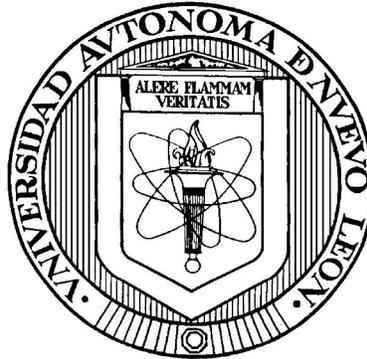


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE ESAT-6 DE *Mycobacterium tuberculosis* EN LA
POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.**

Por

DAVID RODRÍGUEZ MIER

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS
con Orientación en Inmunología Médica.**

Junio, 2016

**EFFECTO DE ESAT-6 DE *Mycobacterium tuberculosis* EN LA
POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.**

Aprobación de la tesis:



DR. C. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Director de Tesis.



DR. C. ADRIÁN GEOVANNI ROSAS TARACO
Co-director de Tesis



DR. C ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
Comisión de tesis



Dr. med. RAQUEL GARZA GUAJARDO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE ESAT-6 DE *Mycobacterium tuberculosis* EN LA
POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.**

Presentado por: David Rodríguez Mier

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona, la co-dirección del Dr. Adrián Geovanni Rosas Rosas Taraco y como miembro de la comisión de tesis la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza. Este trabajo cuenta con el apoyo de CONACYT (182237) y aprobación del comité de ética de esta Facultad con el número de registro IN16-00001.

DEDICATORIA

A Brenda mi compañera de vida y de aventuras, a Sofía, a la memoria de mi padre Mario y a mi madre Patricia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Brenda quien me ha dado su amor, comprensión, y paciencia y amor. Este proyecto fue posible gracias a ti, a todos los sacrificios, esfuerzo y fe en nuestros sueños y en mí. Gracias por levantarme en los momentos difíciles, escucharme y alentarme a seguir adelante.

A Sofía quien ha transformado mi vida y que todos los días me ilumina con su voz, sonrisas y juegos, tú me das más motivación para seguir día a día.

A mi padre Mario (Q.E.P.D.), padre y hombre ejemplar quien siempre me inculcó valores mediante su ejemplo profesional y personal.

A mi madre Patricia quien siempre ha creído en mí apoyándome en cada uno de mis proyectos, guiándome sin cansancio con sus enseñanzas, ejemplo y amor.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, quien dio su apoyo y orientación en los momentos críticos.

Al Dr. Adrián G. Rosas Taraco, por su confianza, apoyo, paciencia y orientación a lo largo de este programa.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza (Dra. AYA), por su paciencia, apoyo y por apegarse a su vocación de docente, a pesar de las adversidades.

Al CONACYT por el apoyo económico proporcionado, conforme lo demanda la Nación.

CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Tuberculosis por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.1.1 Epidemiología	1
1.1.2 Factores sociales.	2
1.1.3 Factores de riesgo	3
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.2.1 Factores de virulencia	5
1.2.2 Antígeno de secreción temprana de 6 kDa.	6
1.3 Inmunidad innata	7
1.3.1 Sistema fagocítico mononuclear	8
1.3.2 Macrófagos	8
1.3.3 Marcadores de superficie de los macrófagos.	10
1.3.4 Macrófagos en la tuberculosis.	11
1.3.5 Moléculas de reconocimiento de patrones de los macrófagos.	13
1.3.6 Activación de los macrófagos	14
1.3.7 Polarización de los macrófagos	17
1.4 Interacción ESAT-6/macrófago	18
2. JUSTIFICACIÓN.	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAL Y MÉTODOS	26
4.1 Medios de cultivo y su preparación	26
4.1.1 Medio completo.	26
4.1.2 Medio de diferenciación.	27
4.1.3 Medio de cultivo para la estimulación de los macrófagos con ESAT-6	27

4.2	Reactivos y su preparación.28
4.3	Obtención de macrófagos de médula ósea.29
	4.3.1 Animales de experimentación30
	4.3.2 Obtención de la médula ósea.21
	4.3.3 Cuantificación de células.31
	4.3.4 Cultivo de células obtenidas de médula ósea.34
	4.3.5 Recuperación de los macrófagos33
4.4	Ensayo de TUNEL33
4.5	Estímulo con ESAT-6 de Mtb35
4.6	Cuantificación de la producción de óxido nítrico36
4.7	Pruebas de fagocitosis37
4.8	Determinación del perfil de polarización mediante la secreción de citocinas38
	4.8.1 Determinación de TGF- β 1.39
	4.8.2 Determinación de IL-1041
	4.8.3 Cuantificación de células.42
4.9	Análisis estadístico43
4.10	Manejo de residuos peligroso y desechos anatómicos44
5.	RESULTADOS46
	5.1 Determinar los niveles de apoptosis inducidos por ESAT-6 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>46
	5.2 Producción de NO en los macrófagos estimulados con ESAT-650
	5.3 Valoración de la función fagocítica de los macrófagos estimulados con ESAT-651
	5.4 Determinación del perfil de polarización de los macrófagos conforme a la producción de citocinas52
	5.4.1 Producción de TNF-a al estímulo con ESAT-6 como indicador del perfil M152
	5.4.2 Producción de TGF-b e IL-10 al estímulo con ESAT-6 como indicadores del perfil M253
6.	DISCUSIÓN55
7.	CONCLUSIÓN61
8.	PERSPECTIVAS.62

BIBLIOGRAFÍA.63
APÉNDICES.69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
TABLA 1	PERFIL DE LOS MACRÓFAGOS M1 Y M2.16
TABLA 2	ESPECIFICACIONES DE LOS KITS DE ELISA PARA DETERMINAR CITOCINAS38
TABLA 3	CURVA DE CALIBRACIÓN ELISA DE TGF- β40
TABLA 4	CURVA DE CALIBRACIÓN ELISA DE IL-10. . .	.42
TABLA 5	CURVA DE CALIBRACIÓN ELISA DE TNF- α43
TABLA 6	EFFECTO DE ESAT-6 EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
FIGURA 1	ENSAYO DE TUNEL REALIZADO EN MACRÓFAGOS ESTIMUALDOS CON ESAT-647
FIGURA 2	PRODUCCIÓN DE NO AL ESTÍMULO CON ESAT-6 .	.49
FIGURA 3	ESAT-6 REGULA NEGATIVAMENTE LA PRODUCCIÓN DE NO50
FIGURA 4	LA PROTEÍNA ESAT-6 DISMINUYE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS .	.51
FIGURA 5	LA PRODUCCIÓN DE TNF- α ES REGULADA POR LA PROTEÍNA ESAT-6. . .	.53
FIGURA 6	EFEECTO DE ESAT-6 EN LA PRODUCCIÓN DE TGF- β54

RESÚMEN

David Rodríguez Mier

Obtención del grado: Junio de 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: **EFECTO DE ESAT-6 DE *Mycobacterium tuberculosis* EN LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.**

Número de páginas: 74

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Inmunología médica.

Área de estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: El agente causal más común de la tuberculosis es *Mycobacterium tuberculosis*. El macrófago es la célula blanco de este agente, esta célula es parte de la respuesta inmunológica innata. El conocimiento actual señala a la proteína ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* como uno de los principales factores de virulencia. El propósito de este trabajo es conocer si ESAT-6 posee algún efecto en la polarización de los macrófagos. Los macrófagos se obtuvieron de la médula ósea de ratón se cultivaron y estimularon con la proteína ESAT-6 en distintos tiempos de incubación. La polarización del macrófago se estudió valorando la capacidad fagocítica y cuantificando la producción de NO y citocinas para demostrar el perfil inmunológico adoptado.

Contribuciones y conclusiones: Los resultados de este trabajos sugieren que si existe un efecto de ESAT-6 sobre la polarización de los macrófagos en tiempos determinados. Acorde a lo anterior concluimos que ESAT-6 si tiene efecto en la polarización de los macrófagos en diferentes tiempos. Este trabajo contribuye a esclarecer el conflicto actual sobre el efecto de ESAT-6 en los macrófagos.

Dr. Mario César Salinas Carmona
Director de Tesis

Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Co-director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis por *Mycobacterium tuberculosis*.

1.1.1 Epidemiología

Durante más de un siglo se ha estudiado la tuberculosis con el fin de comprender y controlar esta enfermedad. A pesar de los intentos realizados para controlar esta enfermedad un tercio de la población mundial se encuentra infectada [1]. La organización mundial de la Salud (OMS) en su reporte global de tuberculosis 2014 reportó que 9 millones de personas padecían tuberculosis

activa, mientras 1.1 millones tenían co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Entre ambos grupos se reportó un total de 1.5 millones de muertes. En México, en el año 2013 se reportó una prevalencia de 31,000 casos (incluyendo co-infecciones con VIH)[2].

1.1.2 Factores sociales

La prevalencia de la tuberculosis ha sido asociada con factores socioeconómicos, particularmente con los factores asociados a baja educación y pobreza[3]. Factores genéticos de una población específica como lo es la población del noreste de México fueron asociados con la predisposición a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* [4]. Los sectores más desprotegidos de nuestra población son los más susceptibles pues al no lograr el control de causas de la infección, esta continúa presentándose y persistiendo al haber desarrollado resistencia a los tratamientos por parte de la misma bacteria. Lo anterior indica que la tuberculosis es una enfermedad presente en el hombre por causas controlables, pero de difícil solución.

1.1.3 Factores de riesgo

Los pacientes con diabetes tienen mayor propensión a padecer tuberculosis, incluso que los pacientes infectados con VIH [5]. En el mundo se ha asociado a la diabetes mellitus como un factor de riesgo para padecer tuberculosis según confirma un estudio en donde el continente americano tiene la mayor incidencia de diabetes y tuberculosis mostrando una asociación positiva entre padecer ambas enfermedades [6]. Los casos de tuberculosis se incrementaron con la aparición del HIV, un fenómeno similar se espera en el caso de la diabetes mellitus [5, 7]. En un estudio de casos y controles realizado en pacientes mexicanos se encontró una fuerte asociación entre la diabetes mellitus y la tuberculosis multidrogoresistente [8]. El aumento de la incidencia de la diabetes mellitus es un factor de riesgo para contraer tuberculosis. LA tuberculosis una de las enfermedades que ha acompañado a la humanidad a lo largo de su historia y la susceptibilidad a dicha enfermedad ha sido asociada con el estrato socioeconómico, enfermedades metabólicas e incluso los antecedentes genéticos [3, 4, 6, 8] lo anterior coloca a la tuberculosis como un riesgo epidemiológico tanto global como en México.

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) es un bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR) y es el agente causal más común de la tuberculosis [9] la vía de transmisión de persona a persona es a través de aerosoles que contienen el bacilo [10].

Mtb es un patógeno intracelular, las características de la bacteria son otorgados por las características de su pared celular. Dicha pared está compuesta principalmente por ácidos micólicos. Este componente específico de la pared de la micobacteria constituye 50% de su peso seco. Debido a la capa de ácidos micólicos el ingreso de nutrientes es deficiente y por ese motivo la micobacteria tiene un crecimiento lento, en cambio esta pared gruesa favorece la resistencia a la degradación por las enzimas lisosómicas. Los ácidos micólicos están distribuidos en la porción externa de la pared mientras que la capa interna se compone principalmente de arabinogalactano, manosidos de fosfatidil-mioinositol (PIM) y peptidoglucanos. Otros componentes que contienen manosa son lipoarabinomanana, lipomanano y mananoglicoproteínas. Los mananos y arabinomananos están presentes en la superficie y forman la pared de la

bacteria. Mientras que los liporabinomananos, lipomananos y PIM conservan un dominio que se ancla en la membrana plasmática [9].

1.2.1 Factores de virulencia.

Mtb es un bacilo que posee una serie de factores secretados por el bacilo que lo hacen virulento. El genoma de *Mtb*, particularmente de la cepa H37Rv fue descrito en 1998 por Cole y cols. en donde se describe un locus nombrado “región de diferencia 1” (RD1). Es un locus de 9.5 kb de longitud y se compone de 9 genes [11]. Este conjunto de 9 genes se codifica para el sistema de secreción nombrado ESX-1. Alrededor de 14 proteínas contribuyen a este sistema de secreción, aunque es importante mencionar que hasta el año 2009 aún no se habían caracterizado completamente todos los componentes de este sistema. Dicho locus no se encuentra presente en *Mycobacterium bovis* (BCG), siendo esta cepa en particular utilizada como vacuna en nuestro país por su poca o casi nula virulencia, pero si posee un efecto inmunogénico importante [12]. El sistema ESX-1 secreta algunas proteínas a las que se ha enfocado la literatura por su interés virulento, además de la descripción de la importancia inmunológica de estas proteínas. La proteína de interés para este trabajo es el antígeno de secreción temprana de 6 kDa (ESAT-6) cuyos genes codificadores

se encuentra en el locus mencionado anteriormente que forman parte del sistema de secreción ESX-1 [13] .

1.2.2. Antígeno de secreción temprana de 6kDa.

El antígeno de secreción temprana, conocido como ESAT-6 es una de las proteínas de virulencia de *Mtb*. La secuencia aminoacídica de ESAT-6 está altamente conservados entre las distintas cepas del *Mycobacterium tuberculosis*. La proteína ESAT-6 se libera generalmente con una proteína chaperona llamada CFP-10 (filtrado de proteínas de cultivo de 10kDa), este dímero se puede disociar en condiciones ácidas., como las presentes en el fagolisosoma, otorgando la capacidad de inactivarlo [14, 15]. La proteína ESAT-6 por sí sola ha demostrado tener diversas funciones biológicas entre ellas: 1) modular la actividad del macrófago, afectando la vía de señalización de la célula huésped (tanto TLR, TCR y MAPK), 2) promover la secreción de factores de inflamación como IFN- γ (citocina importante en la activación de macrófagos), 3) activar el inflamasoma [16] (que comienza una respuesta inflamatoria), 4) alterar la membrana celular al tener la capacidad de crear poros, 5) estimular la expresión de caspasas, que culminará en apoptosis [17].

El efecto que tiene ESAT-6 en la célula huésped es tan relevante que incluso se ha descrito que posee la capacidad de alterar su metabolismo[18], favoreciendo la acumulación de ácidos grasos dentro de las células , haciendo uso de la maquinaria celular para que se formen intermediarios de la lipólisis y poder utilizarlos como fuente de energía[11].

1.3 Inmunidad Innata.

La inmunidad innata es el sistema primario de defensa inmediata o barrera hacia los agentes infecciosos. La respuesta inmune innata también orquesta la activación de la respuesta adaptativa, misma que es de mayor duración y posee memoria. La respuesta inmunológica innata es conformada por elementos moleculares y celulares. Las células de la respuesta inmune innata son las células dendríticas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y macrófagos [19, 20]. Los macrófagos son las células de interés de este estudio, por lo que a continuación se profundizará en su descripción.

1.3.1 Sistema fagocítico mononuclear.

El sistema fagocítico mononuclear es un sistema compuesto por monocitos y células dendríticas. Es bajo este esquema de clasificación en donde se define que las células que lo conforman poseen una función fagocítica muy elevada, se conocen como fagocitos profesionales. Este sistema de clasificación de los macrófagos, existen otras clasificaciones funcionales que refieren a los estados inflamatorios.

1.3.2 Macrófagos.

Los macrófagos son células inmunológicas mieloides que son caracterizadas por su alta capacidad fagocítica. La descripción de estas células fue realizada por Ilya Metchnikoff, quien propuso que estas células evolucionaron para fagocitar células no deseadas u “obsoletas”. La actividad de estas células

fagocíticas profesionales puede ser reclutada para las funciones efectoras de la respuesta inmunológica innata, incluida la eliminación de patógenos. Más allá de describir la regulación del desarrollo y el control de los patógenos de los macrófagos, Metchnikoff también describió el papel de estas células en la reparación de heridas y destacó su contribución en la inflamación estéril fisiológica. Fue él quien anticipó el papel de la inflamación y los macrófagos como un proceso de homeostasis para un organismo sano [21, 22].

Los macrófagos se diferencian de monocitos provenientes de médula ósea o del saco vitelino, los macrófagos están distribuidos en el organismo. Los macrófagos pueden también clasificarse como tisulares y procedentes de médula ósea (en sangre se conocen como monocitos), ambos tipos de macrófagos pueden coexistir en los tejidos [21, 22]. Los macrófagos tisulares migran a sus tejidos en el periodo prenatal. Los compartimentos celulares en donde residen los macrófagos tisulares se mantienen aislados, son autosuficientes y e independientes del ingreso de células derivadas de médula ósea. Los monocitos circulantes en el torrente sanguíneo tienen la propiedad de infiltrar tejidos. La infiltración de los monocitos a los tejidos se asocia con reacciones inflamatorias patológicas y homeostáticas. Estos macrófagos derivados de monocitos generalmente tienen un tiempo de vida limitado. [21].

1.3.3 Marcadores de superficie de los macrófagos.

Los macrófagos son células de uso común en investigación, por lo que es importante conocer los marcadores de superficie celular para diferenciarlas de otras células de origen mieloide. CD11b se expresa en todas las células de linaje mieloide, CD11c se expresa en muchas células derivadas de la médula ósea; incluidos los macrófagos, LY6C se expresa a la alta en los monocitos de origen mieloide e IL4-Ra se expresa en la mayoría de los macrófagos [23].

Los marcadores característicos de los macrófagos derivados de médula ósea en el ratón expresan a la alta LY6C en su membrana. Los macrófagos $CD11b^+CD115^+LY6C^{hi}$ expresan receptores de quimiocinas $CCR2^{hi}CX_3CR1^{low}$ y su función es pro inflamatoria y microbicida. Los macrófagos con los marcadores $CD11b^+CD115^+LY6C^{low}$ expresan los receptores de quimiocinas $CX_3CR1^{hi}CCR2^{low}$, la función de estas células es la vigilancia, el inicio de respuestas inmunológicas tempranas así como la reparación de tejidos. En los macrófagos humanos estas funciones se repiten solo que se muestran como funciones típicas o clásicas, intermedias y no clásicas [24].

1.3.4. Macrófagos en la tuberculosis.

Los tejidos cuando se enfrentan a una enfermedad o lesiones los monocitos circulantes serán reclutados y se diferenciarán a macrófagos conforme migran a los tejidos afectados [22]. Los macrófagos están asociados a múltiples enfermedades por ejemplo: los macrófagos asociados a tumor, los cuales se acumulan en los tejidos tumorales produciendo citocinas de manera paracrina. El caso de otras patologías como intestino irritable, encefalomiелitis autoinmune experimental, los macrófagos están involucrados en la inmunofisiopatología. La acumulación de macrófagos en los vasos sanguíneos que juegan un papel crucial en el desarrollo de aterosclerosis. La función de los macrófagos en las enfermedades metabólicas, su participación en la adipogénesis así como en la resistencia a la insulina aún es material de estudio, hasta el momento se ha determinado que los distintos estados de activación de los macrófagos están involucrados en cada estado [21-26].

La función de los macrófagos en la patogenia de diversas enfermedades es debido a que son células especializadas en la fagocitosis y neutralización de detritos celulares y agentes potencialmente dañinos incluidos los patógenos. Los macrófagos pueden considerarse como una adaptación de los organismos

multicelulares para sobrellevar la especialización y complejidad de la inmunovigilancia. Los macrófagos tisulares son células que no migran sin embargo contribuyen a las condiciones del medio local. Los macrófagos tienen una alta capacidad de migrar y activar a las células T [1].

Los macrófagos son guardianes del ambiente local, por lo que poseen un arreglo de moléculas de monitoreo y de reconocimiento de patrones de patógenos y de daños (como los TLR, DAMPs), receptores de lectina tipo C, receptores tipo RIG y tipo Nod; así como receptores nucleares de hormonas, de citocinas e incluso moléculas de adhesión [21, 27].

Los macrófagos que se localizan en pulmón están expuestos constantemente a microbios, contaminantes y polvos. Los macrófagos presentes en este tejido se encuentran en los alveolos de las vías respiratorias sanas. Se encargan de mantener un ambiente óptimo al eliminar el exceso de surfactante pulmonar, así como de eliminar todos los contaminantes ambientales que puedan presentarse en este órgano. Los macrófagos alveolares también pueden secretar cantidades importantes de interferón tipo I al estar en contacto con virus y cuando se exponen a bacterias pueden aumentar su función fagocítica [21].

Gran parte de las funciones genéricas efectoras de los macrófagos incluyen actividades asociadas con su actividad lisosómica altamente desarrollada en donde se efectúa las actividades de proteasa y actividad bactericida. Lo anterior se relaciona puesto que el macrófago coordina la reacción inflamatoria al secretar citocinas y quimiocinas que reclutan neutrófilos, monocitos y linfocitos.

La activación de los macrófagos y su polarización es el interés de este trabajo. El proceso de activación del macrófago es un proceso que se caracteriza por ocurrir de distintas maneras, poseer varios subtipos de polarización y tener plasticidad. Los macrófagos al responder a un reto también secretan factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento similar a insulina, factores de crecimiento de hepatocitos y el de fibroblastos [21, 24].

1.3.5. Moléculas de reconocimiento de patrones de los macrófagos.

La invasión por agentes patógenos inicia una respuesta inmunológica a través de las interacciones entre el patógeno y sus factores de virulencia así como los mecanismos de vigilancia del sistema inmunológico del huésped. La interacción del huésped-patógeno es generalmente iniciada por el reconocimiento de las estructuras moleculares conservadas, estos patrones se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), estos patrones son esenciales para el ciclo de vida del patógeno. Los PAMPs pueden estar ausentes o compartimentalizados dentro de la célula huésped ya que estos son censados por moléculas de reconocimiento expresadas por las

células del sistema inmunológico innato como células dendríticas, macrófagos y neutrófilos.

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que se localizan en las células del sistema inmunológico innato censarán la presencia de PAMPs e incluso de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Posterior al reconocimiento de algún patrón activarán vías de señalización que culminarán en la inducción de respuestas inflamatorias mediadas por múltiples citocinas y quimiocinas las cuales facilitarán la erradicación del patógeno[21, 27].

El sistema inmunológico innato montará una respuesta efectiva contra el agente infeccioso a través de la activación de la respuesta inmunológica adaptativa que es de larga duración y posee memoria inmunológica. La respuesta adaptativa es mediada por la interacción con linfocitos B y T.

Los PRRs existen de distintas clases como los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo RIG I (RLRs), receptores tipo NOD (NLRs) y los receptores de DNA. [19, 20].

1.3.6.Activación de los macrófagos.

Los macrófagos son células que requieren ser activadas para poder efectuar sus funciones. La activación de los macrófagos se conoce como activación

clásica y activación alternativa. Una nomenclatura más sencilla es M1 o M2, dicha clasificación mimetiza la nomenclatura de las células T cooperadoras, cuya clasificación se ha estudiado más e incluso permite relacionar a los diferentes tipos celulares [26]. Esta clasificación es útil ya que la diversidad funcional de los macrófagos, la cual se atribuye a su habilidad a responder a los diferentes microambientes con diversos fenotipos funcionales. Todos los cambios que suceden en los macrófagos al polarizarse ocurren de manera profunda ya que el código genético se activa de forma distinta en cada tipo de estado de polarización, por lo que desde el punto de vista del metabolismo, síntesis de proteínas y factores inmunológicos cambian completamente.[28].

Las citocinas relacionadas con Th1 como el IFN γ así como los estímulos de microorganismos como el lipopolisacárido activa los macrófagos de manera clásica que conlleva a una polarización al fenotipo M1. Los macrófagos M1 se caracterizan por un fenotipo inflamatorio, microbicida y tumoricida. Por otra parte, las citocinas Th2 como IL-4 e IL-14 polarizan los macrófagos a un fenotipo activado alternativo M2 [29]. Estos macrófagos se relacionan con inflamación menos activa, promueven la remodelación y reparación de tejidos, cooperan en la eliminación de parásitos, progresión del tumor y poseen funciones inmunoreguladoras [27, 30, 31].

Los patógenos son reconocidos por los PRRs y la activación es inducida por los TLRs y sus ligandos en donde se activarán las vías de NF- κ B, AP-1, IRFs, STAT1 y EGR quienes participan en la respuesta de IFN que corresponde a un perfil M1. El IFN γ , GM-CSF son otros estímulos que activarán el fenotipo M1.

Los estímulos que inducen el perfil M2 son: IL-4, IL-10 y glucocorticoides. La IL-4 es producida por células Th2, eosinófilos, basófilos o los mismos macrófagos. El receptor de IL-4 comparte una cadena común con el receptor de IL13, la cadena gamma, mientras que las cadenas alfa son específicas a su citocina [26]. Las funciones efectoras del perfil de polarización de cada macrófago son variadas, se pueden abordar desde distintos puntos de vista en donde se observa diferencias en dichas funciones (tabla 1) [26, 32, 33].

Tabla 1. Perfil de los macrófagos M1 y M2.	
M1 (IFNg)	M2 (IL4/IL13)
Aumento de fagocitosis. Induce autofagia. Aumenta la secreción de NO. Activación de iNOS.	Disminución de fagocitosis. Disminuye la autofagia. Disminuye la secreción de NO. Activación de Arg1.

Los macrófagos en sus diferentes perfiles polarizados tienen la capacidad de reprogramarse de cada estado polarizados. Las células en sus diferentes estados de polarización tienen no solo esas características también el metabolismo de cada estado polarizado cambia; incluso alterando el metabolismo se puede inducir el estado de polarización [34].

Los macrófagos M1 utilizan la vía glucolítica, por lo que obtienen energía de una manera mucho más rápida y los macrófagos M2 utilizan la β -oxidación para obtener energía. La alteración del metabolismo celular de los macrófagos puede inducir la polarización hacia macrófagos M1 o M2 dependiendo de la disponibilidad de los nutrientes, la activación de alguna de estas vías metabólicas inducirá su polarización [34, 35].

Los cambios suscitados en los macrófagos al polarizarse ocurren de manera profunda y se mantendrán siempre que el estímulo este presente o que otro estímulo re programe al macrófago. Existen cambios en la regulación de la transcripción durante la polarización del macrófago. Estos cambios en la regulación de la transcripción son los que permiten la diversidad entre las poblaciones de macrófagos polarizados y a los que se atribuye la identidad [28].

1.3.7. Polarización de los macrófagos.

Los macrófagos activados se encuentran en un estado conocido como M0, en el cual son células activas que han pasado de ser células provenientes de monocitos a macrófagos. Se observan los cambios en sus características fenotípicas, se observan prolongaciones de la membrana y aumenta la adherencia a los tejidos, *In vitro* los macrófagos al activarse al estado M0 se adhieren a la placa. Los macrófagos activados desarrollarán cambios en su metabolismo e incluso en su membrana celular. El estímulo externo que los activará de manera clásica (M1) o de manera alternativa (M2), las vías de señalización propias de cada estado, así como los cambios mencionados en su metabolismo. Una vez que los macrófagos se han polarizado hacia alguno de los posibles estados, estos son susceptibles a los distintos estímulos.

Los macrófagos poseen la propiedad de cambiar de un estado de polarización a otro e incluso regresar al mismo estado de polarización inicial ya que las citocinas que producen pueden inducir estos cambios o distintos estímulo pueden orientar el perfil de polarización de los macrófagos. Esto puede presentarse *in vivo* cuando existen procesos crónicos los cuales se establecen durante periodos prolongado en donde el proceso inflamatorio se torna más leve. *In vitro* este proceso sucede en condiciones de cultivo en donde los estímulos pueden ser inducidos o las condiciones de cultivo cambian y los macrófagos se adaptan o responden a los distintos estímulos a los que están expuestos [21, 26, 27, 36-41].

1.4 Interacción ESAT-6/macrófago.

Los macrófagos expresan los TLR en sus membranas, estos PRRs son los principales receptores que identifican los componentes de *Mycobacterium tuberculosis*. En el caso particular de ESAT-6 la interacción se efectúa con distintos heterodímero de TLR. Los heterodímero TLR-2, TLR-4 y TLR-2/6 activan las vías de señalización intracelular que dependen de la proteína acopladora MyD88[42], esta vía culmina en la activación de los factores de

transcripción NF- κ B y se sintetizarán citocinas inflamatorias como: TNF- α , IL-1 β e IL-12 [10, 16, 17, 43-45]. En estas vías existen rutas que activan la caspasa 8 y por ende activan el proceso de apoptosis. La producción de citocinas no solo activa los macrófagos, también poseen actividad en la función de los linfocitos y la activan de los mismo macrófagos al estimular la secreción de IFN- γ [1, 15, 17, 43, 45-49].

El macrófago al interactuar con distintos estímulos se polarizará activando los factores de transcripción indicados; ya sea que secreten citocinas pro inflamatorias, antiinflamatorias e inmunoreguladoras. Por otra parte, también se modifica la producción de óxido nítrico la cual es mediada por distintos genes. La activación de cada gen dependerá del estado de polarización en el que el macrófago se encuentre activado [50]. El gen *NOS2* y el gen *Arg1* son genes que poseen la capacidad de generar óxido nítrico. El gen *iNOS* es el principal encargado de producir NO en los macrófago M1, al expresarse este gen se produce la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), es a través de esta vía, que la producción de NO es mucho más efectiva. Por otro lado en los macrófagos M2 se activan el gen *Arg1* que al expresarse produce la enzima *Arginasa*, la función de esta enzima es producir NO a través del metabolismo de la arginina, sin embargo esta vía no es tan eficiente como la mediada por la enzima iNOS[51].

Este tipo de respuestas caracterizan a los macrófagos al estar en contacto con *Mycobacterium tuberculosis*. La función de cada estado de polarización de los macrófagos ya se explico con anterioridad, lo relevante es el efecto que causa

en los macrófagos al estar en contacto con los factores de virulencia de *Mtb* [10, 23, 26, 47, 52, 53]. En diversos estudios se ha descrito la existencia de distintos estados de polarización del macrófago presentes al mismo tiempo y en la misma localización. La localización de estos macrófagos en granulomas desarrollados en simios mediante la identificación de las enzimas características de cada estado (iNOS y Arg1) sugiere la coexistencia de ambos tipos de macrófagos [51, 54, 55]. La existencia de los granulomas indica una respuesta inmunológica activa ante la infección, El hecho de que se presenten dos escenarios inmunológicos distintos no es un asunto extraordinario ya que en el microambiente se pueden presentar distintos factores que estimularán a la respuesta inmunológica de distintas formas. Lo que si es extraordinario es que no se pueda determinar un perfil dominante en la respuesta inmunológica desarrollada ante la infección por *Mtb* [29] .

La proteína ESAT-6 participa en la virulencia del bacilo [56], esta proteína provee a *Mtb* distintas capacidades para sobrevivir dentro de la célula huésped. La proteína ESAT-6 al interactuar con los PRRs, particularmente TLR-2 provoca distintas reacciones inmunológicas en el macrófago que pueden ser: producción de citocinas inflamatorias, formación de poros en la membrana celular del macrófagos, acumulación de especies reactivas de oxígeno[10, 17, 57]. La proteína ESAT-6 también posee la capacidad de alterar el metabolismo de los macrófagos. Se ha demostrado que recalibra al macrófago promoviendo el fenotipo espumoso el cual se caracteriza por la acumulación de lípidos, disminución en la producción de NO y secreción de citocinas antiinflamatorias [18, 58-61]. La capacidad de modificar el metabolismo es una de las múltiples

funciones descritas para ESAT-6, también se ha descrito su capacidad de inducir apoptosis en los macrófagos mediante la expresión de caspasas, e incluso en experimentos realizados *in vitro* se ha observado que este efecto se produce de manera dosis-dependiente [46, 62].

En cuanto a la producción de citocinas provocada por el contacto con ESAT-6 existe controversia ya que algunos autores reportan la producción de citocinas pro inflamatorias como lo es el TNF- α , sin embargo reportan que este efecto es dosis-dependiente y dependiente del tiempo. Se reporta que la secreción de TNF- α alcanza su máxima concentración a las 8 horas y disminuye considerablemente hasta las 24 horas, posteriormente hasta las 72 horas los niveles continuarán siendo bajos [48]. Sin embargo otros autores consolidan la controversia sobre la función de ESAT-6 ya que describen que en sus experimentos al aumenta la dosis de ESAT-6 disminuye la secreción de citocinas pro inflamatorias como IL-12, IL-6 y TNF- α al compararlo con el estímulo provocado por LPS. Al profundizar esta situación y valorar la expresión de los genes que producen citocinas como IL-1 β , TNF se observa que al estímulo con ESAT-6 disminuye la expresión de los genes que expresan estas proteínas [63, 64]. Otros grupos de trabajo describen como que al transfectar a la cepa BCG con el gen que codifica a ESAT-6, los macrófagos secretan TNF- α e IFN- γ , comprobando que ESAT-6 estimula la producción de citocinas pro inflamatoria [65]. El TNF- α es una citocina característica de macrófagos M1 y el IFN- γ es necesaria para activar a los macrófagos y polarizarlos al estado M1 [1, 66]. De esta manera se establece la controversia en la literatura sobre la

función de ESAT-6 en la respuesta inmunológica y sobre como es que posee las características de generar respuestas inflamatorias, sin embargo se reporta también que posee efectos antiinflamatorios, mientras que en el granuloma ambos tipos de macrófagos co-existen[67-69].

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

En distintos modelos experimentales de tuberculosis se han observado diferentes subpoblaciones de macrófagos lo cual sugiere una regulación por parte del bacilo. La proteína ESAT-6 es un factor de virulencia de *Mtb.* que podría ser de importancia en la infección, regulando la polarización de macrófagos como un factor que facilita la supervivencia del bacilo dentro del huésped.

Actualmente existe controversia sobre la función de ESAT-6 en la regulación de la polarización de estas células. Por lo que elucidar el efecto de ESAT-6 en la polarización de los macrófagos permitirá comprender los mecanismos que pudieran estar involucrados en etapas tempranas de la infección.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar el efecto de ESAT-6 sobre la polarización de macrófagos.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de apoptosis inducidos por ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Cuantificar el NO en los sobrenadantes de los macrófagos estimulados por ESAT-6.
3. Cuantificar los niveles de citocinas relacionadas con M1/M2 en macrófagos estimulados con ESAT-6.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Medios de cultivo y su preparación

4.1.1 Medio completo

La preparación de medio de cultivo completo consiste en la adición de suero bovino fetal al 5%, L-glutamina al 2% y complementando el volumen final con medio DMEM Advance (Gibco) (Ver apéndice A).

4.1.2. Medio de diferenciación

El medio de diferenciación se preparó colocando una solución de medio que contiene factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) a una concentración del 30% al medio completo (Ver apéndice A).

4.1.3. Medio de cultivo para estimulación de macrófagos con ESAT-6.

Para estimular a los macrófagos se utilizó la proteína ESAT-6 de *Mtb*. Recombinante de ABCAM (ab124574). El producto contenía 50µg de la proteína recombinante, se encontraba almacenado a -20°C, se descongeló a 4°C y se prepararon alícuotas a diferentes concentraciones 0.5µg/mL, 1µg/mL y 2µg/mL disueltas en medio completo.

4.2 Reactivos y su preparación.

La solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fue preparada en agua estéril y a una concentración final de 0.1M a un pH de 7.3-7.4. Una vez preparada la solución se esterilizó en autoclave y por filtración en una membrana de 0.22 μm .

La preparación de azul de tripano (Sigma No. 468) se realizó pesando 2g disolviéndolos en 50 mL de PBS (concentración al 4%). Posterior a la preparación del colorante azul de tripano se filtro con un filtro Whatman y se guardó.

La solución de Griess se preparó utilizando el reactivo de Griess modificado de Sigma (G4410-10G). Se pesaron 0.5g y se disolvieron en 12.5 mL de H₂O ultra pura. La solución de Griess se almacenó a 4°C y se protegió de la luz, el almacenamiento de la solución era temporal ya que la solución se utilizaba fresca para cada curva de calibración y experimento.

4.3 Obtención de macrófagos de médula ósea

4.3.1 Animales de experimentación

Los animales utilizados para este proyecto fueron ratones BALB/c criados en el bioterio del departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina bajo condiciones controladas con agua y alimento *ad libitum*. Los procedimientos realizados a los ratones se efectuaron bajo lo establecido por la NOM 062-ZOO-1999, este proyecto fue aprobado por el comité de ética de esta Facultad bajo el número de registro IN16-00001.

Los ratones seleccionados para este proyecto tenían una edad de entre 6 y 8 semanas y se sacrificaron mediante dislocación cervical.

4.3.2. Obtención de la médula ósea

Las condiciones de trabajo posterior al sacrificio se realizaron en esterilidad en un mechero de Bunsen. Una vez que se sacrificó el ratón se procedió a obtener el fémur y la tibia de ambos miembros inferiores. Se realizó una incisión en la línea media del abdomen, se removió la piel de las piernas levantando la piel en base de cada pata y se retiró. Se removió la masa muscular hasta que el hueso quedó expuesto, evitando cortar el hueso ya que cualquier daño al hueso comprometería la esterilidad de la médula ósea. Una vez disecado el fémur y se expuso la articulación de la cadera de cada muslo y la rodilla de cada pierna y se cortaron las articulaciones separando los huesos. Los huesos libres de toda la masa muscular posible se colocaron en un tubo cónico con medio de cultivo completo a 4°C. Se trasladaron los huesos a la campana de flujo laminar para la manipulación de los mismos en condiciones de esterilidad. Se retiró en su totalidad la masa muscular de cada hueso y se lavaron con medio completo a 4°C, se cortaron los huesos de las epífisis. Se colocó una aguja 25-G para perfundir con medio de cultivo completo la médula ósea. La perfusión continuó hasta que el hueso se observará blanco o se observará a la médula ósea salir del hueso. Posterior al lavado de cada hueso el tubo donde se recolectó se

centrifugo a 1600 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue decantado y el botón celular se resuspendió en 1mL de medio de diferenciación mezclando gentilmente evitando las burbujas, se tomo una alícuota de 10µL y se resuspendió en 90µL de la solución azul de tripano al 4% [70, 71].

4.3.3 Cuantificación de células

La alícuota obtenida de la suspensión de las células, que se encontraba en una dilución 1:10 se cuantificaba mediante el uso de la cámara de Neubauer (B31781-1 de Baxter). Se colocaron 10µL y se contaron en los cuadrantes de cada lado de la cámara, se obtuvo un promedio de las células vivas y se realizó el siguiente cálculo: ((Promedio de células vivas) (1×10^4) (Factor de dilución)(volumen de suspensión))

4.3.4 Cultivo de células obtenidas de médula ósea

El número obtenido representa el número de células obtenidas, se tomo una alícuota de la solución para poder colocar 8×10^6 células en placas de cultivo celular de 100mm x 20mm (430293) de Corning. Se coloco la concentración celular llevándola a un volumen final de 10 mL de medio de diferenciación incubándolo a 37°C al 5% de CO₂. Es necesario añadir primero el medio de diferenciación y posteriormente las células agitando suavemente para lograr una distribución homogénea en la placa.

Después de 48 horas de incubación se observó la morfología de las células en el invertoscopio y agregaron 5mL más de medio de diferenciación a 37°C. La culminación del cultivo se realizó a las 120 horas totales de incubación observando las placas en el invertoscopio buscando células de apariencia estrellada y adheridas al fondo de la placa.

4.3.5 Recuperación de los macrófagos

Las placas fueron colocadas sobre gel refrigerante cubierto con una gasa durante 20 minutos. Se retiró el medio de cultivo y se colocó PBS estéril a 4°C repitiendo el procedimiento en toda la placa con la intención de despegar los macrófagos de la placa. Se realizó conteo de las células obtenidas usando la técnica de exclusión con azul tripano. Este paso se repitió las veces necesarias obtener el número requerido de células por experimento.

4.4 Ensayo de TUNEL

Las células obtenidas se colocaron en cámaras Lab-Tek II Chamber Slide de Nunc (154941) de 8 pozos tratadas. El área de cultivo de cada pozo en la placa es de 0.7 cm², se colocaron las 1.5x10⁵ células por 1 cm², por lo que en cada pozo se colocaron 1.05x10⁵ células por pozo con un volumen de 500 µL de

medio de cultivo, incubándose durante 24 horas para que las células se adhirieran a la placa. Posterior a la incubación de 24 horas, se retiró el medio de cultivo completo y se añadió medio de cultivo con ESAT-6 a diferentes dosis (0.5, 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) incubándose durante 8, 24 y 72 horas. Este experimento se realizó por duplicado en 2 experimentos independientes.

Se utilizó el kit *In situ* BrdU-Red DNA para realizar el ensayo de TUNEL de ABCAM (ab66110). El procedimiento se realizó conforme a las indicaciones del proveedor. Se fijaron las cámaras con formaldehído/PBS al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron por inmersión en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. El siguiente lavado se realizó vertiendo PBS en las cámaras y colocándolas en una superficie plana.

Se prepararon 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solución de proteinasa K y se cubrió cada laminilla con 100 μL de solución y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se sumergió la laminilla en PBS durante 5 minutos, se retiró el PBS y se cubrió la laminilla con 100 μL de buffer de lavado durante 5 minutos a temperatura ambiente, se repitió el lavado con el buffer de lavado.

El siguiente paso es cubrir las laminillas con 50 μL de la solución etiquetadora de DNA preparada con: 100 μL de TdT buffer de reacción, 7.5 μL de TdT enzima, 80 μL de Br-dUTP, 322.5 μL de H_2O destilada. Se cubrió la laminilla procurando esparcir la solución a lo largo de la laminilla y se incubó a 37°C en una incubadora húmeda durante 1 hora. Se retiró la cobertura plástica y se enjuagó la laminilla sumergida en PBS durante 5 minutos realizando este paso 2 veces.

Se cubrió la laminilla con 100 μL de solución con anticuerpo preparado con 50 μL de anti-BrdU-Red Antibody y 950 μL de buffer de enjuague. Se coloca una

cobertura plástica incubando las laminillas en oscuridad, en un recipiente con gasas humedecidas durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se retiró la cobertura plástica y se añade 100µL de 7-AAD/RNase A buffer de tinción, se cubre de nuevo procurando esparcir el líquido y se incuba en la oscuridad en una incubadora húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se levantan las células al sumergir la laminilla en agua destilada durante 5 minutos, realizando el paso 2 veces. Se agrega DAPI de ABCAM (ab104140) incubando durante 5 minutos y se realizaron dos lavados en agua destilada. Se observaron las células a 390 nm (azul) y a 586 nm (rojo). Se fotografiaron cada pozo un mínimo de 3 veces y se contabilizaron las células que presentaban solo color azul y color morado obtenido al mezclar la imagen de los núcleos rojos y azules.

4.5 Estímulo con ESAT-6 de Mtb

Las células despegadas de la placa de cultivo se colocaron en placas de 24 pozos COSTAR (3524) de fondo plano tratadas para cultivo de tejidos. Se colocaron a una concentración de 1.5×10^5 células por pozo durante 24 horas con 500µL de medio de cultivo completo para que las células se adhirieran. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se colocó ESAT-6

a 0.5µg/mL; incubando durante 8, 24 y 48 horas. Se recuperaron los sobrenadantes para cuantificar NO y citocinas producidas por los macrófagos en los tiempos de incubación ya mencionados. Se colocó medio fresco en cada tratamiento y control para probar la capacidad fagocítica de los macrófagos; este experimento se realizó por triplicado con sus controles y en dos experimentos independientes como replicas técnicas.

4.6 Cuantificación de la producción de óxido nítrico.

La producción de óxido nítrico se realizó mediante el método de Griess, realizando una curva de calibración previa a cada experimento. Este experimento se realizó con sus controles y tratamientos por triplicado en dos experimentos independientes como replicas técnicas.

La curva de calibración consiste en colocar 7 estándares y un blanco a concentraciones de 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 y 25 µM, todos por triplicado preparados de un concentrado de NaNO₂ 100µM. Las lecturas se realizaron por espectrofotometría, cada lectura por triplicado a una longitud de onda de 540 nm, colocando 250µL de medio de cultivo completo y 250µL de solución de Griess, es importante realizar todas las lecturas en un tiempo menor a 30

minutos. En el apéndice C se muestran las curvas de calibración utilizadas para los experimentos.

4.7 Pruebas de fagocitosis

Se realizaron pruebas de fagocitosis a cada tratamiento y su control, por triplicado en 2 experimentos independientes como replicas técnicas. Se colocaron 500 μ L de medio con esferas de látex carboxiladas de 2 μ m (Polysciences 18327). Se colocaron 1 μ L de esferas de látex por cada mililitro de medio de cultivo completo. Se observaron las células durante dos horas y se fotografiaron en 3 a 5 campos, se contabilizaron las células que fagocitaron y las que no lo hicieron en cada uno de los tratamientos y sus controles.

4.8 Determinación del perfil de polarización mediante la secreción de citocinas

Se cuantificó la cantidad de citocinas producidas por los macrófagos estimulados por ESAT-6 en sus tres tiempos de incubación (8, 24 y 48 horas). Se recuperaron experimentos de los triplicados experimentales y sus controles en dos experimentos independientes como replicas técnicas. En la tabla 2 se mencionan los datos del ELISA tipo Sandwich.

Kit	Proveedor	No. De catalogo.
Quantikine ELISA Mouse TGF-b1	R&D Systems	MB100B
Mouse IL-10 ELISA Kit	Thermo Scientific	EM2IL10
Mouse TNFa ELISA Kit	Thermo Scientific	EMTNFA

Las pruebas de ELISA se realizaron acorde a las especificaciones del proveedor y debido a esa circunstancia los sobrenadantes no alcanzaban el volumen requerido. Esta situación se resolvió tomando los sobrenadantes de controles y tratamientos con sus respectivos triplicados y mezclándolos para obtener el volumen indicado.

4.8.1 Determinación de TGF- β 1

La determinación de TGF- β 1 se realizó a partir de los sobrenadantes de los cultivos estimulados con 0.5 μ g/mL de ESAT-6 de *Mtb*. Se colocaron 100 μ L de sobrenadante, la muestra se activó agregando 20 μ L de la solución de Hall 1N, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se neutralizo colocando 20 μ L de una solución de NaOH1.2N/0.5 M HEPES. Este paso genera un factor de dilución de 1.4, por lo que se consideró al momento de extrapolar los datos obtenidos.

Se preparó la curva de calibración con la s concentraciones señaladas en la tabla 3.

Estándar	Concentración
1	2000 pg/mL
2	1000 pg/mL
3	500 pg/mL
4	250 pg/mL
5	125 pg/mL
6	62.5 pg/mL
7	31.3 pg/mL

El tratamiento de cada pozo fue el siguiente: se agregaron 50 μ L de diluyente de ensayo RD1-21, se agregaron los estándares, controles y muestra activados por triplicado en cada pozo, se dio un ligero golpe a la placa durante un minuto y se cubrió con plástico protector incubando la placa durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después se decantaron los pozos y se lavaron con 400 μ L de buffer de lavado, realizando un total de 4 lavados. Posterior a los lavados se agregaron 100 μ L del anticuerpo anti-TGF- β 1 conjugado con peroxidasa de rábano a cada pozo, se cubrió la placa y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se repitió el lavado con el buffer de lavado a un total de 4 lavados. Se agregaron 100 μ L de solución Stop a cada poco y se agito suavemente la placa para asegurar que se mezclara. Se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan FC. La curva de estandarización se realizó y con los valores obtenidos se extrapolaron los datos teniendo en cuenta el factor de dilución de 1.4 para multiplicar por este factor al extrapolar.

4.8.2 Determinación de IL-10.

La determinación de IL-10 se realizó un ELISA tipo sandwich con el kit señalado en la tabla 3. En la placa se añadieron 50µL de buffer de ensayo a cada pozo y se añadieron posteriormente 50 µL de los estándares y las muestras en cada pozo por duplicado. Se cubrió la placa y se incubo durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavo la placa 3 veces con el buffer de lavado y se añadieron 50µL del reactivo de anticuerpo biotinilado premezclado a cada pozo. Se cubrió la placa y se incubo durante una hora a temperatura ambiente. Una vez que el tiempo de incubación finalizó se lavo la placa 3 veces con el buffer. Se diluyo el concentrado de estreptavidina-HRP en buffer de dilución, se agregó 100 µL de esta solución a cada pozo. La placa se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, posterior a la incubación se lavó la placa tres veces para agregar 100 µL de sustrato TMB a cada pozo. Se incub durante 30 minutos a temperatura ambiente, deteniendo la reacción agregando 100 µL de solución STOP a cada pozo. La lectura se realizó en el lector de placas Thermo Scientific Multiskan FC a una longitud de onda de 450 nm.

Estándar	Concentración
1	3000 pg/mL
2	1000 pg/mL
3	333 pg/mL
4	111 pg/mL
5	37 pg/mL
6	0 pg/mL

La curva de calibración se preparo conforme a lo señalado en la tabla 4 y los resultados se extrapolaron conforme a los datos obtenidos en la curva de calibración.

4.8.3 Determinación de TNF- α

La determinación de IL-10 se realizó un ELISA tipo sandwich con el kit señalado en la tabla 3. Se agregaron 50 μ L de los estándares y las muestras en cada pozo por duplicado. Posteriormente a cada pozo se le agregaron 50 μ L de reactivo de anticuerpo biotinilado a cada pozo, se cubrió la placa e incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, las placas se lavaron 5 veces con el buffer de lavado. Se diluyó el concentrado estreptavidina-HRP y se agregaron

100 μ L a cada pozo, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con la placa cubierta para lavarla 5 veces con el buffer de lavado una vez transcurrido el lapso de tiempo. Se agregaron 100 μ L de sustrato TMB a cada pozo incubando durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, deteniendo la reacción con 100 μ L de solución Stop en cada pozo. Se realizó la medición de la absorbancia en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan FC a una longitud de onda de 450 nm. La curva de calibración se realizó con las especificaciones señaladas en la tabla 5.

Las concentraciones se obtuvieron por extrapolación con la curva obtenida con los estándares.

Estándar	Concentración
1	2450 pg/mL
2	350 pg/mL
3	50 pg/mL
4	0 pg/mL

4.9 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó en el software Graph Pad Prism Versión 6.0. Los datos se capturaron y se analizaron estadísticamente para obtener medias, medianas y modas. Posteriormente se analizó el comportamiento de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnoff. Todos los datos

tuvieron un comportamiento fuera de la campana Gauss, siendo de distribución anormal por lo que se compararon los grupos mediante pruebas de comparación múltiple, Kruskal-Wallis y el análisis post-hoc se realizó con la prueba de Dunn y prueba de Mann-Whitney. Todos los ensayos se estudiaron y se les resto el error *etha* (error experimental), para poder eliminar dicho factor. En todas las pruebas se considero un $p < 0.05$ como valor significativo estadísticamente.

4.10 Manejo de residuos peligrosos y desechos anatómicos

El manejo de todos los residuos orgánicos se llevará a cabo a los parámetros internos del departamento y Hospital Universitario los cuales son establecidos acorde a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Todos los cultivos se desecharan en una bolsa roja, asegurando que el contenedor del cultivo se encuentre hermético para evitar derrames. Los líquidos deben ser tratados antes de desecharse ya sea mediante esterilización por calor, o mediante el uso de tabletas de cloro obteniendo una dilución final de estas de 2,500 ppm (para tabletas de 4.7g diluir 1.75 tabletas por litro) o por la dilución de Virusolve 1:20 final. En cuanto a la disposición de los cadáveres de animales se colocaron en bolsas amarillas y sin exceder media hora después del sacrificio se cerró la

bolsa con un nudo o bien con cinta adhesiva, se etiquetaron las bolsas con los datos de quien solicito los animales, cantidad de animales y laboratorio al que se encuentra adscrito el investigador. Se colocaron los cadáveres en el congelador correspondiente.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Determinar los niveles de apoptosis inducidos por ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*.

La determinación de la dosis de ESAT-6 con la que se estimuló a los macrófagos consistió en detectar aquella dosis que causará el menor grado de apoptosis. En la figura 1 se observan los patrones observados al microscopio junto con sus controles. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en dos experimentos aislados como réplicas biológicas. Ambos experimentos presentaron el mismo patrón, demostrando así su reproducibilidad.

La proteína ESAT-6 induce la apoptosis de una manera dosis dependiente, entre mayor la dosis la inducción de apoptosis será mayor. La dosis en la que se observó un porcentaje menor de apoptosis en los macrófagos fue la de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. El efecto dosis dependiente en la inducción de apoptosis ya no se observó a las 72 horas de incubación, motivo por el que en los experimentos ya no se utilizó este tiempo de incubación (tabla 6).

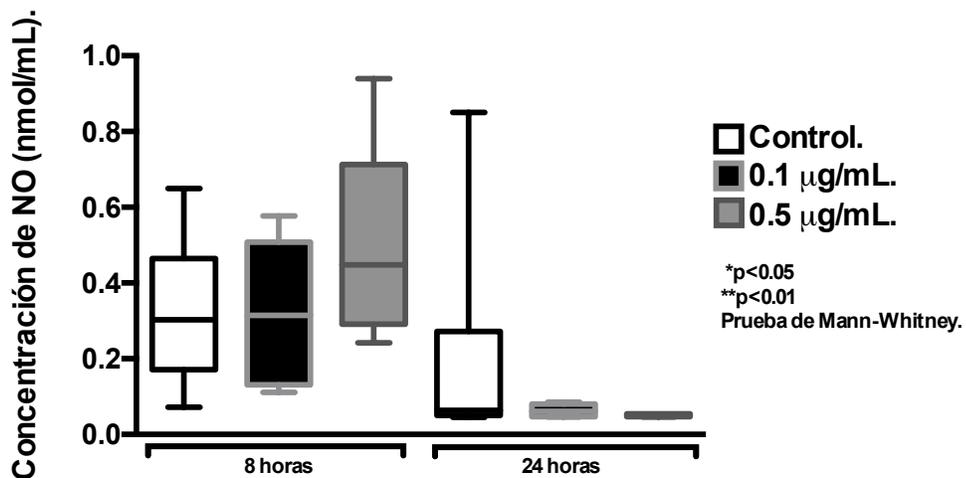
Tabla 6.Efecto de ESAT-6 en la inducción de apoptosis.					
8 horas	<i>Control</i>	<i>0.5 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>1.0 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>2.0 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>P</i>
	0	0	2.142*	8.904*	0.01
24 horas	<i>Control</i>	<i>0.5 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>1.0 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>2.0 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>P</i>
	3.5	8.16	11.27*	11.39*	0.01
72 horas	<i>Control</i>	<i>0.5 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>1.0 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>2.0 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>P</i>
	25.83	26.98	17.87	22.93	NS

Los valores presentados son medianas. Prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. * <0.05 , ** <0.01 .

Para determinar el efecto de la interacción de ESAT-6 a la dosis que produce menor porcentaje de apoptosis con los macrófagos, se cuantificó el NO de los sobrenadantes de las células estimuladas con 0.5 $\mu\text{g/mL}$, se añadió una dosis de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ para poder observar que el efecto de la interacción de ESAT-6 con el macrófago también depende de la dosis. La producción de NO es

significativamente mayor a las 8 horas de incubación, sin embargo la producción de NO disminuye importantemente a las 24 horas.

En la figura 2 se observa una tendencia de aumentar la producción de NO a la dosis de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ESAT-6, mientras que entre el control y el tratamiento de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se observan diferencias. Debido a que no existe diferencia entre estas dosis se eligió la dosis de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por facilidad técnica.



Tiempo de estimulación y concentración de ESAT-6.

Figura 2. Producción de NO al estímulo con ESAT-6.

No se aprecian diferencias significativas entre el control y los tratamientos.

5.2 Producción de NO en los macrófagos estimulados con ESAT-6.

Los macrófagos estimulados con 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de ESAT-6 no produjeron NO de manera distinta a su control a las 8 horas de incubación pues no se encontró una diferencia significativa. En los tiempos de incubación posteriores se observó que la producción de NO disminuyó significativamente en comparación con sus respectivos controles. Esto señala que ESAT-6 regula negativamente la producción de NO en los macrófagos en los tiempos de incubación más prolongados (Fig. 3), indicando un probable cambio en el perfil de polarización de los macrófagos.

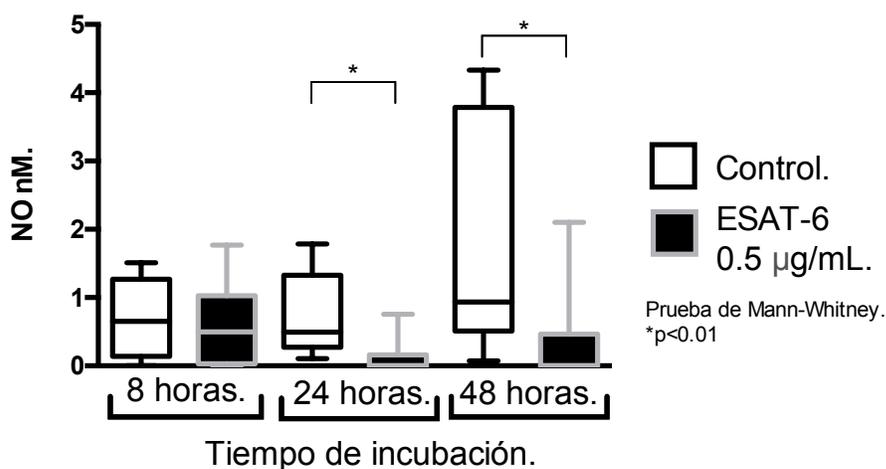


Figura 3. ESAT-6 regula negativamente la producción de NO. A las 8 horas no hay diferencia significativa en la producción del NO, sin embargo a las 24 y 48 horas si disminuye significativamente.

5.3 Valoración de la función fagocítica de los macrófagos estimulados con ESAT-6

La capacidad fagocítica es una característica de los macrófagos por lo que se valoro si esta se afectaba al estimularlos con la proteína ESAT-6. Se observa una tendencia a la disminución en la fagocitosis al comprar con sus controles. La capacidad fagocitica de los macrófagos fue significativamente diferente a las 48 horas de estimulación con la proteína estudiada (Fig. 4).

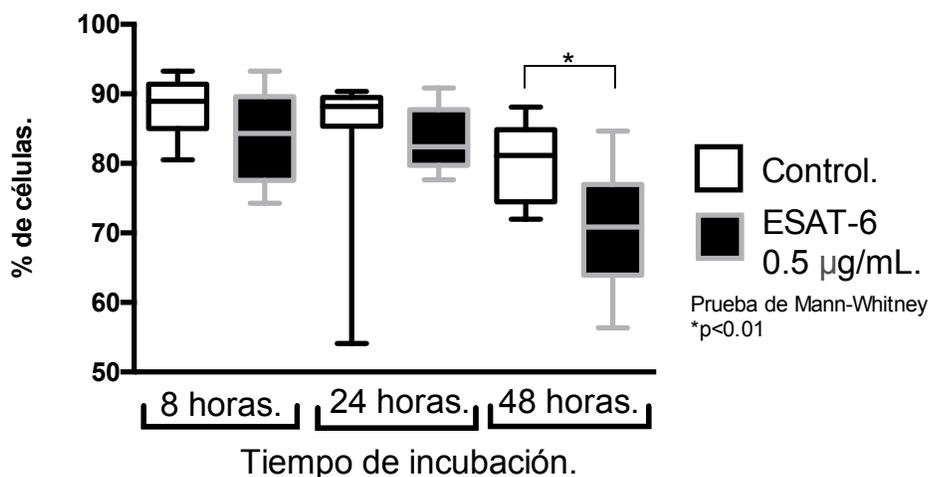


Figura 4. La proteína ESAT-6 disminuye la capacidad fagocítica de los macrófagos. La capacidad fagocítica se cuantifico 2 horas después de colocar esferas de látex a los macrófagos, solo se observa disminución en la capacidad fagocítica a las 48 horas.

5.4 Determinación del perfil de polarización de los macrófagos conforme a la producción de citocinas.

Las citocinas estudiadas fueron TNF- α , TGF- β e IL-10, la producción de estas citocinas en los sobrenadantes de los cultivos sugiere un perfil de polarización de los macrófagos.

5.4.1 Producción de TNF- α al estímulo con ESAT-6 como indicador del perfil M1

La citocina TNF- α es característica de los macrófagos M1 y se detectó su producción cuando la proteína ESAT-6 interactuó con los macrófagos .

En la figura 5 se observa como la producción de TNF- α varía en el tiempo, elevando su producción a las 8 horas y disminuyéndola a las 48 horas, en ambos tiempos de incubación las diferencias con sus controles son estadísticamente significativas (Fig. 5). Los resultados fueron reproducibles al replicarse en una replica técnica del experimento.

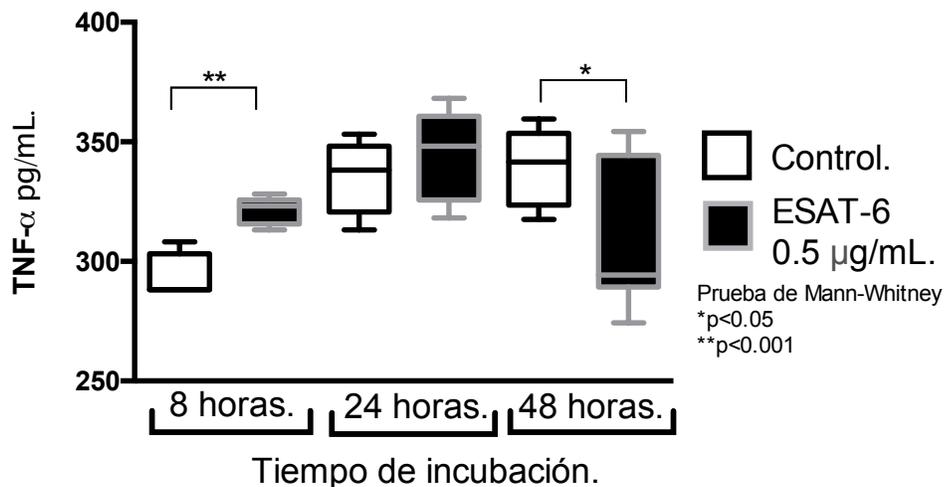


Figura 5. La producción de TNF- α es regulada por la proteína ESAT-6. La producción de TNF- α varía en los distintos tiempos de incubación.

5.4.2 Producción de TGF- β e IL-10 al estímulo con ESAT-6 como indicadores del perfil M2

La producción de estas citocinas es importante para valorar una polarización hacia el perfil M2. En la figura 6 se muestra como la producción de TGF- β está

presente en los controles y en las células estimuladas con ESAT-6, se muestra como a las 48 horas aumenta su producción, sin embargo no es mayor que su control. Los resultados se replican en el experimento independiente. La producción de IL-10 no se detectó (figura 8) dentro de los valores cuantificados en la curva de calibración (Apéndice D), estos resultados mostrarán ser reproducibles al obtener los mismos resultados en la replica técnica realizada de manera aislada.

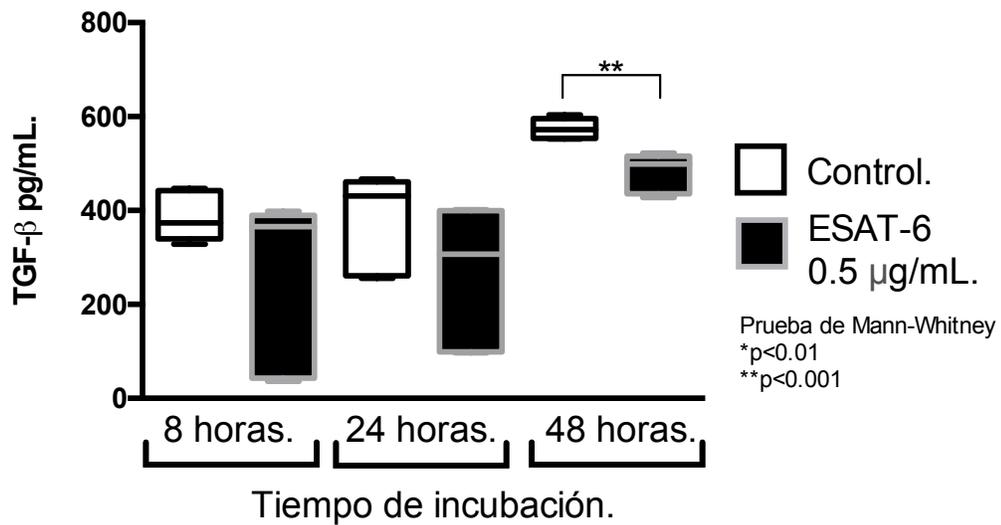


Figura 6. Efecto de ESAT-6 en la producción de TGF- β . La producción de TGF- β es menor que sus controles en todos los tratamientos. Se observa un aumento en su producción a las 48 horas, sin embargo es menor al comparar con su control.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

El efecto de la proteína ESAT-6 en la producción de citocinas es controversial, algunos autores postulan que la interacción de esta proteína con los macrófagos estimula la producción de citocinas proinflamatorias, propias de un perfil M1, como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β [48, 64], mientras que otros autores señalan que la interacción de ESAT-6 con los macrófagos produce disminución en la producción de citocinas inflamatorias, disminución en la producción de NO y activación de la arginasa 1, características sugerentes de un perfil M2 [45, 63, 72].

La obtención de macrófagos a partir de la médula ósea de ratones Balb/c generó macrófagos de morfología estrellada con vesículas en su citoplasma y adheridos a la placa. También se encontró que los macrófagos poseían la capacidad de fagocitar perlas de látex. La observación de las células en placa y

la conservación de la capacidad fagocítica son métodos aceptables para identificar a los macrófagos, aunque no tan elegantes como podría ser la caracterización de marcadores de superficie mediante citometría de flujo. Sin embargo la caracterización realizada en este estudio cumple con el objetivo de obtener macrófagos y demostrar su funcionalidad[22, 71, 73].

En nuestros experimentos se obtuvo un efecto inductor de apoptosis mediado por ESAT-6 de manera dosis-dependiente. Nuestros resultados coinciden con lo reportado en la literatura por distintos autores donde ESAT-6 induce apoptosis, sin embargo los mecanismos exactos aún son sujetos a discusión en la literatura [62, 74-77]. El objetivo de este trabajo no fue explicar el mecanismo de inducción de apoptosis en las células estimuladas con ESAT-6, sin embargo conocer el mecanismo es importante para determinar si la apoptosis inducida es reversible o irreversible [78-81]. Existen reportes de la capacidad de ESAT-6 de inducir apoptosis mediante la interacción de miRNA155 y SOCS1. Al inducir la expresión de miRNA155 se inhibe la expresión de SOCS1 y en consecuencia aumenta la actividad de la caspasa 3 [77]. Otros autores describen que las micobacterias con alta expresión de ESAT-6 inducen apoptosis al activar la caspasa 1 [76], sin embargo estos trabajos no estudian el efecto en la polarización de los macrófagos después de la interacción entre los macrófagos y ESAT-6. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado en la literatura sobre el efecto dosis dependiente de ESAT-6 en la inducción de apoptosis en los macrófagos [46], aunque el mecanismo sugerido es mediante la formación de poros en la

membrana plasmática de la célula huésped y este mecanismo se ha demostrado que puede resultar reversible al retirar el estímulo que inicia el proceso de apoptosis pero no cuando ya se presenta apoptosis [80]. El efecto de ESAT-6 en distintos tipos de macrófagos está descrito en la literatura, sin embargo no se contempla el efecto inductor de apoptosis [18, 41, 45, 52, 57, 66, 77, 82, 83]. El ya mencionado efecto es un punto de controversia en la literatura; aún no se determina si este efecto es benéfico para la bacteria o para el huésped [84, 85].

En este trabajo se sugiere el posible efecto de ESAT-6 en la polarización de macrófagos, siendo este un tópico de controversia en la literatura. Nuestros resultados coinciden con lo reportado respecto a un efecto de polarización a M1 en el primer tiempo de incubación y una disminución del mismo en el último tiempo de incubación [48]. Sin embargo, los reportes en los que se estudia el efecto de la proteína ESAT-6 en la polarización de macrófagos son pocos y en los que se estudia utilizaron cepas de *Mtb* y no solo la proteína ESAT-6, por lo que los distintos factores presentes en la bacteria interfieren en los resultados [86].

El NO es un indicador de la activación de la respuesta inmunológica en los macrófagos, sin embargo la técnica de Griess para cuantificar los nitritos tiene algunas debilidades entre ellas la volatilidad del NO dificultando su detección una alternativa para la detección de la activación del macrófago podría ser la detección de la expresión de *Nos2* o *Arg1* mediante RT-qPCR. [27]. El NO producido por los macrófagos es un factor bactericida importante para la eliminación del agente *Mtb* [65, 82, 87].

La fagocitosis es una de las funciones básicas de los macrófagos [21, 23]. Por otra parte también se describe como los macrófagos activados alternativamente disminuyen su capacidad de fagocitosis [33, 73]. En nuestros resultados se observa una tendencia a la disminución de esta capacidad, probablemente los macrófagos estimulados con ESAT-6 pudieran estar cambiando a un fenotipo M2. Para lo anterior, ensayos de inmunofenotipificación por citometría de flujo son necesarios para poder comprobar esta aseveración. La regulación negativa del NO a las 24 y 48 horas es un resultado que coincide con lo reportado en la literatura [51, 65, 82]. Es importante considerar que si bien la dosis de ESAT-6 utilizada genera poca apoptosis, existen células que entraron a este proceso, sin embargo al demostrar que a las 24 y 48 horas disminuye la producción de NO, al compararse con sus controles, rechaza la posibilidad de atribuir este fenómeno a la disminución en la población celular. Además, la disminución en la capacidad fagocítica de los macrófagos a las 48 horas es una evidencia importante que sustenta nuestro trabajo.

El perfil de polarización adoptado por los macrófagos se abordó conforme a la producción de citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias. Las citocinas seleccionadas son producidas por macrófagos M1 (TNF- α) y M2 (TGF- β e IL-10), respectivamente; sin embargo la inclusión de otras citocinas como IFN- γ , IL-1 β , IL-4 e IL-13 podría ser de utilidad para comprender el microambiente desarrollado al estímulo con ESAT-6.

La producción de TNF- α ha sido involucrada en el desarrollo de la infección por *Mtb* [48, 86]. En nuestros ensayos encontramos niveles elevados de TNF- α a las 8 horas pero disminuye a las 48 horas. Es un patrón similar al reportado en la literatura en donde señalan que el aumento de producción de TNF- α logra su pico máximo de producción a las 8 horas y su disminución a las 24 horas de estimulación [48]. Lo anterior indica una posible polarización de macrófagos a M1 en tiempos tempranos de estimulación.

La producción de TGF- β es un hallazgo importante pues es característica de los macrófagos que poseen función inmunoreguladora y de reparación de los tejidos [26, 53]. En nuestros resultados no se observó un cambio importante en la secreción de TGF- β y no se detectó secreción de IL-10. Las citocinas TGF- β e IL-10 se secretan en etapas tardías de la infección por *Mtb*, por lo que probablemente otras citocinas como IL-4 e IL-13 podrían ser de utilidad en la descripción del efecto de ESAT-6 sobre los macrófagos [53]. El estudio de IL-4 es de importancia debido a que existen reportes en la literatura donde se asocia su presencia a la complicación de la infección por *Mtb* ya que esta citocina es característica del perfil M2 [88]. Por otra parte estudios sugieren que los macrófagos activados (M2) por IL-4 no son necesarios para la progresión de la enfermedad [89], sin embargo este estudio indica los hallazgos de un modelo de ratón en el que concluyen que no es indispensable esta vía de activación para desarrollar tuberculosis. Otro aspecto importante es que los resultados no son concluyentes en el aspecto que el estudio se realiza con cepas de *Mtb* utilizando la bacteria entera y no se demuestra la actividad de cada

componente, además que los tiempos de estudio son muy prolongados y la actividad de ESAT-6 sucede en etapas tempranas de la infección por *Mtb*.

Los resultados obtenidos confirman lo reportado por otros grupos de trabajo donde describen que ESAT-6 actúa en los macrófagos regulando la producción de NO y la fagocitosis a la baja, así como un aumento en la producción de TNF- α a las 8 horas y la disminución de esta citocina a las 48 horas. El tiempo de estudio y el tipo de macrófagos utilizados pueden ser un factor que afecte al estudio, ya que el uso de líneas celulares humanas, la incubación por más lapsos de tiempo, la realización de otras pruebas como determinación de la expresión genética y pruebas que señalen el metabolismo de las células acorde al estado de polarización adoptado podrían ofrecer resultados diferentes que ayuden a resolver la controversia sobre el efecto de ESAT-6 en la polarización de los macrófagos. Se necesitan más estudios para determinar la participación de ESAT-6 en la polarización de macrófagos.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIÓN

La proteína ESAT-6 parece tener un efecto modulador sobre la polarización de los macrófagos, en etapas tempranas la producción de TNF- α aumentó mientras que su producción disminuyó a las 48 horas. Esto sugiere una polarización temprana de M1 y posiblemente una polarización a M2 a las 48 horas.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

1. Inmunofenotipificación de los macrófagos mediante citometría de flujo.
2. Detectar la expresión de genes característicos de macrófagos M1/M1.
3. Detectar la expresión de genes involucrados en la producción de NO.
4. Estudiar más citocinas para un perfil más amplio del microambiente

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang, X., et al., *ESAT-6 Inhibits production of IFN- γ by Mycobacterium tuberculosis-Responsive Human T Cells*. The Journal of Immunology, 2009. **182**: p. 3886-3667.
2. OMS, *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2014*. 2013.
3. Young, B.N., et al., *Social and clinical predictor of drug-resistant tuberculosis in a public hospital, Monterrey, Mexico*. Annals of Epidemiology, 2014. **24**: p. 771-775.
4. Young, B.N., et al., *The Effects of Socioeconomic Status, Clinical Factors, and Genetic Ancestry on Pulmonary Tuberculosis disease in Northeastern Mexico*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94303.
5. Harries, A.D., et al., *The looming epidemic of diabetes-associated tuberculosis- learning lessons from HIV-associated tuberculosis*. International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases., 2011. **15**(11): p. 1436-1444.
6. Sadoun, E., et al., *The Global Relationship Between the Prevalence of Diabetes Mellitus and Incidence of Tuberculosis- 2000-2012*. Global Journal of Health Science, 2015. **7**(2): p. 183-191.
7. Baghei, P., et al., *Diabetes mellitus and tuberculosis facts and controversies*. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders., 2013. **12**(58): p. 1-8.
8. Gómez-Gómez, A., et al., *Diabetes and Other Risk Factors for Multi-drug Resistant Tuberculosis in a Mexican Population with Pulmonary Tuberculosis- Case Control Study*. Archives of Medical Research, 2015. **46**: p. 142-148.
9. Kleinnijenhuis, J., et al., *Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and Developmental Immunology, 2011. **2011**: p. 1-12.
10. Rajaram, M.V., et al., *Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis*. Semin Immunol, 2014. **26**(6): p. 471-485.
11. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **396**: p. 190-198, 537-544.
12. Seghrouchni, F., et al., *Design of immunogenic peptides from Mycobacterium tuberculosis genes expressed during macrophage infection*. Tuberculosis (Edinb), 2009. **89**(3): p. 210-217.
13. Kurenuma, T., et al., *The RD1 locus in the Mycobacterium tuberculosis genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium*

- ion efflux in infected macrophages*. Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 3992-4001.
14. Simeone, R., et al., *Phagosomal Rupture by Mycobacterium tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death*. PLoS Pathogens, 2012. **8**(2): p. e1002507.
 15. Vergne, I., et al., *Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis*. PNAS, 2005. **102**(11): p. 4033-4038.
 16. Mishra, B.B., et al., *Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome*. Cell Microbiol, 2010. **12**(8): p. 1046-1063.
 17. Yu, X. and J. Xie, *Roles and underlying mechanisms of ESAT-6 in the context of Mycobacterium tuberculosis-host interaction from a systems biology perspective*. Cell Signal, 2012. **24**(9): p. 1841-1846.
 18. Singh, V., et al., *Mycobacterium tuberculosis-Driven Targeted Recalibration of Macrophage Lipid Homeostasis Promotes the Foamy Phenotype*. Cell Host & Microbe, 2012. **12**: p. 669-681.
 19. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. **30**(1): p. 16-34.
 20. Kelly, B. and L.A. O'Neill, *Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity*. Cell Res, 2015. **25**(7): p. 771-784.
 21. Chen Varol, A., Mildner, Steffen Jung., *Macrophages- Development and Tissue Specialization*. The Annual Review Of Immunology, 2015. **33**: p. 643-675.
 22. Wynn, T.A., A. Chawla, and P. J.W., *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. Nature, 2013. **496**: p. 445.
 23. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
 24. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**: p. 762-774.
 25. Ajay Chawla, K.D.N., Y.P. Sharon Goh, *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**: p. 738-749.
 26. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 1-13.
 27. Biswas, S.K., et al., *Macrophage polarization and plasticity in health and disease*. Immunol Res, 2012. **53**(1-3): p. 11-24.
 28. Lawrence, T. and G. Natoli, *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 750-761.
 29. Bhattacharjee, A., et al., *IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages*. Free Radic Biol Med, 2013. **54**: p. 1-16.
 30. Chaudhuri, A., *Regulation of Macrophage Polarization by RON Receptor Tyrosine Kinase Signaling*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 546.
 31. Sahin, E., et al., *Macrophage PTEN regulates expression and secretion of arginase I modulating innate and adaptive immune responses*. J Immunol, 2014. **193**(4): p. 1717-1727.

32. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
33. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-483.
34. Bligh, J. and J. R.G., *Polarizing Macrophages through Reprogramming of Glucose Metabolism*. Cell Metabolism, 2012. **15**: p. 793-795.
35. Biswas, S.K. and A. Alberto Mantovani, *Orchestration of Metabolism by Macrophages*. Cell Metabolism, 2012. **15**: p. 432-437.
36. Li, C., M. Levin, and D.L. Kaplan, *Bioelectric modulation of macrophage polarization*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21044-21055.
37. Mills, C.D., L.L. Lenz, and K. Ley, *Macrophages at the fork in the road to health or disease*. Front Immunol, 2015. **6**(59): p. 1-6.
38. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. Journal of Leukocyte Biology, 2003. **73**(2): p. 209-212.
39. Redente, E.F., et al., *Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 159-168.
40. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-896.
41. Barros, M.H., et al., *Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80908.
42. Chatterjee, S., et al., *Early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis promotes protective T helper 17 cell responses in a toll-like receptor-2-dependent manner*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002378.
43. Chatterjee, S., et al., *Early Secreted Antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis Promotes Protective T Helper 17 Cell Responses in a Toll-Like Receptor-2-dependent Manner*. PLoS Pathogens, 2011. **7**(11): p. e1002378.
44. Mortaz, E., et al., *Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis*. Journal of Clinical Immunology, 2015. **35**: p. 1-10.
45. Pathak, S.K., et al., *Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages*. Nature Immunology, 2007. **8**(6): p. 610-618.
46. Derrick, S.C. and S.L. Morris, *The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression*. Cell Microbiol, 2007. **9**(6): p. 1547-1455.
47. Smart, M., et al., *Immune response to immunodominant MYcobacterium tuberculosis antigen ESAT-6 derived peptide is HLA-haplotype dependent*. Jacobs Journal of Allergy and Immunology, 2014. **1**(1): p. 1-13.

48. Feng, Y., et al., *Continuous treatment with recombinant Mycobacterium tuberculosis CFP-10ESAT-6 protein activated human monocyte while deactivated LPS-stimulated macrophage*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **365**: p. 534-540.
49. Zahrt, T.C., *Molecular mechanisms regulating persistent Mycobacterium tuberculosis infection*. Microbes and Infection, 2003. **5**(2): p. 159-167.
50. Mills, C.D., *Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages*. Front Immunol, 2015. **6**(212): p. 1-12.
51. Rath, M., et al., *Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages*. Front Immunol, 2014. **5**(532): p. 1-10.
52. Sreejit, G., et al., *The ESAT-6 Protein of Mycobacterium tuberculosis Interacts with Beta-2 Microglobulin (B2M) Affecting Antigen Presentation Function of Macrophage*. PLoS Pathogens, 2014. **10**(10): p. e1004446.
53. Lugo-Villarino, G., et al., *Macrophage polarization- convergence point targeted by Mycobacterium tuberculosis and HIV*. Front Immunol, 2011. **2**(43): p. 1-7.
54. Mattila, J.T., et al., *Microenvironments in Tuberculous Granulomas Are Delineated By Distinct Populations of Macrophage Subsets and Expression of Nitric Oxide Synthase and Arginase Isoforms*. Journal Of Immunology, 2013. **191**: p. 773-784.
55. Duque-Correa, M.A., et al., *Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas*. PNAS, 2014. **111**(38): p. E4024-E4032.
56. Russel, D.G., et al., *Mycobacterium tuberculosis Wears What It Eats*. Cell Host & Microbe, 2010. **8**: p. 68-76.
57. Rahman, A., et al., *Mycobacterium tuberculosis Subverts the TLR-2 - MyD88 Pathway to Facilitate Its Translocation into the Cytosol*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86886.
58. Russel, D.G., et al., *Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma*. Nature Immunology, 2009. **10**(9): p. 943-948.
59. Peyron, P., et al., *Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for M. tuberculosis Persistence*. PLoS Pathogens, 2008. **4**(11): p. e1000204.
60. Cambier, C.J., et al., *Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids*. Nature, 2014. **505**(7482): p. 218-222.
61. Chua, J., et al., *A tale of two lipids: Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest*. Curr Opin Microbiol, 2004. **7**(1): p. 71-7.
62. Fratazzi, C., et al., *Macrophage apoptosis in mycobacterial infections*. Journal of Leucocyte Biology, 1999. **66**: p. 763-764.
63. Ganguly, N., et al., *Mycobacterium tuberculosis 6-kDa Early Secreted Antigenic Target (ESAT-6) protein downregulates Lipopolysaccharide induced c-myc expression by modulating the Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2*. BMC Immunology, 2007. **8**(24).

64. Mayer-Barber, K.D., et al., *Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk*. Nature, 2014. **511**(7507): p. 99-103.
65. Herbst, S., U.E. Schaible, and B.E. Schneider, *Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19105.
66. Xu, Y., et al., *Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing chimaeric protein of Ag85B and ESAT-6 enhances immunostimulatory activity of human macrophages*. Microbes Infect, 2010. **12**(8-9): p. 683-689.
67. Ernst, J.D., *The immunological life cycle of tuberculosis*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 581-91.
68. Kaufmann, S.H.E., *HOW CAN IMMUNOLOGY CONTRIBUTE TO THE CONTROL OF TUBERCULOSIS?* Nat Rev Immunol, 2001. **1**: p. 20-30.
69. Etna, M.P., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis*. Semin Immunol, 2014. **26**(6): p. 543-551.
70. Cho, H.J., et al., *Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(3): p. 1-12.
71. Zhang, X., R. Goncalves, and D.M. Mosser, *The isolation and characterization of murine macrophages*. Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 14**(141): p. 1-18.
72. El Kasmi, K.C., et al., *Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens*. Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1399-406.
73. Antonios, J.K., et al., *Macrophage polarization in response to wear particles in vitro*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(6): p. 471-82.
74. Aguilo, J.I., et al., *ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of Mycobacterium tuberculosis*. Cell Microbiol, 2013. **15**(12): p. 1994-2005.
75. Shi, J., et al., *A novel firefly luciferase biosensor enhances the detection of apoptosis induced by ESAT-6 family proteins of Mycobacterium tuberculosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **452**(4): p. 1046-1053.
76. Welin, A., et al., *Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing M. tuberculosis undergo caspase-1- and cathepsin B-independent necrosis*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20302.
77. Yang, S., et al., *Early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium Tuberculosis promotes apoptosis of macrophages via targeting the microRNA155-SOCS1 interaction*. Cell Physiol Biochem, 2015. **35**(4): p. 1276-1288.
78. Elmore, S., *Apoptosis- A Review of Programmed Cell Death*. Toxicol Pathol, 2008. **35**(4): p. 495-516.
79. Rastogi, R.P., R.P. Sinha, and S. R.P., *Apoptosis: Molecular machanisms and pathogenicity*. EXCLI Journal, 2009. **8**: p. 155-181.

80. Geske, F.J., et al., *Early stages of p53-induced apoptosis are reversible*. Cell Death and Differentiation, 2001. **8**(2): p. 182-191.
81. Hao, Z. and T.W. Mak, *Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP*. J Mol Cell Biol, 2010. **2**(2): p. 63-64.
82. Cunningham-Bussel, A., T. Zhang, and C.F. Nathan, *Nitrite produced by Mycobacterium tuberculosis in human macrophages in physiologic oxygen impacts bacterial ATP consumption and gene expression*. PNAS, 2013. **110**(45): p. e4256-e4265.
83. Ganguly, N., et al., *Mycobacterium tuberculosis secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF-kappaB transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(1): p. 98-106.
84. Aguilo, N., et al., *ESX-1-induced apoptosis during mycobacterial infection: to be or not to be, that is the question*. Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**(88): p. 1-7.
85. Jung, J., et al., *The Intracellular Environment of Human Macrophages That Produce Nitric Oxide Promotes Growth of Mycobacteria*. Infection and Immunity. **81**(9): p. 3198-3209.
86. Miller, J.L., et al., *The type I NADH dehydrogenase of Mycobacterium tuberculosis counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF-alpha-mediated host cell apoptosis*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000864.
87. Li, M., et al., *microRNA-146a promotes mycobacterial survival in macrophages through suppressing nitric oxide production*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23351-23361.
88. van Crevel, R., et al., *Increased Production of Interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T Cells from Patients with Tuberculosis Is Related to the Presence of Pulmonary Cavities*. Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**: p. 1194-1197.
89. Guler, R., et al., *IL-4/Ralpha-dependent alternative activation of macrophages is not decisive for Mycobacterium tuberculosis pathology and bacterial burden in mice*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121070.

APÉNDICES

APÉNDICE A: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO E INACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO.

La preparación de los medios de cultivo utilizo como base el medio de cultivo DMEM Advanced de Gibco, enriquecido con D-Glucosa, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 110mg/L, es un medio libre de suero bovino fetal y L-glutamina. Los procesos de preparación de medios y de alícuotas se realizó en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar.

La preparación del medio de cultivo completo consiste en la adición de suero bovino fetal a una concentración del 5%, L-glutamina 200mM al 2% y completando el volumen final con medio DMEM Advance.

El proceso de preparación del medio de diferenciación consistió en colocar factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) a una concentración del 30% y obtener el volumen final deseado con medio de cultivo completo, este medio se utilizaba fresco y no se almacenaba.

El sistema del complemento presente en el suero bovino fetal se inactivo al calentar el suero a 56°C durante 30 minutos, esto se realizo para evitar cualquier activación del sistema, posterior a la inactivación del complemento el

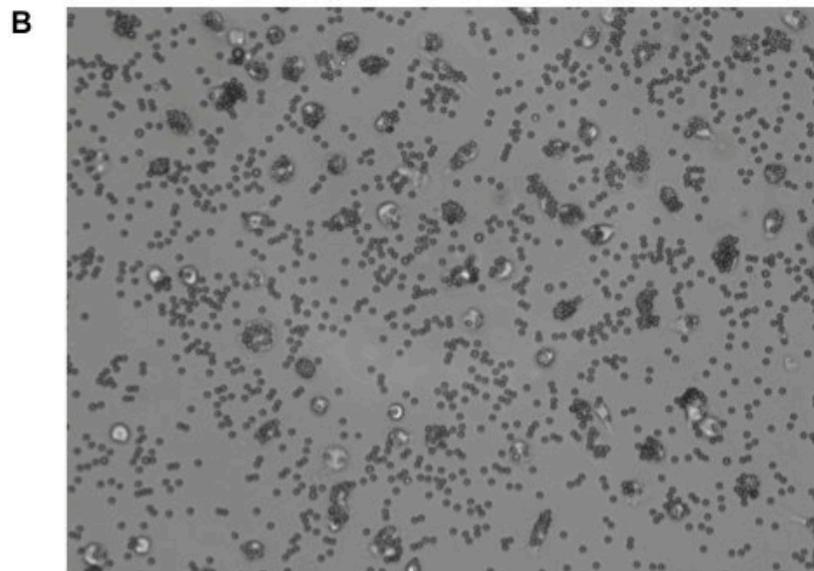
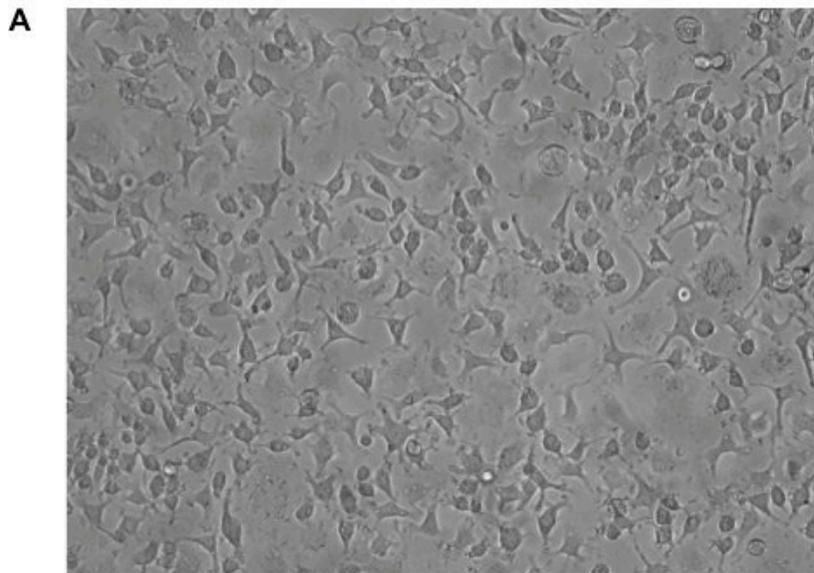
suero se esterilizo por filtración a través de una membrana de 0.22 μm . Posteriormente el suero inactivado y filtrado se almacenaba a -20°C en alícuotas de 50 mL cuya tapa se sellaba con parafina plástica (Parafilm) hasta su uso.

Para la preparación de L-glutamina de Sigma No. 200-202-1. Se pesaron 2.93g y se diluyo en 100 mL de PBS para obtener una concentración de 200mM. Posteriormente se filtro la solución por filtros de 0.22 μm depositándose en alícuotas de 10 mL las cuales se sellaron con parafina plástica para conservarlas a -20°C .

El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), con el que se preparo el medio de diferenciación, se obtuvo al cultivar fibroblastos de ratón de la línea L929. Este factor fue proporcionado por el laboratorio de Inmunología celular del departamento de Inmunología de esta Facultad. El medio fue recuperado de un cultivo celular de fibroblastos de ratón L929 con 3 a 7 días de incubación sin cambios de medio. El medio de cultivo fue filtrado con membranas de 0.22 μm y se realizaron alícuotas de 40 mL las cuales se sellaron parafina plástica y se almaceno a -20°C protegido de la luz. Al utilizar alguna alícuota de este medio se filtraba de nuevo con una membrana de 0.22 μm y se congelaba.

El proceso de descongelamiento para las alícuotas de suero, L-glutamina y medio de diferenciación consistió en colocar las alícuotas en agua a temperatura ambiente hasta que se logrará su descongelación, evitando que el agua alcanzará las tapas para minimizar cualquier riesgo de contaminación.

**APÉNDICE B: COMPROBACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN A
MACRÓFAGOS**

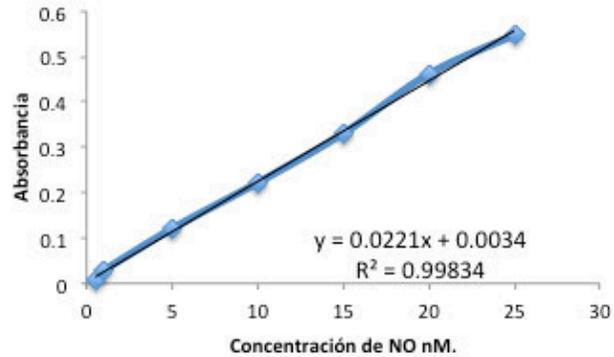


Comprobación de la diferenciación a macrófagos.

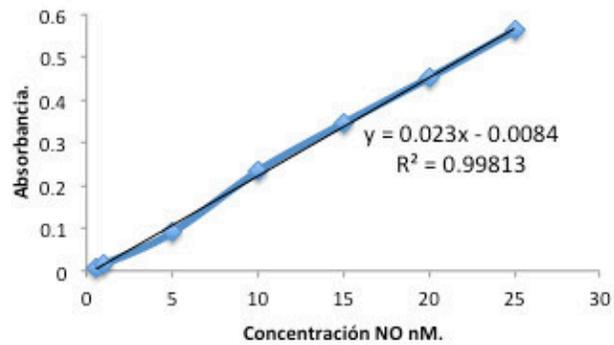
A. Se observan los macrófagos obtenidos después de 5 días de incubación con el medio diferenciador para comprobar las características morfológicas características de los macrófagos. B Se observan los macrófagos en contacto con perlas de látex en donde se observa que poseen la capacidad de fagocitar.

APÉNDICE C: CURVAS DE CALIBRACIÓN DE NO

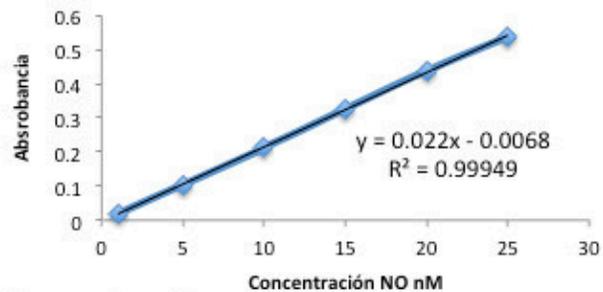
A Curva de calibración 8 horas.



B Curva de calibración 24 horas.



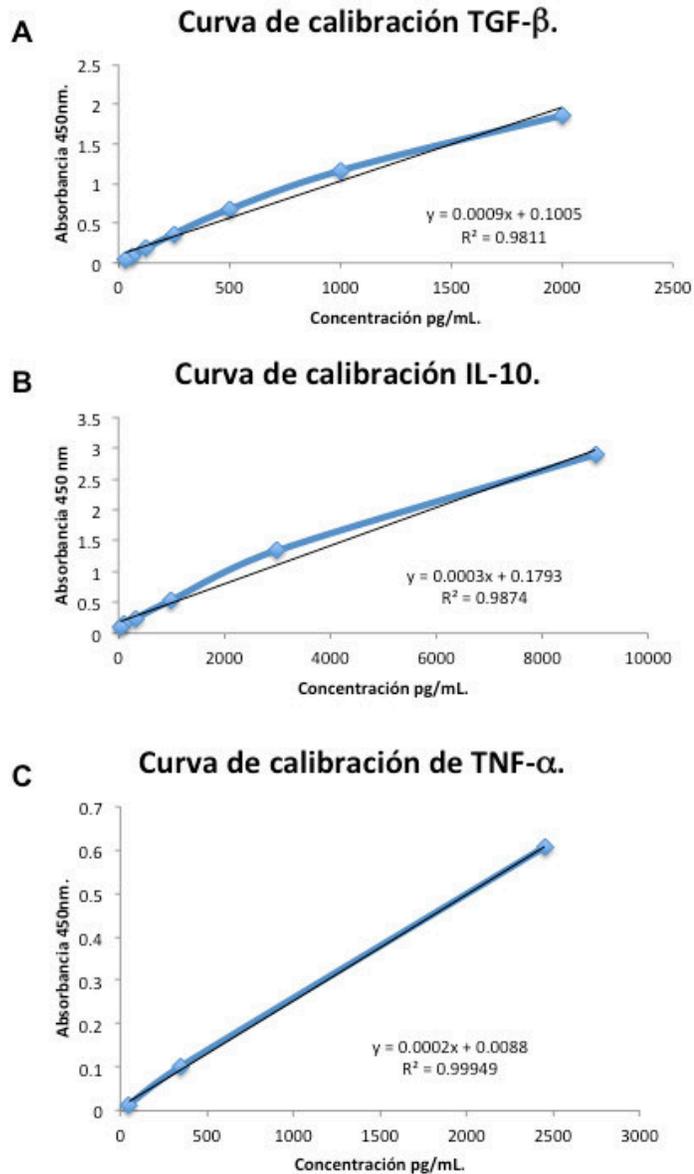
C Curva de calibración NO 48 horas.



Curvas de calibración de NO..

Se observa la curva de calibración utilizada para calcular la concentración de NO. A: 8 horas, B: 24 horas, C:48 horas.

APÉNDICE D: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ELISAS



Curvas de calibración de ELISA.

Se observa la curva de calibración utilizada para calcular la concentración de citocinas en cada ELISA. A: TGF- β , B: IL-10, C: TNF- α .

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

David Rodríguez Mier
Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Tesis: EFECTO DE ESAT-6 DE *Mycobacterium tuberculosis* EN LA
POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 16 de noviembre de 1988, hijo de Mario Rodríguez Cervantes y Patricia Mier Duque. Compañero de vida de Brenda Treviño Juárez y padre de Sofía Rodríguez Treviño.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Cirujano y Partero en 2012. Cumplió su servicio social en el Instituto de Cardiología y Medicina Vasculat de TEC Salud en el proyecto Participación del proceso inflamatorio crónico asociado a la obesidad y disfunción miocárdica. Fue co-autor de dos artículos y participó en 2 congresos con carteles antes de entrar a la maestría.

Experiencia Profesional:

- 1) Encargado del departamento médico para Auto líneas Regiomontanas de agosto de 2013 hasta agosto de 2014.
- 2) Médico industrial para Caterpillar México en febrero de 2013 hasta agosto de 2013.
- 3) Profesor de bachillerato técnico en enfermería de febrero de 2013 hasta julio de 2014, impartiendo las materias de bioquímica, fisiología, patología y pediatría.