



Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

**NUEVOS MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO
DE LA TUBERCULOSIS.**

NEW CELLULAR MODELS FOR TUBERCULOSIS RESEARCH.

AUTORA: SARA MARCO EMBID

DIRECTOR: DR. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS

CODIRECTORA: DRA. AINHOA ARBUÉS ARRIBAS

Facultad de medicina

Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública. Universidad de Zaragoza

Año académico 2024-2025.

AGRADECIMIENTOS

En especial, a Ainhoa Arbués Arribas, mi codirectora, por todo su tiempo, paciencia y dedicación desde las primeras páginas. Sin ella, no hubiera sido posible este trabajo.

A Carlos Martín Montañés, mi director, por toda su ayuda.

Y, por último, a Adrián y a Cane, por su apoyo constante durante la elaboración de este trabajo, a la vez que fuente de motivación.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 CONTEXTO EPIDEMIOLOGICO E IMPORTANCIA.....	9
1.2 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD	9
1.2.1 Exposición a la micobacteria tuberculosa.	10
1.2.2 Infección tuberculosa latente	11
1.2.3 Enfermedad tuberculosa subclínica y activa.....	12
1.3 ¿ES POSIBLE MODELIZAR LO QUE OCURRE EN EL SER HUMANO?	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
4. RESULTADOS	18
4.1. MODELOS DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i> HUMANO.....	19
4.1.1 MODELO POR GUIRADO <i>et al.</i> , 2015	21
4.1.2 MODELO TRIDIMENSIONAL DE MICROESFERAS POR TEZERA <i>et al.</i> , 2017	24
4.1.3 MODELO CON PERLAS DE SEFAROSA POR MEZOUAR <i>et al.</i> , 2019	26
4.1.4 MODELO TRIDIMENSIONAL POR ARBUÉS <i>et al.</i> , 2020	29
4.1.5 MODELO MODULAR A MICROESCALA POR BERRY <i>et al.</i> , 2020.....	32
4.1.6 MODELO ESFEROIDE 3D POR MUKUNDAN <i>et al.</i> , 2021	37
4.2 ORGANOIDES.....	42
4.2.1 ORGANOIDE PULMONAR POR BRAIAN <i>et al.</i> , 2015	44
4.2.2 ORGANOIDE BRONQUIOLAR POR IAKOBACHVILI <i>et al.</i> , 2022	46
4.2.3 ORGANOIDE ALVEOLAR POR KIM <i>et al.</i> , 2024	49
5. DISCUSIÓN.....	52
6. CONCLUSIONES	55
7. BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXO 1: MODELOS DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	61
ANEXO 2: MODELOS DE ORGANOIDE <i>IN VITRO</i>	62

ABREVIATURAS

2D: *Bidimensional*

3D: *Tridimensional*

ALI: *Interfase aire-líquido (Air-liquid interfase)*

ASC: *Células madre adultas (Adult stem cells)*

BCG: *Mycobacterium bovis Bacilo Calmette-Guérin*

BSL-3: *Laboratorio de bioseguridad nivel 3 (Biosafety level 3)*

CGMs: *Células gigantes multinucleadas*

EVR: *Everolimus*

G-CSF: *Factor estimulante de colonias de granulocitos (Granulocyte colony-stimulating factor)*

GFP: *Proteína fluorescente verde (Green fluorescent protein)*

GM-CSF: *Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)*

IFN- γ : *Interferón gamma*

IGRA: *Ensayo de liberación de interferón (Interferón gamma release assay)*

IL: *Interleucina*

INH: *Isoniazida*

iPSCs: *Células madre pluripotentes inducidas (Inducible pluripotent stem cells)*

LTBI: *Infección tuberculosa latente (Latent tuberculosis infection)*

Mabs: *Mycobacterium abscessus*

MDMs: *Macrófagos derivados de monocitos (Monocyte-derived macrophages)*

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

MOI: *Multiplicidad de infección (Multiplicity of infection)*

OMS: *Organización mundial de la salud*

PBMCs: *Células mononucleadas de sangre periférica (Peripheral blood mononuclear cells)*

PGE2: *Prostaglandina E2*

PMA: *Forbol-12-miristato-13-acetato*

RFP: *Proteína fluorescente roja (Red fluorescent protein)*

RIF: *Rifampicina*

TB: *Tuberculosis*

TNF- α : *Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor necrosis factor Alpha)*

TST: *Prueba de la tuberculina (Tuberculin skin test)*

VEGF: *Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular endotelial growth factor)*

VIH: *Virus de la inmunodeficiencia humana*

RESUMEN

La tuberculosis continúa siendo la principal causa de muerte por un agente infeccioso en el mundo. Su elevada complejidad inmunopatológica y las limitaciones de los modelos animales para reproducir fielmente la infección humana han impulsado el desarrollo de nuevos modelos celulares *in vitro*. Esta revisión bibliográfica analiza los avances más recientes en los dos tipos más empleados: los modelos de granuloma y los organoides pulmonares. Los modelos de granuloma *in vitro* permiten estudiar en un entorno controlado la formación y evolución de los granulomas, estructuras multicelulares características de la enfermedad, siendo capaces de simular estados como la latencia bacteriana o la reactivación inducida por inmunosupresión. Los organoides, por su parte, son microtejidos tridimensionales que imitan las características estructurales y funcionales del epitelio respiratorio.

Los resultados obtenidos muestran un interés científico creciente por estos modelos, especialmente por los organoides, recientemente desarrollados, mientras que los modelos de granuloma cuentan con una trayectoria más consolidada. Ambos han demostrado ser útiles para reproducir las etapas iniciales de la infección, permitiendo caracterizar la respuesta inmune o evaluar la eficacia de terapias. Sin embargo, todavía presentan ciertas limitaciones y hasta el momento no existe un único modelo que reúna todos los componentes necesarios para replicar de forma exacta la complejidad de la infección tuberculosa en el pulmón humano. En este contexto, es de suma importancia integrar estos modelos con tecnologías emergentes capaces de suplir y complementar estas carencias, como, por ejemplo, los sistemas “*lung-on-a-chip*”. Por otra parte, el cambio hacia el uso en los modelos de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* podría ofrecer una nueva perspectiva en investigaciones futuras.

En conclusión, aunque los modelos celulares actuales permiten reproducir aspectos clave de la tuberculosis, todavía no existe un sistema que abarque todas las fases de la enfermedad. El desarrollo de modelos más complejos, integrales y que puedan prolongarse durante más tiempo será esencial para avanzar hacia nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas más eficaces.

Palabras clave: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Patogénesis, Modelos celulares, Granuloma *in vitro*, Organoides.

ABSTRACT

Tuberculosis remains the leading cause of death from a single infectious agent worldwide. Its high immunopathological complexity, along with the limitations of animal models in precisely reproducing human infection, has driven the development of new *in vitro* cellular models. This literature review analyzes the most recent advances in the two most widely used types: granuloma models and lung organoids. *In vitro* granuloma models allow to study the formation and evolution of granulomas, multicellular structures characteristic of the disease, in a controlled environment and can simulate conditions such as bacterial latency or reactivation induced by immunosuppression. Organoids, on the other hand, are three-dimensional microtissues that mimic the structural and functional features of the respiratory epithelium.

The findings show a growing scientific interest in these models, especially in organoids, which have been more recently developed, while granuloma models have a more established trajectory. Both models have proven useful in reproducing the early stages of infection, allowing for the characterization of the immune response and the evaluation of the effectiveness of therapies. However, they still present certain limitations, and so far, no single model includes all the necessary components to accurately replicate the complexity of the tuberculous infection in the human lung. In this context, the integration of these models with emerging technologies—such as lung-on-a-chip systems—becomes crucial, as they may help overcome and complement current limitations. Furthermore, the transition towards using *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in these models could provide a new perspective for future research.

In conclusion, although current cellular models allow for the reproduction of key aspects of tuberculosis, there is still no system capable of encompassing all phases of the disease. The development of more complex, integrative, and long-lasting models will be essential for advancing toward more effective therapeutic and diagnostic strategies.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Pathogenesis, Cellular models, *In vitro* granuloma, Organoids.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO E IMPORTANCIA

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que se transmite por el aire causada por organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Según el último informe global de la OMS publicado en 2024, la situación mundial de la TB registró un aumento significativo en el número de casos notificados en todo el mundo en el año 2023, concretamente **8,2 millones de personas**, frente a los 7,5 millones de 2022, 6,4 millones en 2021 y 5,8 millones en 2020. Si bien es posible que entre los nuevos diagnósticos de 2022 y 2023 se encuentren una cantidad considerable de individuos que desarrollaron TB en años previos cuyo diagnóstico se retrasó debido a la pandemia por COVID-19, la recuperación actual en las cifras pone de manifiesto la necesidad de seguir esforzándose en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento puesto que, a pesar de ser una enfermedad prevenible y tratable, sigue siendo la **principal causa de muerte por agente infeccioso en todo el mundo**.⁽¹⁾

En definitiva, la investigación continua sobre la TB es esencial para abordar sus altas tasas de mortalidad actuales, desarrollar nuevas vacunas y tratamientos y mejorar los métodos de diagnóstico para lograr combatir la enfermedad de la manera más eficaz.

1.2 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD⁽²⁾

La infección por *Mtb* implica una compleja interacción entre la micobacteria y el sistema inmune del huésped. Pese a que se trata de un patógeno pulmonar, *Mtb* es capaz de producir enfermedad en muchas otras partes del cuerpo. A su vez, se presenta dentro de un espectro dinámico (Figura 1) que va desde una infección asintomática (clásicamente denominada infección tuberculosa latente), en la cual las micobacterias se aíslan dentro de granulomas confiriendo al individuo un estado asintomático y no contagioso, hasta la enfermedad pulmonar activa y sí transmisible, donde el paciente puede presentar la clínica característica (tos, sudoración nocturna, fiebre, hemoptisis, astenia, pérdida de peso...).

En la historia natural de la TB se distinguen principalmente tres posibles situaciones condicionadas por las diferentes formas de relación entre el agente patógeno y el sistema inmune del huésped, que se describirán brevemente a continuación.

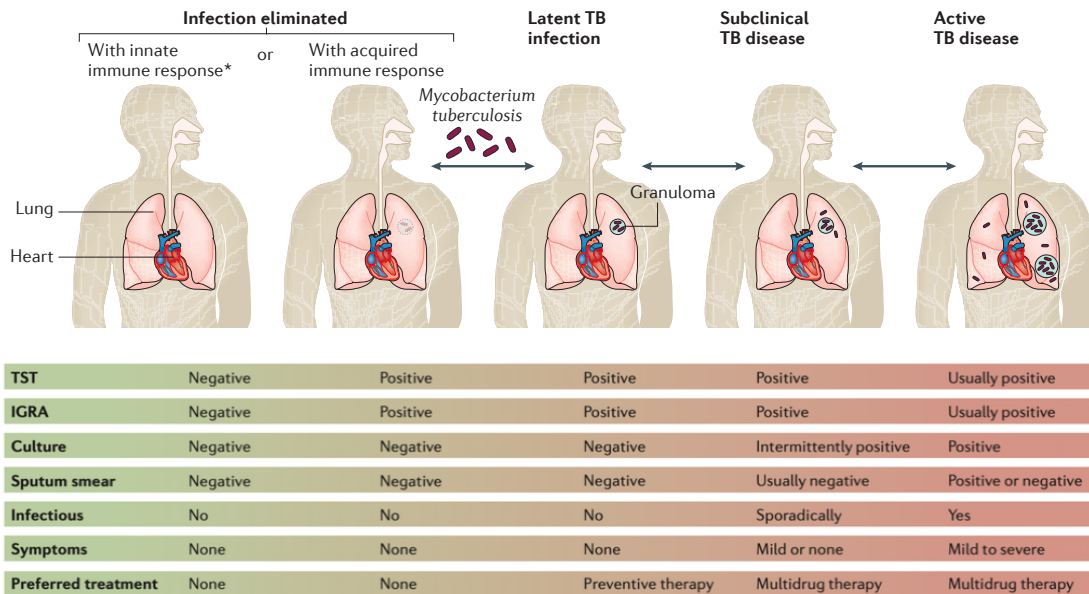


Figura 1: El espectro de la tuberculosis: Desde la erradicación de la infección hasta la enfermedad activa pulmonar. ⁽²⁾

1.2.1 Exposición a la micobacteria tuberculosa.

Mtb entra en el organismo a través de la vía respiratoria tras la inhalación de gotas en aerosol. Una vez inhaladas, estas partículas son capaces de escapar del aclaramiento mucociliar gracias a su pequeño tamaño llegando a alcanzar el alvéolo donde *Mtb* interactuará con el macrófago alveolar que constituye la primera línea de defensa (**inmunidad innata**). En muchas ocasiones, esta primera línea defensiva resulta suficiente para evitar la infección, de forma que los macrófagos alveolares fagocitan al bacilo y lo eliminan en el interior de sus fagolisosomas sin que llegue a intervenir la inmunidad adaptativa. En esta situación, que se trata de un fenómeno bastante habitual, solo se ha producido una exposición a la bacteria y las pruebas diagnósticas de la tuberculina (TST, del inglés *Tuberculin Skin Test*) y del interferón gamma (IGRA, del inglés *Interferon Gamma Release Assay*) son negativas.

Cuando la inmunidad innata no es suficiente para eliminar a *Mtb*, entra en acción la **inmunidad adaptativa**, en la que intervienen las células dendríticas infectadas

que migran a los ganglios linfáticos donde presentan antígenos del bacilo a los linfocitos T, activando una respuesta mediada principalmente por células T CD4+ y CD8+. Los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel crucial en la producción de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ), que potencia la capacidad de los macrófagos para destruir al bacilo dentro de las fagolisosomas. Por su parte, los linfocitos T CD8+ pueden inducir la apoptosis de macrófagos infectados y liberar granzimas y perforinas que contribuyen a la eliminación de *Mtb*.

A medida que esta inmunidad se activa, se forman granulomas, estructuras organizadas compuestas por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y linfocitos, con la finalidad de contener la infección y por tanto evitar la diseminación del bacilo (Figura 2). Para lograr la eliminación completa de *Mtb* (lo que se denomina inmunidad esterilizante), se requiere una coordinación y eficacia inmunitaria muy alta, en la que los macrófagos no solo contengan, sino que además destruyan todos los bacilos dentro del granuloma.

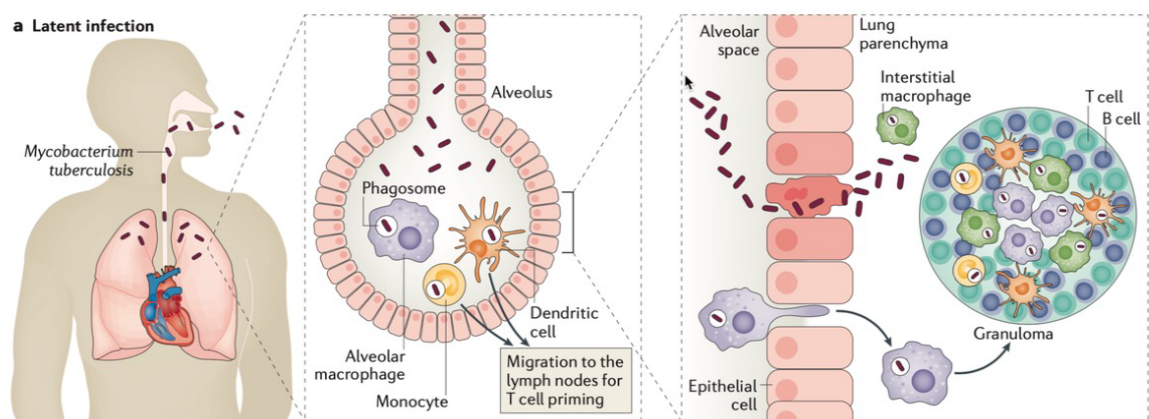


Figura 2: Formación del granuloma e infección latente. ⁽²⁾

1.2.2 Infección tuberculosa latente

La TB latente (o LTBI por sus siglas en inglés) es la circunstancia en la que la acción coordinada de los macrófagos y los linfocitos T, predominantemente CD4+, a pesar de haber sido capaz de contener a la bacteria en el granuloma no es capaz de eliminarla. En esta situación se produce una infección que es asintomática ya que *Mtb* está presente en situación de dormancia en el organismo. Puesto que las micobacterias no replican y no se liberan al exterior, esta fase de la infección no es transmisible.

Sin embargo, cabe destacar que, tradicionalmente, se ha denominado LTBI a la presencia de una respuesta adaptativa específica frente a *Mtb* (resultado positivo en la prueba del IGRA), independientemente de la presencia de micobacterias viables (verdadera infección latente) o no (inmunidad esterilizante).

1.2.3 Enfermedad tuberculosa subclínica y activa.

Lo más habitual es que la infección permanezca en estado latente durante toda la vida o que llegue a eliminarse. Sin embargo, hay un pequeño porcentaje de individuos en los que intervienen factores inmunosupresores y la infección se reactiva: las micobacterias replican, dando lugar a la rotura del granuloma y a su liberación a las vías respiratorias (Figura 3).

Al principio esta replicación es lo suficientemente baja para que no haya grandes manifestaciones clínicas, es lo que se conoce como enfermedad **tuberculosa subclínica (fase transitoria)**. Sin tratamiento, la enfermedad subclínica se convertirá rápidamente en **enfermedad tuberculosa activa** con su espectro clínico característico y la posibilidad de transmisión de la infección.

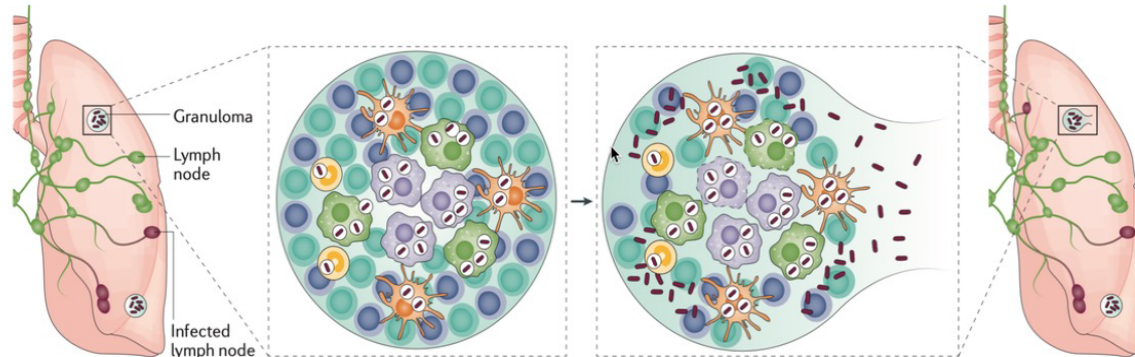


Figura 3: Tuberculosis activa: La replicación bacteriana supera la contención en el granuloma. ⁽²⁾

1.3 ¿ES POSIBLE MODELIZAR LO QUE OCURRE EN EL SER HUMANO?

A pesar de los avances en el estudio de *Mtb* y la enfermedad que causa, reproducir con precisión los procesos que ocurren en el organismo humano sigue siendo un gran desafío. La complejidad de la interacción entre el patógeno y el huésped, que incluye la respuesta inmunitaria, las diferentes fases de la enfermedad y el estado de latencia, requiere sistemas experimentales que reflejen estas características con fidelidad. Durante años, los modelos animales han sido fundamentales para entender la patogénesis y poder evaluar y diseñar nuevos tratamientos, pero presentan limitaciones debido a las diferencias fisiológicas y genéticas con el ser humano, a lo que se añade el inconveniente de que muy pocos modelos han permitido reproducir algunas de las fases de la enfermedad, como, por ejemplo, la infección latente.

En este contexto, los **nuevos modelos celulares** surgen como una herramienta prometedora. La implementación de sistemas *in vitro* permite recrear microambientes más cercanos a los tejidos afectados por la TB. Estos modelos no solo facilitan la investigación de los mecanismos moleculares y celulares de la infección, sino que también podrían servir para ensayar nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas.

Sin embargo, para lograr una verdadera mimetización de la enfermedad humana en la experimentación *in vitro*, es fundamental seleccionar los **tipos celulares adecuados** que imiten el microambiente al que *Mtb* se enfrenta en el tejido pulmonar. Por otro lado, no todas las **cepas de *Mtb*** resultan válidas para estos modelos. Diferentes cepas pueden presentar variabilidad en virulencia y en la respuesta inmune inducida, lo que puede influir en la replicación de los procesos patológicos observados en humanos. Por lo tanto, el uso de cepas clínicas representativas y la caracterización fenotípica de las bacterias son aspectos cruciales para aumentar la fiabilidad de estos modelos celulares.

Por todo ello, la **pregunta central** que motiva esta revisión bibliográfica es analizar en qué medida y de qué manera estos nuevos modelos celulares pueden reflejar lo que ocurre en el ser humano y contribuir al desarrollo de intervenciones más efectivas contra la TB basándose en la literatura existente más reciente.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar los nuevos avances en modelos celulares para el estudio de la TB humana.

Objetivos específicos:

1. Revisar los diferentes tipos de modelos celulares más actuales utilizados en la investigación de la TB humana.
2. Comparar la capacidad de los nuevos modelos celulares para reproducir las etapas tempranas de la infección tuberculosa en humanos.
3. Describir las principales innovaciones, ventajas y limitaciones identificadas en la literatura científica sobre el uso de los nuevos modelos celulares para el estudio de la TB.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente revisión bibliográfica narrativa sistematizada comienza con un análisis de la literatura científica disponible en la base de datos PubMed, donde se realizaron dos búsquedas específicas dirigidas hacia la recopilación de la información más reciente sobre los modelos celulares “Granuloma *in vitro*” y “Organoide pulmonar”.

Para tal propósito, en las respectivas estrategias de búsqueda se aplicaron como palabras clave los siguientes términos MeSH: “*Tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, granuloma, 3D culture, in vitro techniques, in vitro granuloma model, organoids y organoid model*” siendo combinados entre sí con los operadores booleanos “AND” y “OR” (Figura 4). El operador “NOT” no fue utilizado.

Para garantizar que esta revisión bibliográfica recoge el conocimiento más actualizado en este campo, se han seleccionado únicamente los artículos publicados en los últimos 10 años (rango temporal desde enero de 2014 hasta diciembre de 2024).

Como **criterios de exclusión** que dejaron atrás publicaciones no relevantes para este trabajo se siguieron los siguientes:

- A. Publicaciones que no aplicaban modelos celulares para el estudio de *Mtb*.
- B. Publicaciones en cuyos modelos no se haya utilizado más de un tipo celular.
- C. Publicaciones en idiomas diferentes a inglés o español.

Entre los artículos restantes, se seleccionaron aquellos correspondientes a modelos de granuloma *in vitro* y organoides más utilizados en el estudio de la TB y que permiten obtener una visión global de las ventajas e inconvenientes de los mismos.

Para complementar la búsqueda se consultó en páginas web para identificar información más detallada sobre el desarrollo y características principales de los modelos celulares seleccionados. A su vez, se revisaron revistas científicas disponibles en SciELO y Elsevier y se obtuvo información del Repositorio institucional en salud (REPISALUD) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), así como del *Global tuberculosis report 2024* de la OMS.

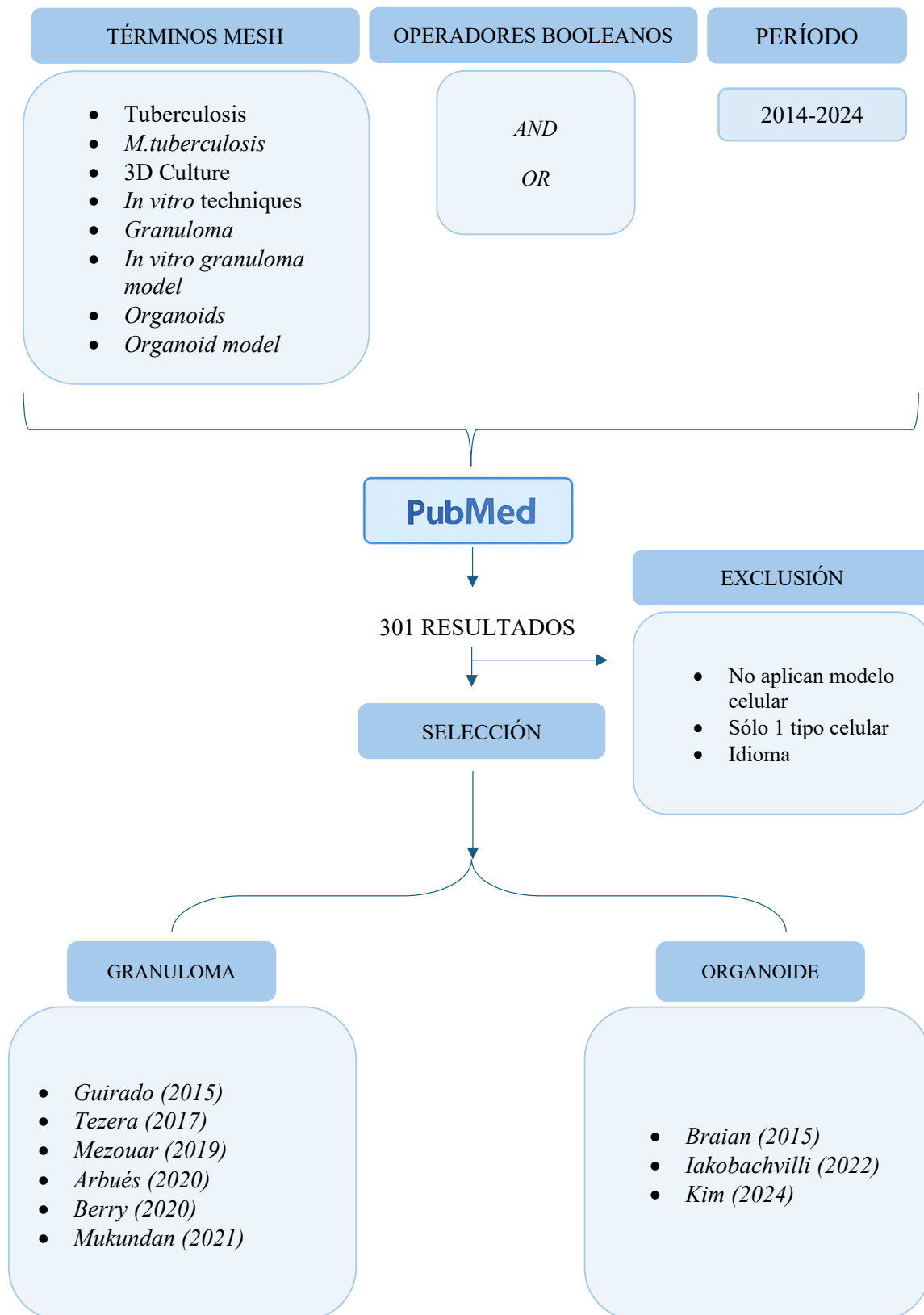


Figura 4: Diagrama de flujo de la estrategia de búsqueda y selección de modelos empleada. (Fuente: Elaboración propia)

Por último, para el desarrollo de esta revisión bibliográfica, se amplió la búsqueda para referenciar algunos modelos anteriores que sirvieron de punto de partida para los modelos descritos en este trabajo, así como alguna de sus posteriores adaptaciones.

4. RESULTADOS

Tras la consulta de bibliografía en la base de datos Pubmed se obtuvieron un total de 301 resultados. Si bien se descartaron aquellos que no se ajustaban al enfoque de este estudio, resulta relevante destacar que, como se observa en los gráficos de barras comparativos representados en la Figura 5, es evidente una clara tendencia ascendente en el número de publicaciones relacionadas con el uso de granulomas *in vitro* y organoides como modelos celulares para el estudio de la TB, especialmente en el periodo acotado de los últimos 10 años. Este incremento progresivo en el volumen de publicaciones sugiere que el tema abordado en esta revisión es no solo de actualidad, sino que está ganando un interés creciente dentro de la comunidad científica.

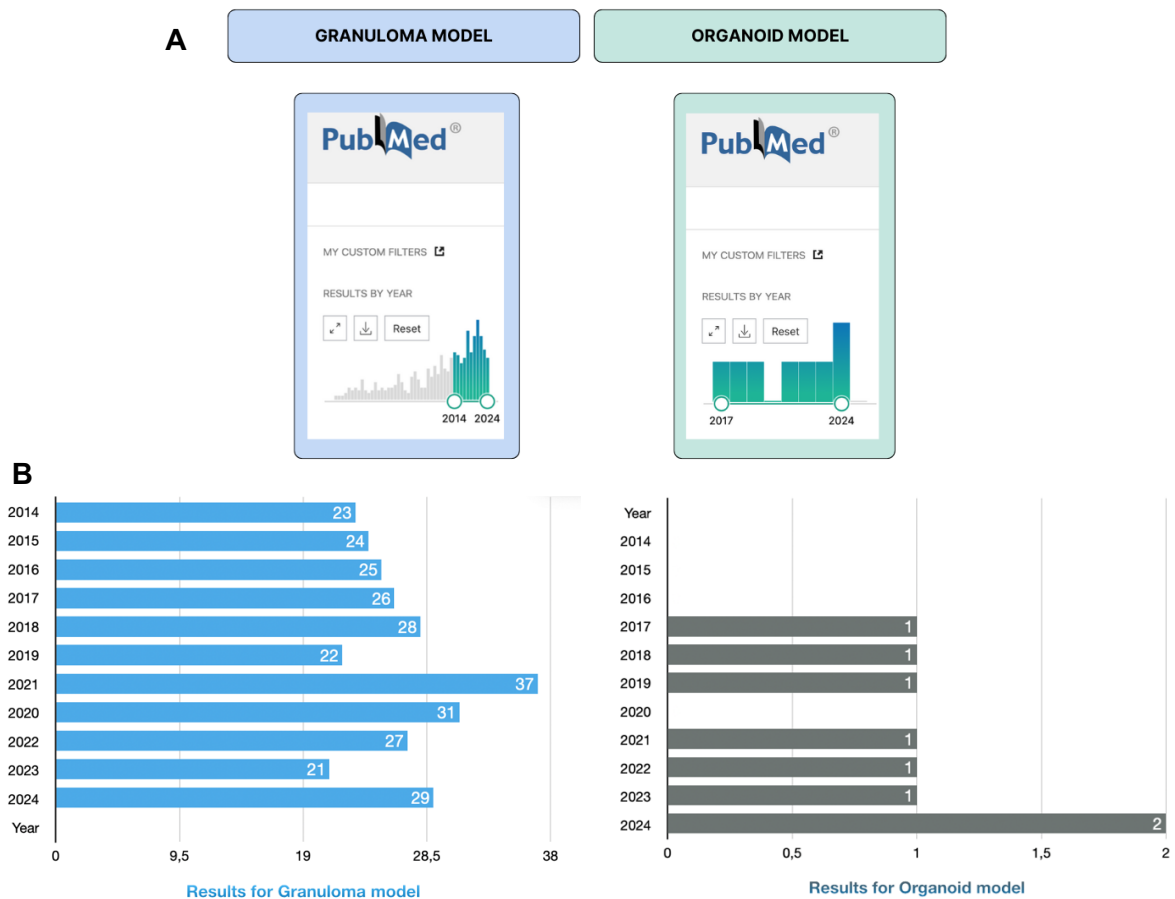


Figura 5: Resultados comparativos de la búsqueda en Pubmed. Los diagramas de barras representan (A) el total de resultados obtenidos, y (B) el número de artículos en cada uno de los años del período seleccionado. (Fuente: Elaboración propia)

En la Figura 5 se observa asimismo que el número de publicaciones en PubMed relacionadas con los modelos de granuloma *in vitro* supera significativamente al de aquellas relacionadas con los organoides en el periodo comprendido entre 2014 y 2024. En cuanto a estos últimos, apenas se encontraban resultados en los años anteriores a 2017, por lo que resulta evidente que se trata de un modelo celular en creciente desarrollo.

No cabe duda de que ambos modelos presentan una tendencia ascendente en el número de publicaciones, lo que refleja un creciente interés en su desarrollo y aplicación en el estudio de la enfermedad por *Mtb*.

4. 1. MODELOS DE GRANULOMA *IN VITRO* HUMANO

Antes de comenzar con la presentación de este tipo de modelo celular, es preciso contextualizar brevemente el concepto de granuloma, tan relevante en la enfermedad infecciosa causada por *Mtb*.

Tras la infección por *Mtb*, es posible que el bacilo consiga evitar su destrucción, permitiéndole su multiplicación en el interior del macrófago. Los macrófagos alveolares se activan y comienzan a liberar citoquinas proinflamatorias que atraen neutrófilos, linfocitos y más macrófagos, generando una respuesta inflamatoria que conduce a la formación de un granuloma. Los granulomas son estructuras complejas compuestas por diferentes tipos celulares que se agregan de un modo organizado. ⁽³⁾ En su parte más interna se encuentra una zona de necrosis central circunscrita por macrófagos, células epitelioides, neutrófilos, células dendríticas y células gigantes multinucleadas (CGMs). Dicho núcleo central se encuentra rodeado en la periferia por un anillo de linfocitos (Figura 6).

Este agregado celular que constituye el granuloma se forma alrededor de los bacilos con la finalidad, desde la perspectiva del sistema inmunitario, de contener y conseguir aislar la infección del resto del organismo. Sin embargo, desde una perspectiva bacteriana, supone la disponibilidad de una colección de células fagocíticas que pueden ser infectadas y en las que replicarse en su interior. Es debido a esta dualidad que el granuloma ha suscitado un gran interés en la investigación.

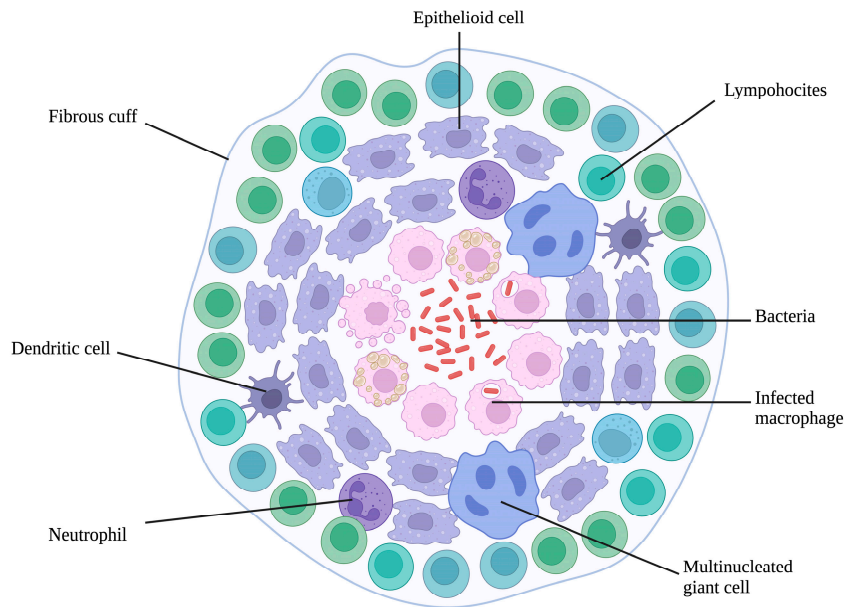


Figura 6: Estructura clásica de un granuloma. ⁽⁴⁾

La respuesta inmune del huésped es capaz de ajustarse y responder al estado fisiológico de la bacteria causando una modulación de la expresión genética en el sitio de la infección. Sin embargo, la erradicación total del bacilo no se completa debido a los mecanismos y estrategias desarrolladas por *Mtb* que le permiten persistir dentro del granuloma durante largos periodos de tiempo e incluso permitiendo la diseminación local y sistémica escapando del mismo. Por tanto, ser capaces de descifrar los diversos mecanismos subyacentes implicados en la iniciación y mantenimiento de los granulomas darán las claves para conocer las estrategias implicadas en el control de la infección y en otros casos, la persistencia del patógeno, lo que permitirá desarrollar nuevas terapias dirigidas contra la TB (Figura 7).

En este contexto, el desarrollo de nuevos modelos celulares de granuloma *in vitro* humano ha resultado ser especialmente relevante, ya que permiten recrear en condiciones controladas las complejas interacciones moleculares entre *Mtb* y las células del huésped, proporcionando un entorno experimental fiable para identificar los mecanismos implicados en una respuesta inmune eficaz contra las micobacterias. ⁽⁵⁾

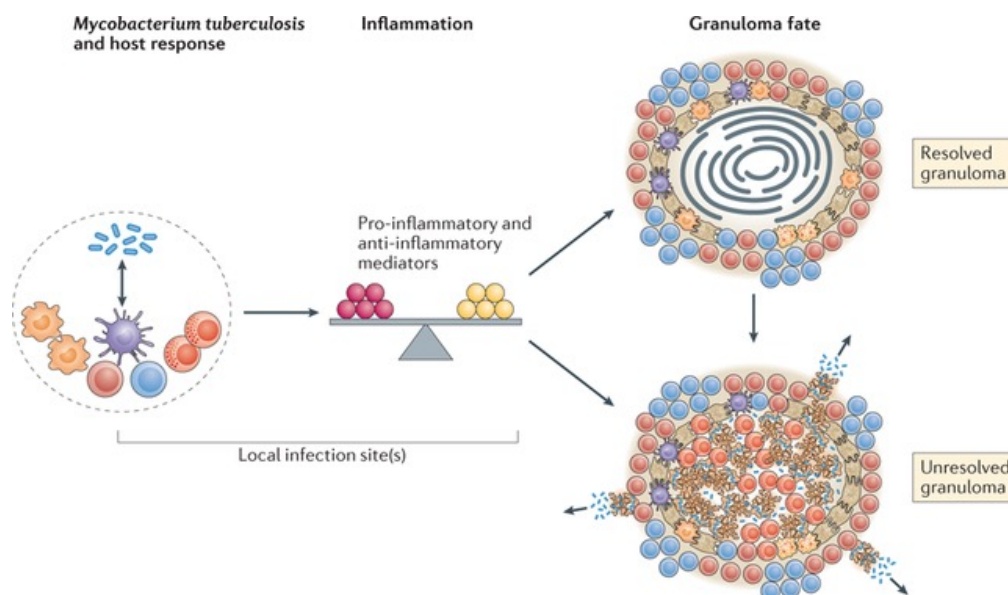


Figura 7: El comportamiento del granuloma está influenciado por una interacción dinámica entre factores del huésped y la bacteria ⁽⁵⁾

A continuación, se describen en detalle aquellos modelos de granuloma *in vitro* seleccionados para su análisis. Un resumen de sus principales características puede encontrarse en el Anexo 1.

4.1.1 MODELO POR GUIRADO *et al.*, 2015

El grupo liderado por Schlesinger desarrolló un modelo de granuloma *in vitro* humano basado en el uso de células mononucleares de sangre periférica (o PBMCs por sus siglas del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) humanas. Este modelo se caracteriza por el uso de suero autólogo como una opción estratégica para mejorar su relevancia al preservar las características específicas de cada donante, de forma que se asemejase más a las condiciones fisiológicas del cuerpo humano. Este estudio incluyó una muestra de 28 personas, 14 de las cuales tenían una infección tuberculosa latente (TST y/o IGRA positivos) y las otras 14 no estaban infectadas, con el principal objetivo de estudiar y comprender las diferencias en las respuestas inmunitarias entre las personas con infección tuberculosa asintomática y las sanas. ⁽³⁾

Las PBMCs se infectaron con la cepa de *Mtb* H37Rv, considerada actualmente como la cepa de referencia de este patógeno y, por tanto, la más estudiada en los centros de investigación a nivel mundial. Descubierta y aislada por primera vez en

el año 1905 y nombrada H37, se mantuvo en cultivo en el laboratorio durante muchos años durante los que se seleccionaron aquellas variantes de tipo más virulento. La variante rugosa virulenta de H37 bautizada H37Rv se considera la cepa estándar de trabajo ya que mantiene su virulencia en modelos *in vivo* (a diferencia de su variante atenuada H37Ra) lo que la hace muy conveniente para el estudio de la patogénesis de la TB. ⁽⁶⁾ En particular, la cepa empleada en este estudio estaba genéticamente modificada para expresar la proteína fluorescente verde GFP para permitir su visualización.

El modelo de granuloma *in vitro* desarrollado se estudió durante 12 días, realizando seguimientos diarios que permitieron un análisis exhaustivo de los cambios producidos. Como observaciones clave a lo largo de este periodo se encuentran las diferencias significativas entre los granulomas derivados de personas con tuberculosis asintomática (LTBI) y los de personas no expuestas (naive). Se observó que los granulomas de individuos con TB asintomática se desarrollaban más rápido (Figura 8). Las PBMCs naive no mostraron evidencia de agregación celular hasta el día 6 post-infección, mientras que en el caso de aquellos provenientes de individuos con LTBI se observa la formación de agregados ya en el 4º día post-infección. Además, generaban una respuesta inmunológica más potente, exhibiendo a su vez un mejor control de la carga bacteriana (capacidad para contener la infección) en comparación con los individuos sanos (Figura 9). Un análisis de citoquinas demostró que los granulomas de individuos con TB asintomática presentaban niveles elevados de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-12p40), indicando una activación inmunológica mayor en ese grupo, así como una mayor proliferación celular en los granulomas de los mismos.

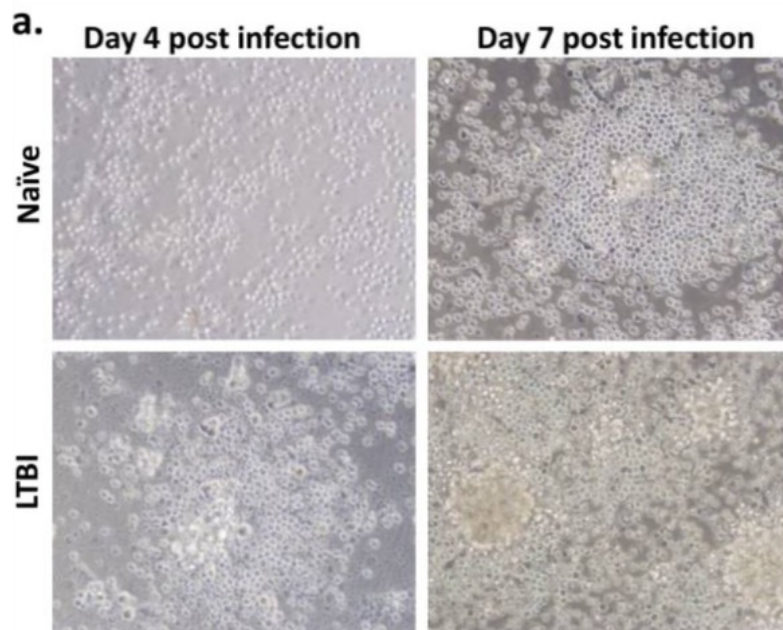


Figura 8. La formación de estructuras similares a granuloma está acelerada en individuos con infección latente (LTBI) frente a individuos no expuestos (naïve). ⁽³⁾ Imágenes representativas al microscopio de campo claro del proceso de agregación celular, paso inicial en la formación del granuloma. Las PBMCs obtenidas de individuos con LTBI y naïve fueron infectadas con *Mtb* H37Rv y cultivadas durante un periodo de 12 días.

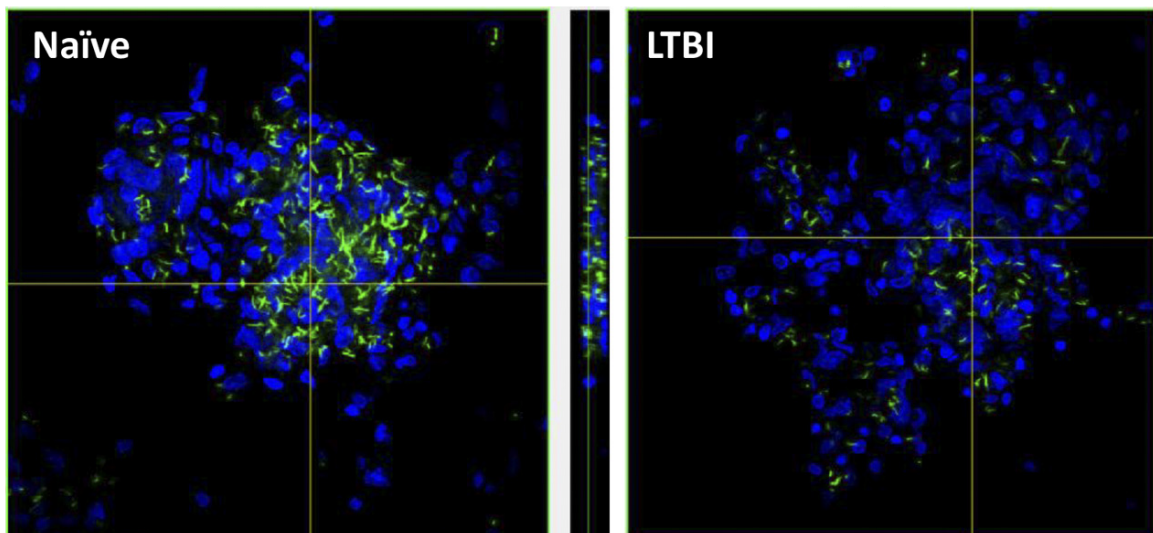


Figura 9: Las estructuras similares a granulomas (agregados tempranos) de individuos con LTBI ejercen un mejor control de la carga bacteriana. ⁽³⁾ En las imágenes de microscopía de fluorescencia se observan los núcleos de las células en azul y *Mtb* H37Rv en verde.

Otro de los hallazgos más relevantes del estudio es la identificación de una firma transcripcional específica de *Mtb* dentro de los granulomas, es decir, la expresión de un conjunto particular de genes, que variaba según el estado inmune del huésped. En los individuos con TB asintomática ocurría un cambio metabólico,

favoreciendo el uso de ácidos grasos en lugar de azúcares como fuente de energía, lo que sugería que la bacteria estaba adaptándose a un ambiente inmunológico más hostil dentro del granuloma. Además, se observó una mayor acumulación de cuerpos lipídicos en los macrófagos, lo que podría indicar una estrategia para sobrevivir en un estado de latencia prolongada, aprovechando los lípidos del huésped como fuente de nutrientes. En los granulomas de individuos sanos, *Mtb* mostraba un perfil metabólico diferente, con una mayor expresión de genes asociados a la glucólisis (uso de azúcares) en lugar de los genes relacionados con la degradación de ácidos grasos mencionados anteriormente.

Sin embargo, este estudio presentaba algunas limitaciones para reproducir plenamente el microambiente del granuloma humano *in vivo*. La mayoría de estas son comunes a todos los modelos basados en el uso de PBMCs. En particular, entre estas limitaciones se encuentran la falta de ciertos tipos celulares clave, como neutrófilos, agentes principales que intervienen en la respuesta inicial; de células endoteliales, que desempeñan un papel clave en la vascularización del granuloma y en la regulación de la respuesta inflamatoria; de fibroblastos, que contribuyen a la organización estructural del granuloma; así como la ausencia de células dendríticas, lo que podría afectar a la replicación de la presentación antigénica y la activación del sistema inmune adaptativo. Además, este modelo en particular carece de matriz extracelular, un componente esencial para la organización estructural del granuloma.

4.1.2 MODELO TRIDIMENSIONAL DE MICROESFERAS POR TEZERA et al., 2017 ^(7,8)

El estudio de Tezera y colaboradores, publicado en el año 2017, pretendía desarrollar un modelo que imitara más fielmente las condiciones fisiológicas del granuloma, esto es, en un entorno tridimensional, con el objetivo de analizar la respuesta inmunitaria frente a *Mtb* H37Rv. Para ello, PBMCs de donantes sanos se encapsularon en microesferas compuestas de una matriz de colágeno tipo 1 (principal componente de la matriz extracelular pulmonar) y alginato mediante una técnica de ingeniería de tejidos denominada bioelectrospraying (Figura 10).

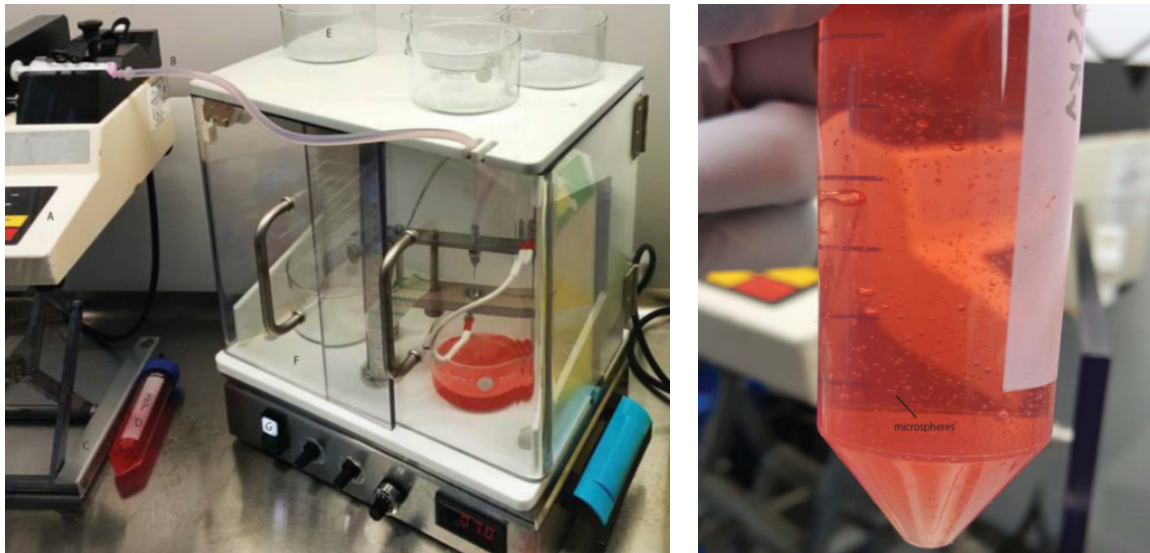


Figura 10: Imagen representativa del dispositivo de Bioelectrospraying y de las microsferas generadas. ⁽⁹⁾

Esta técnica de bioelectrospraying o bioelectropulverización consiste en la utilización de electricidad de alto voltaje (en vez de aire, como normalmente se utilizaría en un spray) para rociar pequeñas gotas de una solución formada por material biológico, incluso células vivas. Mediante la aplicación del alto voltaje a la mezcla líquida y su paso a través de una aguja muy fina se generan pequeñas gotas que se depositan en una solución que permite su solidificación inmediata dando lugar a las microsferas.

Una de las principales aportaciones de este modelo fue demostrar que los cultivos 3D permitían una mayor supervivencia celular en comparación con los 2D, ya que pudo alargarse la investigación hasta 21 días, posicionándose hasta la actualidad como el modelo celular de granuloma de mayor durabilidad en el tiempo. Los resultados mostraron que las condiciones experimentales variaban significativamente con el tiempo, destacando que muchos de los efectos sólo podían observarse a partir del día 7. La matriz extracelular no solo juega un papel fundamental en la supervivencia celular, sino que también confiere a las células una mayor capacidad para secretar citocinas y controlar la capacidad de proliferación de *Mtb*.

La investigación examinó cómo ciertas terapias dirigidas al huésped podrían modificar la respuesta inmunitaria frente a *Mtb*. La adición de prostaglandina E2 (PGE2) mostró un efecto protector al suprimir el crecimiento de *Mtb*, pero también redujo la viabilidad celular y aumentó la producción de citocinas proinflamatorias,

como las interleucinas IL-6 e IL-8, lo que podría causar daño tisular y mayor patología. Asimismo, se investigaron las consecuencias de suplementar células T específicas para *Mtb*, las cuales son importantes para controlar la infección. Sorprendentemente su adición provocó un aumento del crecimiento de *Mtb* y una exacerbación de la inflamación potencialmente dañina. Los estudios mostraron que las intervenciones terapéuticas tienen efectos complejos y no inmediatos, con posibles resultados tanto beneficiosos como perjudiciales dependiendo del contexto y del tiempo de evaluación, lo que destaca la importancia de utilizar modelos celulares más complejos para estudiar estos efectos a largo plazo.

Una de las principales limitaciones de este modelo es su limitada transferibilidad a distintos laboratorios, debido a que la generación de las microesferas requiere de un equipamiento especializado, que no está disponible en la mayoría de centros de investigación. Esta dependencia tecnológica dificulta su implementación generalizada y su uso a gran escala en estudios sobre la TB.

4.1.3 MODELO CON PERLAS DE SEFAROSA POR MEZOUAR *et al.*, 2019 ⁽⁹⁾

El modelo de granuloma *in vitro* desarrollado por Mezouar *et al.* es un modelo en 2D clásico (no incorpora matriz extracelular) basado en el uso de PBMCs aisladas de donantes sanos y de perlas de sefarosa (nombre comercial de la agarosa reticulada en forma de perlas) recubiertas con un lisado preparado a partir de *Mtb* H37Rv. Dichas perlas sirven como núcleo central alrededor del cual se agrupan las PBMCs formando estructuras similares a granulomas, ya que los monocitos migran a las perlas y se diferencian en macrófagos, para posteriormente polarizarse y fusionarse para formar CGMs (Figura 11). En este estudio se observó la cinética de formación de granulomas a los 3,6 y 9 días de cultivo.

Cabe mencionar que el primer modelo en emplear perlas de sefarosa recubiertas con extractos micobacterianos para inducir la formación de granulomas *in vitro* fue descrito por **Puissegur y colaboradores en el año 2004.** ⁽¹⁰⁾ Dicho modelo estableció la base para simular la respuesta inmune frente a *Mtb* utilizando PBMCs y perlas de sefarosa, y fue adaptado y refinado en investigaciones posteriores, como la de Mezouar *et al.*, 2019 aquí descrita.

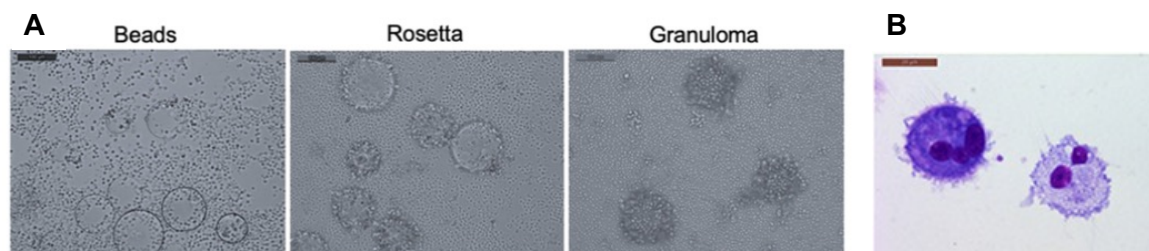


Figura 11: Imágenes representativas de la formación de granulomas y CGMs. ⁽⁹⁾ (A) Imágenes correspondientes a la cinética de formación granulomatosa: perlas (*beads*), rosetas y granuloma. (B) Imagen representativa de CGMs aisladas a partir de granulomas e identificadas mediante tinción de May-Grünwald-Giemsa.

El objetivo principal del estudio consistía en investigar los efectos de los fármacos bloqueantes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) etanercept y adalimumab. Para contextualizar brevemente, el TNF- α cumple un papel fundamental en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune, así pues, su bloqueo con este tipo de fármacos anti-TNF se ha convertido en una herramienta clave en el control y tratamiento de patologías inflamatorias como las espondiloartropatías o la enfermedad inflamatoria intestinal entre otras. ⁽¹¹⁾ Por otra parte, el TNF- α juega un papel fundamental en la estabilización y organización de los granulomas participando, entre otras funciones, en la fusión de los macrófagos para formar las CGMs (figura 12).

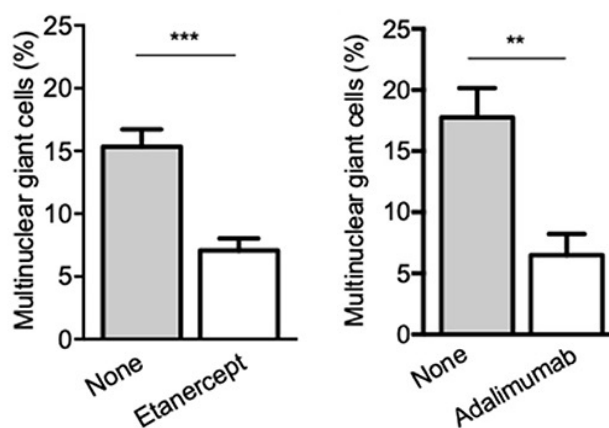


Figura 12: Ertanercept y Adalimumab inhiben la formación de CGMs. ⁽⁹⁾

En el estudio se encontró que etanercept retrasaba la formación del granuloma, pero no la impedía y, a su vez, reducía significativamente la generación de CGMs esenciales para retener a *Mtb*, alterando la polarización de los macrófagos hacia un perfil proinflamatorio y aumentando la producción de IL-10 e IL-17. Sin embargo, al compararlo con adalimumab, se observó que este último también inhibía la

formación de CGMs pero mediante un mecanismo diferente, induciendo la apoptosis de macrófagos. Estos hallazgos refuerzan la idea de que el tratamiento con fármacos contra TNF- α es un factor de riesgo importante en el contexto de la TB, pues pueden desorganizar los granulomas y contribuir a la reactivación de la infección latente, siendo su resultado biológico variable según el tipo de fármaco utilizado.

Este modelo presenta varias limitaciones importantes. Una de las más destacables es la ausencia de *Mtb* viable (se trata de un preparado con extractos de *Mtb* H37Rv en lugar de bacterias vivas) lo que hace necesario el uso de perlas de Sefarosa para inducir la agregación celular y simular la estructura del granuloma. Esto se debe a que, al no haber micobacterias activas, el proceso de formación del granuloma no se desencadena de manera fisiológica. Si bien es cierto que, desde el punto de vista del riesgo biológico, permite que el experimento se realice en una sala de cultivo celular en lugar de en un laboratorio de contención biológica nivel 3 (requerido para la manipulación de cepas de *Mtb* virulentas). Además, se trata de un modelo clásico (en ausencia de matriz extracelular), que permite estudiar la formación del granuloma de manera simplificada.

Por otro lado, desde la propia publicación se destaca la falta de evidencia clínica demostrada que vincule la reducción de CGMs con la reactivación de la TB en pacientes tratados con bloqueantes del TNF- α , lo que dificulta la interpretación directa de los resultados. Además, aunque se analiza el papel de las citocinas IL-10 e IL-17 en la formación de granulomas, el estudio no aborda el papel de otras citocinas relevantes, lo que limita la comprensión del proceso inmunológico en su totalidad. Finalmente, el análisis se limita a un periodo corto de tiempo, sin evaluar los efectos a largo plazo, la resolución de los granulomas ni su posible reactivación, lo cual es crucial para entender la naturaleza crónica de las infecciones tuberculosas.

4.1.4 MODELO TRIDIMENSIONAL POR ARBUÉS *et al.*, 2020 ^(12, 14-16)

Este modelo, explotado por primera vez por Arbués y colaboradores en el año 2020, está basado en el uso de PBMCs de donantes sanos infectadas con la cepa virulenta de *Mtb* H37Rv y embebidas en una matriz de colágeno tipo 1 y fibronectina, y fue desarrollado por Kapoor *et al.* en el año 2013. ⁽¹³⁾ Al igual que en el caso del modelo de microesferas de Tezera, una de las grandes ventajas que presentó el modelo fue la incorporación de esta matriz simulando las condiciones fisiológicas del entorno pulmonar. Asimismo, como se muestra en la Figura 13, otro aspecto ventajoso es la posibilidad de recuperar fácilmente tanto células del huésped como bacterias, lo que permite un análisis multiparamétrico celular y molecular proporcionando información clave para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y preventivas.

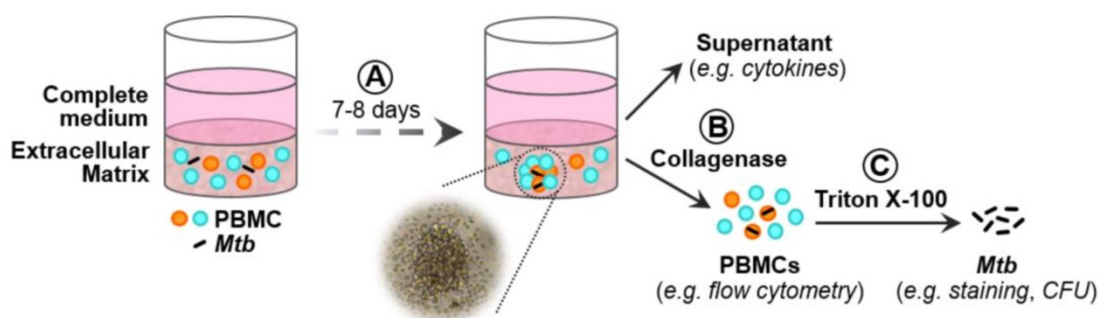


Figura 13: Esquema representativo del modelo tridimensional de granuloma *in vitro*. ⁽¹²⁾

Este modelo 3D permitió estudiar las características de *Mtb* durante el estado de latencia. Se describió que cuando *Mtb* entra en estado de dormancia almacena en su interior triacilglicéridos formando inclusiones lipídicas que pueden teñirse con el colorante rojo Nilo (Figura 14). Además, se observó que este cambio metabólico confería una tolerancia transitoria a los fármacos, ya que la bacteria entra en un estado de bajo consumo energético y división celular reduciendo su vulnerabilidad a los tratamientos.

Asimismo, el modelo es capaz de reproducir la resucitación de *Mtb* inducida por el debilitamiento del sistema inmunológico asociado al tratamiento con fármacos bloqueantes de TNF- α , como ya había sido descrito por el grupo de Kapoor y colaboradores. Por otra parte, en este estudio se evaluó por primera vez el potencial

riesgo de reactivación de la TB latente asociado al tratamiento con otros inmunomoduladores de uso clínico no dirigidos contra TNF- α , concretamente ustekinumab (un anticuerpo bloqueante de IL-12 e IL-23), anakinra (una forma recombinante del antagonista del receptor de IL-1) y secukinumab (un anticuerpo anti-IL-17). Los resultados obtenidos concluyeron que tanto ustekinumab como anakinra promovieron la resucitación de *Mtb*, mientras que secukinumab no. ⁽¹³⁾

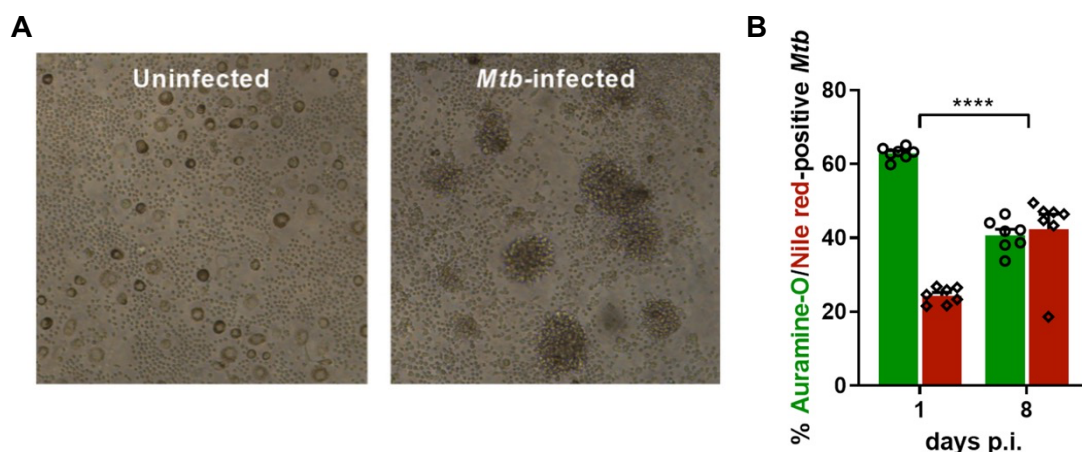


Figura 14: Los granulomas imitan las características del estado de latencia. ⁽¹⁴⁾ (A) Imágenes representativas de granulomas formados 8 días después de la infección, en comparación con PBMCs no infectadas. (B) Porcentajes de *Mtb* metabólicamente activas (Auramina-O positivas, en verde) y en estado de dormancia (rojo Nilo positivas, en rojo) cuantificadas por microscopía de fluorescencia antes (1 día post-infección) o después (8 días post-infección) de la formación de granulomas.

En el año 2021, ⁽¹⁵⁾ los autores realizaron una comparación directa entre dos modelos de granuloma *in vitro* basados en PBMCs infectadas con *Mtb*, uno en un entorno bidimensional (2D, sin matriz extracelular) y otro tridimensional (3D, con una matriz de colágeno y fibronectina). Mientras que en el modelo 2D se observaba una formación más rápida y mayor tamaño de los agregados celulares (lo que se asocia con una producción temprana de quimiocinas y activación de linfocitos), éstos presentaban además una carga bacteriana significativamente más alta.

Por el contrario, el modelo 3D con matriz, aunque se vio que retrasaba la formación de agregados y la activación inicial de las células inmunitarias, favorecía la supervivencia de los macrófagos y promovía una mayor liberación de GM-CSF (por sus siglas del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), lo que se correlaciona con un mejor control de la replicación de *Mtb*. Además, la presencia de la matriz induce un entorno hipóxico que impulsa a las bacterias a adquirir un

fenotipo de dormancia (con acumulación de lípidos), que no se reproduce en el modelo 2D.

Por tanto, este trabajo comparativo demuestra que la incorporación de una matriz extracelular no solo mejora la relevancia fisiopatológica del modelo *in vitro*, sino que también permite reproducir aspectos críticos de la respuesta inmune y la patogénesis de la TB observados en el contexto clínico. En conclusión, este modelo de granuloma *in vitro* resulta particularmente relevante para los estudios centrados en dormancia micobacteriana. Así como para comprender mejor los mecanismos involucrados en la reactivación.

Este modelo 3D comparte la limitación de todos los modelos basados en PBMCs de carecer de algunos tipos celulares relevantes, como por ejemplo los neutrófilos. A su vez, carece de vascularización y de células no hematopoyéticas, como por ejemplo las células epiteliales. Asimismo, presenta algunos desafíos técnicos, como la dificultad para añadir nuevas células inmunes, lo que limita la capacidad de estudiar interacciones celulares en tiempo real o evaluar como la respuesta inmune evoluciona en presencia de diferentes estímulos. Esto es debido a la encapsulación de las células en la matriz, lo que dificulta la adición de nuevas células inmunes una vez el granuloma ha sido formado.

Por último, **recientemente en el pasado año 2024, Arbués** y colaboradores ⁽¹⁶⁾ publicaron un nuevo estudio en el que se amplió el uso de este modelo 3D para demostrar que la diversidad genética del complejo *Mtb* afectaba a la interacción con las células inmunes humanas. La principal característica del estudio reside en que se llevó a cabo utilizando **cepas clínicas** representativas de cinco linajes, demostrando que los linajes modernos (L2 a L4, que suelen asociarse a epidemias de TB de propagación global) exhibían tasas de crecimiento superiores y generaban respuestas granulomatosas más marcadas que los linajes ancestrales (L1 y L5, representativos de cepas endémicas restringidas a un área geográfica determinada) (Figura 15). Además, se evidenció que una respuesta inmune protectora (caracterizada por la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ y la secreción de mediadores clave como la quimiocina CXCL9, la granzima B y el TNF- α) se correlacionaba negativamente con la proliferación bacteriana, y que la diversidad genética influía en la apoptosis de los macrófagos y en la morfología de

los granulomas, aportando nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias y estrategias de vacunación.

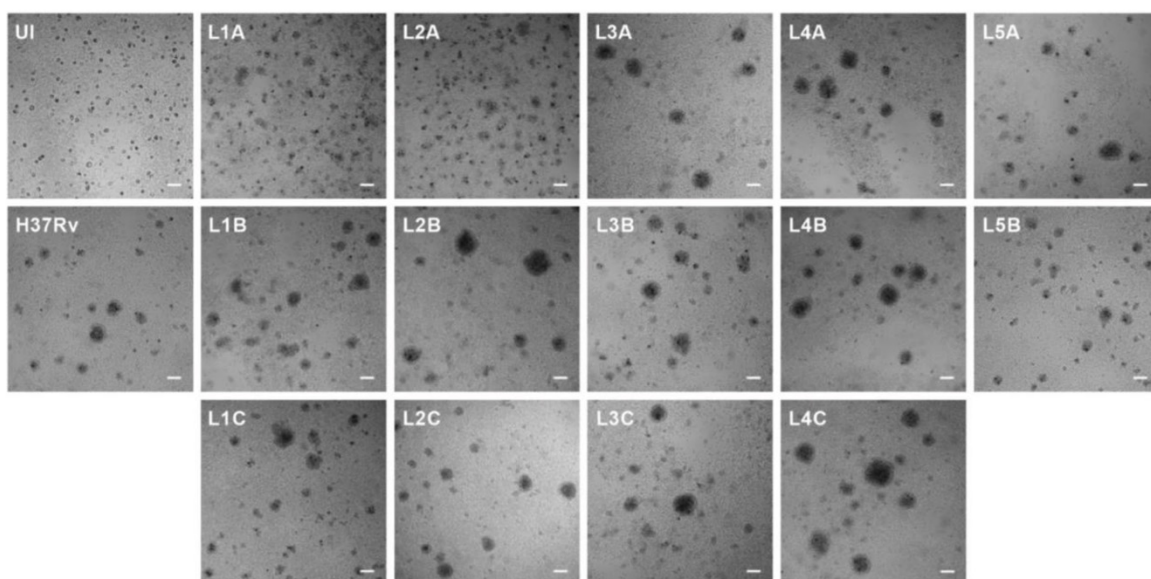


Figura 15: La diversidad en las cepas de *Mtb* se traduce en un espectro de respuestas granulomatosas relacionadas con el crecimiento bacteriano. ⁽¹⁶⁾ Imágenes representativas de los granulomas al 7º día.

Como se puede observar, este modelo celular descrito ha sido utilizado en diversos artículos científicos, asimismo sucede con el modelo de microesferas de Tezera y colaboradores, o con el modelo de esferoides de Mukundan (que será descrito con mayor profundidad en un apartado posterior), lo que demuestra su relevancia y gran potencial en la investigación.

4.1.5 MODELO MODULAR A MICROESCALA POR BERRY *et al.*, 2020 ⁽¹⁷⁾

La investigación presenta un modelo modular *in vitro* de granulomas a microescala para estudiar la señalización inmune en la TB. El modelo está compuesto por un sistema innovador que consiste en una plataforma basada en microfluidos de reciente desarrollo, conocida como “Stacks”, que contiene 24 pocillos individuales que permiten una fácil interacción entre diferentes capas de células y componentes del microambiente (Figura 16). Esta plataforma permite que las células no se encuentren adheridas a una superficie sólida (como ocurre en un cultivo tradicional), sino que se encuentren suspendidas en un entorno en 3D dentro de los microcanales, pudiendo moverse e interactuar.

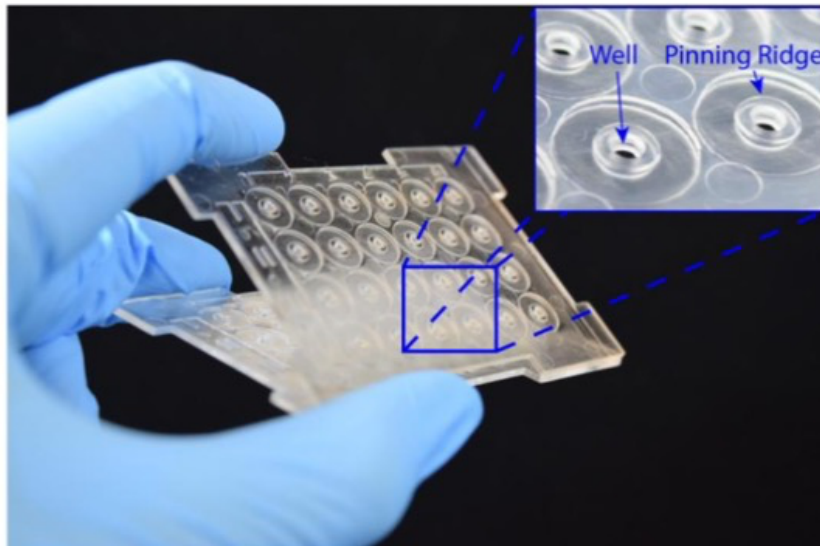


Figura 16: Plataforma microfluidica "Stacks".⁽¹⁷⁾

A diferencia de los anteriores modelos propuestos, en este estudio se utilizó la cepa *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) para inducir la formación de los granulomas *in vitro*. Se trata de una cepa de *M. bovis*, el agente etiológico de la TB bovina, atenuada mediante subcultivo que es la vacuna actual contra la TB. Por ello, cabe mencionar que la respuesta inmunológica inducida por BCG (tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*) puede diferir significativamente de la provocada por las cepas virulentas de *Mtb*.

Para la generación de los granulomas se utilizó como modelo celular único macrófagos derivados de monocitos (MDMs por sus siglas del inglés *monocyte-derived macrophages*), aislados a partir de PBMCs. Además, se incorporó una segunda capa, adaptada partir de un modelo de angiogénesis preexistente y diseñada específicamente para el cultivo de células endoteliales humanas procedentes de la vena umbilical sobre una matriz extracelular (matrigel), con el objetivo de replicar *in vitro* un entorno angiogénico que permitiera el estudio de la interacción entre los compartimentos vascular y granuloma. En concreto, se prepararon individualmente la capa de granuloma y la capa de células endoteliales como se muestra en el esquema representado en la Figura 17.

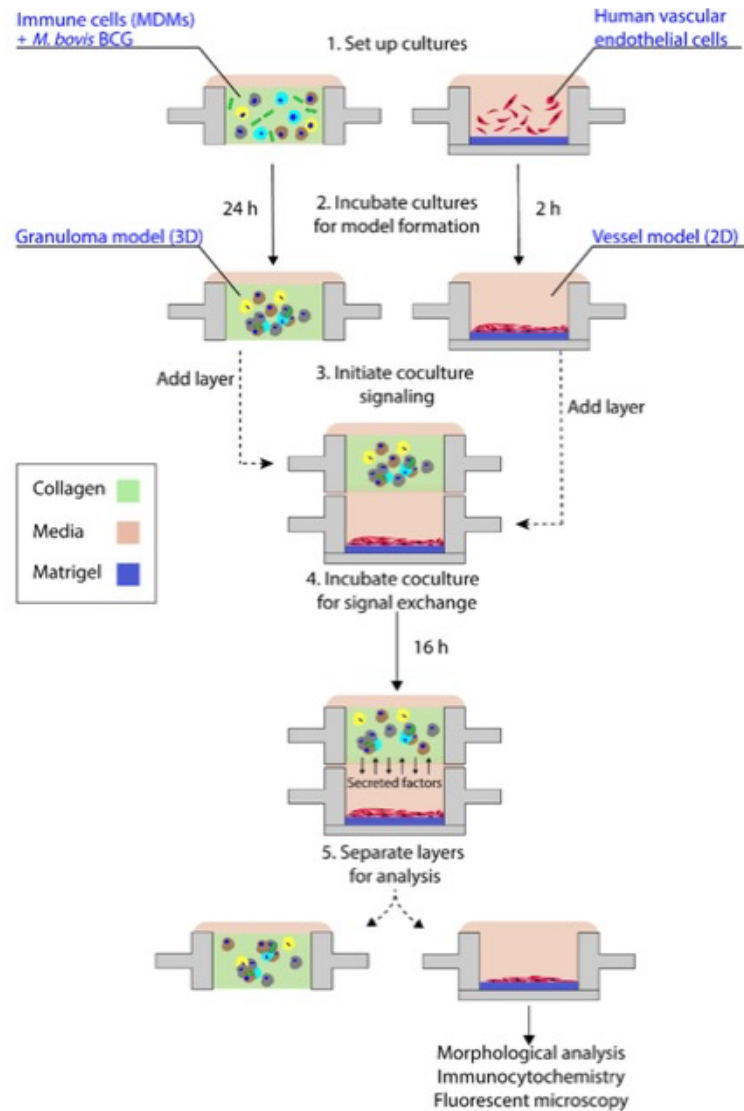


Figura 17: Esquema del flujo de trabajo para el co-cultivo de las capas de granuloma y endotelial. ⁽¹⁷⁾

Mientras que los MDMs fueron infectados con BCG e incubados durante 24 horas (capa para granulomas), la capa de células endoteliales fue sembrada 2 horas antes del ensamblaje y se observó su organización estructural tubular. Estas dos capas fueron posteriormente ensambladas compartiendo el medio de cultivo, permitiendo así la comunicación mediante factores solubles. Tras 16 horas de co-cultivo, se analizaron las células endoteliales para evaluar los efectos de la interacción con la capa para granulomas. Se observó que aquellas expuestas a MDMs infectados (+BCG) formaban estructuras más delgadas y con prolongaciones celulares dispersas, mientras que las que estuvieron en contacto con MDMs no infectados (-BCG) desarrollaron estructuras más anchas y con redes interconectadas (Figura 18). Dicha diferencia significativa en la morfología vascular

entre los cultivos expuestos a MDMs infectados y no infectados sugirió que la infección con BCG tiene un impacto en la angiogénesis.

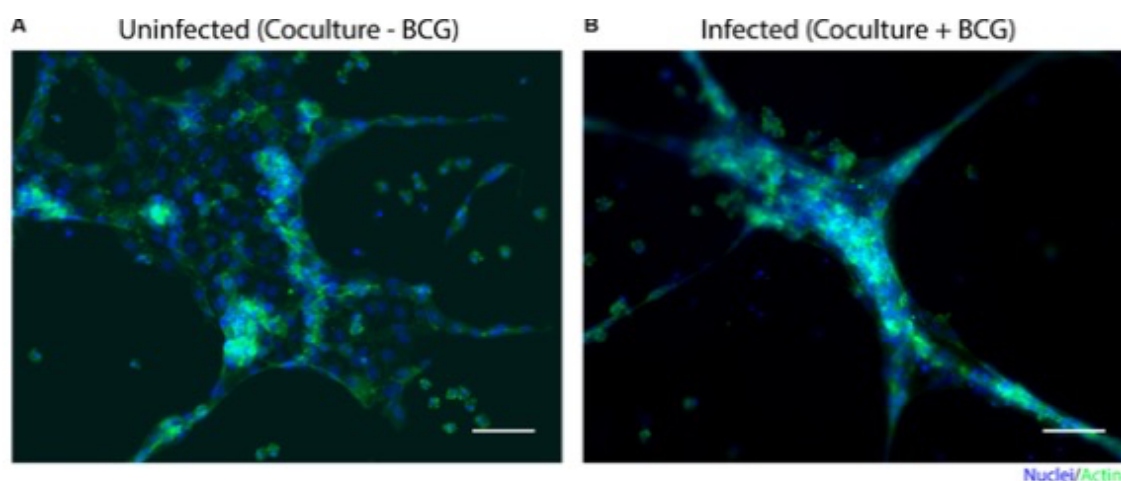


Figura 18: El co-cultivo de la capa endotelial junto con la capa para granulomas modifica la forma de las estructuras endoteliales multicelulares.⁽¹⁷⁾ En las imágenes se puede ver una capa endotelial tras 16 horas de cultivo con una capa que no está infectada (-BCG) **(A)** y otra que sí lo está (+BCG) **(B)**. Los núcleos de las células endoteliales están teñidos en azul y su citoesqueleto de actina en verde.

Asimismo, se analizaron tres factores solubles proinflamatorios y se compararon los resultados entre capas infectadas y no infectadas. Por un lado, las citocinas IL-6 y TNF- α mostraron una secreción significativamente mayor en las capas infectadas, alcanzando su nivel máximo el primer día post-infección. Por otro lado, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas del inglés *vascular endothelial growth factor*) también se encontró en niveles significativamente más altos en las capas infectadas, sin embargo, a diferencia de los otros dos factores, su pico de secreción ocurrió en el segundo día post infección. En general, la secreción de IL-6, TNF- α y VEGF disminuyó con el tiempo, coincidiendo con la formación de agregados celulares (granulomas) a partir del tercer día post infección. Estos resultados sugieren que la plataforma utilizada, pese a su miniaturización, permite detectar aumentos en la secreción de factores solubles inducidos por la infección.

Tras los resultados anteriores expuestos, resulta evidente que la interacción entre la capa para granulomas y la capa endotelial genera cambios en la forma y organización de las células endoteliales y desde la publicación se propone que estos cambios se deben, al menos en parte, a la secreción aumentada de factores

solubles como el VEGF, una molécula clave en la angiogénesis. Sin embargo, los autores reconocen que pueden existir otros factores no medidos que también podrían influir en la morfología observada, lo que refuerza la idea de que el granuloma no es una estructura aislada, sino que interactúa activamente con su entorno.

El modelo permitió su seguimiento de la formación de granulomas durante un **máximo de 5 días**, lo que constituye el período de estudio más corto entre los modelos seleccionados. Sin embargo, una de las principales limitaciones a destacar radica en que las células endoteliales y las PBMCs utilizadas no proceden del mismo donante, de manera que no es posible la inclusión de células de la inmunidad adaptativa (como los linfocitos T), ya que podría desencadenarse una respuesta alogénica que comprometería la integridad del modelo. Es por este motivo que los investigadores se limitaron a utilizar exclusivamente macrófagos, en consecuencia, los agregados celulares no pudieron adquirir la característica estructura de granuloma propiamente dicha, puesto que carecían de la capa externa de linfocitos que lo rodea.

Por otra parte, el modelo presentó otras limitaciones que afectaron al alcance de los análisis. Aunque el modelo permitió el análisis de factores solubles, debido a la limitación en el volumen de sobrenadante disponible, las muestras de varios pocillos tuvieron que ser agrupadas para poder llevarlo a cabo, lo que impidió obtener datos específicos de un solo pocillo. En segundo lugar, la formación de agregados multicelulares de macrófagos (granulomas) en torno a las micobacterias en las capas destinadas a la formación de granulomas se observó a partir del tercer día post-infección, mientras que el co-cultivo con células endoteliales tuvo que ser limitado a sólo 16 horas debido a la inestabilidad de la red de túbulos endoteliales, que se descompone a partir de las 18 horas de cultivo. La combinación de estos hechos redujo el tiempo de observación de la interacción entre las capas para granulomas y las células endoteliales a un breve periodo de tiempo durante el cual la formación de granulomas aún no se había producido.

Se concluye la descripción de este modelo con su principal ventaja, que consiste en su miniaturización, ya que reduce el volumen de los cultivos a 4 µL/pocillo, lo que supone una disminución de más de 10 veces en el uso de células y reactivos

en comparación con modelos anteriores. Cabe destacar además que el modelo logra incorporar la interacción con el sistema vascular. Sin embargo, debido a las limitaciones temporales impuestas por el diseño del modelo, únicamente es posible analizar dicha interacción de los macrófagos infectados de forma individual y no de los agregados multicelulares que se asemejan más a granulomas.

4.1.6 MODELO ESFEROIDE 3D POR MUKUNDAN *et al.*, 2021 ^(18,19)

El modelo propuesto en este estudio supone un cambio de enfoque significativo pues, hasta ahora, el desarrollo de modelos tridimensionales que imitasen los eventos tempranos de la patogénesis de *Mtb* tenían un bajo rendimiento, precisaban de matriz extracelular y no se habían utilizado, como en este caso, para el estudio de la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Así pues, este es el primer modelo de granuloma 3D *in vitro* que demuestra la viabilidad de estudiar simultáneamente VIH-TB.

Los investigadores reportan la generación de un **modelo 3D sin matriz**, al cual a partir de este momento se denominará **esferoide 3D**, utilizando monocitos/macrófagos humanos derivados de **células THP-1** junto con BCG modificada genéticamente para expresar la proteína fluorescente roja mCherry.

Las células THP-1, son una línea celular humana derivada de la sangre de un paciente con leucemia monocítica aguda, cultivadas y mantenidas en laboratorio desde el año de su descubrimiento en 1980. Estas células se asemejan a monocitos primarios y pueden ser diferenciadas a macrófagos mediante la estimulación con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), de forma que se utilizan en investigación como modelo para estudiar la biología de monocitos y macrófagos *in vitro*.

En este modelo las células THP-1 se cultivaron en presencia de BCG mCherry en una placa con fondo en U tratada para evitar la adherencia de las células, permitiendo de esta forma que pudieran agregarse y formar esferoides tridimensionales (Figura 19). Los investigadores observaron que el incremento de la multiplicidad de infección (MOI, del inglés *multiplicity of infection*) se traducía en un aumento en el tamaño de los esferoides.

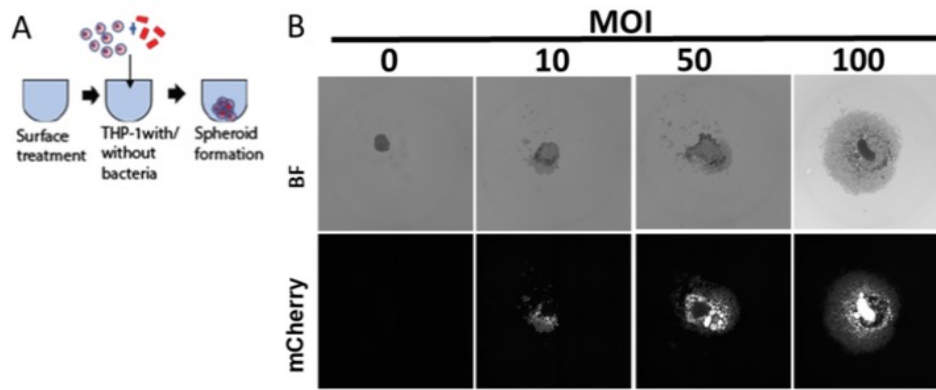


Figura 19: Formación de esferoides 3D y modelización de la infección micobacteriana. ⁽¹⁸⁾ (A) Esquema de la formación de esferoides en pocillos con fondo en U. (B) El área del esferoide aumenta con el incremento de la multiplicidad de infección (MOI).

Los investigadores mejoraron aún más el modelo al coinfectar los THP-1 tanto con BCG mCherry como con VIH pseudotipado, con un objetivo claro: estudiar las interacciones entre TB y el VIH para proporcionar información sobre el papel de la inmunodeficiencia en los granulomas. En el estudio se observó que la presencia de VIH aumentaba la expresión de mCherry lo que indicaba una proliferación bacteriana activa en los esferoides THP-1. Asimismo, se comprobó que la infección por VIH provocaba una interrupción total de la formación correcta de esferoides, observando que a medida que aumentaba su concentración la integridad estructural de los esferoides se veía comprometida (Figura 20). Esta alteración es importante pues puede reflejar el efecto perjudicial del VIH sobre la respuesta inmunitaria y la formación de granulomas, esenciales para contener la infección tuberculosa.

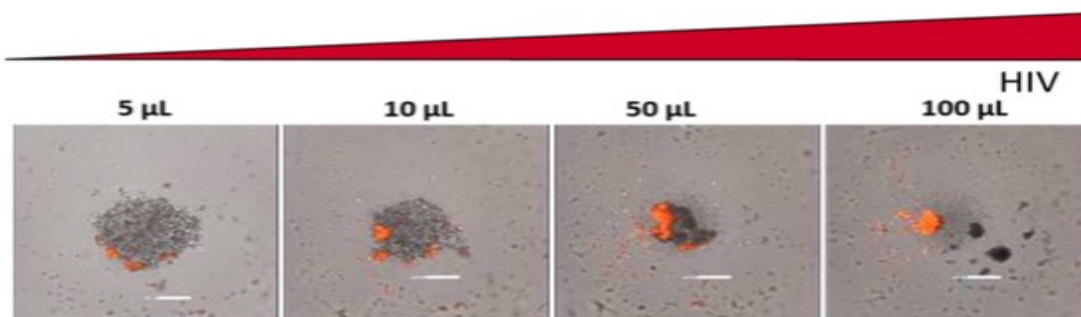


Figura 20: Imágenes de células THP-1 coinfectadas con BCG mCherry (rojo) y virus pseudotipado del VIH. ⁽¹⁸⁾

Para determinar la aplicación de este modelo al estudio de los fármacos antituberculosos se utilizaron nuevamente las mediciones de intensidad del

marcador fluorescente en respuesta a isoniazida (INH) y rifampicina (RIF) junto con Everolimus (EVR), un fármaco inmunosupresor inhibidor de la vía mTOR que había demostrado en estudios anteriores actividad bactericida en agregados de PBMCs infectados con *Mtb*. En este estudio se utilizó con la finalidad de explorar su posible acción como molécula terapéutica adyuvante dirigida al huésped en el tratamiento de la TB.

La vía mTOR es crucial para el crecimiento, proliferación y supervivencia celular y su inhibición aumenta el fenómeno de la autofagia. Dado que la autofagia es uno de los mecanismos clave involucrados en la eliminación de *Mtb* por las células del huésped se analizaron los esferoides con marcadores de autofagia (Figura 21).

Se observó que la combinación de los tres fármacos conducía a una reducción máxima de la intensidad, en comparación con el uso de uno solo. Así pues, estos modelos pueden ayudar a mejorar la comprensión de las interacciones VIH-TB y desarrollar mejores estrategias de tratamiento farmacológico.

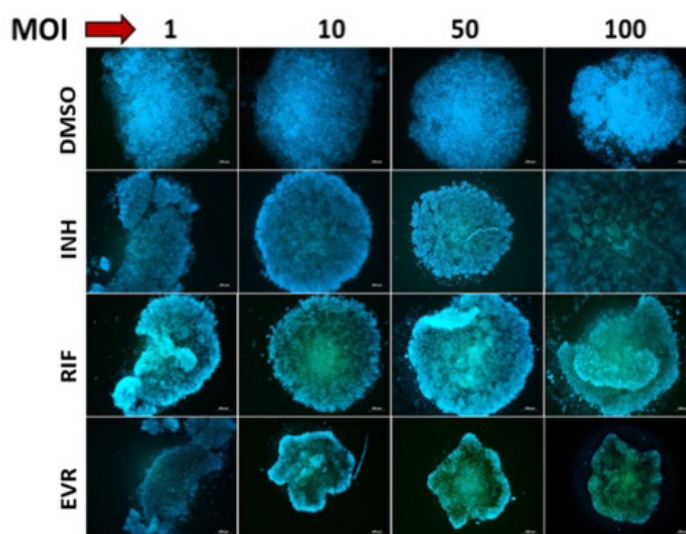


Figura 21: Evaluación de la respuesta a fármacos mediante citometría de imagen. ⁽¹⁸⁾ De izquierda a derecha imágenes correspondientes al aumento de la carga bacteriana. De arriba abajo, se muestran imágenes referentes a las diferentes condiciones de tratamiento, desde grupo control (sin tratamiento) y los fármacos INH, RIF y EVR. Los esferoides se tiñeron con el colorante de autofagia CYTOID (verde) y Hoechst (azul). Se observa la inducción de la autofagia en los esferoides infectados con BCG mCherry con el tratamiento farmacológico, especialmente en el grupo tratado con EVR

Como limitaciones, no se aborda la importancia del microambiente como factor contribuyente en la patogénesis; oxigenación, estructura de tejido o vascularización. Por otro lado, siguen faltando datos de seguimiento a largo plazo

de estos modelos a consecuencia de la limitada viabilidad celular y, por tanto, no han conseguido simular la cronificación de la TB por el momento.

Por último, las células THP-1 no son representativas completamente del sistema inmune. A diferencia de las PBMCs, que como ya se ha detallado en modelos anteriores de granuloma *in vitro*, se obtienen directamente de donantes, aportando una población celular heterogénea, representativa del sistema inmunológico real de cada sujeto, con la variabilidad inter-individual correspondiente, las THP-1 son una línea celular monocítica inmortalizada. ⁽²⁰⁾ Las principales diferencias entre estos dos modelos celulares se recogen en la Tabla 1.

	Células THP-1	PBMCs
Origen	Línea celular derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda.	Células primarias aisladas de la sangre periférica de donantes.
Descripción	Monocitos inmortalizados	Mezcla de monocitos, linfocitos T y B, células dendríticas y Natural Killers.
Diferenciación a macrófagos	Tratamiento con PMA.	Estímulos naturales.
Variabilidad	Homogénea (es la misma línea celular)	Variación según el donante (heterogeneidad inter-individual).
Importancia en investigación de TB	Modelo reproducible, de mayor rendimiento.	Representación fisiológica del sistema inmune humano.

Tabla 1: Principales diferencias entre células THP-1 y PBMCs. (Fuente: elaboración propia)

En el mismo año, Mukundan y colaboradores publican un segundo artículo en el que expanden el uso del modelo esferoide 3D, dejando de lado la coinfección con VIH. ⁽¹⁹⁾ Para este estudio, además de BCG mCherry, se utilizaron varias cepas virulentas de *Mtb*: H37Rv, la cepa hipervirulenta HN878 y la cepa hiperinmunogénica CDC1551.

El uso de *Mtb* H37Rv permitió demostrar que los esferoides reproducían características clave de los granulomas tuberculosos en humanos, como la formación de un núcleo necrótico central donde se localizaban las micobacterias (Figura 22) y la generación de un ambiente hipóxico. Para analizar la respuesta inflamatoria se midieron los niveles de citocinas, mostrando que los esferoides infectados con la cepa *Mtb* H37Rv tenían niveles elevados de TNF- α en comparación con los controles no infectados. Además, se detectó un aumento en la producción de VEGF (fundamental en la angiogénesis) y G-CSF (importante para la proliferación y diferenciación de células inmunitarias), dos factores de crecimiento relacionados con la hipoxia. Estos resultados confirman que el modelo de esferoides no solo reproduce la hipoxia característica de los granulomas tuberculosos, sino que también genera una respuesta inflamatoria similar a la observada en la TB humana.

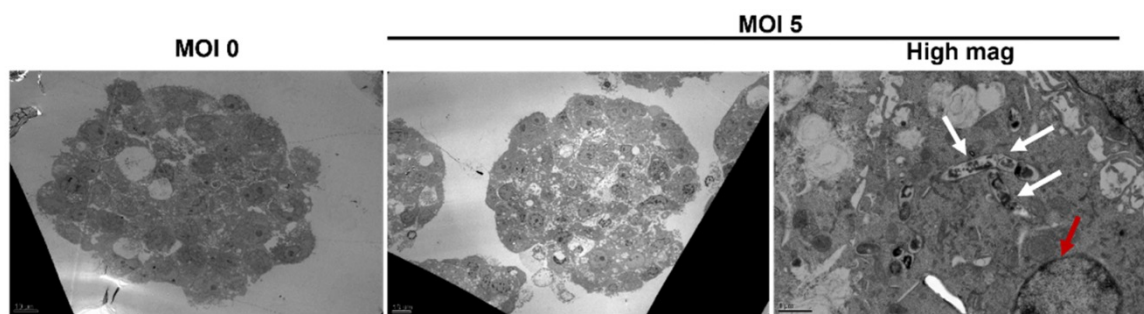


Figura 22: Imagen de microscopía electrónica representativa del esferoide. ⁽¹⁹⁾ A mayor aumento (High mag) se observa marcada con flechas blancas la ubicación de BCG dentro de un macrófago. Señalada con flecha roja se destaca un área de necrosis.

El modelo también fue utilizado para evaluar el impacto de la cepa de *Mtb* en la respuesta a los antibióticos INH y RIF. Se observó que los esferoides infectados con *Mtb* HN878 o CDC1551 responden de manera distinta a estos fármacos. En particular, la cepa HN878, caracterizada por su mayor virulencia, mostró una mayor resistencia a los antibióticos en comparación con la cepa CDC1551. Estos resultados indican que el modelo puede ser útil para estudiar la efectividad de tratamientos antituberculosos y la influencia de la variabilidad bacteriana en la respuesta terapéutica.

Finalmente, los investigadores adaptaron el modelo esferoide para incluir PBMCs y que fuera más representativo de la diversidad de tipos celulares presentes en los

granulomas tuberculosos. Mediante la adición de fibroblastos pulmonares se logró la formación de esferoides más compactos y con una organización celular que imitaba la fibrosis que se observa en los granulomas humanos (Figura 23). La presencia de fibroblastos en la periferia de los esferoides sugiere que este tipo de células puede desempeñar un papel clave en la estabilización y evolución de la estructura granulomatosa.

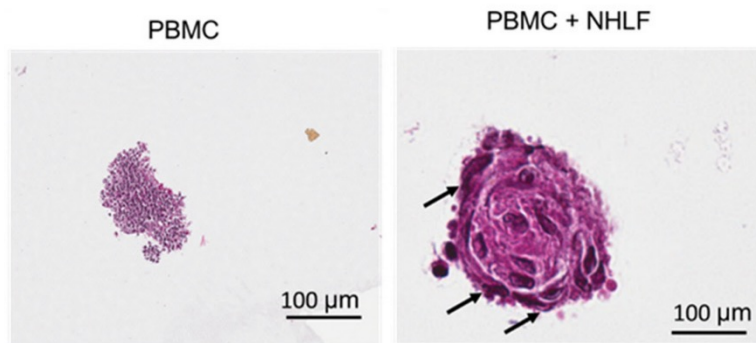


Figura 23: Imagen representativa de los esferoides de PBMCs en monocultivo (izquierda) o co-cultivo con fibroblastos pulmonares (derecha).⁽¹⁹⁾ Tinción con hematoxilina-eosina. Las flechas indican los fibroblastos presentes en la periferia.

4.2 ORGANOIDES

Los organoides son microtejidos multicelulares tridimensionales diseñados en el laboratorio con la finalidad de recrear la estructura compleja y la organización funcional de un órgano humano, como, por ejemplo, el de un pulmón (Figura 24). Consisten en una representación reducida y simplificada del órgano pudiendo llegar a tener las mismas características estructurales y funcionales del mismo.^(21,6)

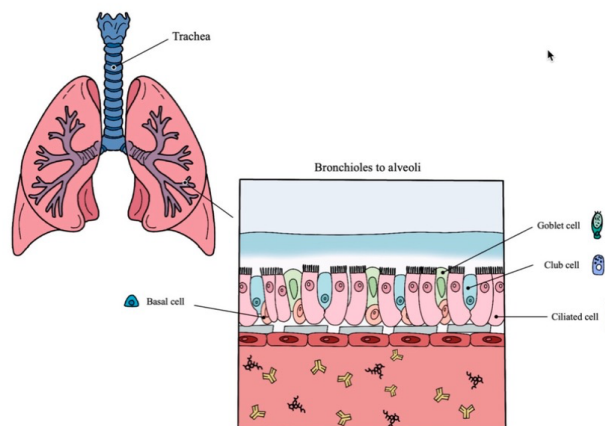


Figura 24: Imagen representativa de los principales tipos celulares presentes en el sistema respiratorio.⁽⁶⁾

Estos microtejidos 3D son desarrollados *in vitro* a partir de células madre pluripotentes inducidas (con las siglas en inglés iPSCs) o células madre adultas (ASC por sus siglas del inglés *adult stem cells*) capaces de proliferar y diferenciarse hacia células especializadas similares a las que forman los órganos verdaderos *in vivo*. Durante este proceso, las células se autoensamblan en estructuras esféricas, como se muestra en la Figura 25. ⁽²²⁾

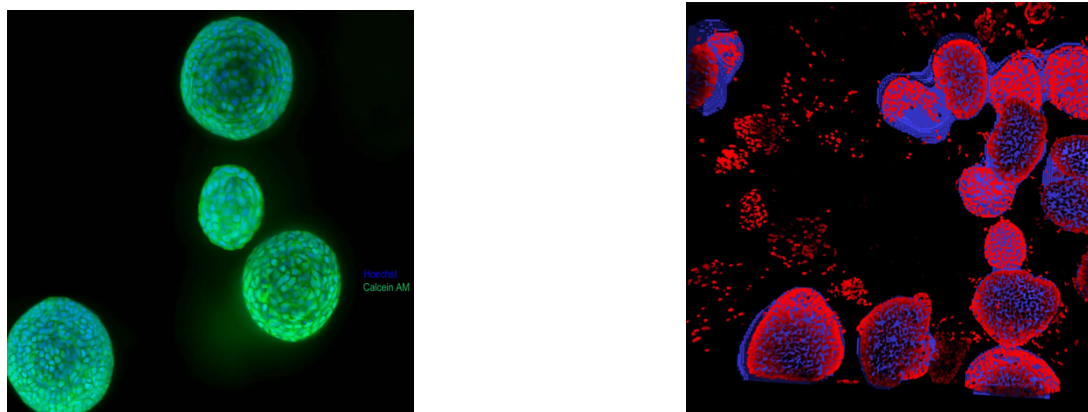


Figura 25: Imágenes representativas de organoides pulmonares. ⁽²¹⁾

A diferencia de los esferoides revisados en apartados previos, los organoides están conformados por una estructura celular más compleja, presentan además capacidad de autorrenovación y precisan de andamiajes extracelulares (matriz extracelular). Aunque los estudios que utilizan dichos modelos en combinación con *Mtb* son actualmente escasos, han resultado ser de gran importancia para desentrañar aún más las fases tempranas de la TB.

En función de las estructuras que van a representar, los organoides pulmonares pueden dividirse en diferentes categorías: organoides alveolares, bronquiales, bronquioalveolares, pulmonares y traqueoesferas. Como se muestra en la Figura 26, los organoides bronquiales se asemejan a las vías respiratorias conductoras más pequeñas, por lo que las células basales, ciliadas y productoras de moco se encuentran principalmente en los mismos. En cambio, los organoides alveolares se asemejan a la estructura de los alvéolos y, por tanto, están formados principalmente por neumocitos tipo 1 (AT1) y neumocitos tipo 2 (AT2) ⁽²²⁾

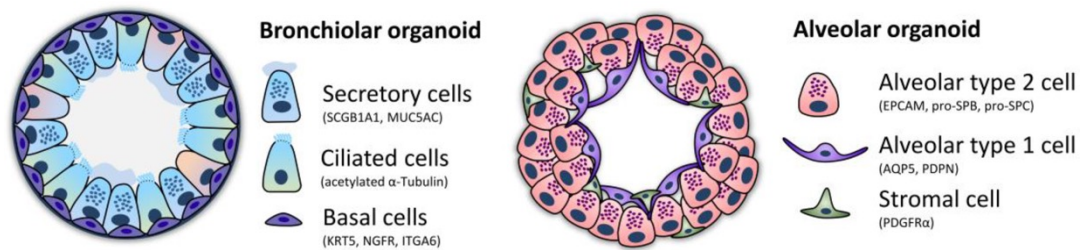


Figura 26: Representación esquemática de los principales tipos celulares en organoides bronquiales y alveolares. ⁽²²⁾

Tras la revisión de la literatura, a continuación, se describen los principales y más representativos estudios en los que se desarrollaron modelos de organoide para la investigación en TB (y sus principales características se resumen en el Anexo 2). Sin embargo, cabe destacar que los modelos que han conseguido aplicarse específicamente al estudio de esta enfermedad son todavía muy escasos. Esto se refleja en un menor número de referencias (si bien todas ellas son de publicación muy reciente) en comparación con los modelos de granuloma, cuyo desarrollo ha sido más amplio y consolidado en el tiempo.

4.2.1 ORGANOIDE PULMONAR POR BRAIAN *et al.*, 2015

En el año 2014 Parasa y colaboradores ⁽²³⁾ publican el primer modelo de tejido pulmonar descrito para la TB. Completamente innovador, demostró su capacidad para replicar aspectos fisiológicos de la infección por *Mtb*, incluyendo la migración de macrófagos y la formación temprana de granulomas. Un año más tarde, el grupo de Braian y colaboradores ⁽²⁴⁾, refinaron el modelo desarrollado por Parasa adaptándolo hacia la realización de estudios funcionales de la interacción huésped-patógeno, con un enfoque en la formación temprana de granulomas. Su trabajo se dirigió en mejorar la capacidad del modelo anterior para analizar interacciones funcionales mediante técnicas de análisis tridimensional y cuantificación de imágenes.

Como se muestra en el panel A de la Figura 27, para la reconstrucción del modelo de tejido pulmonar tridimensional *in vitro*, se partió de una línea celular de fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5) embebidos en una matriz compuesta de colágeno tipo I. Sobre dicha capa se añadió una mezcla de monocitos humanos aislados de sangre periférica de donantes sanos anónimos, que se marcaron con tinte rojo (PKH26) para el seguimiento celular, y macrófagos (diferenciados a partir

de monocitos) que se infectaron con *Mtb* H37Rv modificada para expresar una proteína fluorescente verde (GFP). Finalmente, se sembraron células epiteliales bronquiales específicas de pulmón (línea celular 16HBE14o-).

Una vez que las células epiteliales conforman una capa adecuada en el interior del sistema, se realiza la retirada de una parte del medio de cultivo en la zona apical para garantizar la exposición al aire, dejando en la parte inferior una nutrición óptima. El mantenimiento de estas condiciones induce la formación de un epitelio estratificado, la secreción de mucosidad en la capa expuesta al aire y la secreción de proteínas componentes de la matriz extracelular. Se monitoriza la infección y los cambios tisulares 7 días después de la implantación de los macrófagos infectados. En la Figura 27 (panel B) se muestran imágenes del estudio representativas del tejido infectado y no infectado con *Mtb*. En este modelo la infección experimental con *Mtb* virulenta induce la agrupación de monocitos y macrófagos en el sitio de la infección, emulando la formación de granulomas tempranos.

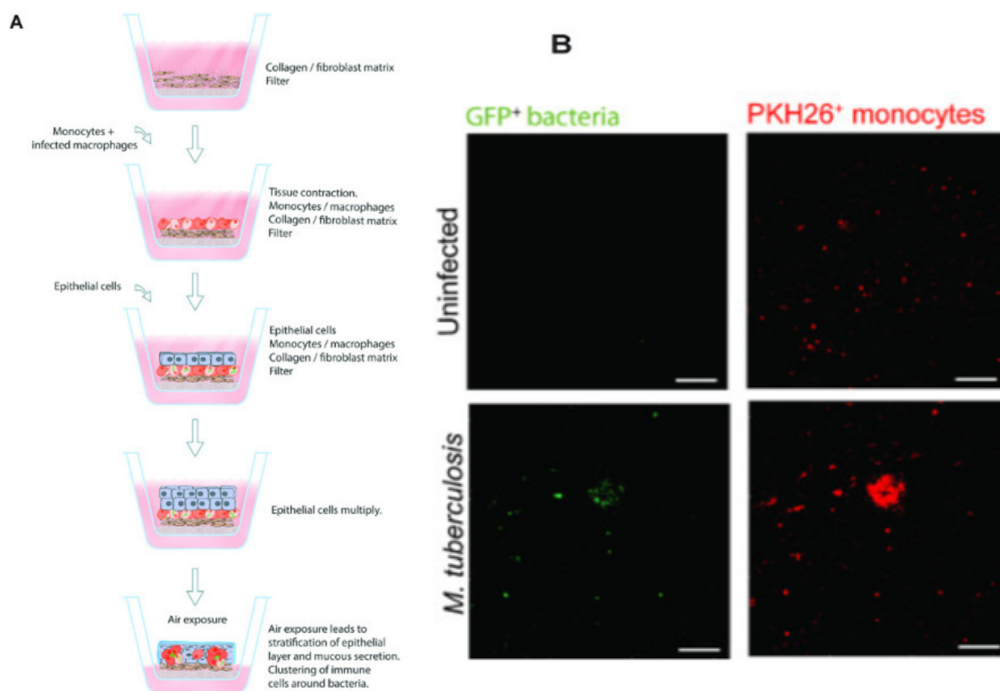


Figura 27: (A) Esquema del modelo de tejido pulmonar. (B) Los monocitos se agrupan alrededor de *Mtb* virulenta. ⁽²⁴⁾

Además de la cepa de *Mtb* virulenta H37Rv, se estudiaron cepas mutantes que habían sido genéticamente modificadas para no secretar el factor de virulencia ESAT-6 y así establecer un marco comparativo. Se comprobó que las cepas mutantes defectuosas en la secreción de ESAT-6 no generan estas estructuras.

Este factor de virulencia se ha vinculado a la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa, promoviendo la atracción de células inmunitarias al sitio de infección. Es por ello que las cepas bacterianas deficientes en ESAT-6 son controladas mejor por los macrófagos y, por tanto, la inflamación que inducen es menor. La comprensión de este papel ha abierto oportunidades para el desarrollo de terapias dirigidas, constituyendo la deficiencia en ESAT-6 en una de las bases de la atenuación de BCG la actual vacuna contra la TB. ⁽²⁵⁾

Aunque el modelo presenta algunas limitaciones, como el uso exclusivo de colágeno tipo I y la ausencia de ciertas células inmunitarias (neutrófilos y linfocitos), ofrece un microambiente tisular relevante para investigar mecanismos de inmunidad innata y procesos de defensa del huésped, siendo aplicable tanto a estudios básicos como a investigaciones de diversas enfermedades pulmonares.

4.2.2 ORGANOIDE BRONQUIOLAR POR IAKOBACHVILI *et al.*, 2022 ⁽²⁶⁾

En este estudio se exploró el potencial de los organoides de vías respiratorias humanas como sistema en el que poder evaluar los primeros pasos de la infección por micobacterias a partir del estudio de la interacción de las mismas con las células epiteliales que conforman el modelo.

El proceso de obtención de estos organoides fue diferente, puesto que se derivaron de tejido pulmonar sano obtenido de cinco donantes independientes que estaban siendo sometidos a una intervención quirúrgica como parte de su tratamiento para el cáncer de pulmón. Además, a diferencia de todos los modelos anteriores en los que la infección se llevaba a cabo simplemente mezclando las células con *Mtb*, en este caso se requiere el uso de un micro-inyector (Figura 28).

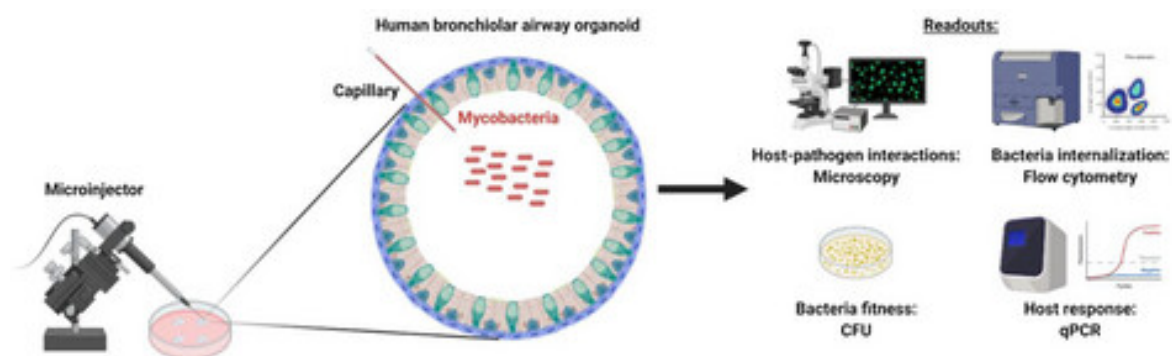


Figura 28: Imagen esquemática representativa de la infección del organoide bronquiolar. ⁽²⁶⁾

Para generar este **organoide bronquiolar**, se utilizaron ASC que estaban presentes en el epitelio de las vías respiratorias, que proliferaron y se diferenciaron en células del epitelio bronquial: basales, secretoras y ciliadas. Sin embargo, como característica diferencial de este modelo, al contrario que las iPSCs que se han utilizado en otros modelos de organoide, las ASC no tienen capacidad para dar lugar a neumocitos. Si bien los neumocitos son importantes para la replicación de *Mtb*, la región bronquial es el principal punto de entrada del patógeno. Por lo tanto, este modelo de organoide se centra en los eventos tempranos de la infección en la vía aérea, pero no en el nicho replicativo en el alvéolo.

Fueron estudiadas dos especies de micobacterias diferentes con el objetivo de observar la respuesta del organoide a la infección y la interacción de la micobacteria con el epitelio. Por un lado, se utilizaron *Mtb* H37Rv (que expresaba la proteína fluorescente roja DsRed para facilitar su visualización) y BCG (con el objetivo principal de poder estudiar la interacción entre macrófagos y organoides infectados en el contexto de un modelo de menor riesgo). Por otro lado, se incluyó la micobacteria no tuberculosa *Mycobacterium abscessus* (*Mabs*), que causa infecciones pulmonares en individuos vulnerables con patologías pulmonares previas (como, por ejemplo, la fibrosis quística), si bien no son frecuentes en individuos sanos, cuya incidencia a nivel mundial se está viendo incrementada y que tiene la característica añadida de que es una de las más resistentes a antibióticos.

Los resultados obtenidos mostraron que las micobacterias se podían encontrar fácilmente en el lumen de los organoides con cierta internalización por las células epiteliales de las vías respiratorias (Figura 29). Si bien el crecimiento de *Mtb* estuvo controlado, *Mabs* replicó muy fácilmente. En respuesta a la infección por *Mtb* se demostró que en los organoides se indujo la expresión de ciertos péptidos antimicrobianos y, curiosamente, tanto *Mtb* como *Mabs* inhibieron la producción de mucinas que funcionan en la eliminación de patógenos. En cuanto al uso de BCG, utilizada para modelar la interacción organoide-macrófago, se observó que estos últimos migraban hacia el organoide e interaccionaban con el borde basal rodeándolo y fagocitando a las micobacterias, sin embargo, no fueron capaces de atravesar la base para internalizarse en el lumen de los organoides. Esto demuestra que, al no encontrarse las bacterias expuestas a la acción directa de

los macrófagos en el lumen, permanecen en un entorno relativamente protegido donde pueden persistir y proliferar, especialmente en el caso de *Mabs*, por lo tanto, resalta la importancia de la necesidad de otros mecanismos de control de la infección.

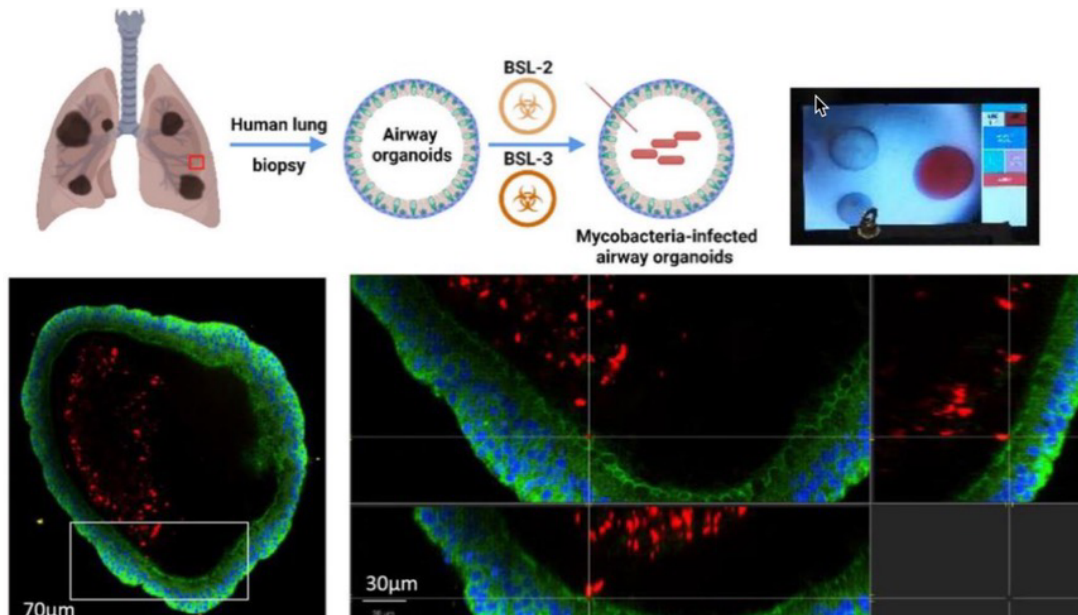


Figura 29: Imagen esquemática de organoides de las vías respiratorias humanas infectados con *Mtb* y *Mabs*. En la imagen inferior se muestra la presencia de *Mtb* (marcada con la proteína fluorescente roja DsRed) dentro de los organoides bronquiolares cuatro días después de la inyección. ⁽²⁶⁾

Es importante destacar las principales limitaciones de este sistema: en primer lugar, la disponibilidad del material de partida (tejido pulmonar de donante sano) es muy limitada ya que requiere de una intervención quirúrgica; por otro lado, la necesidad de un sistema de microinyección para la infección hace que en muchos laboratorios no pueda implementarse. A su vez, al tratarse de una estructura quística cerrada, es notable la ausencia de una **interfase aire-líquido** (ALI por sus siglas en inglés) de forma que carece de la exposición directa a un entorno gaseoso, como ocurre con el epitelio respiratorio pulmonar en condiciones fisiológicas. Esta exposición es crucial para modelar con precisión ciertos aspectos de la fisiología pulmonar, como por ejemplo el comportamiento del moco, ya que se produce y se moviliza en respuesta al contacto con las partículas inhaladas y el aire inspirado. Finalmente, como se ha comentado previamente, el modelo carece de neumocitos, por lo que no puede simular al completo la interacción de las micobacterias con los alveolos.

4.2.3 ORGANOIDE ALVEOLAR POR KIM *et al.*, 2024 ⁽²⁷⁾

Este estudio presenta un modelo de infección por *Mtb* H37Rv utilizando **organoides pulmonares alveolares** creados a partir de células madre pluripotentes humanas diferenciándolas en células epiteliales pulmonares que incluyeron AT1, AT2 y secretoras de moco, así como una menor proporción de células representativas de las vías respiratorias inferiores: células club, caliciformes y basales. Como mantenimiento y soporte para el cultivo inicial se utilizó una matriz extracelular sintética conocida como Matrigel, cuyo componente principal es el colágeno tipo IV. El modelo incorporó macrófagos humanos obtenidos a partir de la línea celular THP-1, marcados con GFP para su visualización, que fueron microinyectados junto con *Mtb* modificada para expresar una proteína fluorescente roja (RFP) en el lumen de los organoides (Figura 30).

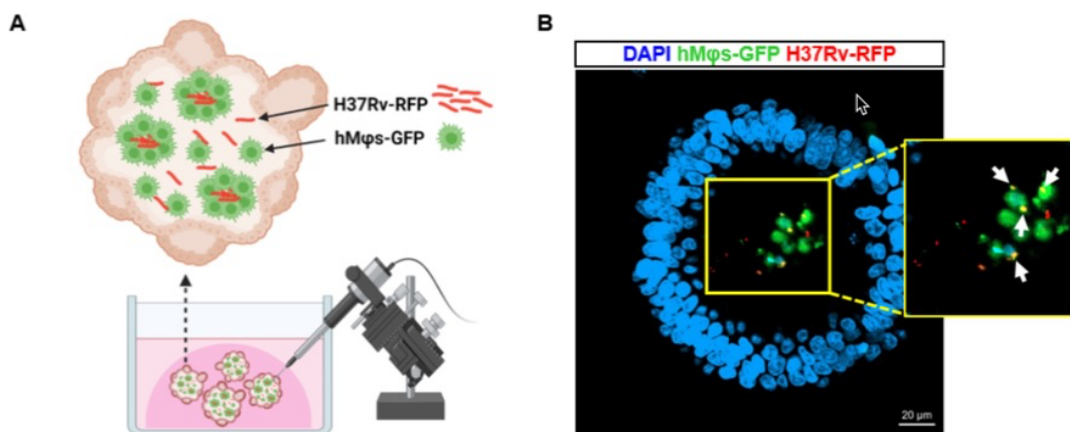


Figura 30: Establecimiento de un modelo organoide con infección por *Mtb* H37Rv. Panel A: esquema representativo de la infección en el modelo. Panel B: Imágenes de fluorescencia del organoide. ⁽²⁷⁾

Este sistema, con estructura 3D, permitió observar la interacción de *Mtb* con los macrófagos. El modelo facilitó el cultivo a largo plazo manteniendo la estructura y la infección durante múltiples pasajes (en total 4), un procedimiento clave para el mantenimiento y la expansión del modelo. Este proceso implica dividir y cultivar nuevamente los organoides para asegurar su viabilidad a largo plazo, siendo necesarios puesto que, con el tiempo, pueden crecer demasiado o perder su estructura y funcionalidad. Durante los pasajes, los organoides se extraen de la matriz de Matrigel en la que se cultivan, se fragmentan mecánicamente en grupos de células más pequeños y luego se reinyectan en nuevo Matrigel fresco

mezclado con medio de cultivo. Este procedimiento no solo mantiene la estructura tridimensional de los organoides, sino que también permite la multiplicación celular y la obtención de un mayor número de organoides infectados, lo que es esencial para la realización de múltiples experimentos. Además, prolongan la vida del modelo, permitiendo la evaluación de tratamientos y la dinámica de la enfermedad durante periodos extensos, como se demostró en este estudio donde se logró mantener durante 4 semanas realizando pasajes cada 7 días (Figura 31).

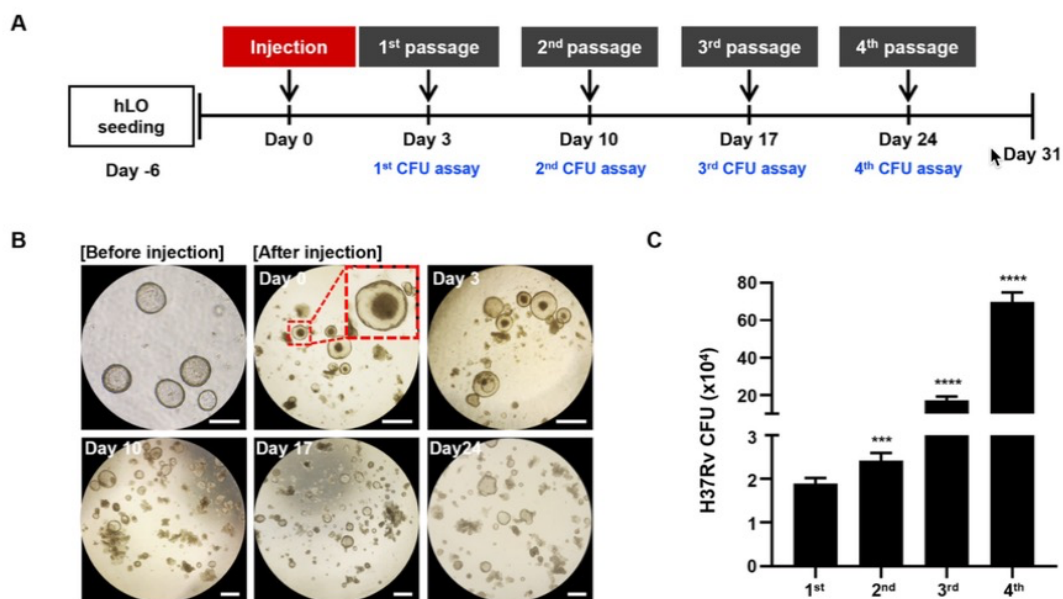


Figura 31: Representación de un modelo de infección por *Mtb* H37Rv de larga duración (31 días) utilizando organoides. ⁽²⁷⁾ **(A)** Esquema del desarrollo temporal experimental, realizando pasajes cada 7 días. **(B)** Imágenes microscópicas de los organoides infectados. **(C)** determinación de la carga bacteriana de *Mtb* H37Rv tras cada pase mediante el análisis de unidades formadoras de colonias (CFU).

A su vez se utilizó para evaluar la eficacia de los fármacos antituberculosos RIF y bedaquilina, así como terapias dirigidas al huésped mediante el silenciamiento de genes MFN2 y HERPUD1. Los resultados que se obtuvieron mostraron que tanto RIF como bedaquilina redujeron significativamente la supervivencia intracelular de *Mtb*. Además, ambos fármacos redujeron la producción de citocinas inflamatorias como IL-6, IL-10 y TNF- α , lo que indica una disminución de la respuesta inflamatoria. En cuanto a las terapias dirigidas al huésped, el silenciamiento de los genes MFN2 y HERPUD1 también redujo la supervivencia intracelular de *Mtb* y la respuesta inflamatoria. La combinación de los tres mostró

un efecto sinérgico, disminuyendo aún más la carga bacteriana. En conclusión, se observó que las terapias dirigidas al huésped en combinación con fármacos anti-TB, podrían ser una estrategia prometedora para mejorar el tratamiento de la TB, y que este modelo es valioso para evaluar nuevas estrategias terapéuticas contra la TB.

Como limitaciones, este modelo aún carece de una representación completa de células inmunitarias como células dendríticas o células B y T, cruciales para representar con más precisión la patología tuberculosa. Además, las células que se utilizan son una línea de origen tumoral que no se diferencia mediante un estímulo fisiológico sino mediante un compuesto químico. Por otra parte, este sistema requiere la microinyección de los macrófagos directamente dentro del lumen del organoide, lo que no consigue representar completamente el reclutamiento y agregación natural que ocurre *in vivo*.

A pesar de estas limitaciones, el modelo ofrece varias ventajas como el mantenimiento de la estructura 3D durante el cultivo a largo plazo y la capacidad de evaluar la eficacia de fármacos anti-TB y terapias dirigidas al huésped y muestra un gran potencial para estudiar la latencia y reactivación de TB debido a esa capacidad de mantener la infección y viabilidad durante un tiempo prolongado.

5. DISCUSIÓN

La TB sigue siendo la principal causa de muerte por enfermedad infecciosa a nivel mundial. La patogénesis de esta enfermedad se caracteriza por la formación en los pulmones de granulomas, estructuras celulares organizadas que contienen macrófagos infectados, CGMs, linfocitos y otras células inmunitarias. Aunque tradicionalmente los granulomas se consideran como un mecanismo de defensa del huésped para contener la infección, también suponen un nicho protector para la persistencia bacteriana y la diseminación posterior. Por lo tanto, comprender la dinámica compleja de la formación, el mantenimiento y la resolución del granuloma es crucial para desarrollar estrategias eficaces contra la TB. ^(28,29)

En los últimos años el desarrollo de nuevos modelos experimentales *in vitro* ha transformado la investigación biomédica, proporcionando herramientas innovadoras, más precisas y éticamente más responsables. En el ámbito de la investigación en TB, los nuevos modelos celulares como los **Granulomas *in vitro* humanos** o los **Organoides**, entre otros, han surgido como herramientas prometedoras que permiten simular con mayor precisión y fidelidad las interacciones celulares y la inmunopatología de la enfermedad, en un entorno controlado y reproducible. Estos dos modelos no solo están permitiendo a los investigadores superar algunas de las limitaciones asociadas a la experimentación animal como, por ejemplo, la incapacidad de replicar aspectos concretos de la biología humana, sino que están contribuyendo a la identificación de nuevas estrategias terapéuticas más efectivas para el tratamiento de la TB. Todo ello sin pasar por alto el avance que suponen hacia una ciencia más ética y sostenible.

Si bien estos modelos *in vitro* han experimentado un gran avance en los últimos años, es importante destacar que, hasta el momento, **ningún modelo único ha conseguido recapitular por completo la complejidad de la TB humana**. Todos los modelos revisados se centran en las **primeras etapas** de la formación del granuloma y la respuesta inmunitaria frente a *Mtb*, con duraciones variables de los experimentos entre los 7 y los 31 días. Por tanto, modelizar las etapas posteriores de la enfermedad sigue siendo un desafío.

A su vez, muchos de los modelos *in vitro* no consiguen reproducir completamente la complejidad del microambiente que *Mtb* encuentra en el pulmón y no tienen en

cuenta la dinámica del sistema inmunitario ni la heterogeneidad de las poblaciones celulares. En este sentido, la última y novedosa incorporación al estudio de la TB son los **modelos de "pulmón en un chip"** (del inglés *lung-on-a-chip*) que ofrecen un gran potencial que podría llegar a suplir algunas de las carencias encontradas en los modelos actuales. ⁽³⁰⁾ Estos dispositivos microfluídicos permiten un control preciso del microambiente celular, así como el co-cultivo de diferentes tipos de células pulmonares e inmunitarias. Además, una gran ventaja que aportan es que pueden diseñarse para imitar las fuerzas mecánicas o movimientos que se producen en los pulmones durante la respiración, proporcionando un entorno fisiológicamente similar para el estudio de la TB. Asimismo, pueden recrear la ALI, lo que permite el estudio de la exposición apical de las células epiteliales a los patógenos y la dinámica del moco, o también permiten incorporar vascularización en 3D gracias a la ingeniería de redes vasculares, lo que facilita el reclutamiento continuo de células inmunitarias transmitidas por la sangre y reconstituye más fielmente el entorno dinámico de los granulomas reales. Aunque esta tecnología aún está en desarrollo, ya se han realizado co-cultivos con *Mtb*. ⁽³¹⁾

Por otro lado, la investigación con *Mtb* es todo un desafío puesto que requiere **estrictas medidas de bioseguridad debido a su naturaleza infecciosa**. Esto puede limitar la capacidad de realizar experimentos de alto rendimiento y manipular el microambiente del granuloma. Por ejemplo, los laboratorios de nivel de bioseguridad 3 (BSL-3 por sus siglas en inglés) son necesarios para trabajar con cepas virulentas de *Mtb* lo que requiere una infraestructura y una capacitación especializadas. Es por ello por lo que en algunos de los modelos analizados se ha optado por el uso de cepas no virulentas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la respuesta inmunológica inducida por estas últimas puede diferir significativamente de la provocada por las cepas virulentas de *Mtb*.

Uno de los resultados sorprendentes en la revisión fue la llamativa **escasez de modelos que utilizan aislados clínicos de *Mtb***, puesto que en su mayoría utilizan la cepa de laboratorio H37Rv. Estos aislados clínicos exhiben una diversidad genética y fenotípica significativa, lo cual puede influir en la respuesta del huésped, la virulencia, la capacidad de entrar en latencia y la respuesta a los fármacos. Por tanto, la incorporación de aislados clínicos en los modelos *in vitro*, como ya se han utilizado en el estudio de Arbués *et al.*, 2024 ⁽¹⁵⁾, podría ofrecer una nueva

perspectiva en futuras investigaciones, para comprender mejor la heterogeneidad de la TB humana.

En definitiva, los modelos celulares *in vitro* se han consolidado como herramientas esenciales para desentrañar la compleja interacción entre *Mtb*, las células inmunitarias y el microambiente pulmonar. Con vistas al futuro, sería interesante que los estudios se dirigieran hacia el desarrollo de modelos más complejos y fisiológicamente relevantes, capaces de modelizar la patogénesis de la enfermedad en todas sus fases y no solo las etapas tempranas, con el objetivo de comprenderla mejor, identificar nuevos objetivos terapéuticos y desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas más eficaces. ^(32,33)

6. CONCLUSIONES

A lo largo de esta revisión bibliográfica se han descrito diversos modelos celulares que han resultado relevantes para el estudio de la TB en los últimos diez años. Aquellos más desarrollados hasta el momento han sido los granulomas *in vitro*, que han proporcionado valiosos conocimientos sobre los mecanismos moleculares y celulares implicados en la infección tuberculosa y han contribuido a evaluar la efectividad de diversos tratamientos. Por su parte, los organoides, aunque con un desarrollo mucho más reciente y un número muy reducido de estudios aplicados a la TB, ofrecen un gran potencial para comprender y modelizar más fielmente las etapas de la infección.

La revisión de la literatura ha permitido responder a la pregunta que motivaba este trabajo, confirmando que es posible modelizar aspectos de la TB en el ser humano mediante estos sistemas *in vitro*. Dichos modelos, ya sean basados en PBMCs, esferoides 3D u organoides, han logrado reproducir con éxito fenómenos clave como la interacción inicial entre *Mtb* y las células del huésped, la activación del sistema inmune que da lugar a la formación de estructuras granulomatosas, o los fenómenos de dormancia y resucitación micobacterianas. para comprender los mecanismos de respuesta inicial frente a la infección.

Sin embargo, es importante resaltar que, aunque estos sistemas suponen una herramienta valiosa que ha permitido profundizar en los eventos que ocurren en las fases iniciales de la patogénesis, hasta la fecha, presentan limitaciones para recrear la complejidad total de la enfermedad en toda su evolución.

El reto principal se encuentra en definir cuáles son las características imprescindibles con las que debe contar un modelo celular *in vitro* para representar de forma más fiel los eventos *in vivo*. A modo de aportación personal, y de cara al desarrollo de futuros modelos celulares capaces de suplir las carencias identificadas en esta revisión, encuentro esencial la incorporación de los siguientes elementos: una **matriz extracelular**, fundamental para simular las condiciones fisiológicas del entorno pulmonar; diversos tipos de **células de la inmunidad innata y adaptativa**, preferiblemente primarias para representar la variabilidad inter-individual; **células epiteliales**, como los neumocitos, para simular la interacción de *Mtb* con el epitelio pulmonar; **vascularización**, para facilitar el

reclutamiento continuo de las células del sistema inmune y representar más fielmente el entorno pulmonar; **cepas clínicas representativas de la diversidad de *Mtb***, como ya se ha descrito previamente; y una **interfase aire-líquido**, para simular la exposición real al aire del epitelio respiratorio. Finalmente, es prioritario el desarrollo de modelos que puedan prolongarse durante periodos de tiempo más largos.

Como una posible línea de investigación orientada a ser capaz de suplir las carencias de los modelos actuales, se propone el novedoso modelo de *lung on-a-chip*, con capacidad para recrear de una forma más representativa el microambiente pulmonar, integrando tipos celulares de los que carecen los anteriores modelos e incluso imitando las fuerzas mecánicas del tejido y su vascularización, ofreciendo una alternativa para el estudio de la TB en condiciones que simulen mejor el entorno fisiológico *in vivo*.

En conclusión, el desarrollo de un modelo celular capaz de abarcar todas las fases de la enfermedad continúa siendo un desafío que abre la puerta a futuras investigaciones orientadas a perfeccionar dichos modelos. El objetivo es obtener herramientas experimentales que reflejen de la manera más completa posible la complejidad de la TB en el ser humano y, en consecuencia, posibiliten el diseño de intervenciones terapéuticas y diagnósticas más efectivas. Sólo se logrará el control de la TB si se alcanza a comprender plenamente su patogénesis y para ello, los modelos celulares avanzados desempeñan un papel fundamental.

7. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Global tuberculosis report 2024 [Internet]. Who.int. [citado el 20 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>
2. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2016;2:16076. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
3. Guirado E, Mbawuiké U, Keiser TL, Arcos J, Azad AK, Wang S-H, et al. Characterization of host and microbial determinants in individuals with latent tuberculosis infection using a human granuloma model. *MBio* [Internet]. 2015;6(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.02537-14>
4. Franco C, Rezzani R. Methods and Models for Studying Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Infections. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024;26(1):18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26010018>
5. Cadena, A. M., Fortune, S. M., & Flynn, J. L. (2017). Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews. Immunology*, 17(11), 691–702. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.69>
6. Notificación sobre actividades de utilización confinada de organismos modificados genéticamente [Internet]. Gob.es. [citado el 21 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/medio-ambiente-y-salud/a_es_17_02_informacion_publica_tcm30-183280.pdf
7. Tezera LB, Bielecka MK, Chancellor A, Reichmann MT, Shammari BA, Brace P, et al. Dissection of the host-pathogen interaction in human tuberculosis using a bioengineered 3-dimensional model. *Elife* [Internet]. 2017;6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.21283>
8. Tezera LB, Bielecka MK, Elkington PT. Bioelectrospray methodology for dissection of the host-pathogen interaction in human tuberculosis. *Bio Protoc* [Internet]. 2017;7(14). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21769/BioProtoc.2418>
9. Mezouar S, Diarra I, Roudier J, Desnues B, Mege J-L. Tumor Necrosis Factor-alpha antagonist interferes with the formation of granulomatous multinucleated giant cells: New insights into Mycobacterium tuberculosis infection. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10:1947. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01947>
10. Puissegur M-P, Botanch C, Duteyrat J-L, Delsol G, Caratero C, Altare F. An in vitro dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cell Microbiol* [Internet]. 2004;6(5):423–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00371.x>

11. Sánchez Cano D, Callejas Rubio JL, Ortego Centeno N. Uso de los fármacos antagonistas del factor de necrosis tumoral en las enfermedades autoinmunes: situación actual. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2008;131(12):471–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1157/13126958>
12. Arbués A, Kammüller M, Portevin D. Generating three-dimensional human granulomas in vitro to study *Mycobacterium tuberculosis*-host interaction. *Bio Protoc* [Internet]. 2020;10(22):e3820. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21769/BioProtoc.3820>
13. Kapoor N, Pawar S, Sirakova TD, Deb C, Warren WL, Kolattukudy PE. Human granuloma in vitro model, for TB dormancy and resuscitation. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(1):e53657. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053657>
14. Arbués A, Brees D, Chibout S-D, Fox T, Kammüller M, Portevin D. TNF- α antagonists differentially induce TGF- β 1-dependent resuscitation of dormant-like *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2020;16(2):e1008312. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008312>
15. Arbués A, Schmidiger S, Kammüller M, Portevin D. Extracellular matrix-induced GM-CSF and hypoxia promote immune control of *Mycobacterium tuberculosis* in human in vitro granulomas. *Front Immunol* [Internet]. 2021;12:727508. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.727508>
16. Arbués A, Schmidiger S, Reinhard M. CXCL9, granzyme B and TNF- α orchestrate protective in vitro granulomatous responses across *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages. [Internet].; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7554/elife.99062.1.sa3>
17. Berry SB, Gower MS, Su X, Seshadri C, Theberge AB. A modular microscale granuloma model for immune-microenvironment signaling studies in vitro. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020;8:931. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00931>
18. Mukundan S, Bhatt R, Lucas J, Tereyek M, Chang TL, Subbian S, et al. 3D host cell and pathogen-based bioassay development for testing anti-tuberculosis (TB) drug response and modeling immunodeficiency. *Biomol Concepts* [Internet]. 2021;12(1):117–28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1515/bmc-2021-0013>
19. Mukundan S, Singh P, Shah A, Kumar R, O'Neill KC, Carter CL, et al. In vitro miniaturized tuberculosis spheroid model. *Biomedicines* [Internet]. 2021;9(9):1209. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9091209>
20. Línea celular THP-1: Desbloqueando los avances en los estudios inmunológicos [Internet]. Cytion. [citado el 7 de diciembre de 2024]. Disponible en: https://www.cytion.com/es/Centro-de-conocimiento/Linea-celular/Linea-celular-THP-1-Desbloqueando-los-avances-en-los-estudios-inmunologicos/?utm_source=chatgpt.com

21. Organoides [Internet]. Moleculardevices.com. [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://es.moleculardevices.com/applications/3d-cell-models/organoids>
22. Kühl L, Graichen P, von Daacke N, Mende A, Wygrecka M, Potaczek DP, et al. Human lung organoids-A novel experimental and precision medicine approach. *Cells* [Internet]. 2023;12(16). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cells12162067>
23. Parasa VR, Rahman MJ, Ngyuen Hoang AT, Svensson M, Brighenti S, Lerm M. Modeling Mycobacterium tuberculosis early granuloma formation in experimental human lung tissue. *Dis Model Mech* [Internet]. 2014;7(2):281–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.013854>
24. Braian C, Svensson M, Brighenti S, Lerm M, Parasa VR. A 3D human lung tissue model for functional studies on Mycobacterium tuberculosis infection. *J Vis Exp* [Internet]. 2015;(104). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3791/53084>
25. Aguilo N, Gonzalo-Asensio J, Alvarez-Arguedas S, Marinova D, Gomez AB, Uranga S, et al. Reactogenicity to major tuberculosis antigens absent in BCG is linked to improved protection against Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(1):16085. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms16085>
26. Iakobachvili N, Leon-Icaza SA, Knoops K, Sachs N, Mazères S, Simeone R, et al. Mycobacteria-host interactions in human bronchiolar airway organoids. *Mol Microbiol* [Internet]. 2022;117(3):682–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.14824>
27. Kim S-Y, Choi J-A, Choi S, Kim KK, Song C-H, Kim E-M. Advances in an in vitro tuberculosis infection model using human lung organoids for host-directed therapies. *PLoS Pathog* [Internet]. 2024;20(7):e1012295. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1012295>
28. Fitzgerald LE, Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M. Three-dimensional in vitro models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant mycobacteria. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:623856. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/623856>
29. de Waal AM, Hiemstra PS, Ottenhoff TH, Joosten SA, van der Does AM. Lung epithelial cells interact with immune cells and bacteria to shape the microenvironment in tuberculosis. *Thorax* [Internet]. 2022;77(4):408–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217997>
30. Gkatzis K, Taghizadeh S, Huh D, Stainier DYR, Bellusci S. Use of three-dimensional organoids and lung-on-a-chip methods to study lung development, regeneration and disease. *Eur Respir J* [Internet]. 2018;52(5):1800876. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00876-2018>
31. Thacker VV, Dhar N, Sharma K, Barrile R, Karalis K, McKinney JD. A lung-on-chip model of early Mycobacterium tuberculosis infection reveals an essential role for alveolar

- epithelial cells in controlling bacterial growth. *Elife* [Internet]. 2020;9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.59961>
32. Fonseca KL, Rodrigues PNS, Olsson IAS, Saraiva M. Experimental study of tuberculosis: From animal models to complex cell systems and organoids. *PLoS Pathog* [Internet]. 2017;13(8):e1006421. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006421>
33. Elkington P, Lerm M, Kapoor N, Mahon R, Pienaar E, Huh D, et al. In vitro granuloma models of tuberculosis: Potential and challenges. *J Infect Dis* [Internet]. 2019;219(12):1858–66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiz020>

ANEXO 1: MODELOS DE GRANULOMA IN VITRO

AUTORES	TIPOS CÉLULARES	CEPA	OTRAS CARACTERÍSTICAS DEL MODELO	APORTACIONES	SEGUIMIENTO
Guirado et al., 2015	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (PBMCs: monocitos, células <i>natural killer</i> y linfocitos T y B) y derivados	<i>Mtb</i> H37Rv (GFP)	Suero humano autólogo	Diferencias en la respuesta inmunitaria en sanos e individuos con TB asintomática	12 días
Tezera et al., 2017	PBMCs y derivados	<i>Mtb</i> H37Rv	3D en matriz de colágeno-alginato (encapsulación en microesferas-bioelectrospray)	Incorporación de matriz extracelular	21-24 días
Mezouar et al., 2019	PBMCs y derivados (incluidas células gigantes multinucleadas)	Sin <i>Mtb</i> viable	Perlas de Sefarosa	Efecto de los anti-TNF- α en el granuloma	9 días
Arbués et al., 2020	PBMCs y derivados	<i>Mtb</i> H37Rv Aislados clínicos de <i>Mtb</i>	3D en matriz de colágeno y fibronectina	Características de latencia micobacteriana y reactivación bajo inmunomodulación	8 días
Berry et al., 2020	Macrófagos derivados de monocitos + Células endoteliales cordón umbilical	BCG	Plataforma microfluidica (Stacks)	Miniaturización Estudio de los procesos de vascularización	5 días
Mukundan et al., 2021	Monocitos/macrófagos humanos THP-1 (línea celular)	BCG (mCherry) <i>Mtb</i> H37Rv, HN878 y CDC1551	Modelo esferoide 3D sin matriz extracelular	Mayor rendimiento Estudio de la interacción VIH- <i>Mtb</i>	14 días

ANEXO 2: MODELOS DE ORGANOIDE IN VITRO

AUTORES	TIPOS CELULARES	CEPA	OTRAS CARACTERÍSTICAS DEL MODELO	APORTACIONES	SEGUIMIENTO
Braian et al., 2015	Fibroblastos pulmonares humanos Células epiteliales bronquiales humanas Monocitos/macrófagos	<i>Mtb</i> H37Rv (GFP) <i>Mtb</i> deficiente en ESAT-6	Matriz de colágeno tipo 1	Inclusión de fibroblastos y células epiteliales e incorporación de interfase aire-líquido	7 días
Lakobachvili et al., 2022	Células epiteliales pulmonares derivadas de ASC Macrófagos derivados de monocitos humanos	<i>Mtb</i> H37Rv (DsRed) BCG <i>Mabs</i>	Estructura quística	Diferencias entre <i>Mtb</i> y <i>Mabs</i> . Interacción macrófago-organoide	21 días
Kim et al., 2024	Células epiteliales pulmonares derivadas de PSC Macrófagos humanos THP-1	<i>Mtb</i> H37Rv (RFP)	Matrigel	Tratamiento con bedaquilina y terapias dirigidas contra el huésped	4 semanas