	26
5.3. Análisis de similitud de genes entre <i>H. sapiens</i> y <i>G. mellonella</i>	31
6. Perspectivas de futuro.....	32
7. Discusión	33
8. Conclusión	36
9. Autoevaluación	37
10. Bibliografía	38
11. Anexo	46

Datos del centro

Los resultados presentados en este Trabajo de Final de Grado fueron obtenidos durante la estancia en prácticas en el grupo de investigación Bacterial PathoGenOmics del Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), que es un instituto mixto de investigación de titularidad compartida entre el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universitat de València.

Datos del centro de investigación:

Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio)

Bacterial PathoGenOmics Research Group

C/ Catedrático Jose Beltran, 2

46980 - Paterna, Valencia

Abreviaturas

<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>C. elegans</i>
Calmodulina	CaM
Células <i>Natural Killer</i>	NK
Dosis letal	DL
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i>
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Factor de crecimiento de los hepatocitos	Hgs
Fosfatidil inositol 3 fosfato	PI3P
Fosfatidilinositol-3-kinasa	PI3K
<i>Galleria mellonella</i>	<i>G. mellonella</i>
Lectinas de unión a manosa	MBL
<i>M. bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin	BCG
Metaloproteinasa	MMP
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i>
Ontología génica	GO
Péptidos antimicrobianos	PAM
Profenoloxidasa	PPO
Proteína SH2 inducible por citoquinas	CISH
Quinasa II dependiente de calmodulina	CaMKII
Quinasa N-terminal C-Jun	JNK
Receptor Interacción Serina/Treonina Quinasa 3	RIPK3
Receptores de lectina tipo C	CLR
Receptores de reconocimiento de patrones	PRR
Receptores tipo NOD	NLR
Receptores tipo Toll	TLR
Unidades formadoras de colonias	UFC
Virus de la inmunodeficiencia humana	VIH

1. Resumen

La tuberculosis es la enfermedad infecciosa que más muertes causa a nivel mundial. Actualmente se puede tratar mediante la administración de antibióticos, sin embargo, las formas de tuberculosis resistentes a medicamentos aumentan cada año. A pesar de los esfuerzos, la perspectiva de eliminar la enfermedad sigue siendo distante. Para lograr la erradicación de la tuberculosis se requiere, entre otras cosas, un mayor conocimiento de las interacciones huésped-patógeno, y para ello, se necesitan mejores modelos experimentales. Los modelos animales utilizados hasta el momento han contribuido de forma significativa a mejorar la comprensión de la tuberculosis, y han permitido estudiar y desarrollar nuevos agentes antimicrobianos y vacunas. Sin embargo, todos tienen limitaciones y no existe un modelo animal único que reproduzca todos los aspectos de la patogénesis micobacteriana observada en humanos. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos modelos alternativos. La larva de la polilla de cera, *Galleria mellonella* que se ha utilizado como un modelo de infección simple, económico y eficaz para estudiar algunas enfermedades causadas por patógenos humanos, por lo que se propone como un modelo alternativo para el estudio de la tuberculosis. En este trabajo se demuestra que *G. mellonella* presenta una elevada similitud estructural y funcional con el sistema inmune innato de los humanos. Además, se ha observado que tras la infección con *Mycobacterium smegmatis* la larva muestra una mortalidad dependiente de la dosis. Tales características demuestran que *G. mellonella* es un buen modelo para estudiar la infección por *M. tuberculosis*. En este contexto, se propone la infección de *G. mellonella* con micobacterias para el estudio de la respuesta inmune a la infección mediante el análisis de la expresión génica.

Palabras clave: *Galleria mellonella*, *Mycobacterium tuberculosis*, modelo de infección, respuesta inmune innata, tuberculosis.

2. Introducción

2.1. Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, un bacilo Gram-positivo, ácido-alcohol resistente, que afecta principalmente a los pulmones. La tuberculosis es la enfermedad con mayor mortalidad causada por un solo agente infeccioso y una de las 10 causas principales de muerte a nivel mundial (1). Existen otras especies del género *Mycobacterium* como *M. bovis*, *M. africanum* o *M. microti* que pueden causar tuberculosis, pero es infrecuente en el individuo sano. La tuberculosis supone una importante amenaza para la salud pública a nivel mundial. Se estima que alrededor de 10 millones de personas contrajeron esta enfermedad en 2018 y 1,5 millones de personas murieron por tuberculosis este mismo año (1). La mayor parte del número estimado de casos en 2018 ocurrió en la Región de Asia Sudoriental (44%), Región de África (24%) y en la Región del Pacífico Occidental (18%). Los siguientes países representaron dos tercios del total de casos estimados en todo el mundo: La India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (6%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%) (**Figura 1**)(2).

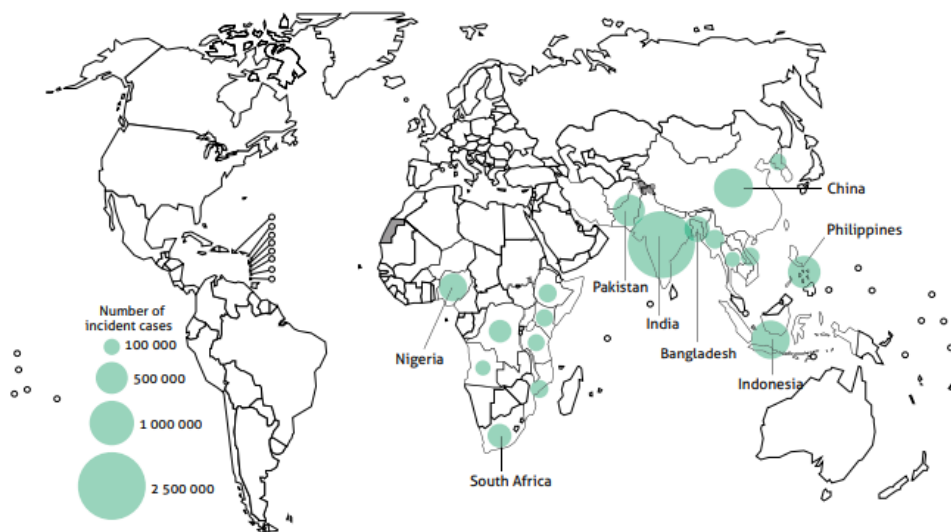


Figura 1. Incidencia estimada de la tuberculosis en 2018, para países con al menos 100 000 casos incidentes. Disponible en World Health Organization. Global tuberculosis report (2019).

Los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud indican que una cuarta parte de la población mundial tiene tuberculosis latente, es decir, se han infectado por el bacilo pero no presentan sintomatología ni pueden transmitir la infección (1). Desafortunadamente, el estado latente de *M. tuberculosis* es reversible, y la reactivación de la tuberculosis es la principal fuente de transmisión entre individuos (3). Entre un 5 y un 15% de

las personas que presentan infección tuberculosa latente desarrollan la enfermedad a lo largo de su vida (1). Sin embargo, este riesgo se incrementa en personas que presentan trastornos del sistema inmunitario, principalmente, aquellas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (3). Además, la presencia de trastornos del sistema inmunitario incrementa la gravedad de la enfermedad. Los síntomas más comunes de la tuberculosis pulmonar activa son: tos, fiebre, dolores torácicos, pérdida de peso, debilidad y sudores nocturnos (1). Estos síntomas pueden ser leves durante muchos meses, por lo que la persona afectada puede tardar en buscar atención médica, incrementando el riesgo de transmitir la enfermedad (1).

La tuberculosis se puede tratar farmacológicamente mediante la combinación simultánea de cuatro medicamentos antimicrobianos, isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, que se administran durante 6 meses (1,4). Sin embargo, este tratamiento suele estar asociado a efectos secundarios y a toxicidades complejas (5). Además, se ha demostrado la existencia de cepas del bacilo que presentan resistencia a, al menos, uno de los antibióticos utilizados. La tuberculosis multirresistente está causada por una cepa que no responde al tratamiento con isoniazida y rifampicina, los dos medicamentos antituberculosos de primera línea más eficaces, por lo que supone una amenaza a la seguridad sanitaria. Las formas de tuberculosis resistentes a los medicamentos son cada vez más comunes y están en camino de convertirse en los patógenos más mortales del mundo, siendo responsables de una cuarta parte de las muertes debido a la resistencia a los antimicrobianos (1,6). La creciente resistencia a antibióticos que la bacteria está desarrollando dificulta el control de la tuberculosis a nivel mundial (7). Por consiguiente, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas seguras y eficaces es cada vez más necesario. Sin embargo, en la actualidad todavía no se comprende de forma completa la patogénesis de la tuberculosis, lo que dificulta considerablemente el desarrollo de nuevos tratamientos (5).

Durante décadas se han utilizado modelos animales con el objetivo de comprender la patogénesis y la respuesta del huésped a la infección, así como para estudiar y desarrollar nuevos agentes antimicrobianos y vacunas (8). Sin embargo, la patogénesis y la progresión de la infección por *M. tuberculosis* son complejas y los modelos animales no son capaces de reproducir todos los aspectos de la infección en humanos, lo que dificulta el estudio de la enfermedad (9,10). Adicionalmente, los modelos utilizados para el estudio de la tuberculosis presentan limitaciones éticas, prácticas y de coste (revisado en (5)).

El uso de estos modelos animales ha contribuido a proporcionar una comprensión de la patogénesis básica, sin embargo, para lograr un conocimiento más completo de la enfermedad, es necesario el desarrollo de nuevos modelos de infección que superen las limitaciones de los que se utilizan actualmente (8).

El uso de insectos como modelo de infección proporciona una alternativa interesante, ya que presentan ventajas respecto a los modelos de mamífero, entre las que cabe destacar su bajo coste y la ausencia de limitaciones éticas. Además, su sistema inmunitario presenta grandes similitudes con el sistema inmune innato humano, lo que les convierte en un modelo ideal para el estudio de la respuesta innata frente al bacilo y los mecanismos de resistencia y escape de este (11).

En los últimos años la larva del insecto de la polilla de la cera, *Galleria mellonella*, se ha convertido en un modelo popular para el estudio de diversas enfermedades causadas por una gran variedad de patógenos bacterianos y fúngicos, debido a las ventajas que presenta respecto a los modelos de infección tradicionales (12). Sin embargo, por el momento son escasos los estudios que describen el uso de *G. mellonella* como modelo de infección para el estudio de micobacterias (13–15). Dada la urgente necesidad de encontrar nuevos modelos de infección *in vivo* para el estudio de la tuberculosis, en este trabajo se propone la larva de *G. mellonella* como un modelo invertebrado sencillo que parece ser prometedor como modelo de estudio alternativo para la tuberculosis.

Con el objetivo de poner a punto *G. mellonella* como modelo experimental para el estudio de la infección por *M. tuberculosis*, se han infectado las larvas de *G. mellonella* con *Mycobacterium smegmatis*. En este estudio se ha utilizado la cepa de *M. smegmatis* debido a que el uso de *M. tuberculosis* como organismo experimental conlleva dificultades prácticas y de seguridad (14). El uso de *M. smegmatis* como sustituto de *M. tuberculosis* está bien establecido (16). *M. smegmatis* es un modelo simple, que presenta un tiempo de replicación rápido, entre tres y cuatro horas y generalmente se considera no patógena, por lo que únicamente requiere un nivel de bioseguridad 1 (16,17). Estas características lo convierten en un modelo adecuado para la investigación de otras especies de micobacterias (16,18). Además, *M. smegmatis* es un modelo particularmente conveniente debido a su facilidad de manipulación genética (17), por lo que permitirá utilizar diversas cepas de micobacterias mutantes en los estudios(14).

Cabe destacar que en estudios recientes se ha utilizado la larva de *G. mellonella* para estudiar las infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas como *M. marinum* (13) y *M. abscessus* (15), así como para miembros del complejo de *M. tuberculosis* como *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (14), sin embargo, en este trabajo se pretende caracterizar en mayor profundidad la respuesta inmune de la larva en respuesta a la infección por micobacterias, estudiando los cambios de expresión génica en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*.

2.2. Respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*

La infección por *M. tuberculosis* es compleja y cuando tiene lugar, la interacción entre el huésped y la micobacteria puede tener diferentes consecuencias. La respuesta inmune innata del huésped puede eliminar completamente al patógeno, sin embargo, en ocasiones la bacteria es capaz de sobrevivir dando lugar a una infección latente o a la enfermedad tuberculosa (19,20).

El desarrollo de la tuberculosis comienza con la adquisición del patógeno por vía respiratoria. Cuando se inhala, el bacilo se encuentra con la primera línea de defensa que consiste en células epiteliales de las vías respiratorias y células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos alveolares y células dendríticas (20,21). El primer mecanismo inmune que tiene lugar está mediado, en gran medida, por moléculas de la inmunidad innata. Están involucrados varios receptores que reconocen productos micobacterianos como lipoproteínas, lipomananos y ADN. La principal consecuencia del reconocimiento de moléculas micobacterianas es la expresión de citocinas proinflamatorias, pero también moléculas de adhesión celular y quimiocinas que movilizan y activan macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (22). Es posible que esta primera línea de defensa elimine a la bacteria, y por tanto, termine con la infección (23). Por el contrario, si la bacteria no es eliminada, se introduce en los fagocitos y se reproduce en su interior (23). Los macrófagos se convierten en un nicho para la replicación de la bacteria y permiten la persistencia de la infección en una fase latente. Adicionalmente *M. tuberculosis* es capaz de expresar diversos factores de virulencia con el objetivo de contrarrestar los esfuerzos de macrófagos para eliminar el patógeno (20).

Los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células *Natural Killer* (NK), mastocitos y el sistema del complemento son los principales elementos que participan en la inmunidad innata en respuesta a la infección (24,25).

Los macrófagos alveolares pueden eliminar al patógeno mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) con actividad microbicida y la generación de un entorno

proinflamatorio en el lugar de la infección (24). Las células dendríticas también juegan un papel importante en el sistema de defensa inmune, debido a la presentación de antígenos y la producción de citocinas capaces de estimular la diferenciación de los linfocitos CD4 e iniciar respuestas adaptativas (26). Los macrófagos alveolares y las células dendríticas que contienen bacilos en su interior estimulan la producción de mediadores inmunes como IL-1 y TNF- α que activan a los macrófagos para inducir la muerte bacteriana temprana o IL-12 e IL-18 que activan los NK e inducen la secreción de IFN- γ (27). Las células NK estimulan la fusión fagolisosómica e inhiben la replicación de la bacteria (28). Los neutrófilos juegan un papel defensivo como fagocitos, pero también secretando proteínas antibacterianas (29). La función de los mastocitos en la respuesta inmune frente a la infección por *M. tuberculosis* en humanos no se conoce del todo, sin embargo estas células contienen una gran cantidad de mediadores de la inflamación que se sabe que participan en el proceso (30). El sistema del complemento funciona como un importante sistema de defensa y se ha demostrado que los componentes C5 y C7 de la cascada del complemento juegan un papel defensivo en respuesta a la infección (31). Además, los receptores del complemento participan en la fagocitosis de la micobacteria opsonizada (32). Sin embargo, no se conoce bien el papel de otros componentes de la cascada del complemento en la progresión de la infección (31).

M. tuberculosis puede ser eliminada por el sistema inmune innato antes del inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa. Sin embargo, la micobacteria ha desarrollado estrategias que la capacitan para inhibir los mecanismos de inmunidad innata descritos. Si la bacteria sobrevive, se replicará y diseminará. En este caso, la respuesta inmune adaptativa del huésped se vuelve crítica para el control de la enfermedad (20).

Tras el desarrollo de la inmunidad adaptativa, se establece un mecanismo complejo y coordinado entre la inmunidad innata y adaptativa que encierra a la micobacteria en el interior de granulomas (revisado en (19)). El granuloma es una estructura histopatológica característica de la tuberculosis que limita la proliferación y diseminación de las micobacterias (28,33). Es una estructura formada por un cúmulo de células inmunitarias bien organizadas (34), que contienen macrófagos infectados por *M. tuberculosis* en el centro, rodeados por diferentes tipos de células inmunes (34). Las células T, células B, neutrófilos, fibroblastos, macrófagos infectados y no infectados, células epiteliales derivadas de los macrófagos, macrófagos espumosos y células de Langehans gigantes multinucleadas forman estos granulomas (23). Los granulomas de tuberculosis pueden variar en su composición celular, así como en la carga bacteriana que contienen, el entorno inflamatorio y niveles de oxigenación (28).

La encapsulación de la bacteria en el interior de los granulomas conduce al desarrollo de infección tuberculosa latente (33), de modo que los macrófagos reclutan células inmunes para formar granulomas, aislando la bacteria y evitando su propagación (35). *M. tuberculosis* latente reside en los granulomas humanos, concretamente en los macrófagos espumosos ricos en lípidos, que actúan como una fuente de carbono y energía para el patógeno (36,37). En ocasiones, los granulomas pueden sufrir necrosis, destruyendo el tejido y liberando la bacteria, de forma que se desarrollaría la enfermedad activa (35).

Tradicionalmente se ha considerado que el granuloma juega un papel protector para el huésped, sin embargo, los granulomas favorecen la persistencia y difusión de las micobacterias más que su eliminación (19,23). Esta incertidumbre depende de varios factores como la extrema heterogeneidad detectada en la morfología del granuloma en diferentes etapas de la enfermedad (38).

Es esencial conocer los mecanismos de inmunidad innata que tienen lugar cuando ocurre la infección por *M. tuberculosis*, ya que esta es capaz de decidir el resultado de la infección. La respuesta inmune innata es crítica para las respuestas antimicobacterianas tempranas, también es importante para la progresión de la infección y el control a largo plazo de *M. tuberculosis* al iniciar continuamente las respuestas inmunes adaptativas y al regular la inflamación (20,32). La mayoría de mecanismos innatos involucrados en la infección por *M. tuberculosis* que se conocen actualmente se han estudiado en células murinas. Sin embargo, debido a la existencia de diferencias clave en la respuesta del huésped entre humanos y otros modelos animales, es esencial confirmar la relevancia de estos hallazgos en modelos que presenten una mayor similitud. Una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la inmunidad innata en humanos permitirá desarrollar mejores tratamientos para la tuberculosis (20).

2.3. Modelos animales para el estudio de la tuberculosis

Actualmente se utilizan diversos modelos animales para el estudio de la tuberculosis. Entre estos cabe destacar el uso de ratones, cobayas, pez cebra o primates no humanos (revisado en (39)). Hasta el momento, la contribución de diferentes modelos animales preclínicos en la investigación de la tuberculosis ha sido significativa para mejorar la comprensión sobre la enfermedad (39). Sin embargo, todos presentan limitaciones y no existe un modelo animal único que reproduzca todos los aspectos de la patogénesis micobacteriana observada en

humanos (14). A continuación, se describe de forma general las ventajas e inconvenientes de los modelos animales que más se utilizan actualmente.

Los primates no humanos, principalmente los macacos, se utilizan para el estudio de tuberculosis, debido a que son modelos animales que presentan una elevada similitud genética, fisiológica e inmunológica con los seres humanos. Además, la presentación clínica y la patología en estos animales puede ser notablemente similar a la de la tuberculosis humana (40). Sin embargo, los estudios en primates no humanos son caros y difíciles (41). Las consideraciones éticas, prácticas y su elevado coste limitan su uso (42).

Un modelo preclínico alternativo que permite superar algunas de las limitaciones que presentan los primates no humanos son las cobayas. Las cobayas son un modelo relativamente económico y similar a los humanos en términos de patología pulmonar después de la infección por *M. tuberculosis*. Sin embargo, también presentan limitaciones como modelo de estudio, ya que no reproducen algunas características de la tuberculosis humana, su mantenimiento es complicado y tienen un precio más elevado que otros modelos como el ratón o el pez cebra (39,43).

El pez cebra es cada vez más utilizado como alternativa a los modelos animales convencionales para el estudio de la patogénesis de la tuberculosis (39). El sistema inmune del pez cebra tiene componentes similares a los de los humanos. En este modelo se pueden observar las diferentes fases de la enfermedad, incluida la latencia y la reactivación (44). Sin embargo, las diferencias fisiológicas y anatómicas que existen entre el pez cebra y los humanos, la necesidad de instalaciones de alojamiento específicas y la elevada sensibilidad a diferentes enfermedades restringen su uso (39).

El ratón es el modelo animal más utilizado para el estudio de la tuberculosis por numerosas razones prácticas, como su coste relativamente bajo, facilidad de manipulación y poca necesidad de espacio (45). Los ratones presentan algunas respuestas inmunológicas similares a las del ser humano, sin embargo, presentan diferencias en la patología de la tuberculosis que obstaculizan su uso para el estudio de la enfermedad (46). La ausencia de características patológicas después de la infección por *M. tuberculosis*, así como la formación de granulomas y las regiones de hipoxia características de la infección tuberculosa latente en humanos no se observan en los pulmones de los ratones, lo que supone una limitación del modelaje de la infección humana (46,47).

Pese a la amplia variedad de modelos animales disponibles para el estudio de la infección por *M. tuberculosis*, hasta el momento no ha sido posible alcanzar un conocimiento completo de los mecanismos de inmunidad que tienen lugar en el huésped humano en respuesta a *M. tuberculosis* (24,39). El estudio de la infección se ha visto obstaculizado, en parte, por los inconvenientes que presentan los actuales modelos experimentales *in vivo* (13). Para superar estas limitaciones es necesaria la existencia de nuevos modelos de estudio, bien caracterizados, de bajo coste y alto rendimiento, que imiten las características principales de la patogénesis de *M. tuberculosis*, con el objetivo de comprender mejor las interacciones entre el huésped y el patógeno, así como para evaluar la eficacia de nuevos fármacos o vacunas (14).

2.4. Modelos alternativos para el estudio de la tuberculosis

El uso de algunos invertebrados como modelo de infección proporciona una alternativa valiosa ya que presentan ventajas respecto a los modelos animales comúnmente utilizados para el estudio de la tuberculosis. Entre estas ventajas cabe destacar su menor coste, que cuentan con una amplia disponibilidad y que su uso es éticamente más aceptable que la utilización de mamíferos (48,49). Adicionalmente, presentan tiempos de reproducción más cortos, permitiendo obtener resultados en un breve periodo de tiempo. Esto supone una ventaja respecto al uso de mamíferos, cuyos tiempos de reproducción son más largos y frenan el progreso de la investigación. Además, a pesar de que los insectos carecen de sistema inmunitario adaptativo, poseen un sistema inmunológico innato complejo y similar al sistema inmune innato de los mamíferos, proporcionando un modelo simple para comprender mejor la inmunidad innata (11,50). Por tanto, los ensayos que utilizan insectos como huésped de infección generalmente son económicos, más sencillos de realizar y permiten obtener resultados en un corto periodo de tiempo. Estas ventajas hacen que los insectos se conciben como huéspedes atractivos para el estudio de patógenos humanos (11).

El uso de invertebrados como *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella* y *Caenorhabditis elegans* como modelo de infección es cada vez más frecuente debido a las numerosas ventajas que presentan. *D. melanogaster* y *C. elegans* son organismos modelos ampliamente utilizados para el estudio de patogénesis microbiana (11,51). Sin embargo, estos modelos presentan importantes limitaciones que los hacen poco aptos para el estudio de la tuberculosis. En primer lugar, la temperatura de mantenimiento de dichos huéspedes no puede ser superior a 25 °C (49,52), lo que supone una limitación para estudiar la patogenicidad de los microorganismos ya que los factores de virulencia están regulados por la temperatura (53). Así mismo, ambos organismos presentan un sistema inmunitario con importantes diferencias

respecto al de los humanos (12). Adicionalmente, trabajar con *D. melanogaster* requiere una experiencia considerable y un equipo especializado (54). Dados los inconvenientes que plantea la utilización de estos modelos, el uso de *G. mellonella* como modelo de infección proporciona una alternativa que permite superar estas limitaciones.

El uso de *G. mellonella* como modelo de estudio es más reciente que el uso de los modelos anteriormente mencionados y solo un número limitado de estudios, por el momento, lo han utilizado organismo modelo (55). Sin embargo, debido a las características que presenta, es cada vez más frecuente emplear la larva de la polilla de cera, *G. mellonella*, como modelo alternativo para el estudio de las infecciones bacterianas y fúngicas y para evaluar la eficacia de nuevos fármacos antimicrobianos (50).

2.5. *Galleria mellonella*

2.5.1. Características de *G. mellonella*

En los últimos años, el uso de la larva de *G. mellonella* ha tomado fuerza como modelo alternativo para el estudio de enfermedades infecciosas. Como prueba de ello cabe mencionar que se han publicado más de 1000 artículos en PubMed sobre *G. mellonella* como modelo de infección (50), de los cuales más 300 se han publicado entre 2018 y 2019, lo que demuestra su creciente popularidad en este ámbito. *G. mellonella* se usa cada vez más como modelo para estudiar los factores de virulencia de los patógenos bacterianos y fúngicos, la toxicología y la patogénesis de las enfermedades. Además, ha demostrado ser un buen modelo para estudiar el sistema inmune innato (56).

G. mellonella (polilla de cera o polilla de panal) es un insecto del orden de los lepidópteros y de la familia *Pyralidae*. Las larvas de *G. mellonella* viven en colmenas y se alimentan principalmente de cera de abejas y polen (56). El ciclo de vida de la polilla de cera consta de cuatro etapas definidas, como huevo, larva, pupa y adulto. La duración del ciclo completo es de 6 a 8 semanas a una temperatura entre 29 y 39 °C (57).

Como modelo de estudio se utiliza la larva de la oruga o gusano de cera y no la polilla adulta. La cabeza de las orugas es de color marrón rojizo y el cuerpo de color beige (**Figura 2A**), que se va oscureciendo a medida que envejecen. La larva presenta seis patas en el tórax y pares adicionales de propatas en el extremo terminal del cuerpo (**Figura 2B**) (50). Generalmente, para estudios experimentales se utilizan las larvas de último estadio, que se desarrollan a

partir del huevo en 5 semanas aproximadamente, miden de 2 a 3 cm de largo y presentan el color beige característico de la larva, como se observa en la **figura 2A** (50,56).

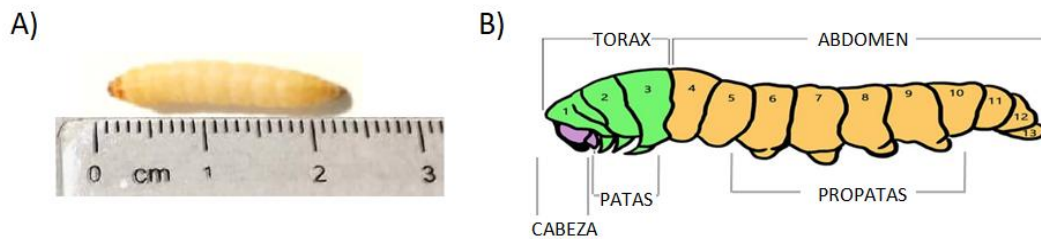


Figura 2. A) Imagen de una larva sana en el último estadio en la que se muestra el color beige característico y un tamaño de 2 a 3 cm. B) Representación gráfica de *G. mellonella* en la que se muestra la anatomía externa de la larva. Figura adaptada, con permiso, de Singkum P; *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* (2019).

Las larvas de *G. mellonella* poseen una serie de características que hacen que estos organismos sean particularmente útiles para el estudio de patógenos. Por un lado, al ser un insecto, presenta diversas ventajas respecto al uso de mamíferos. Su bajo coste de compra y mantenimiento, que puedan obtenerse fácilmente en grandes cantidades, su disponibilidad comercial en todo el mundo, así como su pequeño tamaño, controles éticos reducidos y que no requieren un equipo especializado para su mantenimiento lo hacen un modelo de estudio más accesible (13,56). Además, su ciclo de vida corto, que dura entre 6 y 8 semanas, los hace ideales para estudios a gran escala (58). Adicionalmente, la posibilidad de utilizar un mayor número de réplicas y tamaños de grupos mucho mayores, en comparación con estudios realizados con modelos animales, mejora la reproducibilidad de los estudios (50).

Por otro lado, este modelo de estudio también presenta varias ventajas sobre otros huéspedes invertebrados. En primer lugar, las larvas tienen un tamaño relativamente grande, entre 2 y 3 cm de longitud, que facilita su manipulación, el proceso de infección, así como la recogida de muestras de hemolinfa para su posterior análisis. (12,56). En segundo lugar, las larvas de *G. mellonella* pueden mantenerse a un amplio rango de temperatura, entre 15 y 37 °C, por lo que pueden mantenerse en una incubadora o a temperatura ambiente (56). Se ha demostrado que el almacenamiento de los gusanos a baja temperatura puede prolongar el tiempo de supervivencia sin comer (56). Además, la capacidad de mantenerse adecuadamente a 37 °C, que es una temperatura similar a la temperatura corporal del huésped humano, convierte este modelo en un sistema adecuado para estudiar la virulencia de patógenos humanos (11,55). Esto es significativo para estudiar la virulencia de patógenos humanos sensibles a la temperatura, ya que la síntesis y liberación de algunos factores de virulencia de las bacterias como *M. tuberculosis* están regulados por la temperatura (53,59). En tercer lugar, este modelo permite que los experimentos de infección se realicen de manera precisa y controlada. La vía

de infección más común es mediante inyección intrahemocélica en la última propata izquierda (49), de este modo, se puede cuantificar el inóculo de infección y administrar de forma precisa a la larva. Esto es relevante porque conocer de forma precisa la dosis de patógeno inoculado contribuye, en parte, a incrementar la reproducibilidad de los resultados de los estudios (11,60). También se han descrito otras vías de infección, como la aplicación tópica y la infección por vía oral (56), sin embargo, estos métodos presentan el inconveniente de que las dosis exactas de infección son difíciles de conocer (50,56). Por último, *G. mellonella* ofrece un modelo simple para comprender mejor los mecanismos de inmunidad innata debido a que posee un sistema inmune con un elevado grado de similitud estructural y funcional con el sistema inmune innato de los mamíferos. La respuesta inmune innata de *G. mellonella* consiste en una respuesta inmune altamente coordinada que tiene componentes celulares y humorales (11).

2.5.2. Sistema inmunitario de *G. mellonella*

En el establecimiento y progreso de la enfermedad tuberculosa, la respuesta inmunitaria del paciente frente al patógeno es decisiva. Es deseable, por lo tanto, que un modelo animal reproduzca fielmente la respuesta inmunitaria contra *M. tuberculosis*, o parte de ella. A pesar de que la respuesta inmunitaria adaptativa es exclusiva de vertebrados, la respuesta inmune innata parece estar bien conservada entre vertebrados e invertebrados y *G. mellonella* presenta un sistema inmunológico innato con funciones celulares y humorales altamente análogas al de los humanos (61).

La respuesta innata celular de *G. mellonella* está mediada por células fagocíticas denominadas hemocitos, que circulan por la hemolinfa y también se pueden encontrar en el tracto digestivo y el cuerpo graso del insecto (50,62). Los hemocitos son un tipo de célula similar a los macrófagos y neutrófilos humanos (63). En *G. mellonella* se han encontrado 6 tipos de hemocitos diferentes, estos son prohemocitos, plasmaticitos, coagulocitos, esferulocitos, oenocitoides y células granulares o granulocitos (64). Los plasmaticitos y las células granulares son los hemocitos más comunes, que actúan como la primera barrera de células inmunes (65). Estos hemocitos tienen un papel clave en la defensa celular y están involucrados en la fagocitosis, nodulación y encapsulación del patógeno. Estos tres procesos constituyen la respuesta inmune celular de *G. mellonella* (50). Adicionalmente, los hemocitos sintetizan y secretan proteínas humorales, vinculando la respuesta inmune celular y humoral de *G. mellonella* (65). La respuesta humoral está dirigida por moléculas efectoras solubles que inmovilizan y matan al patógeno. Entre estas moléculas que se encuentran en la hemolinfa de

G. mellonella, se incluyen péptidos antimicrobianos (PAM), proteínas similares al complemento, melanina, ROS y especies reactivas de nitrógeno (50,66).

Los hemocitos pueden llevar a cabo los mecanismos inmunitarios de nodulación y encapsulación. Por un lado, la nodulación consiste en la formación de una capa de células alrededor de un grupo de microorganismos, este proceso tiene lugar en presencia de una gran cantidad de microorganismos (67). Por otro lado, la encapsulación consiste en la formación de una capsula formada por plasmotocitos y granulocitos alrededor de patógenos grandes (67). Ambos procesos pueden ocurrir también cuando la fagocitosis no logra eliminar los patógenos (68).

Los hemocitos también llevan a cabo el proceso de fagocitosis. El mecanismo de fagocitosis en insectos involucra a células granulares y plasmotocitos y es muy similar al proceso de fagocitosis en mamíferos (69). En el proceso de fagocitosis en *G. mellonella* tiene lugar la producción de enzimas por los plasmotocitos y granulocitos con la finalidad de destruir al patógeno (62). La fagocitosis de los hemocitos está mediada por proteínas similares al complemento que actúan como opsoninas, reconociendo y uniéndose a componentes conservados de los patógenos (64). Estas proteínas son similares a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en mamíferos (50). Estas moléculas opsonizan los patógenos y activan el sistema enzimático profenoloxidasa (PPO). Los hemocitos también reconocen a los patógenos a través de receptores conocidos como calreticulina o apolipoforina (58,64). La calreticulina es una proteína expresada en la superficie de los hemocitos, y en los mamíferos es importante en la adhesión celular, fagocitosis, presentación de antígenos y en el proceso de inflamación (70). En humanos, la calreticulina es expresada por los neutrófilos y evitan el auto reconocimiento en las reacciones de defensa celular (56). La proteína apolipoforina III es similar a la apolipoproteína E presente en los mamíferos y ambas están asociadas con la inmunidad innata a las bacterias Gram-positivas como las micobacterias, promoviendo la fagocitosis (62,71). Una vez los patógenos son fagocitados, se eliminan por varios mecanismos entre los que cabe destacar la liberación de ROS generadas por el estallido oxidativo, iniciado por el complejo NADPH oxidasa (72). En los neutrófilos, el complejo funcional NADPH se forma después de la translocación de las proteínas $p47^{phox}$ y $p67^{phox}$ del citosol a la membrana plasmática, del mismo modo que ocurre en *G. mellonella*, cuyos hemocitos presentan proteínas homologas a $p47$ y $p67$ (72).

Otro mecanismo de defensa frente a patógenos que tiene lugar en *G. mellonella* es la melanización. La respuesta de melanización se describe como la síntesis y deposición de

melanina para encapsular patógenos en el lugar de la infección, seguida de la coagulación y opsonización (73). Es análoga a la formación de abscesos en infecciones en mamíferos (50,73). El proceso de melanización tiene lugar cuando los receptores reconocen componentes de las micobacterias, lo que conlleva a la producción de PPO por las células granulares y los oenocitoides, de modo que cuando las células fagocíticas abarcan un patógeno, se activa el sistema enzimático de membrana PPO (62).

La cascada de PPO se activa por serinproteasas y desencadena la síntesis de melanina por la enzima fenoloxidasa. Normalmente esta enzima se encuentra en su forma inactiva como una proenzima, la PPO. La fenoloxidasa, convierte la tirosina en dihidroxifenilalanina y oxida las sustancias fenólicas en quinonas y melanina, dejando oscurecidas las larvas infectadas (revisado en (58)). En la cascada enzimática de también participan las lectinas, que tienen capacidad de unirse a los plasmotocitos e inducir la fagocitosis (62) y también está relacionado con la síntesis inducida de PAM, como lisozimas (58,74). Las lisozimas actúan sobre la capa de peptidoglicano presente en hongos y bacterias. La cascada PPO de insectos es similar al sistema de complemento de los mamíferos en lo que respecta a la estructura, la función y el modo de acción de las proteínas que la componen (58,75).

Los PAM también tienen un importante papel en la inmunidad innata. Son pequeñas moléculas catiónicas secretadas por *G. mellonella*, que según su mecanismo de acción muestran un amplio espectro de actividad contra bacterias, hongos, parásitos y virus. Los mecanismos de acción de los PAM van desde la desintegración de la membrana hasta la supresión de los procesos, incluida la síntesis de proteínas y ADN (revisado en (58)). Se han aislado 18 PAM de la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella* (76,77), que poseen un amplio espectro de actividad (56).

Adicionalmente, otros mecanismos inmunitarios más específicos son de especial importancia cuando ocurre una infección por *M. tuberculosis*. *G. mellonella* es capaz de formar estructuras similares a granulomas. Los granulomas en el huésped humano son estructuras celulares altamente organizadas y dinámicas que contienen y controlan la infección por micobacterias (14). Son el rasgo distintivo de la infección tuberculosa en humanos y una característica clave en el desarrollo de infección tuberculosa latente, sin embargo, muchos de los modelos animales que actualmente se utilizan para el estudio de la tuberculosis no son capaces de formar estas estructuras en respuesta a la infección por micobacterias (5,14). *G. mellonella* puede formar estructuras similares a granulomas en respuesta a la infección, lo que podría facilitar la comprensión del papel de la inmunidad innata en el establecimiento y desarrollo de

la infección por *M. tuberculosis* (14). Pese a la similitud de las estructuras que se forman en *G. mellonella* con los granulomas humanos, la composición celular exacta difiere en algunos aspectos, ya que las larvas no poseen linfocitos, que son una parte esencial de los granulomas (15).

En infecciones experimentales, se ha podido observar que *G. mellonella* también produce la acumulación de cuerpos lipídicos que actúan como fuente de carbono y energía para las micobacterias, del mismo modo que ocurre con los macrófagos espumosos en el huésped humano (14,37).

3. Objetivos

El presente trabajo tiene como finalidad caracterizar *G. mellonella* como modelo de infección para el estudio de la tuberculosis. Para conseguir el objetivo propuesto, los objetivos específicos son:

1. Estudiar la respuesta inmunitaria de la larva mediante la administración por vía intrahemocélica de una especie de micobacteria no patógena, *Mycobacterium smegmatis*.
2. Identificar los genes que debido a su sobreexpresión o represión en condiciones de infección pueden jugar un papel relevante en el progreso de la infección.
3. Realizar un análisis de similitud de genes entre humanos y *G. mellonella* para analizar la expresión génica en *G. mellonella* tras la infección por micobacterias.

4. Materiales y métodos

4.1. Búsqueda bibliográfica

Se ha realizado una revisión bibliográfica con la finalidad de proporcionar una visión general de los mecanismos inmunitarios que tienen lugar en humanos en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, así como de los modelos que se utilizan para estudiar la tuberculosis. Se han estudiado las principales limitaciones de los modelos animales utilizados actualmente y las ventajas que presenta el uso de *G. mellonella* como modelo alternativo.

Para llevar a cabo la revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda de las publicaciones disponibles en las bases de datos PubMed y Web Of Science, entre los meses de marzo y junio de 2020, concretamente, las últimas búsquedas se han realizado el 20 de junio de 2020, donde

se ha realizado una revisión general de todos los temas del trabajo, comprobando que no se hubiese actualizado ninguno de los estos con nueva información.

Para realizar la búsqueda se utilizaron ambas bases de datos con diversas ecuaciones de búsqueda. En primer lugar, se utilizaron las palabras clave "*Mycobacterium tuberculosis* OR *tuberculosis* AND *immune response*" con el objetivo de profundizar en la interacción huésped-patógeno cuando tiene lugar una infección por *M. tuberculosis* en humanos. Posteriormente, teniendo ya una visión general del tema, se profundizó en las limitaciones que presentan los modelos animales que se utilizan actualmente para el estudio de la tuberculosis, para ello, se realizó una nueva búsqueda "*infection model* OR *animal model* OR *experimental animals*". Finalmente, se ha profundizado en las ventajas que presenta *G. mellonella* como modelo de infección alternativo para el estudio de la enfermedad, con especial énfasis en su respuesta inmunitaria. Para ello se ha utilizado una nueva ecuación de búsqueda con las palabras clave "*Galleria mellonella* AND *infection model* AND *tuberculosis*". Tras cada una de las búsquedas, se seleccionaron los artículos relevantes para los objetivos del trabajo según el título, resumen y palabras clave.

Criterios de inclusión y exclusión: Se han incluido artículos sobre cada uno de los temas publicados en los últimos 5 años. Asimismo, también se evaluaron las referencias de los artículos seleccionados y se han incluido estudios citados en las publicaciones seleccionadas, pese a la antigüedad, si se consideraban relevantes para los objetivos del trabajo. La selección de artículos se limitó a artículos publicados en inglés y cuyo resumen estuviera disponible. Se excluyeron las publicaciones que no aportaban información relacionada con los objetivos del trabajo, entre estas, las que estudian el desarrollo de nuevas vacunas y la coinfección de tuberculosis con VIH.

4.2. Condiciones de cultivo de *M. smegmatis*

M. smegmatis se cultivó en medio líquido Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich) que contenía 0,2% de glicerol (Sigma-Aldrich), 0,05% de Tween 80 (Sigma-Aldrich), 10% de enriquecimiento de glucosa. Las bacterias se dejaron crecer en una incubadora a 37 °C hasta que alcanzaron una densidad óptica de entre 0,8 y 1.

Previo a los experimentos de infección, se prepararon los inóculos de *M. smegmatis*, para ello, se adaptó el procedimiento propuesto por Li *et. al.* En primer lugar, se tomaron alícuotas de micobacterias en medio líquido y se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en PBS-

Tween 80 al 0,05% (v/v). Posteriormente se repitió el mismo proceso de centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo en PBS-Tween 80. Se utilizó en PBS-Tween 80 debido a que se ha demostrado que previene la aglomeración de las micobacterias, especialmente a concentraciones elevadas de inóculo bacteriano (14).

4.3. Cría de larvas de *G. mellonella*

Las larvas de *G. mellonella* se adquirieron de Biosystems Technology Ltd (Devon, UK). A su llegada, las larvas se colocaron en pequeñas cajas de plástico con rejillas que permitan la ventilación. En cada caja se colocaron 10 larvas con comida y en oscuridad. La comida de las larvas fue proporcionada también por Biosystems Technology Ltd, y consiste en una mezcla de sémola de maíz, harina de trigo, leche desnatada en polvo, cera de abejas y levadura seca. Esta mezcla fue suplementada con glicerol y miel, siguiendo las indicaciones proporcionadas por la casa comercial.

Las cajas con larvas se mantuvieron a dos temperaturas diferentes. Por un lado, la mayor parte de las larvas se dejaron crecer a 15 °C, ya que a esta temperatura las larvas se desarrollan más despacio y se prolonga su supervivencia (78). Por otro lado, se separaron 6 cajas, que son las que contenían las larvas que se utilizaron para el experimento de viabilidad. Estas se mantuvieron a 37 °C, ya que a esta temperatura se desarrollan más rápido (78). Se dejaron crecer hasta que alcanzaron un tamaño de 2 a 3 cm, que es una medida adecuada para realizar los experimentos. Una vez alcanzaron la medida adecuada se realizó el proceso de infección.

4.4. Infección de las larvas de *G. mellonella*

El proceso de infección de *G. mellonella* con *M. smegmatis* se llevó mediante inyección. Las inyecciones se realizaron con una con una jeringa Hamilton del 25 µL. Para llevar a cabo el proceso de infección, en primer lugar, se seleccionaron las larvas vivas, no melanizadas y se separaron en 6 grupos diferentes. Cada uno de los grupos fue infectado con diferentes concentraciones de bacterias.

Cada grupo estaba compuesto por 10 larvas. Se incluyeron dos grupos control a los que no se les administró *M. smegmatis*. Por un lado, a un grupo no se le realizó ningún procedimiento, pero se mantuvo en las mismas condiciones que el resto para evaluar su desarrollo y supervivencia. Por otro lado, a otro grupo de larvas se le administró 10 µL de PBS-Tween 80. El resto de grupos de larvas fueron infectados con diferentes concentraciones de *M. smegmatis*:

1×10^5 Unidades formadoras de colonias (UFC), 1×10^6 UFC, 1×10^7 UFC y 2×10^7 UFC. Estas dosis se escogieron a partir de las concentraciones utilizadas en estudios previos (5,14)

El proceso de infección se llevó a cabo mediante inyección de las micobacterias en las larvas como se observa en la **Figura 3**. Para el proceso de inyección, se esterilizó la microjeringa aspirando etanol al 70% y enjuagó con PBS. Posteriormente se aspiraron 10 μ L de suspensión bacteriana o PBS-Tween para el control, que es la cantidad que se ha de administrar a cada larva. Seguidamente, se tomó la larva con unas pinzas y se inmovilizó boca arriba. Después se localizó la última propata izquierda para producir la infección. En esta zona se insertó la aguja y se administró la suspensión bacteriana. Finalmente, las larvas infectadas se colocaron en una placa de Petri con papel de filtro y se guardan en una caja oscura y con ventilación dentro de una incubadora a 37 °C.

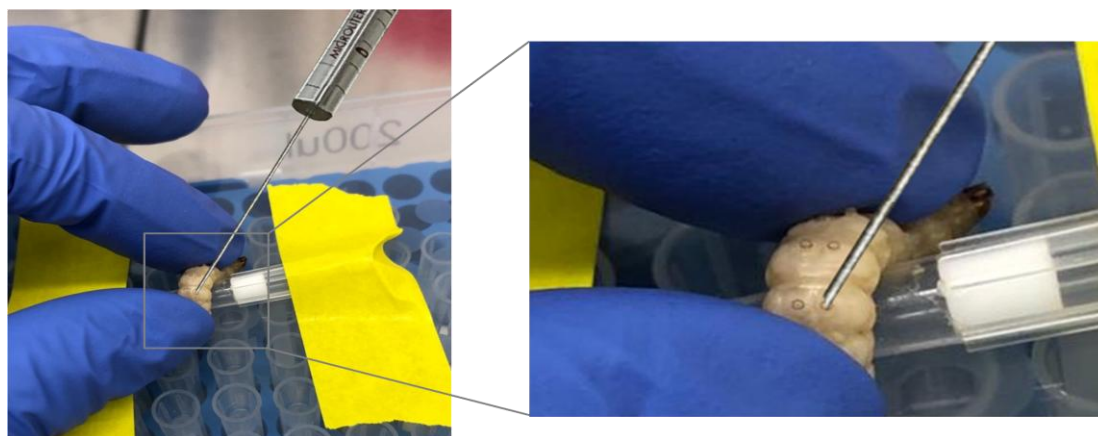


Figura 3. Proceso de inyección de la suspensión micobacteriana en la última propata de la larva de *G. mellonella*.

4.5. Análisis de similitud de genes entre *H. sapiens* y *G. mellonella*

Con el objetivo de conocer la similitud en la respuesta inmunitaria frente a micobacterias entre humanos y *G. mellonella* se ha realizado una revisión bibliográfica de la virulencia de *M. tuberculosis* en humanos y posteriormente, mediante un análisis bioinformático se ha estudiado los genes que podrían ser relevantes en el progreso de la infección en *G. mellonella*.

Para ello, en primer lugar, se han recopilado los principales genes humanos que se expresan diferencialmente cuando ocurre una infección por *M. tuberculosis*. Para ello, se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando la base de datos PubMed entre abril y mayo del 2020. Por un lado, se ha realizado una búsqueda de artículos que incluyera las siguientes palabras clave “*Mycobacterium tuberculosis* AND innate immune response AND gene expression” para conocer los genes cuya expresión se encuentra alterada para llevar a cabo la respuesta inmunitaria innata tras la adquisición del patógeno. Estos tienen especial importancia porque

son esenciales para decidir el resultado de la infección. Por otro lado, dada la complejidad de la infección por *M. tuberculosis* no únicamente se ve alterada la expresión de los genes del sistema inmune, por ello se han incluido genes que se expresan diferencialmente en macrófagos infectados respecto a macrófagos no infectados. Para ello se ha realizado una nueva búsqueda “*macrophage AND gene expression AND Mycobacterium tuberculosis OR tuberculosis*”. Adicionalmente se han consultado los artículos utilizados para la introducción.

Posteriormente, se ha realizado un análisis de similitud para conocer qué genes podrían verse alterados en *G. mellonella* tras la infección por micobacterias. Para el análisis de similitud se ha realizado un alineamiento de los genes humanos de interés con el genoma de *G. mellonella*. Para llevar a cabo el alineamiento de las secuencias, se obtuvieron las secuencias de los genes humanos de la base de datos Gene-NCBI y se alinearon con el genoma de *G. mellonella* mediante un BLAST. Se ha utilizado la herramienta TBLASTX del NCBI, ya que compara nucleótidos con una base de datos de nucleótidos traduciendo todas las secuencias, por lo que es más adecuado para comparar organismos alejados filogenéticamente e identificar genes presentes en *G. mellonella*. La decisión de si las proteínas eran similares se basó en los valores estadísticos E valor e identidad, así como la funcionalidad de las proteínas para las que estos genes codifican. Las proteínas se consideraron similares con una identidad del 30% cuando estaban completamente cubiertas y un valor E de 10^{-6} . Además, los genes humanos de interés que presentan un gen similar en *G. mellonella* se han clasificado según su función biológica basada en categorías de ontología génica (GO).

Criterios de inclusión y exclusión de genes: Los genes seleccionados para realizar el análisis de similitud son genes humanos que tienen un papel importante en la respuesta inmunitaria cuando se produce una infección por *M. tuberculosis*. También se han incluido genes que, a pesar de no ser del sistema inmunitario, se ve modificada su expresión cuando tiene lugar una infección por *M. tuberculosis*. Se han seleccionado los genes que se han encontrado asociados a tuberculosis en más de un estudio, ya que reflejan una asociación más robusta. Se han excluido los genes del sistema inmunitario adaptativo, debido a que *G. mellonella* no tiene inmunidad adaptativa.

5. Resultados

5.1. Puesta a punto del modelo experimental

Para caracterizar el modelo de infección, en primer lugar se evaluó la virulencia de *M. smegmatis* en el modelo de *G. mellonella* mediante la determinación de la supervivencia de las larvas en respuesta a la infección con distintas dosis de *M. smegmatis* (entre 1×10^5 UFC y 2×10^7 UFC por larva) durante un periodo de 120 h. Para evaluar la supervivencia de las larvas se realizó por respuesta al tacto, de modo que, las larvas que no mostraron ningún movimiento en respuesta al tacto fueron consideradas muertas. El 100% de las larvas de *G. mellonella* infectadas con una dosis de 1×10^5 *M. smegmatis*, sobrevivieron durante un periodo de tiempo de 120h, así como el grupo control y al que se le administró PBS y Tween 80 (**Figura 4A**). Estos resultados demuestran que ni la inyección ni el Tween 80, que se utiliza para prevenir la aglomeración de las micobacterias, afectaron a la supervivencia de las larvas. A dosis más altas de *M. smegmatis*, 1×10^6 , 1×10^7 y 2×10^7 UFC, se observó una letalidad larval dependiente de la dosis, ya que en los grupos infectados con una concentración de 1×10^6 y 1×10^7 UFC sobrevivieron el 50% de las larvas al final del periodo de tiempo evaluado, mientras que el grupo infectado con una concentración de 2×10^7 UFC mostró una supervivencia menor, de un 40% a las 120 horas.

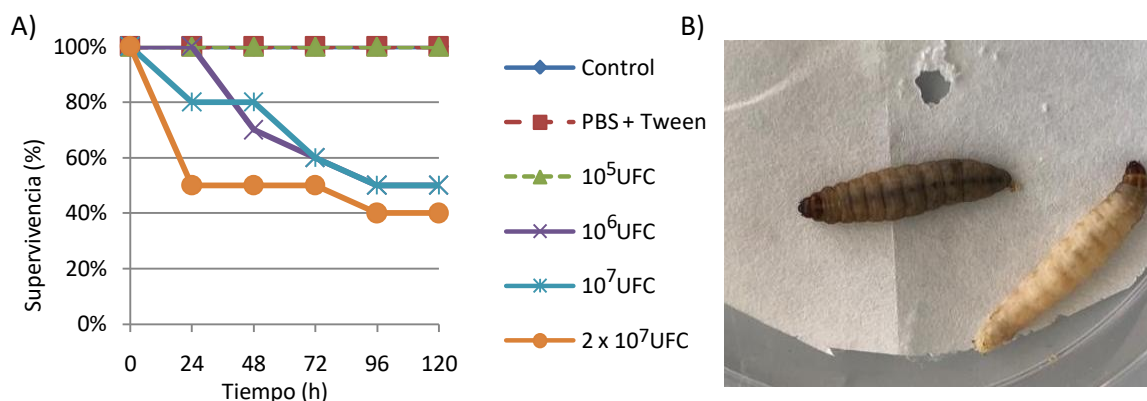


Figura 4. A) Efecto de la variación de la dosis de inóculo de *M. smegmatis* en la supervivencia de las larvas de *G. mellonella* durante 120 h. Las larvas sanas ($n= 10$ por grupo) infectadas con diferentes inóculos de *M. smegmatis*. B) Imagen de una larva sana color beige y una larva melanizada con flexibilidad y tamaño reducidos.

Las larvas infectadas con el paso del tiempo comenzaron a presentar manchas negras sobre el color beige y finalmente se volvieron de color negro (**Figura 4B**). Este oscurecimiento en el color se debe a la cascada de melanización que tiene lugar en *G. mellonella* con el objetivo de eliminar al patógeno (50). La melanización completa se correlaciona con la muerte de las larvas (50). Adicionalmente, las larvas infectadas muestran una flexibilidad y tamaño reducidos,

características del desgaste del organismo (**Figura 4B**). El periodo de tiempo en el que se evaluó la supervivencia de las larvas fue de 120 h, ya que pasado este tiempo, algunas de las larvas comenzaron a hincharse debido a que entraron en la siguiente etapa del ciclo de vida.

Los resultados obtenidos son poco robustos debido a que el estudio de viabilidad se realizó únicamente con 10 larvas por grupo, mientras que para obtener resultados más reproducibles es recomendable utilizar mínimo 20 larvas por grupo (14). Adicionalmente, la dosis de bacteria inoculada a cada grupo de larvas se aproximó mediante la extrapolación a partir de una relación establecida entre la densidad óptica y la concentración de micobacterias. Lo óptimo habría sido comprobar la concentración de la suspensión de bacterias mediante el recuento de viables en placa, pero no se pudo llevar a cabo. Por tanto, los resultados son preliminares ya que no se pudo completar el experimento debido a la interrupción de las prácticas a causa del SARS-CoV-2. No obstante, estos resultados concuerdan con los resultados presentados en estudios previos, que sustentan que la supervivencia de las larvas es dependiente de la concentración de bacteria inoculada (5,13,14).

5.2. Expresión génica en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*

La interacción entre *M. tuberculosis* y el huésped conduce a una respuesta inmune compleja que puede resultar en la eliminación completa del patógeno, en una infección latente o en enfermedad tuberculosa (19). En el huésped humano están involucrados mecanismos de defensa innatos y adaptativos en la respuesta inmunitaria frente a la infección (32). En la respuesta inmunitaria por tuberculosis tienen especial importancia los macrófagos, los linfocitos T y la formación de granulomas (19). Generalmente la inmunidad protectora contra la tuberculosis se atribuye a la respuesta mediada por células T, sin embargo, estudios inmunológicos respaldan que la inmunidad innata tiene una gran importancia en la enfermedad, ya que es la que determina la contención de la infección, presenta mecanismos efectores para matar a la bacteria y es necesaria para la inducción de la inmunidad adaptativa por *M. tuberculosis* (32).

Los detalles moleculares de la interacción del sistema inmunitario innato del huésped humano con *M. tuberculosis* siguen sin conocerse completamente, sin embargo, se sabe que en las diferentes etapas de la infección intervienen varios procesos complejos que pueden beneficiar a la bacteria o al huésped. En este apartado se describe una visión actual de los

acontecimientos moleculares que subyacen a la interacción entre *M. tuberculosis* y diversos procesos y componentes celulares y solubles del sistema inmunitario innato (25).

M. tuberculosis se adquiere por vía respiratoria. Cuando tiene lugar la infección por tuberculosis, los macrófagos alveolares juegan un papel esencial en la captura inicial del patógeno (79). Posteriormente, los macrófagos derivados de monocitos y las células dendríticas también participan en el proceso fagocítico (80). Para la endocitosis de *M. tuberculosis* es necesaria la participación de diferentes receptores de la célula fagocítica que se pueden unir directamente a la bacteria o reconocer opsoninas en su superficie (32).

Los macrófagos alveolares expresan una gran variedad de PRR. Tras el reconocimiento del patógeno, el huésped orquesta múltiples cascadas de señalización a través de los PRR para iniciar una variedad de funciones de defensa inmunológica innatas como la apoptosis, autofagia y activación de inflammasomas. Sin embargo, *M. tuberculosis* es capaz de evadir el sistema inmune del huésped utilizando numerosas estrategias (81).

Entre los PRR que participan en el reconocimiento de *M. tuberculosis* cabe destacar los receptores tipo Toll (TLR), los receptores de lectina tipo C (CLR) y los receptores tipo Nod (NLR). Estos receptores han demostrado participar en el reconocimiento directo de *M. tuberculosis* (79).

Los TLR reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos. Tras la infección los TLR reclutan distintas moléculas adaptadoras como MYD88 y TRAM para transmitir señales *downstream*. Esto da como resultado la activación de múltiples vías de señalización como la vía de NF κ B, la vía MAPK y la de PI3K/AKT, lo que resulta en la inducción de citocinas proinflamatorias (81). El TLR2 reconoce un gran número de antígenos micobacterianos, que incluyen diversas lipoproteínas, fosfatos de fosfatidilinositol y lipomananos (82). TLR9 coopera con TLR2 en la activación de macrófagos. Ambos TLR tienen en común la molécula MYD88, que es indispensable para el huésped, ya que su pérdida está asociada a un resultado letal de la infección por *M. tuberculosis*. MYD88 media las señales de citocinas importantes en la respuesta inmune a *M. tuberculosis*, como IL-1 α e IL-1 β (83). Además de TLR, algunos CLR y NLR también están involucrados en la detección de *M. tuberculosis*.

Los CLR son una familia de PRR en la que se incluyen colectinas, selectinas, receptores fagocíticos y proteoglicanos. Las colectinas son un grupo estructuralmente relacionado de proteínas que incluye proteínas tensioactivas y lectinas de unión a manosa (MBL) que también participan en el proceso de fagocitosis facilitando la unión entre *M. tuberculosis* y células

epiteliales o macrófagos alveolares. El factor MBL reconoce las configuraciones de carbohidratos en una amplia variedad de patógenos e induce la fagocitosis (32). Los CLR involucrados en la detección de la micobacteria, como el receptor de manosa, entre otros, tienen en común la unión funcional a la molécula adaptadora CARD9, que es esencial para el control de *M. tuberculosis* (84).

Además de mediante el reconocimiento directo de la micobacteria mediado por los diversos PRR, la endocitosis de *M. tuberculosis* también puede producirse por el reconocimiento de opsoninas en la superficie de la bacteria. De modo que las micobacterias pueden invadir los macrófagos del huésped tras la opsonización con el factor del complemento C3, que es seguido por la unión y captación a través del receptor del complemento 1,3 y 4 (revisado en (32)).

Una vez *M. tuberculosis* es internalizada en los fagosomas, estos interactúan con numerosos orgánulos endocíticos tempranos y tardíos, además de con otros orgánulos intracelulares para llevar a cabo la maduración del fagosoma. Estas interacciones altamente dinámicas entre la vía endocítica y fagocítica tienen como objetivo principal restringir el crecimiento del patógeno internalizado (85). Sin embargo, *M. tuberculosis* es un patógeno bacteriano adaptado para sobrevivir y permanecer en fagosomas (86). De este modo, los fagosomas micobacterianos que se fusionan con lisosomas para formar fagolisosomas pueden sufrir un defecto en la acidificación. La deficiencia en la acidificación luminal se debe a que *M. tuberculosis* puede replicarse dentro de las células y detener la maduración de los fagosomas y de este modo, puede sobrevivir en el interior de los macrófagos (87). Este mecanismo permite al patógeno evitar la exposición a hidrolasas lisosómicas, condiciones de pH bajo y otros componentes lisosomales bactericidas (87).

Adicionalmente, se han identificado numerosos mecanismos y factores micobacterianos que inhiben la maduración del fagosoma (88). En primer lugar, los fagosomas con *M. tuberculosis* presentan un reclutamiento defectuoso de la ATPasa vacuolar y una reducción de hidrolasas lisosomales, lo que resulta en un defecto en la acidificación del fagolisosoma (revisado en (85)). El mecanismo de exclusión de la ATPasa vacuolar en los fagosomas con *M. tuberculosis* está asociado a la expresión mediada por STAT-5 de la proteína SH2 inducible por citoquinas (CISH), que dirige selectivamente a la ATPasa vacuolar para su degradación (89).

En segundo lugar, en la maduración del fagosoma micobacteriano participan las Rab GTPasas endocíticas, que regulan el tráfico intracelular (90). El proceso de detención de maduración del

fagosoma micobacteriano también tiene lugar porque se produce un bloqueo funcional entre las etapas de maduración controladas por la GTPasa Rab5, que modula la endocitosis temprana y la Rab7 que participa en la fusión del fagosoma con el lisosoma tardío. En tercer lugar, *M. tuberculosis* es capaz de interferir en la fusión del fagosoma con el lisosoma al prevenir la acumulación de fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P) en las membranas del fagosoma. El PI3P es un componente esencial para la fusión del fagosoma con el lisosoma. Se genera por fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) en las membranas endosómicas y fagosómicas tempranas. PI3P es un sitio de unión para proteínas reguladoras involucradas en la maduración de fagosomas, como el sustrato de tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de los hepatocitos (Hgs) (revisado en (85)). Por último, *M. tuberculosis* es capaz de inhibir un aumento de Ca^{2+} citosólico así como de la quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII). La inhibición de Ca^{2+} , calmodulina (CaM) y CaMKII evita que los fagosomas que contienen bacterias se fusionen con los lisosomas. *M. tuberculosis* previene el aumento de la concentración de Ca^{2+} y, a través de la activación de p38 MAPK contribuye a la privación de PI3K en los fagosomas que contienen *M. tuberculosis* y a la reducción de los niveles de Rab5 en los endosomas tempranos. Esto justificaría la inhibición de la maduración del fagosoma (85,91).

También hay evidencia de que los fagosomas con *M. tuberculosis* interactúan con vesículas derivadas del complejo de Golgi que contienen enzimas implicadas en la inmunidad innata. Sortilina es un receptor transmembrana cuya función es transportar proteínas lisosomales desde la red trans-Golgi a los lisosomas, que se requiere para el control de las micobacterias intracelulares (92).

La inducción de la autofagia promueve la maduración y acidificación de los fagosomas de *M. tuberculosis* y su conversión en orgánulos micobactericidas a través de la maquinaria de autofagia canónica o autofagia no canónica (93). Para que se produzca la eliminación de la micobacteria es necesario que se produzca la vía de autofagia completa (94). La quinasa TBK-1 es esencial para la regulación del control de micobacterias mediante autofagia, ya que se requiere esta quinasa para la eliminación de la micobacteria por autofagia inducida por IL-1 β (95).

Se ha demostrado que *M. tuberculosis* altera la función de algunos mecanismos intrínsecos del huésped favoreciendo su propia supervivencia. Por ejemplo, la Coronina 1 es una proteína del huésped activada por la bacteria que afecta a la formación del autofagosoma alrededor de los fagosomas que contienen bacilos (96). Es posible que esta reducción que se observa en la

formación del autofagosoma se deba a la activación alterada de la p38 MAPK necesaria para la inducción de autofagia a través de la señalización TLR (97). Además, se ha demostrado que la proteína Eis de tuberculosis puede modular la autofagia a través de la inhibición de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK). La acción JNK es importante para la activación del regulador de autofagia Beclin-1 (98,99). Eis activa la proteína fosfatasa 16 de especificidad doble de JNK DUSP16/MKP-7 a través de la acetilación de lisina 55 e inactiva JNK por desfosforilación (100).

Una de las vías no canónicas de la autofagia es la fagocitosis asociada a LC3, LC3 se conjuga con un fagosoma en un proceso independiente del complejo de iniciación de autofagia ULK1. ULK1 es la quinasa activadora de autofagia unc-51 tipo 1. La fagocitosis asociada a LC3 se inicia mediante la señalización a través de receptores como TLR2, lo que resulta en el reclutamiento de la NADPH oxidasa en el fagosoma. La NADPH genera especies reactivas de oxígeno esenciales para la fagocitosis asociada a LC3 (101).

M. tuberculosis interacciona con los macrófagos del huésped, lo que resulta en la disrupción de la membrana plasmática. El sellado de estas lesiones es esencial para prevenir la necrosis. La reparación de la membrana plasmática depende de la prostaglandina E2 que regula la sinaptotagmina 7, un sensor de calcio involucrado en el mecanismo de reparación mediado por lisosomas (102). La necroptosis de los macrófagos es una forma programada de necrosis que depende de la activación del Receptor Interacción Serina/Treonina Quinasa 3 (RIPK3). (85).

Otro aspecto a considerar en la respuesta inmunitaria contra la infección por *M. tuberculosis* es la formación de granulomas. Los granulomas retienen las bacterias para limitar la diseminación en el huésped, así como un nicho para la persistencia a largo plazo de *M. tuberculosis*. Los bacilos pueden sobrevivir en el interior del granuloma en estado latente. En ocasiones las bacterias se reactivan y escapan del granuloma (28).

Las metaloproteinasas (MMP) participan en la formación del granuloma como en la destrucción de tejido pulmonar. *M. tuberculosis* secreta una proteína llamada ESAT6, que induce MMP-9 en células epiteliales próximas a macrófagos infectados. Al incrementar MMP-9 se induce el reclutamiento de monocitos y macrófagos necesarios para la maduración del granuloma. Sin embargo, *M. tuberculosis* también puede inducir MMPs que conducen a la destrucción del tejido y por tanto, a la posterior transmisión. *M. tuberculosis* impulsa la expresión de MMP-1 es capaz de degradar el colágeno tipo-1 de forma que se elimina la destrucción de tejido pulmonar en tuberculosis (35).

En resumen, tras la infección por *M. tuberculosis* tienen lugar interacciones complejas entre las células huésped y el patógeno, lo que conlleva a la activación de diversos mecanismos inmunitarios y deriva en la alteración de la expresión de diversos genes. En algunos casos, la activación de los mecanismos innatos puede resultar en la erradicación del patógeno, sin embargo, en otras ocasiones *M. tuberculosis* logra sobrevivir dentro de las células (85).

La comprensión actual del papel de los macrófagos en la tuberculosis, aunque es incompleta, demuestra claramente el papel central que desempeñan estas células tanto en la respuesta inmune protectora del huésped, como en el control de la infección y en el mantenimiento de la infección crónica, el daño tisular y patología asociados (25). Además, se sabe que los diferentes componentes solubles y celulares del sistema inmune innato en respuesta a *M. tuberculosis* pueden ser protectores o perjudiciales para el huésped. Gran parte del conocimiento actual sobre la interacción entre *M. tuberculosis* y el huésped humano se extrapola de los experimentos *in vitro* o de estudios que utilizan modelos animales (25). Sin embargo, dado que se han descrito que existen diferencias importantes en la respuesta inmune entre humanos y los diferentes animales (39), es necesario desarrollar nuevos modelos alternativos *in vivo*, que puedan actuar como huésped sustituto para estudiar la patogénesis de la infección micobacteriana (14).

El insecto *G. mellonella* proporciona una alternativa atractiva, no solo por las ventajas prácticas, éticas y de coste que presenta como modelo de estudio, sino también por su sistema inmunitario, que muestra importantes similitudes con el sistema inmune innato de los humanos. Estas características convierten a *G. mellonella* en un buen modelo para estudios de la inmunidad innata y un huésped fiable para evaluar la eficacia de antibióticos contra patógenos humanos como *M. tuberculosis*.

5.3. Análisis de similitud de genes entre *H. sapiens* y *G. mellonella*

Los elementos celulares y moleculares que componen el sistema inmunitario de *G. mellonella*, descritos en el apartado 2.5.2, muestran una elevada similitud con los componentes del sistema inmune innato en humanos. Adicionalmente, este organismo presenta también una gran cantidad de genes y proteínas que presentan similitud con los genes y proteínas humanas. En la **Tabla 1 del Anexo** se muestra una recopilación de genes humanos cuya expresión se encuentra alterada cuando ocurre una infección por *M. tuberculosis*, así como el gen potencialmente homólogo en *G. mellonella*. Como se muestra en la tabla, existe un gran número de genes del huésped humano que presentan un homólogo en *G. mellonella*.

La decisión de si los genes eran potencialmente homólogos se basó en criterios comúnmente discutidos. Los genes se consideraron potencialmente homólogos con una identidad del 30% cuando estaban completamente cubiertas y un valor E de 10^{-6} (103). Debido a que existe una gran distancia filogenética entre ambos organismos, algunos de los valores obtenidos del TBLASTX son peores de lo esperado y el porcentaje de la secuencia cubierto es muy bajo. Esto puede ser debido a que únicamente esté conservado el centro activo de la proteína para la que codifican los genes. Sin embargo, el análisis bioinformático se realizó con el objetivo de encontrar proteínas de interés en *G. mellonella* para poder evaluar los cambios en la expresión génica tras la infección en estudios futuros. Por tanto, se ha priorizado que las proteínas para las que codifican estos genes presentaran un alto grado de similitud funcional, ante el grado de similitud estructural. Adicionalmente, como se muestra en la **Figura 5** los genes de interés se han clasificado según su función biológica. La categoría predominante de procesos biológicos de GO es la de respuesta inmune innata, en la que se incluye un 38% de los genes.

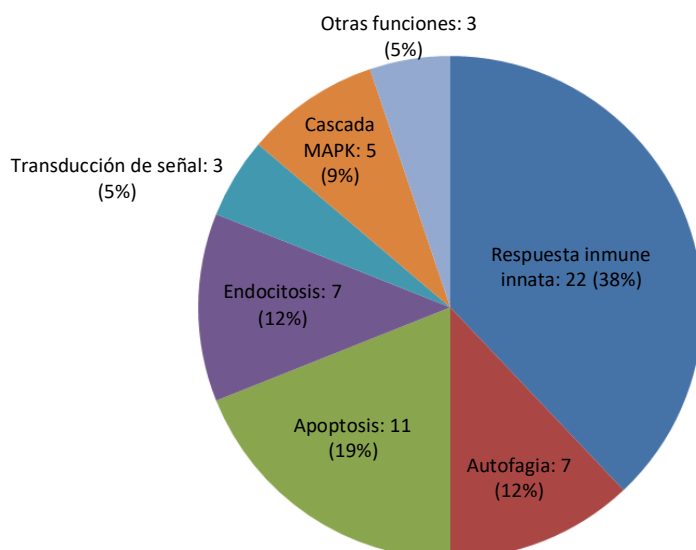


Figura 5. Asignación GO de los genes humanos en función de la participación de los productos génicos en procesos biológicos utilizando GeneCards.

Conocer los genes que pueden estar alterados en *G. mellonella* cuando ocurre una infección por micobacterias, así como su funcionalidad posibilitará el estudio de la respuesta inmune innata mediante el estudio de la expresión génica (103).

6. Perspectivas de futuro

Los resultados obtenidos en este proyecto son escasos debido a que la interrupción de las prácticas por la situación de emergencia sanitaria causada por el SARS-CoV-2 impidió llevar a cabo los experimentos programados. Sin embargo, a continuación, se describe como continuaría el proyecto, proponiendo experimentos adicionales que podrían llevarse a cabo en

estudios futuros para el establecimiento de *G. mellonella* como modelo experimental para el estudio de la tuberculosis.

En estudios futuros, se debería realizar el ensayo de viabilidad con un mayor número de larvas por grupo para obtener unos resultados más robustos que permitan determinar la dosis letal requerida para una mortalidad del 50% de las larvas (DL50) (5). Conociendo la DL50 y administrando esta dosis a nuevos grupos de larvas, se podría evaluar la capacidad del sistema inmune de *G. mellonella* para controlar el crecimiento de *M. smegmatis* mediante la determinación de la supervivencia micobacteriana en el huésped a los diferentes tiempos después de la infección. Para ello se debe llevar a cabo la homogeneización de larvas infectadas y sembrar la hemolinfa en placas con medio Middlebrook 7H11 Agar para la cuantificación de UFC (5,14). También se puede llevar a cabo un análisis histopatológico tiñendo las larvas con Hematoxilina y Eosina y con Tinción de Ziehl-Neelsen para evaluar el proceso de colonización, el impacto de la infección en los tejidos larvarios, observar el proceso de fagocitosis llevado a cabo por los hemocitos y la inducción de granulomas en este modelo de infección (14,49). Además, se puede evaluar la respuesta del huésped mediante microscopia electrónica de transmisión, que permite observar cómo se lleva a cabo la respuesta inmunitaria en *G. mellonella* (14). Estos experimentos se pueden realizar con el objetivo de conocer si *G. mellonella* reproduce las características patológicas de la tuberculosis en respuesta a la infección por *M. smegmatis*, como sucede en respuesta a BCG, como se ha demostrado en un estudio previo (14).

Por otro lado, en estudios futuros se podrían utilizar diversas cepas mutantes de *M. smegmatis* con reporteros (por ejemplo, luminiscencia y fluorescencia), para evaluar las interacciones huésped-patógeno y caracterizar los mecanismos de patogenicidad en *G. mellonella* (14).

Adicionalmente, se propone estudiar la respuesta inmune innata mediante un análisis de transcripción del huésped en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*, ya que el análisis de similitud realizado muestra los genes cuya expresión podría estar alterada tras la infección en *G. mellonella*. La cuantificación de la expresión génica se puede llevar a cabo mediante la extracción de ARN de las larvas infectadas y un posterior análisis mediante la realización de una PCR cuantitativa (103).

7. Discusión

Los modelos animales de infección juegan un papel clave en la investigación de la tuberculosis desde la patogénesis hasta el desarrollo de fármacos, sin embargo, también son uno de los

mayores obstáculos. Todos los modelos de infección de vertebrados están limitados por el coste de compra y mantenimiento, la regulación ética, el rendimiento de la investigación y la capacidad fisiológica para imitar la enfermedad de la tuberculosis.

La creciente popularidad de los invertebrados como modelo de estudio para enfermedades infecciosas se debe a que presentan importantes ventajas éticas, logísticas y económicas en comparación a los modelos de mamífero tradicionalmente utilizados. En los últimos años, ha incrementado la popularidad de *G. mellonella* como huésped sustituto para el estudio de enfermedades infecciosas causadas por diversos patógenos humanos, incluidos hongos, bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y virus (revisado en (56,58)). Sin embargo, por el momento, se ha informado poco sobre el uso de *G. mellonella* como modelo de infección para el estudio de micobacterias (13–15), para las cuales es necesario encontrar nuevos modelos de infección *in vivo*.

La larva *G. mellonella* como modelo de estudio presenta muchas ventajas sobre otros huéspedes invertebrados. Entre estas cabe destacar su gran tamaño, que permite que se realicen los experimentos de forma controlada, realizando infecciones de manera precisa; la capacidad de mantenerse a 37 °C y su complejo sistema inmunitario que comparte un alto grado de similitud funcional y estructural con el sistema inmune innato de los humanos. Adicionalmente, este modelo se puede infectar con diversas cepas micobacterianas y replicar características clave de la patogénesis de *M. tuberculosis* en humanos, como la formación de granulomas y de cuerpos lipídicos micobacterianos intracelulares. Estas características son altamente convenientes para un nuevo modelo de infección tuberculosa.

Además, en este estudio se ha demostrado que *G. mellonella* presenta un amplio repertorio de genes similares a los genes humanos. Estos genes humanos pueden tener un papel relevante en el progreso de la infección debido a su sobreexpresión o represión en condiciones de infección. De los genes identificados con elevada similitud entre *G. mellonella* y *H. sapiens*, la mayoría codifican proteínas con funciones relacionadas con la inmunidad innata. La identificación de estos genes de *G. mellonella* permitirá el estudio de la respuesta inmune a la infección por micobacterias, proporcionando una comprensión más exhaustiva de la expresión y regulación génica, lo que supondrá un importante avance para comprender mejor la dinámica de la interacción huésped-patógeno en la infección por *M. tuberculosis*.

A pesar de la creciente utilización de *G. mellonella* como huésped para el estudio de enfermedades infecciosas, se trata de un modelo que se ha comenzado a utilizar

recientemente y todavía no está tan bien establecido como otros modelos invertebrados como *D. melanogaster* o *C. elegans*. El uso de la larva de *G. mellonella* como modelo de infección presenta algunas limitaciones. La principal desventaja de este modelo es la variabilidad en las cepas de *G. mellonella* comercialmente disponibles (50). La falta de centros de reserva que suministren cepas de referencia criadas en condiciones estándar dificulta la posibilidad de llevar a cabo experimentos comparables en diferentes laboratorios (50). Adicionalmente, existen diferentes métodos de cría disponibles en la literatura científica, al ser un modelo relativamente novedoso todavía no se ha establecido un método estándar (78). Los distintos métodos disponibles para la cría de las larvas, son muy similares (56), sin embargo, la presencia de variaciones en la dieta y en las condiciones de crecimiento puede repercutir en la respuesta inmune de las larvas (104). Por último, algunos aspectos de la respuesta inmune de *G. mellonella*, como las vías de producción de ROS tras la infección por diferentes patógenos, no se conocen completamente (58).

Actualmente se están abordando las limitaciones asociadas a *G. mellonella*. Por el momento se han realizando estudios que proponen protocolos estandarizados para la cría y mantenimiento de las larvas (78,104) y se están realizando cada vez más estudios que tratan de comprender los mecanismos inmunes que tienen lugar en *G. mellonella* en respuesta a la infección por diversos patógenos humanos. Además, recientemente se ha secuenciado el genoma de *G. mellonella* (105) y el transcriptoma también está disponible (106), lo que ha permitido identificar genes que codifican para las proteínas con función en la inmunidad. Esto ha supuesto un gran avance en el uso de este modelo. En un futuro se espera que hayan centros de existencias que suministren poblaciones de referencia de *G. mellonella* con genotipos bien definidos, así como el establecimiento de un método estándar de cría y alimentación de las larvas y una caracterización completa del sistema inmunitario de *G. mellonella*. Superar las limitaciones que presenta este modelo de estudio ayudará a *G. mellonella* a consolidarse como un modelo de infección potente y fiable.

Las evidencias presentadas a lo largo del trabajo demuestran *G. mellonella* es un buen modelo para evaluar la virulencia de una variedad de microorganismos y podría ser especialmente útil para el estudio de *M. tuberculosis*. Este modelo proporciona una alternativa rápida y rentable para recopilar datos iniciales (50), y aunque no sustituirá por completo el uso de mamíferos, permitirá reducir significativamente el número de animales experimentales utilizados para investigar la tuberculosis (14). Además, permitirá lograr un conocimiento más completo de la

de la patogénesis de la enfermedad, así como evaluar la toxicidad y la eficacia de los nuevos productos antimicrobianos y nuevos candidatos a vacunas *in vivo* (5,14).

8. Conclusión

En conclusión, en este estudio se demuestra que la infección por *M. smegmatis* en *G. mellonella* reproduce los resultados observados en estudios previos, lo que indica que probablemente *G. mellonella* reproduzca las características patológicas de la tuberculosis en respuesta a la infección por *M. smegmatis*, del mismo modo que cuando se infecta con otras micobacterias. Adicionalmente, se ha demostrado que *G. mellonella* presenta numerosos genes similares a genes humanos, proporcionando la base de estudios futuros para estudiar la respuesta inmune innata en este modelo.

G. mellonella tiene un gran potencial como modelo para el estudio de la tuberculosis y puede ser útil para la detección de nuevos agentes antimicrobianos. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones que, probablemente, los estudios futuros tratarán de resolver y le permitirán consolidarse como un modelo de infección alternativo para el estudio de la tuberculosis. La utilización de este modelo permitirá lograr grandes avances en el estudio de la enfermedad, acelerar el proceso de investigación, así como reducir significativamente el número de mamíferos utilizados para la investigación de la infección por *M. tuberculosis*.

9. Autoevaluación

Los datos presentados en el trabajo se han obtenido a partir de la estancia en prácticas en el grupo de investigación PathoGenOmics. Mi trabajo se ha enfocado en la propuesta de un modelo alternativo, *Galleria mellonella*, para el estudio de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. A pesar de la interrupción de las prácticas, el tiempo de la estancia ha sido muy provechoso y suficiente para adquirir una mayor experiencia a nivel de laboratorio, tanto en técnicas microbiológicas como en la utilización de insectos como modelo de estudio. Además, la estancia en el grupo de investigación me ha permitido ver el ámbito de la investigación desde una perspectiva más cercana y diferente a la experiencia adquirida durante el grado.

Adicionalmente al trabajo de laboratorio, también he ganado experiencia en la realización de análisis bioinformáticos de similitud y en el procesamiento de datos, permitiéndome desarrollar el sentido crítico en la interpretación de resultados. A nivel teórico, he podido profundizar en el estudio de la tuberculosis, así como en la importancia de los modelos animales para la experimentación. Por otra parte, la realización del trabajo me ha permitido ganar experiencia en la búsqueda en bases de datos bibliográficas así como en la redacción de una revisión bibliográfica.

En conclusión, la realización del Trabajo de Fin de Grado ha sido un proceso muy positivo y enriquecedor que me ha servido para desarrollar competencias que serán de gran utilidad en un futuro.

10. Bibliografía

1. Tuberculosis [Internet]. [cited 2020 Apr 10]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva; 2019. 297 p.
3. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):581–91.
4. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *Lancet* (London, England). 2019 Apr 20;393(10181):1642–56.
5. Asai M, Li Y, Khara JS, Gladstone CA, Robertson BD, Langford PR, et al. Use of the invertebrate galleria mellonella as an infection model to study the mycobacterium tuberculosis complex. *J Vis Exp*. 2019;2019(148):1–8.
6. Shankar Pr. Book review: Tackling drug-resistant infections globally. *Arch Pharm Pract*. 2016;7(3):110.
7. Dheda K, Gumbo T, Maartens G, Dooley KE, McNerney R, Murray M, et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med*. 2017;5(4):291–360.
8. Zhan L, Tang J, Sun M, Qin C. Animal models for tuberculosis in translational and precision medicine. *Front Microbiol*. 2017;8.
9. Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL. Heterogeneity in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(11):691–702.
10. Gumbo T, Lenaerts AJ, Hanna D, Romero K, Nuermberger E. Nonclinical Models for Antituberculosis Drug Development: A Landscape Analysis. *J Infect Dis*. 2015;211:Supl 3, S83–S9.
11. Wang Y, Li DD, Jiang YY, Mylonakis E. Utility of insects for studying human pathogens and evaluating new antimicrobial agents. Vol. 135, *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2013. 1–25 p.
12. Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*. 2013;4(5):350–3.
13. Entwistle FM, Coote PJ. Evaluation of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*, as a novel in vivo model for non-tuberculosis mycobacteria infections and antibiotic treatments. *J Med Microbiol*. 2018;67(4):585–97.
14. Li Y, Spiropoulos J, Cooley W, Khara JS, Gladstone CA, Asai M, et al. *Galleria mellonella*-a novel infection model for the mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*. 2018;9(1):1126–37.
15. Michal M, Grosfeld T, Barkan D. Establishment and Validation of *Galleria mellonella* as a Novel Model Organism To Study *Mycobacterium abscessus* Infection, Pathogenesis, and

- Treatment. 2018;62(4):1–9.
16. Shiloh MU, DiGiuseppe Champion PA. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? Vol. 13, *Current Opinion in Microbiology*. NIH Public Access; 2010. p. 86–92.
 17. Singh AK, Reyrat JM. Laboratory maintenance of *mycobacterium smegmatis*. *Curr Protoc Microbiol*. 2009;(SUPPL. 14):1–12.
 18. King GM. Uptake of Carbon Monoxide and Hydrogen at Environmentally Relevant Concentrations by *Mycobacteria*. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Dec;69(12):7266–72.
 19. de Martino M, Lodi L, Galli L, Chiappini E. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. *Front Pediatr*. 2019 Aug 27;7.
 20. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol*. 2015;17(9):1277–85.
 21. O’Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The Immune Response in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013 Mar 21;31(1):475–527.
 22. Thada S, Valluri VL, Gaddam SL. Influence of Toll-Like Receptor Gene Polymorphisms to Tuberculosis Susceptibility in Humans. *Scand J Immunol*. 2013 Sep 1;78(3):221–9.
 23. de Martino M, Galli L, Chiappin E. Reflections on the immunology of tuberculosis: Will we ever unravel the skein? *BMC Infect Dis*. 2014;14(Suppl 1):S1.
 24. Zuiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, Rodriguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012.
 25. Schorey JS, Schlesinger LS. Innate Immune Responses to Tuberculosis. *microbiolspec*. 2016;4(6):1–27.
 26. Khan N, Vidyarthi A, Pahari S, Agrewala JN. Distinct Strategies Employed by Dendritic Cells and Macrophages in Restricting *Mycobacterium tuberculosis* Infection: Different Philosophies but Same Desire. Vol. 35, *International Reviews of Immunology*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 386–98.
 27. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, Musella RM, Beigier-Bompadre M, Saab MA, et al. Increased Susceptibility to Apoptosis of CD56 dim CD16 + NK Cells Induces the Enrichment of IFN- γ -Producing CD56 bright Cells in Tuberculous Pleurisy . *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6852–60.
 28. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections . *Gram-Positive Pathog*. 2019;7(4):1056–86.
 29. Kroon EE, Coussens AK, Kinnear C, Orlova M, Möller M, Seeger A, et al. Neutrophils: Innate effectors of TB resistance? *Front Immunol*. 2018;9(2637):1–12.
 30. Garcia-Rodriguez KM, Goenka A, Alonso-Rasgado MT, Hernández-Pando R, Bulfone-Paus S. The role of mast cells in tuberculosis: Orchestrating innate immune crosstalk? Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.

31. Cai Y, Yang Q, Tang Y, Zhang M, Liu H, Zhang G, et al. Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. *PLoS One*. 2014;9(3).
32. Reinout van Crevel, Tom H. M. Ottenhoff and JWM van der M. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002;294–309.
33. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2007 Feb 9;85(2):103–11.
34. Gordon S, Keshav S, Stein M. BCG-Induced Granuloma Formation in Murine Tissues. *Immunobiology*. 1994;191(4–5):369–77.
35. Salgame P. MMPs in tuberculosis: Granuloma creators and tissue destroyers. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1686–8.
36. Prosser G, Brandenburg J, Reiling N, Barry CE, Wilkinson RJ, Wilkinson KA. The bacillary and macrophage response to hypoxia in tuberculosis and the consequences for T cell antigen recognition. *Microbes Infect*. 2017 Mar 1;19(3):177–92.
37. Santucci P, Bouzid F, Smichi N, Poncin I, Kremer L, De Chastellier C, et al. Experimental models of foamy macrophages and approaches for dissecting the mechanisms of lipid accumulation and consumption during dormancy and reactivation of tuberculosis. Vol. 6, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
38. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. Vol. 10, *Nature Immunology*. NIH Public Access; 2009. p. 943–8.
39. Gupta AKS & UD. Animal models of tuberculosis: Lesson learnt. *Indian J Med Res*. 2018;147(5):456–63.
40. Lin PL, Pawar S, Myers A, Pegu A, Fuhrman C, Reinhart TA, et al. Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques. *Infect Immun*. 2006 Jul;74(7):3790–803.
41. Flynn JL, Gideon HP, Mattila JT, Ling Lin P. Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis. 2015;264(1):60–73.
42. Capuano S V., Croix DA, Pawar S, Zinovik A, Myers A, Lin PL, et al. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2003 Oct 1;71(10):5831–44.
43. Gupta UD, Katoch VM. Animal models of tuberculosis. In: *Tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb); 2005. p. 277–93.
44. Myllymäki H, Bäuerlein CA, Rämetsä M. The zebrafish breathes new life into the study of tuberculosis. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
45. Vandamme T. Use of rodents as models of human diseases. Vol. 6, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. Medknow Publications; 2014. p. 2–9.
46. Apt A, Kramnik I. Man and mouse TB: Contradictions and solutions. Vol. 89,

- Tuberculosis. NIH Public Access; 2009. p. 195–8.
47. Kramnik I, Beamer G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. Vol. 38, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2016. p. 221–37.
 48. Freires IA, Sardi J de CO, de Castro RD, Rosalen PL. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharm Res*. 2017;34(4):681–6.
 49. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*. 2012;(70):1–7.
 50. Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7(3):214–29.
 51. Glavis-Bloom J, Muhammed M, Mylonakis E. Of model hosts and man: Using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. *Adv Exp Med Biol*. 2012;710:11–7.
 52. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* *. Pasadena (California); 2006.
 53. Konkel ME, Tilly K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. Vol. 2, *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS; 2000. p. 157–66.
 54. Fuchs BB, O’Brien E, Khoury JB El, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. 475(6):475–82.
 55. Nathan S. New to *Galleria mellonella*: Modeling an ExPEC infection. Vol. 5, *Virulence*. Taylor and Francis Inc.; 2014. p. 371–4.
 56. Singkum P, Suwanmanee S, Pumeesat P, Luplertlop N. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2019;66(1):31–55.
 57. Kwadha CA, Ong’Amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Vol. 8, *Insects*. MDPI AG; 2017.
 58. Pereira TC, Barros PP de, de Oliveira Fugisaki LR, Rossoni RD, Ribeiro F de C, Menezes RT de, et al. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J Fungi*. 2018;4(4).
 59. Mohamedmohaideen NN, Palaninathan SK, Morin PM, Williams BJ, Braunstein M, Tichy SE, et al. Structure and function of the virulence-associated high-temperature requirement A of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. 2008;47(23):6092–102.
 60. Desbois AP, Coote PJ. Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents. In: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc.; 2012. p. 25–53.
 61. Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue Cell*. 2016 Aug 1;48(4):297–304.

62. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2004 Feb 1;28(1):101–12.
63. Browne N, Kavanagh K. Developing the potential of using *Galleria mellonella* larvae as models for studying brain infection by *Listeria monocytogenes*. Vol. 4, *Virulence*. Taylor and Francis Inc.; 2013. p. 271–2.
64. Browne N, Heelan M, Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. Vol. 4, *Virulence*. Taylor and Francis Inc.; 2013. p. 597–603.
65. Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. *Insect Biochem Mol Biol*; 2002. p. 1295–309.
66. Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.* 2017 Jun 1;24(3):342–57.
67. Pech LL, Strand MR. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci.* 1996;109(8):2053–60.
68. Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Vol. 211, *Immunobiology*. Elsevier GmbH; 2006. p. 213–36.
69. Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol.* 2000 Jul;46(7):1129–35.
70. Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P. The ins and outs of calreticulin: From the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 2001 Mar 1;11(3):122–9.
71. Halwani AE, Niven DF, Dunphy GB. Apolipophorin-III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* 2000;76(4):233–41.
72. Bergin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: Identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect Immun.* 2005 Jul;73(7):4161–70.
73. Tang H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. Vol. 3, *Fly*. Taylor and Francis Inc.; 2009. p. 105–11.
74. Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity Kenneth Söderhäll and Lage Cerenius. *Curr Opin Immunol.* 1998;23–8.
75. Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. Vol. 42, *Annu. Rev. Entomol.* 1997.
76. Mikulak E, Gliniewicz A, Przygodzka M, Solecka J. *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies. *Przegl Epidemiol.* 2018;72(1):57–73.
77. Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East PD. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect*

- Biochem Mol Biol. 2009 Nov;39(11):792–800.
78. Ellis JD, Graham JR, Mortensen A. Standard methods for wax moth research. *J Apic Res.* 2013;52(1):0–18.
 79. Barber-Mayer KD, Barber DL. Innate and adaptive cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(12):1–19.
 80. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1997;159(2):635–43.
 81. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(12):963–75.
 82. Banaiee N, Kincaid EZ, Buchwald U, Jacobs WR, Ernst JD. Potent Inhibition of Macrophage Responses to IFN- γ by Live Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Is Independent of Mature Mycobacterial Lipoproteins but Dependent on TLR2 . *J Immunol.* 2006;176(5):3019–27.
 83. Hölscher C, Reiling N, Schaible UE, Hölscher A, Bathmann C, Korb D, et al. Containment of aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice does not require MyD88 adaptor function for TLR2, -4 and -9. *Eur J Immunol.* 2008;38(3):680–94.
 84. Schoenen H, Bodendorfer B, Kelly Hitchens, Silvia Manzanero K, Werninghaus, Falk Nimmerjahn, Else Marie Agger SS, Andersen P, et al. Mincle is essential for recognition and adjuvant activity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analogue trehalosedibehenate. 2012;
 85. Bussi C, Gutierrez MG. *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells in space and time. *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43(4):341–61.
 86. Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host Microbe.* 2008;3(6):399–407.
 87. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev.* 2015;264(1):182–203.
 88. Vergne I, Chua J, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* Phagosome Maturation Arrest: Selective Targeting of PI3P-Dependent Membrane Trafficking. *Traffic.* 2003 Sep 1;4(9):600–6.
 89. Queval CJ, Song OR, Carralot JP, Saliou JM, Bongiovanni A, Deloison G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Rep.* 2017 Sep 26;20(13):3188–98.
 90. Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V. Cell Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Phagosome . *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20(1):367–94.
 91. Vergne I, Chua J, Deretic V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J Exp Med.* 2003;198(4):653–9.
 92. Vázquez CL, Rodgers A, Herbst S, Coade S, Gronow A, Guzman CA, et al. The

- proneurotrophin receptor sortilin is required for *Mycobacterium tuberculosis* control by macrophages. *Sci Rep*. 2016;6(July):1–13.
93. Fabri M, Realegeno SE, Jo E, Modlin RL. Role of autophagy in the host response to microbial infection and Potential for Therapy. 2012;23(1):65–70.
 94. Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, et al. Delivery of Cytosolic Components by Autophagic Adaptor Protein p62 Endows Autophagosomes with Unique Antimicrobial Properties. *Immunity*. 2010;32(3):329–41.
 95. Pilli M, Arko-mensah J, Ponpuak M, Roberts E, Master S, Mandell M, et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. 2012;37:223–234.
 96. Mori M, Mode R, Pieters J. From phagocytes to immune defense: Roles for coronin proteins in dictyostelium and mammalian immunity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8(MAR):1–7.
 97. Seto S, Tsujimura K, Koide Y. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cell Microbiol*. 2012;14(5):710–27.
 98. Kim KH, An DR, Song J, Yoon JY, Kim HS, Yoon HJ, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20):7729–34.
 99. Zhang C, Yang L, Zhao N, Zhao Y, Shi C. Insights into Macrophage Autophagy in Latent Tuberculosis Infection: Role of Heat Shock Protein 16.3. *DNA Cell Biol*. 2018;37(5):442–8.
 100. Yoon HJ, Kim KH, Yang JK, Suh SW, Kim H, Jang S. A docking study of enhanced intracellular survival protein from *Mycobacterium tuberculosis* with human DUSP16/MKP-7. *J Synchrotron Radiat*. 2013 Nov 1;20(6):929–32.
 101. Köster S, Upadhyay S, Chandra P, Papavinasasundaram K, Yang G, Hassan A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* is protected from NADPH oxidase and LC3-associated phagocytosis by the LCP protein CpsA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(41):E8711–20.
 102. Divangahi M, Chen M, Gan H, DeJardins D, Tyler T, Lee DM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol*. 2009;10(8):899–906.
 103. Lange A, Schäfer A, Bender A, Steimle A, Beier S, Parusel R, et al. *Galleria mellonella*: A novel invertebrate model to distinguish intestinal symbionts from pathobionts. *Front Immunol*. 2018;9(SEP):1–12.
 104. Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*. 2018 Jan 1;9(1):383–9.
 105. Lange A, Beier S, Huson DH, Parusel R, Iglauder F, Frick JS. Genome sequence of *Galleria mellonella* (greater wax moth). *Genome Announc*. 2018 Jan 1;6(2).

106. Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskas A. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics*. 2011;12.
107. Zhang XX, Huang TY, Wu Y, Peng WG, Xie H Bin, Pan MC, et al. Inhibition of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in T lymphocytes in patients with active tuberculosis. *Int J Infect Dis*. 2017;59:110–7.
108. Roy S, Schmeier S, Kaczowski B, Arner E, Alam T, Ozturk M, et al. Transcriptional landscape of *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–13.
109. Braverman J, Stanley SA. Nitric Oxide Modulates Macrophage Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection through Activation of HIF-1 α and Repression of NF- κ B. *J Immunol*. 2017;199(5):1805–16.
110. Wu K, Fang H, Lyu LD, Lowrie DB, Wong KW, Fan XY. A derived network-based interferon-related signature of human macrophages responding to mycobacterium tuberculosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
111. Yang CS, Lee HM, Lee JY, Kim JA, Lee SJ, Shin DM, et al. Reactive oxygen species and p47phox activation are essential for the *Mycobacterium tuberculosis*-induced pro-inflammatory response in murine microglia. *J Neuroinflammation*. 2007;4:1–16.
112. Shi L, Jiang Q, Bushkin Y, Subbian S, Tyagi S. Biphasic dynamics of macrophage immunometabolism during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MBio*. 2019;10(2):1–19.
113. Scriba TJ, Coussens AK, Fletcher HA. Human Immunology of Tuberculosis. 2017;1–24.
114. Singhanian A, Wilkinson RJ, Rodrigue M, Haldar P, O'Garra A. The value of transcriptomics in advancing knowledge of the immune response and diagnosis in tuberculosis. *Nat Immunol*. 2018;19(11):1159–68.
115. Volpe E, Cappelli G, Grassi M, Martino A, Serafino A, Colizzi V, et al. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*. 2006;118(4):449–60.
116. Vergne I, Fratti RA, Hill PJ, Chua J, Belisle J, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* Phagosome Maturation Arrest: Mycobacterial Phosphatidylinositol Analog Phosphatidylinositol Mannoside Stimulates Early Endosomal Fusion. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):751–60.
117. Reuschl AK, Edwards MR, Parker R, Connell DW, Hoang L, Halliday A, et al. Innate activation of human primary epithelial cells broadens the host response to *Mycobacterium tuberculosis* in the airways. *PLoS Pathog*. 2017;13(9):1–26.
118. Shah JA, Musvosvi M, Shey M, Horne DJ, Wells RD, Peterson GJ, et al. A functional toll-interacting protein variant is associated with bacillus calmette-guérin-specific immune responses and tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Aug 15;196(4):502–11.
119. Mehdi Mirsaeid RTS. Patients at High Risk of Tuberculosis Recurrence Mehdi. *Int J Mycobacteriology*. 2017;6(3):239–45.

11. Anexo

Tabla 1. Tabla resumen de genes humanos cuya expresión se encuentra alterada cuando ocurre una infección por M. tuberculosis, así como el gen potencialmente homólogo en G. mellonella. Los valores de E-valor, Query Cover e Identidad se han obtenido tras la realización del TBLASTX de la base de datos NCBI.

Gen humano	Función del gen humano	Potencial homólogo en Galleria	E-valor	Query Cover	Identidad	Referencia
Gen AKT1	Autofagia	Galleria mellonella serine/threonine-protein kinase N (LOC113510964)	2E-50	3%	36/75(48%)	(93,99,107)
Gen Beclin-1	Autofagia	Galleria mellonella beclin-1-like protein (LOC113523247)	1E-26	7%	36/50(72%)	(20,85,99)
Gen Bnip3	Apoptosis	Galleria mellonella BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (LOC113514457)	0.48	0%	10/17(59%)	(108–110)
Gen calreticulina	Apoptosis	Galleria mellonella calreticulin (LOC113511700)	8E-122	17%	54/71(76%)	(87,90)
Gen CaM	Endocitosis	Galleria mellonella calmodulin (LOC113514184),	2E-68	3%	49/50(98%)	(85,90,91)
Gen CaMKII	Apoptosis	Galleria mellonella calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain (LOC113511666)	2E-133	2%	40/41(97%)	(85,90,91)
Gen CISH	Transducción de señal	Galleria mellonella suppressor of cytokine signaling 2-like (LOC113513801)	2E-13	5%	33/84(39%)	(85,108)
Gen Clec4d	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella CUB and sushi domain-containing protein 1 (LOC113517039)	0.017	1%	14/34(41%)	(25,81,108)
Gen Clec4e	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella hemolymph lipopolysaccharide-binding protein-like (LOC113517324)	0.008	1%	17/36(47%)	(25,28,81,108)
Gen Clec7a	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella C-type lectin domain family 1 member B-like (LOC116413606)	4.2	0%	15/40(38%)	(20,28,81,85,87,110)
Gen CORO1A	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella coronin-2B (LOC113515368)	6E-99	19%	36/59(61%)	(25,28,81,85,87,90,96)
Gen NOX1	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella NADPH oxidase 5 (LOC113509358)	3E-23	1%	26/47(55%)	(19,20,32,85,87,99,111)
Gen eglN3	Apoptosis	Galleria mellonella egl nine homolog 1 (LOC113519818)	2E-45	1%	33/44(75%)	(109,112)
Gen Hgs	Autofagia	Galleria mellonella hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate-like (LOC113514245)	3E-83	5%	31/45(69%)	(85,86)

Gen HIF1A	Apoptosis	Galleria mellonella hypoxia-inducible factor 1-alpha-like (LOC113519898)	4E-52	1%	27/38(71%)	(87,109,112)
Gen IRGM	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella zinc finger protein 84-like (LOC113510719), transcript variant X6	2E-120	2%	171/396(43%)	(3,20,25,81,87,113)
Gen JNK1 (MAPK8)	Transducción de señal	Galleria mellonella stress-activated protein kinase JNK (LOC113516252)	2E-141	0%	53/56(95%)	(85,98,99)
Gen LAMP1	Autofagia	Galleria mellonella PAX-interacting protein 1-like	4e-06	5%	32/98(33%)	(25,81,86,97,102)
Gen MAP1LC3B	Autofagia	Galleria mellonella microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C-like (LOC113520366)	2E-20	1%	28/54(52%)	(25,81,87,102)
Gen MAP7	Otras funciones	Galleria mellonella tigger transposable element-derived protein 1-like	7E-42	0%	40/79(51%)	(114)
MAPK11	cascada MAPK	Galleria mellonella mitogen-activated protein kinase p38b-like (LOC113518077)	4E-93	14%	34/39(87%)	(86,87,90,97,98)
MAPK12	cascada MAPK	Galleria mellonella mitogen-activated protein kinase p38b-like (LOC113518077)	3E-76	10%	29/38(76%)	(86,87,90,97,98)
MAPK13	cascada MAPK	Galleria mellonella mitogen-activated protein kinase p38b-like (LOC113518077)	3E-63	5%	30/38(79%)	(86,87,90,97,98)
MAPK14	cascada MAPK	Galleria mellonella mitogen-activated protein kinase p38b-like (LOC113518077)	1E-96	1%	35/38(92%)	(86,87,90,97,98)
Gen MBL2	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella macrophage mannose receptor 1-like (LOC113522745)	2E-07	1%	19/41(46%)	(32,87,95)
Gen M-CSF-R	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella leukocyte tyrosine kinase receptor-like (LOC113509158)	6E-18	0%	23/39(59%)	(115)
Gen MKP7	cascada MAPK	Galleria mellonella dual specificity protein phosphatase Mpk3 (LOC113511794)	6E-09	0%	33/45(73%)	(98,99,107)
Gen MMP-1	Otras funciones	Galleria mellonella partial mRNA for interstitial collagenase (mmp1 gene), isoform 2	5E-26	5%	25/36(69%)	(3,113)
Gen MMP-9	Apoptosis	Galleria mellonella 72 kDa type IV collagenase (LOC113522981)	6e-08	6%	21/34(62%)	(81,113,115)
Gen MRC1	Endocitosis	Galleria mellonella macrophage mannose receptor 1-like (LOC113517486)	2.5	0%	14/26(54%)	(25,32,108)
Gen mTOR	Apoptosis	Galleria mellonella serine/threonine-protein	5E-149	3%	16/26(62%)	(81,87,93,99,107)

		kinase Tor-like (LOC113516298)				
Gen Myd88	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella: myeloid differentiation primary response protein MyD88 (LOC113513443)	2E-20	8%	76/290(26%)	(24,32,81,86,95)
Gen NCF1	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella SH3 domain-containing kinase-binding protein 1-like (LOC113515631)	2E-10	9%	33/115(29%)	(32,87,101,112)
Gen NCF2	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF1-like isoform X1 (LOC113509476)	1e-06	11%	24/62(39%)	(101)
Gen NFκB2	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella nuclear factor NF-kappa-B p110 subunit (LOC113515637)	2E-16	5%	22/42(52%)	(108,109,115)
Gen Oasl1	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella polyubiquitin-B (LOC113510676)	0.002	1%	30/91(33%)	(108,110)
Gen PGC-1	Apoptosis	Galleria mellonella tigger transposable element-derived protein 1-like (LOC113513546)	1E-75	0%	53/98(54%)	(25,87,112)
Gen PI3K	Apoptosis	Galleria mellonella phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform-like (LOC113517426)	5E-31	0%	31/44(70%)	(81,85,87,99,102,107)
Gen Prdx1	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella peroxiredoxin (LOC113515423)	5E-66	5%	46/52(88%)	(108)
Gen Rab14	Endocitosis	Galleria mellonella ras-related protein Rab-14 (LOC113516886)	2E-77	2%	59/65(91%)	(81,87,90)
Gen Rab5	Endocitosis	Galleria mellonella ras-related protein Rab-5B-like (LOC113518641)	2E-24	0%	32/42(76%)	(24,25,81,85,87,95,116)
Gen RAB7A	Endocitosis	Galleria mellonella ras-related protein Rab-7a (LOC113522588)	6E-88	0%	70/76(92%)	(25,81,85,87,95,97,99)
Gen RELA	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella nuclear factor NF-kappa-B p110 subunit (LOC113515637)	5E-14	2%	27/56(48%)	(108,109,112,117)
Gen RELB	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella embryonic polarity protein dorsal (LOC113512577)	3E-32	1%	29/54(54%)	(109)
Gen RIPK3	Apoptosis	Galleria mellonella 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2	6E-04	4%	13/23(57%)	(28,85)
Gen RPS6KB1	Apoptosis	Galleria mellonella ribosomal protein S6 kinase beta-1 (LOC113517641)	6E-105	1%	45/50(90%)	(81,99)

Gen Sort1	Endocitosis	Galleria mellonella sortilin-related receptor-like (LOC113513004)	5E-07	0%	15/38(39%)	(85,92)
Gen SQSTM1	Autofagia	Galleria mellonella protein ref(2)P-like (LOC113518445)	2E-14	0%	35/58(60%)	(93,97)
Gen STAT3	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella signal transducer and activator of transcription 5B (LOC113513772)	2E-08	0%	21/35(60%)	(99,108,110)
Gen STAT5	Transducción de señal	Galleria mellonella signal transducer and activator of transcription 5B-like (LOC113520992)	8E-07	1%	20/51(39%)	(85)
Gen SYT-7	Endocitosis	Galleria mellonella synaptotagmin-7 (LOC113522302)	2E-34	0%	35/66(53%)	(85,102)
Gen Tbk1	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella serine/threonine-protein kinase TBK1 (LOC113521774)	4E-89	2%	45/59(76%)	(85,95,108)
Gen TLR2	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella toll-like receptor 2 (LOC113510376)	7E-14	2%	23/64(36%)	(3,19,25,32,85,108,113,114,118)
Gen TLR6	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella toll-like receptor 6 (LOC113509577)	2E-13	1%	22/57(39%)	(24,25,32,87)
Gen TLR7	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella toll-like receptor 7 (LOC113509581)	2E-09	4%	13/28(46%)	(24,81,119)
Gen Tollip	Respuesta inmune innata	Galleria mellonella toll-interacting protein B-like (LOC113512022)	5E-55	1%	44/68(65%)	(108,118)
Gen TRAM1	Otras funciones	Galleria mellonella translocating chain-associated membrane protein 1 (LOC113518287)	2E-32	1%	28/44(64%)	(24,25,81)
Gen Ulk-1	Autofagia	Galleria mellonella serine/threonine-protein kinase unc-51 (LOC113520788)	5E-50	2%	32/36(88%)	(28,85,87,101)