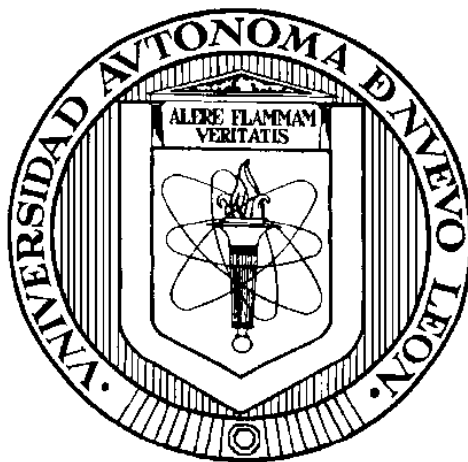


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN LAS FUNCIONES
MICROBICIDAS DE NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON
TUBERCULOSIS PULMONAR**

POR

M.C.P. ANTONIO MUÑOZ BUENROSTRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOLOGÍA MÉDICA**

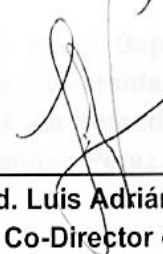
JUNIO, 2019

**EFFECTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN LAS FUNCIONES
MICROBICIDAS DE NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS
PULMONAR**

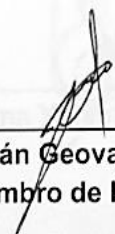
Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza
Director de Tesis



Dr. med. Luis Adrián Rendón Pérez
Co-Director de Tesis



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN LAS FUNCIONES
MICROBICIDAS DE NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS
PULMONAR**

Presentado por:

M.C.P. Antonio Muñiz Buenrostro

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza y la co-dirección del Dr. med. Luis Adrián Rendón Pérez.

Director



Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza

Co-Director



**Dr. med. Luis Adrián Rendón
Pérez**

Miembro de la Comisión



**Dr. C. Adrián Geovanni Rosas
Taraco**

DEDICATORIA

A Dios

Por darme la sabiduría y paciencia para terminar el proyecto.

A mis padres

Por su apoyo, comprensión y amor a lo largo de toda mi vida, gracias por apoyar mis sueños.

A mi esposa

Por estar a mi lado en todos los momentos difíciles de la maestría y darme contención cuando lo necesitaba, gracias por escucharme, te amo.

"Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution." Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mí comisión de tesis: A la Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza, al Dr. Med. Luis Adrián Rendón Pérez y al Dr. C. Adrián Rosas Taraco por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por todo su apoyo durante este año y medio.

A CONACYT por la beca otorgada, # de beca: 635212.

A la Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mi a lo largo de todo el proyecto, gracias por todo su apoyo.

A todos los maestros del Departamento de Inmunología, ya que cada uno puso de su parte para mi formación en la maestría.

Al Dr. C. Oscar Rojas Espinosa por aceptarme en su laboratorio durante 1 mes y enseñarme las técnicas que utilice en mi tesis.

A la Dra. C. Iris Estrada por aceptar mi estancia en el IPN y apoyarme mientras estuve en el IPN. Asimismo, a todas las personas que conocí en el IPN por su amabilidad y hospitalidad, hicieron que mi estancia fuera agradable.

A Edgar Iván Montes Zapata, por apoyarme desde las cosas más básicas del laboratorio, por escucharme cuando tenía dudas y darme consejos de cómo hacer las cosas.

A Juan Ricardo Téllez Dorado, por ser un amigo a lo largo de toda la maestría, espero que por muchos años más, gracias por tu apoyo y amistad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	12
1.1 Neutrófilos.....	12
1.2 Diabetes Mellitus	13
1.3 Mycobacterium tuberculosis (<i>M. tuberculosis</i>)	15
1.4 Tuberculosis pulmonar	16
1.5 <i>M. tuberculosis</i> y mecanismos de evasión inmune.....	18
ANTECEDENTES	20
2.1 Neutrófilos y Diabetes Mellitus Tipo 2	20
2.2 Co-morbilidad de tuberculosis pulmonar y diabetes mellitus tipo 2	21
2.3 Inmunidad innata en tuberculosis pulmonar y diabetes mellitus tipo 2	23
2.4 Las funciones de los neutrófilos: adherencia celular, fagocitosis, producción de mieloperoxidasa y estallido respiratorio y la formación de NETs.	24
2.5 Producción de NETs	25
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
Aislamiento de neutrófilos en sangre venosa periférica.....	31
Evaluación de la adherencia celular, producción de MPO y estallido respiratorio	34
Medición de la adherencia celular	35
Cuantificación de la producción de MPO.....	38
Evaluación del estallido respiratorio con NBT.....	40
Determinación de la fagocitosis	40
Producción de NETs.....	42
Medición de las UFC de <i>M. tuberculosis</i> incubado con neutrófilos mediante el método de conteo de microcolonias.....	44
RESULTADOS	46
7.1 Aislamiento de neutrófilos a partir de sangre venosa periférica en humanos	46
7.2 Evaluación de adherencia celular, fagocitosis, producción de MPO, estallido respiratorio y producción de NETs	46
7.2.1 Adherencia celular.....	46

7.2.2 Fagocitosis.....	48
7.2.3 Produccion de MPO	49
7.2.4 Estallido respiratorio.....	51
7.2.5 Producción de NETs	53
7.3 Cuantificación de la capacidad microbicida de los neutrófilos mediante UFC	58
<i>DISCUSIÓN.....</i>	<i>60</i>
8.1 Aislamiento de neutrófilos a partir de sangre venosa periférica en humanos	60
8.2 Adherencia celular, fagocitosis, producción de MPO y estallido respiratorio	61
8.3 Producción de NETs	64
8.4 Capacidad microbicida por medio del conteo de colonias	65
8.5 Neutrófilo exhausto.....	66
8.6 Selección de pacientes con tuberculosis pulmonar y la comorbilidad TBP/DMT2	67
<i>CONCLUSIÓN.....</i>	<i>69</i>
<i>PERSPECTIVAS.....</i>	<i>70</i>
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>71</i>
<i>RESUMEN AUTOBIÓGRAFICO.....</i>	<i>81</i>

Lista de tablas

Tabla 1. Características de la población.....	29
Tabla 2. Esquema de distribución en placa de 96 pozos.....	35
Tabla 3. Curva de calibración de proteínas.....	36
Tabla 4. Curva de calibración de peroxidasa.....	38

Lista de figuras

Figura 1 Esquema del proceso de aislamiento de neutrófilos.....	32
Figura 2. Esquema para el conteo celular en cámara de Neubauer.....	34
Figura 3. Esquema del procedimiento para evaluar adherencia celular.....	37
Figura 4. Esquema del procedimiento para evaluar la producción de MPO.....	39
Figura 5. Esquema del procedimiento para evaluar la producción del estallido respiratorio	40
Figura 6. Esquema del procedimiento para la determinación de la fagocitosis e imágenes de fagocitosis con levaduras opsonizadas y no opsonizadas.	42
Figura 7. Esquema del procedimiento para la evaluación de la producción de NETs.....	43
Figura 8. Esquema para diluciones seriadas en placa de 96 pozos para el conteo de UFC.....	45
Figura 9. Adherencia celular de neutrófilos en pozos con PBSG.	47
Figura 10. Adherencia celular de neutrófilos en pozos con PMA.....	47
Figura 11. Adherencia celular de neutrófilos en pozos con Mtb.....	48
Figura 12. Visualización de fagocitosis con levaduras opsonizadas y no opsonizadas.....	48
Figura 13. Índice fagocítico de neutrófilos.	49
Figura 14. Producción de mieloperoxidasa de neutrófilos en pozos con PBSG.	50
Figura 15. Producción de mieloperoxidasa de neutrófilos en pozos con PMA.	50
Figura 16. Producción de mieloperoxidasa de neutrófilos en pozos con Mtb.....	51
Figura 17. Estallido respiratorio de neutrófilos en pozos con PBSG.	52
Figura 18. Estallido respiratorio de neutrófilos en pozos con PMA.....	52
Figura 19. Estallido respiratorio de neutrófilos en pozos con Mtb.....	53
Figura 20. NETs de sujetos sanos con PBSG y PMA a la 1, 2 y 3 horas.....	54

Figura 21. NETs de sujetos sanos con Mtb y suero autólogo a la 1, 2 y 3 horas.	54
Figura 22. NETs de pacientes con DMC, DMNC, TBP y TBPDM con PBSG y PMA a las 3 horas.	55
Figura 23. NETs de pacientes con DMC, DMNC, TBP y TBPDM con Mtb y suero autólogo a las 3 horas.	55
Figura 24. Producción de NETs sin estímulo.	56
Figura 25. Producción de NETs con PMA	56
Figura 26. Producción de NETs con Mtb	57
Figura 27. Producción de NETs con suero autólogo.	57
Figura 28. Visualización de colonias de M. tuberculosis en diferentes diluciones.....	58
Figura 29. Muerte intracelular de Mtb en neutrófilos mediante UFC.	59

RESUMEN

EFFECTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN LAS FUNCIONES MICROBICIDAS DE NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

Propósito del Estudio: La diabetes mellitus es un conjunto de síndromes caracterizados por un déficit en la secreción o producción de la insulina, resultando en hiperglucemia crónica responsable de complicaciones vasculares, neuropáticas e inmunológicas. La tuberculosis pulmonar es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, en la mayoría de los casos cursa de forma subclínica y cura espontáneamente, o quedar en estado de latencia. Cuando existe una reactivación de la infección latente generalmente es por alguna alteración en el sistema inmune. El riesgo de adquirir tuberculosis pulmonar en un paciente con diabetes mellitus tipo 2 es 2-4 veces mayor a la de un sujeto sano. **Objetivo:** Analizar el efecto de la DMT2 en las funciones microbicidas de neutrófilos de pacientes con tuberculosis pulmonar. **Metodología:** Los pacientes fueron reclutados y seleccionados en el Servicio de Endocrinología y en el CIPTIR que cumplieran con los criterios de inclusión establecidos. Se realizó una toma de muestra de sangre venosa periférica (20 ml) utilizando tubos con anticoagulante (EDTA) y uno sin anticoagulante para la obtención del suero de 11 pacientes con DMT2c, 15 pacientes con DMT2nc, 15 pacientes con TBP, 11 pacientes con la comorbilidad TBP/DMT2nc y 15 sujetos sanos como control. Se realizó el aislamiento de neutrófilos utilizando la técnica de densidad con Ficoll-Hypaque. Posteriormente se procedió a evaluar las funciones microbicidas del neutrófilo en cada grupo de pacientes: La adherencia celular, la fagocitosis, el estallido respiratorio, la producción de mieloperoxidasa, la producción de trampas extracelulares (NETs) en los neutrófilos y la determinación de la muerte o sobrevivencia de *M. tuberculosis* cuantificando la formación de colonias. **Resultados:** No se encontró diferencias en las concentraciones de las proteínas de adhesión en ningún grupo de pacientes ya sea en estado basal o estimuladas con PMA o Mtb. Al estudiar la fagocitosis los pacientes con DMT2c, DMT2nc y en la comorbilidad de TBP/DMT2nc, mostraron una disminución de ésta función al compararla con la células de los sujetos sanos ($P < 0.0001$); no encontramos diferencias significativa entre los pacientes con DMT2nc y TBP/DMT2nc. La producción de mieloperoxidasa solo se observó aumentada entre los controles y DMT2c ($P < 0.05$). El estallido respiratorio se vio aumentado de manera basal en todos los grupos pacientes comparados con el control de sujetos sanos ($P < 0.0001$). La producción de NETs se vio aumentada de manera basal en los todos grupos de pacientes comparados con los sujetos sanos ($P < 0.0001$). Las UFC estaban aumentadas en todos los grupos de pacientes comparados con los sujetos sanos ($P < 0.0001$), pero no hubo diferencia entre los pacientes con DMT2nc y la comorbilidad TBP/DMT2nc. Los resultados generados fueron evaluados con la prueba de ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey utilizando el software Graphpad Prism versión 7.0. **Conclusión:** Los neutrófilos de los pacientes con la comorbilidad TBP/DMT2nc no presentaron una disminución en sus funciones microbicidas en comparación con los pacientes que solo presentan TBP o DMT2nc.

FIRMA DEL ASESOR

Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
BSA	Albúmina sérica bovina
CO ₂	Dióxido de carbono
CCL2	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
CCR2	Receptor de CCL2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMT2c	Diabetes Mellitus tipo 2 controlada
DMT2nc	Diabetes Mellitus tipo 2 no controlada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HRP	Peroxidasa de rábano caliente
IFN-γ	Interferón gamma
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-22	Interleucina 22
μl	Microlitro
MPO	Mieloperoxidasa
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazolio
ng	Nanogramos
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
PBS	Buffer fosfato salino
PBSG	Buffer fosfato salino con glucosa
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TBP	Tuberculosis pulmonar
TBP/DMT2nc	Tuberculosis pulmonar y Diabetes Mellitus Tipo 2 no controlada
	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TNF-α	Unidades Formadoras de Colonias
UFC	

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Neutrófilos

Los neutrófilos o las células polimorfonucleares forman la primera línea de defensa del sistema inmune innato en el humano y son los leucocitos más abundantes en la sangre (65% a 75% de todos los glóbulos blancos) (1). Se diferencian en la médula ósea de las células progenitoras hematopoyéticas pluripotentes en neutrófilos maduros y tienen una vida útil de 6-10 horas en el torrente sanguíneo (2).

Los neutrófilos contienen gránulos azurófilos o primarios, secundarios y terciarios, con una variedad de proteínas que contribuyen a la defensa del huésped antimicrobiano. Entre las proteínas en los gránulos azurófilos o primarios están aquellas con acción antimicrobiana como las defensinas, lizozima, proteasas (elastasa, catepsina G), hidrolasas ácidas y una peroxidasa que normalmente se expresa solo en neutrófilos y monocitos (mieloperoxidasa). Los gránulos específicos o secundarios, contienen lizozima, colagenasa, gelatinasa, lactoferrina, activador del plasminógeno, histaminasa y fosfatasa alcalina (3). Los gránulos terciarios contienen gelatinasa y catepsinas, así como, glucoproteínas insertadas en la membrana plasmática. (2)

Tras la activación, los neutrófilos son altamente efectivos en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante un proceso conocido como estallido respiratorio. En los neutrófilos estimulados, las ROS se generan casi exclusivamente por NADPH oxidasa (4). Si la fagocitosis no se produce después de la interacción del patógeno con los neutrófilos, la liberación del contenido de gránulos y la formación de ROS se dirigirán al exterior de la célula para erradicar los patógenos extracelulares. Los compuestos antimicrobianos de los gránulos no solo matan a las bacterias, sino que junto con productos bacterianos pueden actuar como quimioattractantes para que lleguen más neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células dendríticas al sitio de infección para que las células dendríticas con los antígenos procesados se dirijan a los ganglios linfáticos regionales y se produzca una respuesta inmune adaptativa (5).

En la actualidad hay reportes de dos tipos de neutrófilos (N1 y N2) cuyas funciones parecen ser diferentes y deberían de tomarse en cuenta en procesos infecciosos, enfermedades autoinmune y cáncer (6).

1.2 Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus es un conjunto de síndromes caracterizados por un déficit en la secreción o producción de la insulina, que produce alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, resultando en hiperglucemia crónica responsable de complicaciones vasculares, neuropáticas e inmunológicas. Existen 2 tipos principales de diabetes mellitus, la diabetes

mellitus tipo 1, la cual es una enfermedad autoinmune contra las células β pancreáticas productoras de insulina razón por la cual los pacientes que la padecen son insulino-dependientes y la diabetes mellitus tipo 2 en la cual la función de las células β pancreáticas se encuentran afectada, además de presentar resistencia a la insulina en los tejidos periféricos (7).

La prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en México fue de 9.4% en el 2016, tuvo un ligero aumento a comparación de 9.2% en el 2012. De ese 9.4%, el 30.3% lo representan los pacientes de 60-69 años, después con 24.9% los pacientes de 70-79 años y con 17.4% los pacientes de 50-59 años. Lo anterior nos indica que la población de 50-79 años representa el 72.6% del 9.4% total de prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en el país. (8) Se proyecta que el número total de personas con diabetes mellitus tipo 2 en el mundo aumentará de 425 millones en 2017 a 629 millones en el 2045 (9).

El diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 se realiza con una glucemia igual o mayor a 200 mg/dl en cualquier momento del día si es un paciente sintomático que implica que tenga la tríada de polidipsia, poliuria y polifagia o que presente cetoacidosis. Si el paciente es asintomático se requiere de dos determinaciones de la concentración de azúcar en la sangre, una glucemia en ayuno mayor a 126 mg/dl y una glucemia mayor o igual a 200 mg/dl a las dos horas de ingerir 75 g de glucosa o que tengan una hemoglobina glucosilada mayor o igual a 6.5%. El tratamiento consiste en antidiabéticos orales (metformina, glibenclamida, etc.) e insulina si es requerida (7). Dentro de las principales

complicaciones de diabetes mellitus tipo 2 se encuentran las vasculares, como a la retinopatía, nefropatía y aterosclerosis. Estas complicaciones ocurren debido a un aumento en los productos finales de glicación avanzada, aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno, aumento en la producción de las citocinas proinflamatorias y aumento en la actividad de la proteína cinasa C. (10)

1.3 Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*)

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que ingresa en las vías respiratorias por medio de gotitas de flügge de 0.5 a 10 μm suspendidas en el aire las cuales llegan a los alvéolos, donde son digeridas por los macrófagos alveolares. A diferencia de la mayor parte de las bacterias fagocitadas, *M. tuberculosis* impide la unión del fagosoma con los lisosomas al inhibir la molécula de unión específica llamada autoantígeno endosómico temprano 1 (EEAI). El fagosoma es capaz de fusionarse a otras vesículas intracelulares para facilitar el acceso de nutrientes al patógeno y permitir la multiplicación intravacuolar. (11). Se han identificado varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en células fagocíticas para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de micobacterias. TLR2 reconoce la lipoproteína (LP) de 19 kDa, el lipomanano (LM) y el lipoarabinomanano (LAM). Los heterodímeros TLR1-TLR2 y TLR6-TLR2 se unen a LP diacilados y triacilados, respectivamente. TLR4 se une a LM tri- y tetraacilada, proteína de choque térmico 65 (HSP65) y proteína ribosomal 50S, mientras que el ADN micobacteriano es reconocido por TLR9 en los fagosomas. Los receptores del

complemento (CR) son los principales responsables de la captación de *M. tuberculosis* opsonizado, mientras que los receptores de manosa (MR) y los receptores basurero (SR) participan en la captación de *M. tuberculosis* no opsonizado (12).

1.4 Tuberculosis pulmonar

La tuberculosis pulmonar es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, en la mayoría de los casos cursa de forma subclínica y cura espontáneamente, es en estos casos donde se puede encontrar un pequeño nódulo calcificado (lesión de Ghon) y el sujeto permanece asintomático y pudiera quedarse con una infección latente. La tuberculosis pulmonar post-primaria se debe a la reactivación de infección latente por alguna alteración en el sistema inmune, se localiza habitualmente en los segmentos apical y posterior del lóbulo superior, y frecuentemente se cavita (13).

La incidencia de tuberculosis pulmonar en México en el año 2015 fue de 16,462 casos y para Nuevo León de 1,148 casos. Las defunciones en México por tuberculosis pulmonar fueron de 1,665 en 2015, teniendo una tasa de mortalidad de 1.4. Las defunciones en Nuevo León por tuberculosis pulmonar fueron de 162 en 2015, teniendo una tasa de mortalidad de 3.1 (14).

El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar se compone de:

1) Por Baciloscopías en las cuales se deben procesar 3 muestras sucesivas de esputo y teñirse con Ziehl-Nielsen para observar los bacilos acido-alcohol resistentes. 2) Por cultivo en medio de Löwenstein-Jensen o Middlebrook el

cual tarda de 4 a 8 semanas. A pesar de lo tardado del examen es la prueba que da la confirmación diagnóstica definitiva. 3) Por PCR, esta prueba permite el diagnóstico de tuberculosis en pocas horas, sin necesidad de cultivar la muestra. Es menos sensible que el cultivo y tiene un alto costo. 4) Con PPD, esta prueba consiste en una intradermorreacción, la cual demuestra la reacción de los linfocitos T previamente sensibilizados con antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* y si el paciente no tiene signos y síntomas clínicos que sugieran una tuberculosis pulmonar, su positividad solo es indicativa de la presencia de linfocitos T de memoria y no se puede tomar como diagnóstica en sujetos asintomáticos. El Quantiferón (GOLD ESTÁNDAR) el cual es actualmente utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, también tiene las mismas implicaciones que la prueba intradérmica con PPD ya que su negatividad no descarta una infección activa de tuberculosis pulmonar en pacientes inmunocomprometidos. 5) Por serología la detección de anticuerpos IgM contra proteínas extracelulares de la bacteria es una prueba que actualmente se está validando (15).

El tratamiento consiste en el DOTBAL que incluye isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante 2 meses e isoniazida y rifampicina durante 4 meses. Si se tiene una correcta adherencia al tratamiento el porcentaje de curación es cercano al 100% (13).

1.5 *M. tuberculosis* y mecanismos de evasión inmune

M. tuberculosis desarrolla mecanismos de evasión de la respuesta inmune produciendo proteínas de secreción temprana como ESAT-6 y CFP-10 que son consideradas factores de virulencia que pueden modular las vías de señalización intracelular de los macrófagos para la activación génica del factor de transcripción NF- κ B por lo que se producen alteraciones de la producción de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y la producción de citocinas pro y anti inflamatorias. El gen noxR1 de micobacterias patógenas inhibe la formación de radicales libres. Las micobacterias fagocitadas secretan una proteína llamada EBP50 (Ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50), la cual tiene la capacidad de suprimir la transcripción de iNOS (Sintasa inducible de óxido nítrico) en el fagosoma donde se encuentra *M. tuberculosis* y por lo tanto la bacteria sobrevive. *M. tuberculosis* secreta proteínas con propiedades antigénicas a través de diversos sistemas de secreción como: Sec, SecA2, ESX1 (16). SecA2 es importante para inhibir la liberación de las enzimas superóxido dismutasa (SodA) y catalasa peroxidasa (KatG) cuyas funciones tiene capacidad bactericida. Cerca del 90% de los fagosomas que contienen bacilos vivos retienen una proteína denominada TACO (tryptophane aspartate-containing coat protein), se cree que modifica la polimerización de la tubulina y en consecuencia se inhiben algunas funciones de movilidad en el citoesqueleto lo que podría explicar la deficiencia quimiotáctica de las células del sistema inmune. Otra estrategia eficiente de *M. tuberculosis* para evadir el sistema inmune es disminuir la expresión de moléculas MHC-II, ya que con esto evita la activación de poblaciones de los linfocitos T CD4 y se produce una respuesta

disminuida a IFN- γ . Sin embargo los neutrófilos infectados con *M. tuberculosis* pueden activar a la PAD4 y producir NETs los cuales pueden retener a las micobacterias junto con las enzimas bactericidas presentes en los NETs para que sean fagocitadas por macrófagos no infectados. Por lo tanto, los componentes antimicrobianos presentes también en los NETs se pueden fusionar al ser fagocitados por los macrófagos adyacentes y conjuntamente con los fagolisosomas que contienen *M. tuberculosis* incrementan la eliminación de la micobacteria (16, 17).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Neutrófilos y Diabetes Mellitus Tipo 2

En un estado de hiperglucemia los neutrófilos producen más citocinas proinflamatorias y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) lo que promueve la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos y se produce su destrucción a lo que se le denomina NETosis produciendo daño tisular (18,19,20,21). Esto se ha reportado en varios estudios en los que se describe una alta cantidad de glucosa *in vitro* e *in vivo* aumenta la liberación de los NETs y los marcadores circulantes de NETosis. (22,23) Además, la expresión de la peptidil arginina deiminasa 4 (PAD4) una enzima importante en la descondensación de la cromatina y la liberación del ADN, está elevada en neutrófilos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (24). La hiperglucemia también reduce la longevidad de los neutrófilos e incrementa la eliminación de estos de los sitios de infección posiblemente incrementando la susceptibilidad y severidad de las infecciones en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (25). En perros se ha observado que la hiperglucemia afecta los receptores de membrana responsables de la activación de la NADPH oxidasa lo cual ocasiona una disminución de la actividad de la NADPH oxidasa en neutrófilos, debido a esto disminuye la producción del anión superóxido y compromete la función bactericida de los neutrófilos (26). Además de esto, diversos estudios realizados por Monouchehr-Pour et al y Bissada et al demostraron que existe una alteración en la quimiotaxis y la fagocitosis de los neutrófilos en pacientes con

diabetes mellitus tipo 2 no controlada (27, 28). Existe un menor porcentaje de macrófagos activados en pacientes diabéticos comparados con los no diabéticos, una menor actividad fagocítica, aunque estos parámetros pueden mejorar si se controlan los niveles de glicemia (29). La hiperglucemia crónica puede inducir la acumulación anormal de productos finales de glicación avanzada (AGE), los cuales son altamente reactivos y pueden unirse y modificar las moléculas de la respuesta inmune como los anticuerpos y el complemento (30, 31). Otro autor también describe que el exceso de los AGE puede promover la constante estimulación de su receptor RAGE, dando lugar a una activación de NADPH oxidasa. Una actividad excesiva de la NADPH conducirá a la acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno y con ello un estrés oxidativo que pueden liberarse de la célula y dañar el tejido (32).

2.2 Co-morbilidad de tuberculosis pulmonar y diabetes mellitus tipo 2

En 2007, se realizó una revisión de 9 estudios en donde se encontró que la diabetes mellitus tipo 2 incrementa el riesgo de padecer tuberculosis pulmonar de 1.5 a 7.8 veces (33). En 2017, se realizó un metanálisis con 44 estudios, donde encontraron que las personas con diabetes mellitus tipo 2 tenían un riesgo de 2-4 veces mayor de contraer tuberculosis pulmonar (IC del 95%: 2,25 a 5,73) en comparación con las personas sin diabetes mellitus tipo 2 (34).

En varios estudios retrospectivos se observó que la diabetes mellitus tipo 2 altera la inmunidad y existe una mayor carga de micobacterias y un mayor tiempo de conversión a negativo de los cultivos con tratamiento, lo que genera una alta tasa de recaída (35, 36, 37, 38). También se ha confirmado en

diferentes estudios que la diabetes mellitus tipo 2 confiere mayor riesgo de falla de tratamiento (39, 40). Existe además un riesgo de 6.5-6.7 veces de fallecer en el grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 comparado con el grupo de tuberculosis pulmonar por si sola (41, 42). En estos pacientes con la co-morbilidad TBP/DMT2 los medicamentos utilizados pueden afectar el desarrollo de la enfermedad. Un ejemplo es la rifampicina un potente inductor enzimático en el hígado, por lo cual acelera el metabolismo de los antidiabéticos orales como las sulfonilureas disminuyendo sus niveles en plasma, ocasionando hiperglucemia en los pacientes con DMT2, la rifampicina aumenta la absorción intestinal de glucosa y puede simular los síntomas de DMT2 (43). La isoniazida en contraste con la rifampicina, inhibe el metabolismo de agentes hipoglucémicos orales y puede dar lugar a un incremento en plasma de estas drogas. La isoniazida inhibe también la liberación y acción de la insulina dando como resultado una hiperglucemia aun en paciente sin DMT2 (44). Los inhibidores de la dipeptidil proteasa-4 (Linagliptina) pueden en teoría reducir la inmunocompetencia debido a su mecanismo de acción (45).

En cuanto a la afectación del sistema inmune, la co-morbilidad TBP/DMT2 esta asociada a un incremento en citocinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 y tipo 17 (IL-17A, IL-17F) y la disminución de la IL-22. Se asocia además a un incremento de IL-18, IL-4, IL-5 e IL-10. Los niveles de hemoglobina glucosilada correlacionan positivamente con los niveles de IL-1 β , IFN- γ , IL-17A, TNF- α ,. Esto nos puede sugerir que una terapia inmunomoduladora para DMT2 como los antagonistas de IL-1 podrían ayudar a reducir el daño tisular, vascular y

renal. El incremento también de citocinas anti-inflamatorias se ve asociado a la susceptibilidad incrementada de padecer infecciones y sus complicaciones (46). En pacientes con la co-morbilidad TBP/DMT2 hay una mayor expresión de CCR2 que puede restringir la llegada de monocitos al pulmón (47). Walsh et al reportó que la secreción de IFN- γ fue significativamente más alta en la comorbilidad TBP/DMT2 comparado con pacientes con TBP sin DMT2 (48). En contraste, en otro estudio se reportó un aumento en las células Treg en el sitio de infección en pacientes con la co-morbilidad TBP/DMT2 con aumento en la producción de IL-10 y disminución de IFN- γ (49).

2.3 Inmunidad innata en tuberculosis pulmonar y diabetes mellitus tipo 2

En el 2008, Graves et.al describió algunas vías por las cuales se podía alterar la inmunidad innata en los pacientes con DMT2. Estos pacientes tienden a tener niveles elevados de glucosa en sangre y esto lleva a la activación de: 1) la PKC, conduce a la formación de trampas extracelulares de neutrófilo; 2) la vía de los polioles que tiene como producto final el sorbitol el cual está implicado en el daño vascular y endotelial de estos pacientes; 3) el estrés oxidativo, conlleva al daño endotelial; y 4) AGE, inhibe la capacidad fagocítica y microbicida de los neutrófilos (50).

En el 2015, Hodgson *et.al* reportaron las principales alteraciones del neutrófilo tanto en TBP como en DMT2. En TBP existe un aumento de TNF- α , IL-8, IL-17, CXCL9, ROS y defensinas en los neutrófilos. En DMT2 por su parte tiene un aumento de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17, CCL2, ROS en los neutrófilos, pero

presenta una disminución en la cantidad de óxido nítrico, CXCR2 y quimiotaxis (51).

2.4 Las funciones de los neutrófilos: adherencia celular, fagocitosis, producción de mieloperoxidasa y estallido respiratorio y la formación de NETs.

Rojas Espinosa, *et.al* realizaron un estudio en donde compararon la adherencia celular de neutrófilos de sujetos sanos, pacientes con TBP, pacientes con DMT2 y pacientes con ambas enfermedades. Se encontró que los pacientes con ambas enfermedades presentaban una disminución en la adherencia celular en comparación con los sujetos sanos, pero no encontró una diferencia estadística entre los sujetos sanos y los pacientes con DMT2 (52). En 1988, Bogna *et.al* reportó una asociación entre la concentración de glucosa de hasta 16.6 mmol con el aumento en la adherencia celular, y a partir de este valor empieza a disminuir la adherencia celular conforme se aumenta la concentración de glucosa hasta llegar a 27.7 mmol (53).

En cuanto a la fagocitosis, Bogna, *et.al* en 1988 reportaron que conforme aumenta la concentración de glucosa hay una disminución en el índice fagocítico y una disminución de la muerte intracelular de microorganismos (53).

Gorudko, *et.al* en el 2011 reportaron un aumento en la cantidad y actividad de mieloperoxidasa (MPO) en plasma de pacientes con DMT2 y cardiopatía isquémica (54). En el 2015, Unubol, *et.al* compararon la producción de MPO por medio de un frotis a partir de sangre de pacientes con DMT2c, DMT2nc y sujetos sanos. Se concluyó que el pobre control glucémico de los pacientes con

DMT2nc da como resultado un decremento en la actividad de MPO de neutrófilos (55).

Por otro lado, Rojas Espinosa, *et.al* en el 2012 no encontraron diferencia significativa en la producción del estallido respiratorio entre los diferentes grupos de estudio, que incluía sujetos sanos, DMT2, TBP y la comorbilidad TBP/DMT2 (52).

2.5 Producción de NETs

En el 2009 Ramos-Kichik *et.al*, demostró la capacidad de *M. tuberculosis* de inducir la producción de NETs (56). Rachel Roth *et.al* en el 2015 describió que la presencia de una alta concentración de glucosa induce la producción de NETs (57). En el 2018 Juarez-Ortega, *et.al* reportaron cambios morfológicos en el núcleo de neutrófilos cuando se exponían al suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, dicho cambio se debía principalmente a la presencia de proteínas solubles de *M. tuberculosis* como ESAT-6 y CFP-10 (58).

En el 2019, Wang, *et.al* observaron una liberación espontánea de NETs en neutrófilos de pacientes con DMT2 en comparación con sujetos sanos (59). Carestia, *et.al* en el 2015 ya habían reportado un resultado similar (60).

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 incrementa el riesgo (3-7 veces) de reactivación de la TB latente. Esto se ha atribuido principalmente a la disminución de la efectividad de la inmunidad innata. En la actualidad, existen pocos estudios que evalúan el deterioro de las funciones microbicidas de los neutrófilos en la co-morbilidad de TBP/DMT2.

HIPÓTESIS

Los neutrófilos de los pacientes con la co-morbilidad TBP/DMT2nc presentan una disminución en sus funciones microbicidas en comparación con los pacientes que solo presentan DMT2nc.

CAPÍTULO 4

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 en las funciones microbicidas de neutrófilos de pacientes tuberculosis pulmonar.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la adherencia celular, la fagocitosis, la producción de mieloperoxidasa, el estallido respiratorio y la producción de NETs en los neutrófilos.
2. Cuantificar la capacidad microbicida de los neutrófilos mediante conteo de colonias de *M. tuberculosis*.

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes incluidos en este estudio fueron reclutados en el servicio de Endocrinología y del Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias (CIPTIR) del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, además de un grupo de 15 sujetos sanos. Todos aceptaron participar en el estudio mediante consentimiento informado verbal, este proyecto fue aprobado como el Comité de investigación y ética de nuestra institución con el número IN18-0005. Las características de los grupos de estudios se encuentran descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los grupos de estudio.

	Sujetos sanos	DMT2c (HbA1C <7%)	DMT2nc (HbA1C >7%)	TBP	TBP/DMT2nc (HbA1C >7%)
Edad (años) Promedio (rangos)	29.6(21-42)	51.27(30-65)	52.8(35-68)	39.33(18-73)	49.72(33-71)
Género	13 Hombres 2 Mujeres	2 Hombres 9 Mujeres	3 Hombres 12 Mujeres	9 Hombres 6 Mujeres	7 Hombres 4Mujeres
IMC	24.70	27.51	29.25	21.77	21.90 (16.8-

Promedio (rangos)	(20.28- 28.72)	(20.39- 33.22)	(21.41- 36.58)	(12.3- 28.51)	25.2)
HbA1c % Promedio (rangos)	-----	6.21 (5.4-6.6)	10.06 (7.1-14.5)	-----	8.93 (7.6-11.2)
Años de evolución de DMT2 Promedio (rangos)	-----	8.03 (1-28)	8.86 (1-25)	-----	11 (1-17)

Criterios de Inclusión:

1. Pacientes masculinos y femeninos mayores de 18 años
2. Pacientes masculinos y femeninos con tuberculosis pulmonar de reciente diagnóstico (dentro del primer mes de tratamiento)
3. Pacientes masculinos y femeninos con diabetes mellitus tipo 2
4. Pacientes masculinos y femeninos con diabetes mellitus tipo 2 y tuberculosis pulmonar de reciente diagnóstico (dentro del primer mes de tratamiento)

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de VIH

2. Pacientes con otra enfermedad endocrina
3. Pacientes con neoplasia
4. Mujeres embarazadas
5. Pacientes con diabetes mellitus tipo 1
6. Pacientes con insuficiencia renal crónica (Creatinina >2 mg/dl)
7. Pacientes con insuficiencia hepática
8. Pacientes con tratamiento inmunosupresor
9. Historia clínica incompleta

Aislamiento de neutrófilos en sangre venosa periférica

De cada sujeto se obtuvieron 20 ml de sangre venosa periférica (15ml en tubos con EDTA y 5 ml en tubo sin anticoagulante). Para el aislamiento neutrófilos, se partió de los 15 ml de sangre venosa periférica utilizando tubos con EDTA . Se colocó 7.5 ml de fluido de sedimentación (Solución A: Dextrán al 6% y NaCl al 0.9% y Solución B: Glucosa al 2.5%, EDTA al 1.2% y NaCl al 0.16% , ambas soluciones mezcladas 1:1) en el fondo de un tubo cónico de 50 ml y se adicionó 15 ml de sangre venosa sobre el fluido de sedimentación y se mezcló por inversión 3 veces (Relación 1:2). Los tubos se pusieron en refrigeración durante 45 min a 4 °C para la sedimentación de eritrocitos. Después de los 45 min se obtuvo el plasma rico en leucocitos. En un tubo cónico de 15 ml se agregaron 3 ml de Ficoll-Hypaque 1077 y sobre este se agregó el plasma rico en leucocitos cuidadosamente para evitar que se mezclaran, al final se formaban dos fases.

La muestra se centrifugo a 1500 rpm por 20 min a 4 °C con aceleración (9) y desaceleración (9) de la centrífuga.

Se obtuvo un botón celular de polimorfonucleares y eritrocitos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió por pipeteo suave el botón celular en la solución de lisis de eritrocitos (5ml de agua destilada y 1ml de PBS). Se dejó actuar la solución de lisis durante 45 segundos y después se agregaron 2 ml de NaCl al 3%. Posteriormente, se centrifugo el tubo a 1500 rpm por 5 min a 4 °C con aceleración (9) y desaceleración (9) de la centrífuga. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular por pipeteo suave en 2 ml de PBSG, figura 1.

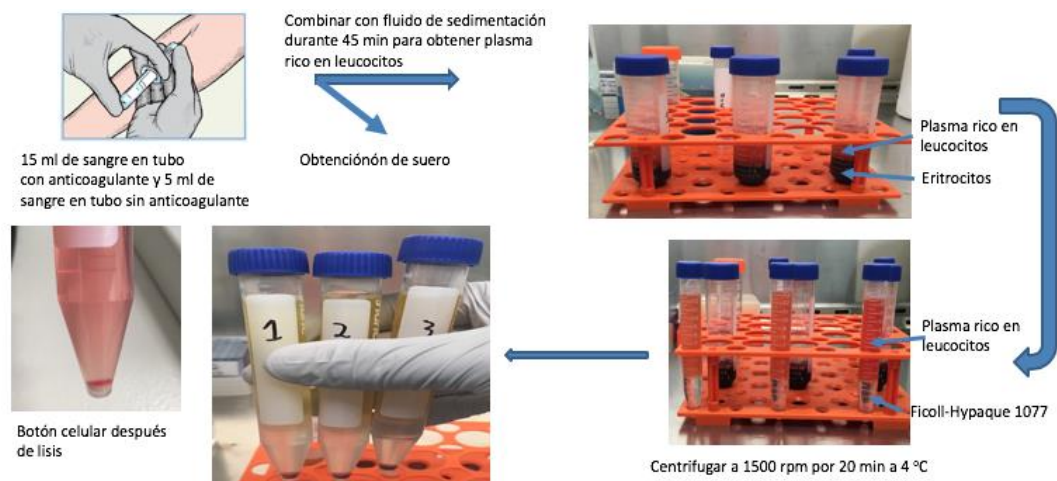


Figura 1. Esquema del proceso de aislamiento de neutrófilos.

Conteo celular

Para saber el número de células polimorfonucleares obtenidas después del proceso de aislamiento, en tubo eppendorf de 0.2 ml se colocaron 90 μ L de azul de tripano y 10 μ L de células resuspendidas en PBSG. De esta mezcla se extrajeron 10 μ L y se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular manual.

Se contaron 4 campos diferentes y se obtuvo el promedio de células vivas y células muertas. Una vez obtenido el promedio se realizó la siguiente ecuación: (promedio)(10,000)(dilución de las células en azul de tripano) (volumen en el cual se resuspendió) para obtener el total de células. Para obtener la viabilidad celular se realizó la siguiente ecuación: (Promedio de células vivas)/(Total de células) x 100, figura 2.

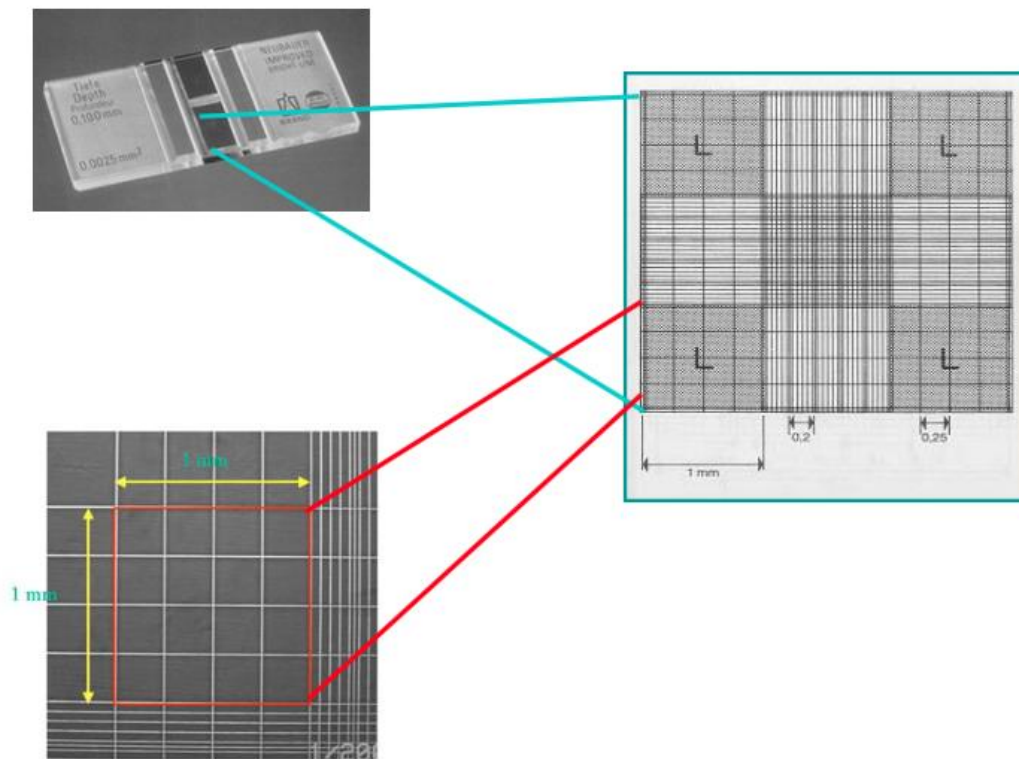


Figura 2. Esquema para el conteo celular en cámara de Neubauer.

Evaluación de la adherencia celular, producción de MPO y estallido respiratorio

Para la evaluación de las funciones microbicidas de los neutrófilos se tuvo un control negativo con PBSG como estímulo, un control positivo con PMA como estímulo y en el pozo experimental se usó *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) como estímulo. A continuación, se describe como se colocaron los neutrófilos con los diferentes estímulos para el análisis de las diferentes funciones microbicidas.

Tabla 2. Esquema de distribución en placa de 96 pozos.

Concentración celular estímulo	y	Fila	Adherencia celular	Mieloperoxidasa	Estallido respiratorio
5 x10 ⁵ estímulo	Sin	A			
5 x10 ⁵ estímulo	Sin	B			
5 x10 ⁵ PMA		C			
5 x10 ⁵ PMA		D			
5 x10 ⁵ H37Rv	Mtb	E			
5 x10 ⁵ H37Rv	Mtb	F			
Blanco		G			
Blanco		H			

Medición de la adherencia celular

Para medir las proteínas de adhesión primero se realizó una curva de calibración de proteínas de la siguiente manera:

Reactivos

- a) Carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 2% en NaOH 0.1 N, agua MiliQ.
- b) Tartrato de sodio y potasio KNaC₄H₄O₆ (4H₂O) al 2% en agua MiliQ.
- c) Sulfato cúprico CuSO₄ (5H₂O) al 1% en agua MiliQ.
- d) Soluciones de albúmina sérica bovina (0-20 mg/ml) en PBS.
- e) Mezcla alcalina: 0.1 ml de (b) + 0.1 ml (c), mezclar y aforar a 10 ml con (a).
- f) Reactivo de Folin-Ciocalteu-Fenol.

Procedimiento:

Se prepararon las diluciones indicadas en el siguiente cuadro a partir del stock de proteínas (Solución stock: BSA 10mg/ml)

Tabla 3. Curva de calibración de proteínas.

Tubo	Dilución	Stock de BSA o dilución	PBS	($\mu\text{g BSA}/10 \mu\text{l}$)
A	S/D	Stock	-	100
B	1:2	50 μl Stock	50 μl	50
C	1:4	50 μl BSA 1:2	50 μl	25
D	1:8	50 μl BSA 1:4	50 μl	12.5
E	1:16	50 μl BSA 1:8	50 μl	6.25
F	1:32	50 μl BSA 1:16	50 μl	3.12
G	1:64	50 μl BSA 1:32	50 μl	1.56
H	-	-	-	0

En las placas de 96 pozos:

1. Se adicionaron 200 μl de la mezcla alcalina en cada pozo de las columnas 1, 2 y 3.
2. Se adicionaron 10 μl de cada dilución y blanco en los pozos correspondientes.
3. Se agito la placa mediante golpes suaves para asegurar el mezclado de los reactivos.
4. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.
5. Se adicionaron 10 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu a cada pozo.
6. Se mezclaron bien los pozos con pipeta evitando formar burbujas.
7. Se incubó la placa durante 30 min a temperatura ambiente.
8. Se leyó en un espectrofotómetro a 655 nm.

Para medir la producción de proteínas de adhesión de los neutrófilos aislados de sangre venosa periférica se realizó lo siguiente:

De una suspensión celular de 5×10^6 cels/ml, se añadieron $100 \mu\text{l}$ (5×10^5) en los pozos correspondientes. Se añadieron $20 \mu\text{l}$ de PMA (81 nM) y $30 \mu\text{l}$ de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) de un vial con Mcfarland de 0.5 (1.5×10^8 /ml) a los pozos correspondientes. La placa se incubó durante 30 min a 37°C con 5% de CO_2 . Se retiró el sobrenadante, se lavó con $150 \mu\text{l}$ de PBSG para eliminar las células no adherentes y se suspendió la monocapa celular en $200 \mu\text{l}$ de mezcla alcalina y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron $10 \mu\text{l}$ del reactivo Folin Ciocalteu y se mezcló con pipeta automática (ajustada a 50 microlitros), evitando la formación de espuma.

Se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia a 655 nm en espectrofotómetro, figura 3.

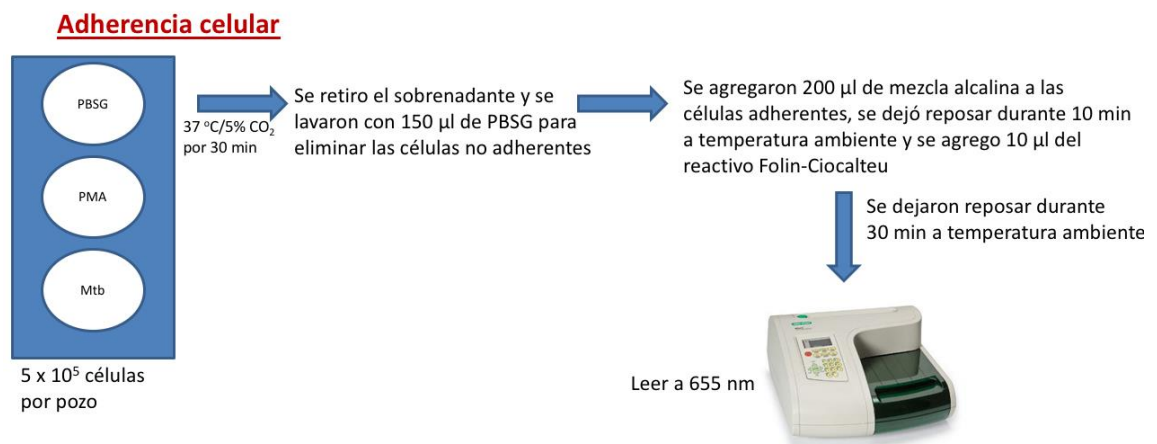


Figura 3. Esquema del procedimiento para evaluar adherencia celular.

Cuantificación de la producción de MPO

Para medir la producción de MPO primero se realizó una curva de calibración con HRP de la siguiente manera:

1. Se preparó una solución stock de HRP (Peroxidasa de rábano caliente) 1mg/ml de agua destilada.
2. Se preparó una dilución de 1:50 con PBS. (STOCK de trabajo)
3. A partir de esta dilución, se prepararon una serie de diluciones seriadas con PBS.

Tabla 4. Curva de calibración de peroxidasa

Pozo/Dilución	Como hacer la dilución	Concentración: mg/ml
A (1:500)	90 μ l PBS + 10 μ l de Stock de trabajo	
B (1:1000)	50 μ l PBS + 50 μ l (A)	
C (1:2000)	50 μ l PBS + 50 μ l (B)	
D (1:4000)	50 μ l PBS + 50 μ l (C)	
E (1:8000)	50 μ l PBS + 50 μ l (D)	
F (1:16000)	50 μ l PBS + 50 μ l (E)	
G (1:32000)	50 μ l PBS + 50 μ l (F)	
H (Blanco)	100 μ l PBS	

4. Se agregaron 100 μ l de la solución sustrato cromógeno (3mg OPD + 10 μ l de H₂O₂ al 30% o 100 μ l de H₂O₂ al 3%) disueltos en 10 ml de PBS a todos los pozos.
5. Se adicionaron 10 μ l de cada dilución a los pozos correspondientes.

6. Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente.
7. Se detuvo la reacción con 20 μl de H_2SO_4 al 4%.
8. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm.

Para medir la producción de mieloperoxidasa de los neutrófilos aislados de sangre venosa periférica se realizó lo siguiente:

De una suspensión celular de 5×10^6 cels/ml, se añadieron 100 μl (5×10^5) en los pozos correspondientes. Se añadieron 20 μl de PMA (81 nM) y 30 μl de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) de un vial con Mcfarland de 0.5 (1.5×10^8 /ml) a los pozos correspondientes. La placa se incubó durante 30 min a 37 °C con 5% de CO_2 . Se retiró el sobrenadante y se suspendió con 100 μl de la solución sustrato-cromógeno con 0.5% de Tween 20. Se incubó 30 min a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con 20 μl de H_2SO_4 al 4%. Finalmente, se leyó la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro.

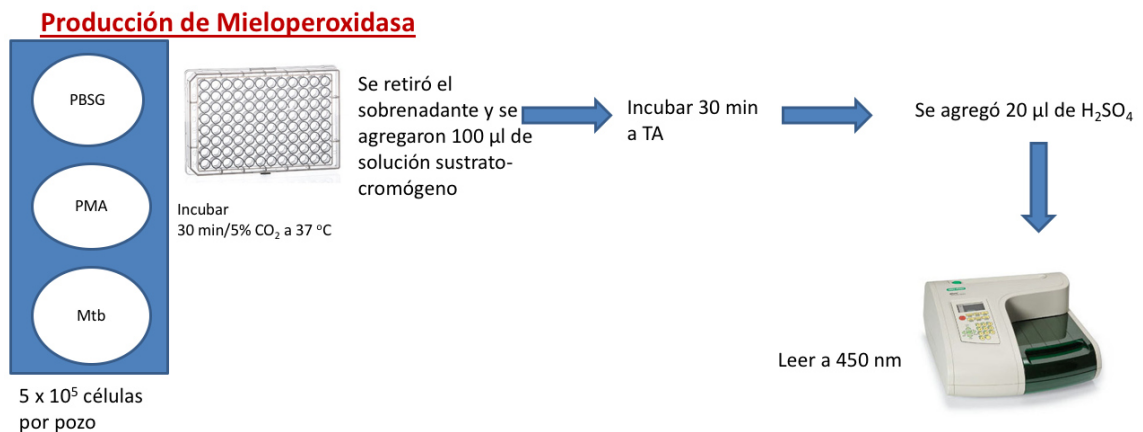


Figura 4. Esquema del procedimiento para evaluar la producción de MPO.

Evaluación del estallido respiratorio con NBT

De una suspensión celular de 5×10^6 cels/ml, se añadieron $100 \mu\text{l}$ (5×10^5) en los pozos correspondientes. Se añadieron $20 \mu\text{l}$ de PMA (81 nM) y $30 \mu\text{l}$ de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) de un vial con Mcfarland de 0.5 (1.5×10^8 /ml) a los pozos correspondientes y $20 \mu\text{l}$ de NBT al 0.1% a todos los pozos. La placa se incubó durante 30 min a 37°C con 5% de CO_2 . Finalizando el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante y se suspendieron las monocapas celulares en $200 \mu\text{l}$ de SDS al 10% en NaOH 0.08 N. Se dejó actuar durante toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se leyó la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro, figura 5.

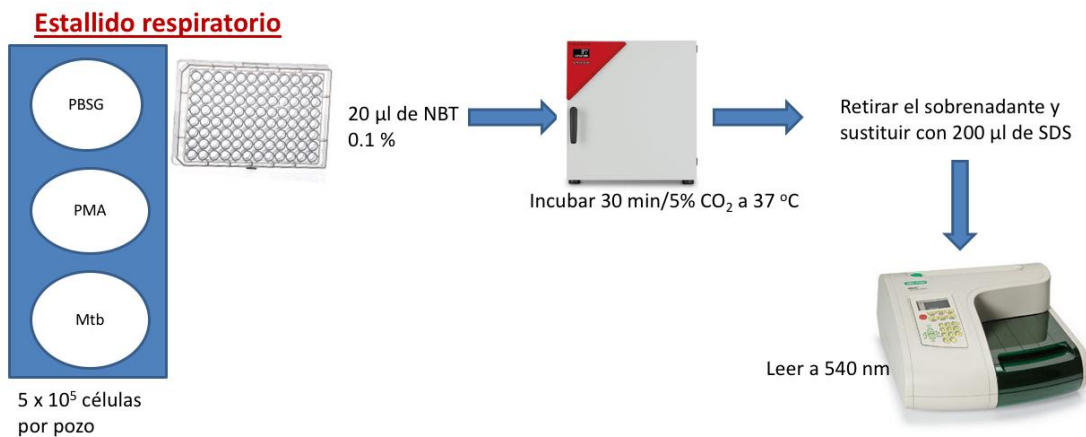


Figura 5. Esquema del procedimiento para evaluar la producción del estallido respiratorio.

Determinación de la fagocitosis

Para esta prueba se utilizó una suspensión celular de 1×10^6 células/ml en un tubo eppendorf. A partir de esa suspensión celular se colocaron 3×10^4 células en 3 círculos previamente marcados en una laminilla utilizando un papel

adherente de vinilo y se incubaron a 37 °C durante 30 min para permitir la adherencia celular.

Se utilizaron levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* para demostrar si existía o no una alteración en la fagocitosis del neutrófilo. Se preparó una suspensión de 0.1g de levaduras en 10 ml de agua destilada utilizando un matraz de 50 ml y se esterilizó en autoclave a 121 °C 15 libras/15min. Se colocaron los 10 ml en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se pasó a otro tubo cónico de 15 ml, el sedimento se descartó. Se volvió a centrifugar a 1000 rpm durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se pasa a otro tubo cónico de 15 ml, este tubo ya contiene las levaduras finas que se utilizaron para la evaluación de la fagocitosis. Se hizo la cuenta de levaduras utilizando la cámara de Neubauer, se ajustó a 4×10^6 /ml en un tubo eppendorf. A partir de esa suspensión se toman 250 μ l (1×10^6) y se agregan a dos tubos eppendorf diferentes, uno marcado como suero y el otro como PBS. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se descarta el sobrenadante, posteriormente se agregan 100 μ l de suero autólogo en el tubo marcado como suero y 100 μ l de PBS en el tubo marcado como PBS y se resuspendieron las levaduras para tener una concentración final de 1×10^6 /100 μ l. A partir de estas suspensiones se tomaron 30 μ l (3×10^5) y se colocaron en los círculos correspondientes, previo a este paso se eliminó el exceso de líquido de las monocapas celulares y se secó cuidadosamente el líquido que queda alrededor de los círculos sin tocar las monocapas celulares. Ya que se colocaron las levaduras en la laminilla, esta se incubó a 37 °C durante 30 min. Una vez

concluido el tiempo se eliminó el exceso de líquido nuevamente y se colocaron 20 μ l de safranina al 0.5%; se dejó actuar durante 1 min y se lavaron las tinciones utilizando agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante. Se eliminó el exceso de líquido, se marcaron los círculos por la parte de atrás de la laminilla utilizando un marcador permanente y se retiró el papel adherente. Se dejó secar al aire libre y finalmente se observaron en un microscopio óptico contando un total de 100 células, de las levaduras opsonizadas como de las no opsonizadas y se dividieron los resultados para obtener el índice fagocítico, figura 6.

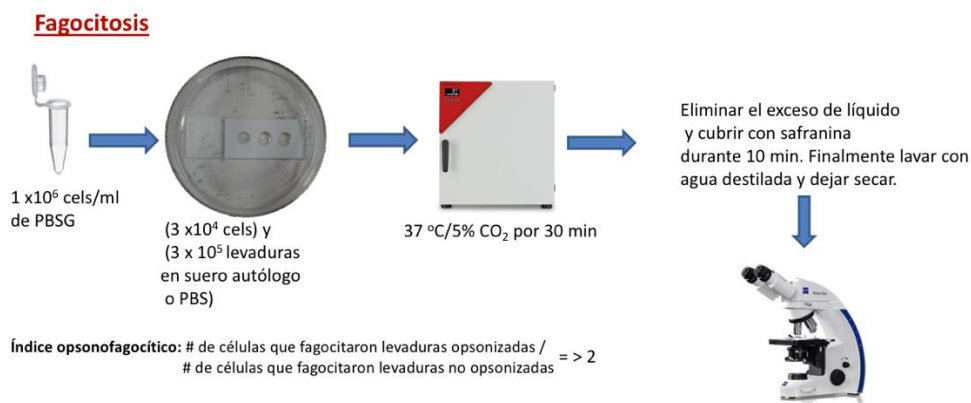


Figura 6. Esquema del procedimiento para la determinación de la fagocitosis.

Producción de NETs

Para esta prueba se utilizó una suspensión celular de 1 x 10⁶ células/ml en un tubo eppendorf. Se utilizaron las mismas laminillas que en la evaluación de la fagocitosis pero en esta ocasión se hicieron 4 círculos en los cuales se colocaron 3 x10⁴ células, el primer círculo se quedó sin estímulo como control negativo, en el segundo círculo se agregaron 10 μ l de PMA (81 nM) como

control positivo, en el tercer círculo se agregaron 3×10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) para un MOI de 10:1 y en el cuarto círculo se agregaron 20 μ l de suero autólogo. Se incubaron las laminillas durante 1, 2, y 3 horas a 37 °C con 5% CO₂. Después de ese tiempo se eliminó el exceso de líquido y se agregaron 20 μ l de paraformaldehído al 1% y se dejó actuar durante 5 min para fijar las células. Se eliminó el exceso de líquido y se agregaron 20 μ l de DAPI, se dejó actuar durante 5 min para la tinción de los núcleos celulares. Se eliminó el exceso de líquido, se marcaron los círculos por la parte de atrás de la laminilla utilizando un marcador permanente y se retiró el papel adherente. En los círculos marcados se agregaron 10 μ l de N-Propilgalato como medio de montaje y se colocó un cubreobjetos de 24 x 50 mm. Finalmente las laminillas se observaron en un invertoscopio (Life Technologies 4471136) con filtro para DAPI, figura 7.

Producción de NETs

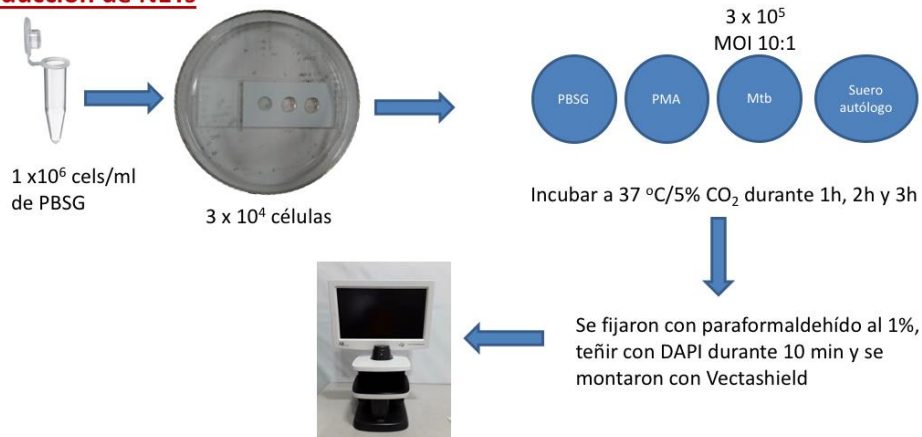


Figura 7. Esquema del procedimiento para la evaluación de la producción de NETs.

Medición de las UFC de *M. tuberculosis* incubado con neutrófilos mediante el método de conteo de microcolonias

Para la cuantificación de UFC primero se preparó una suspensión de 2×10^7 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), los cuales se obtienen al tomar 130 μl de un tubo con un McFarland de 0.5. A los bacilos se les agrego 70 μl de suero autólogo, para tener una suspensión final de $2 \times 10^7/200 \mu\text{l}$. De este tubo se tomaron 100 μl (1×10^7) y se agregaron a un tubo eppendorf el cual contiene una suspensión celular de $1 \times 10^6/\text{ml}$, para tener un MOI de 10:1. El tubo se incubó a 37 °C con 5% CO_2 durante 3 horas. Después del tiempo de incubación se centrifugo el tubo a 1500 rpm durante 5 min (Thermo Fisher SL40P), se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 μl de Tritón X-100 para la lisis celular y obtención de los bacilos fagocitados. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μl de medio Middlebrook 7H9 a 9 pozos. Del tubo eppendorf se tomaron 50 μl y se agregaron al primer pozo con el medio Middlebrook 7H9 mezclando bien y realizando diluciones seriadas como se muestra en la figura 2. Se incubó la placa durante 7 días y se observó al invertoscopio (Life Technologies 4471136) para el conteo de las colonias y ver si hubo muerte intracelular del bacilo, figura 8.

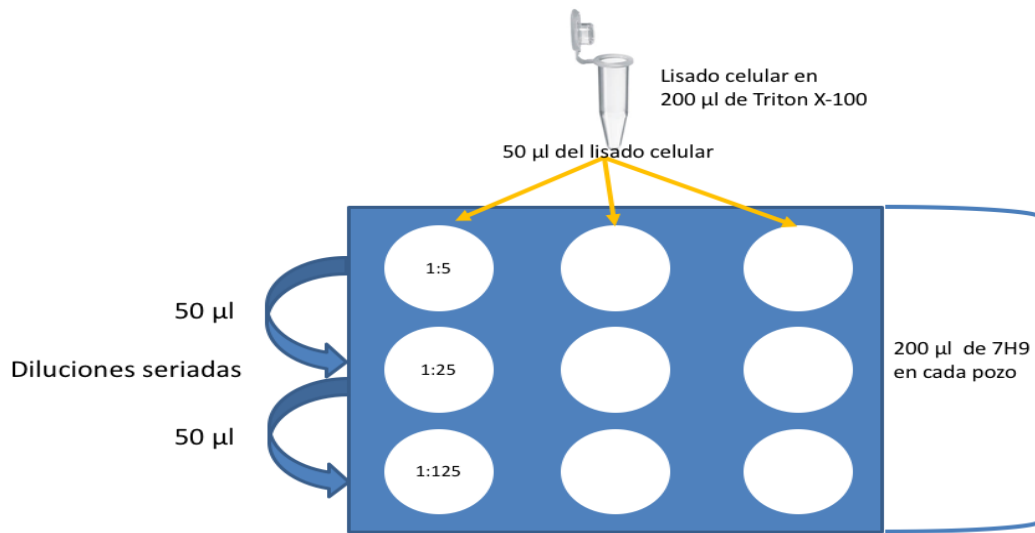


Figura 8. Esquema para diluciones seriadas en placa de 96 pozos para el conteo de UFC.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Aislamiento de neutrófilos a partir de sangre venosa periférica en humanos

Utilizando el proceso de aislamiento de neutrófilos mencionado en la sección de material y métodos se obtuvo un promedio de 2×10^7 cels/ml con una viabilidad mayor al 95%.

7.2 Evaluación de adherencia celular, fagocitosis, producción de MPO, estallido respiratorio y producción de NETs

7.2.1 Adherencia celular

En cuanto a adherencia celular no hubo diferencia significativa entre los diferentes grupos de estudio tanto en el pozo con PBSG, PMA o Mtb, figuras 9, 10 y 11).

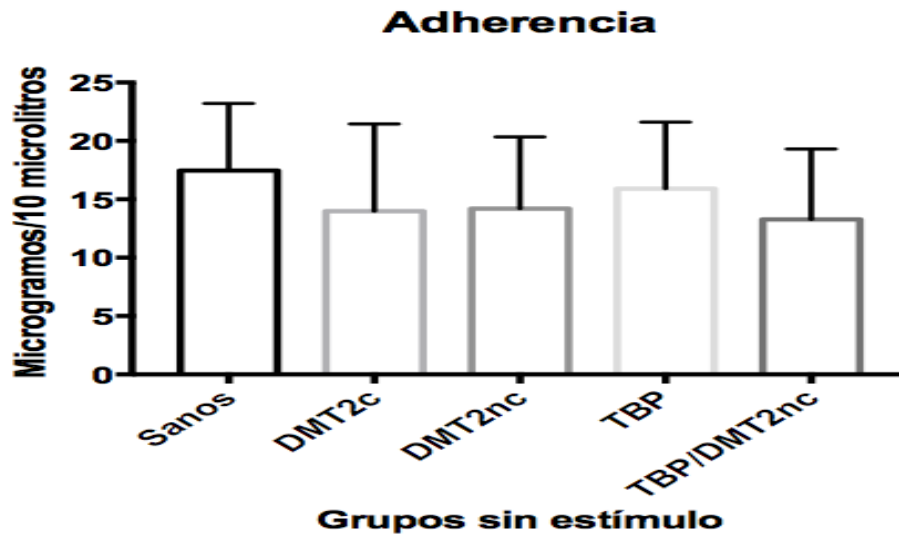


Figura 9. Adherencia celular de neutrófilos en pozos con PBSG. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

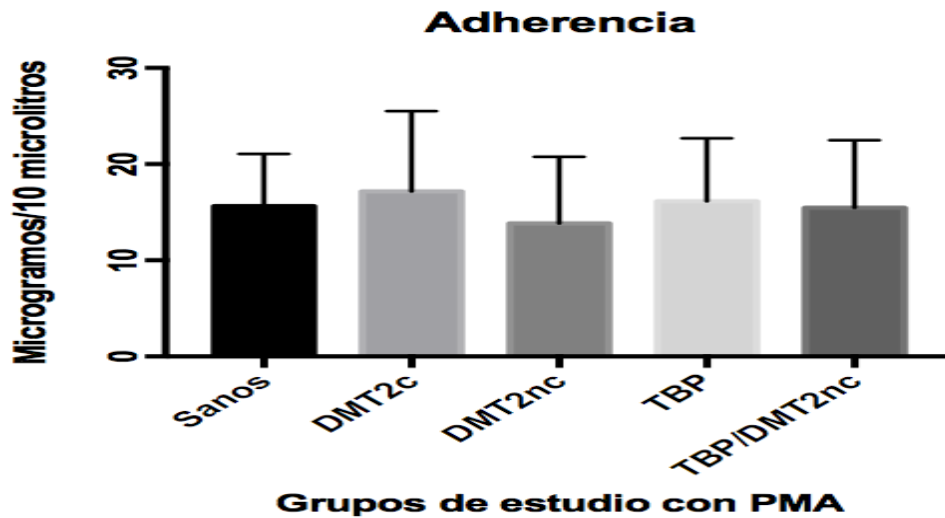


Figura 10. Adherencia celular de neutrófilos en pozos con PMA. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

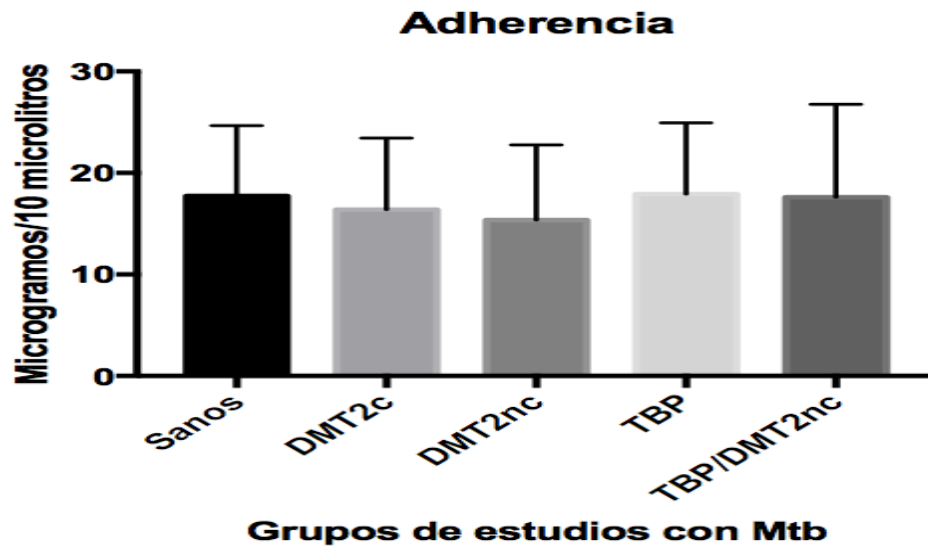


Figura 11. Adherencia celular de neutrófilos en pozos con Mtb. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

7.2.2 Fagocitosis

En la fagocitosis se pudo observar que existe una diferencia significativa entre los diferentes grupos de estudio excepto entre los grupos TBP y TBP/DMT2nc así como entre DMT2nc y TBP/DMT2nc, figuras 12 y 13.

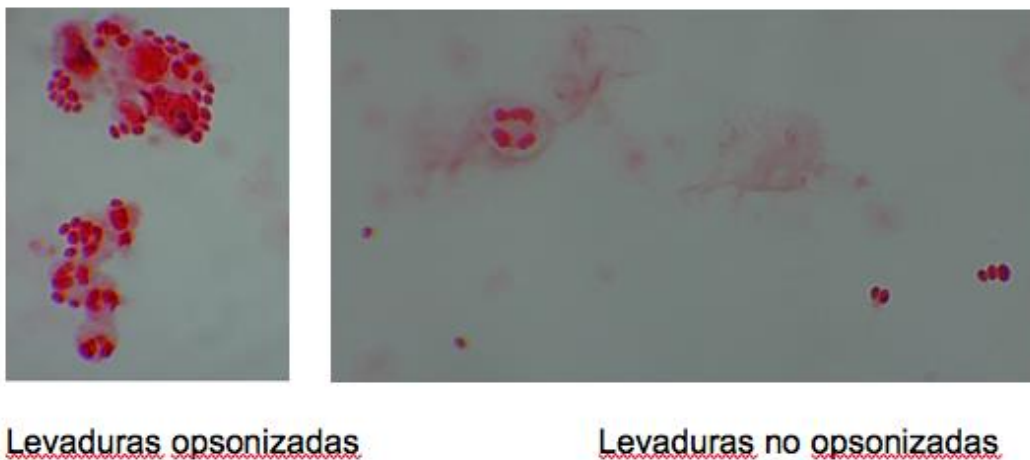


Figura 12. Visualización de fagocitosis con levaduras opsonizadas y no opsonizadas.

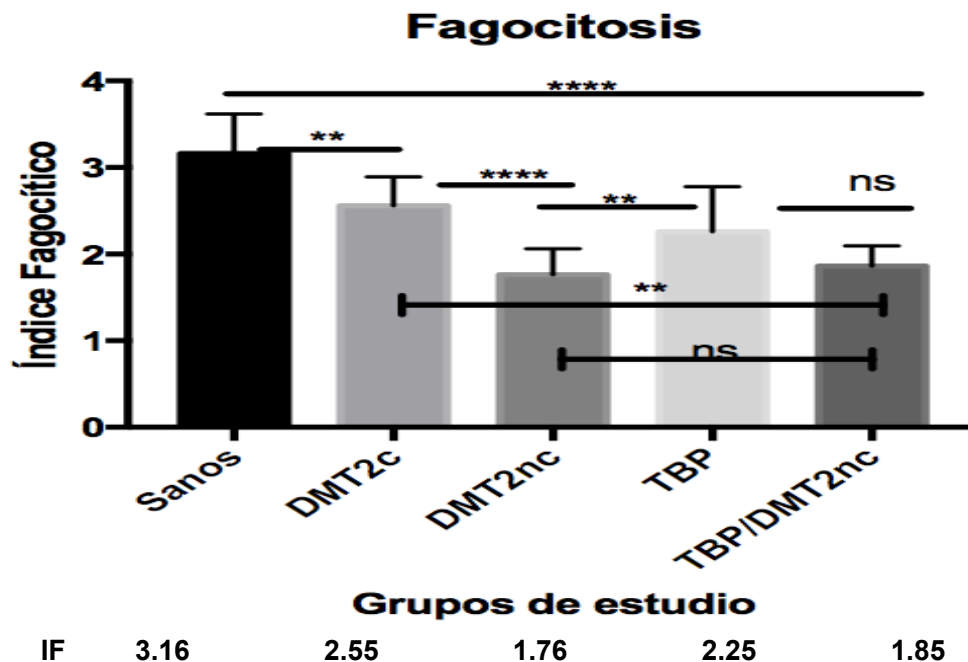


Figura 13. Índice fagocítico de neutrófilos. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.005$).

7.2.3 Producción de MPO

En la producción de MPO se pudo observar una diferencia significativa únicamente entre el grupo de sujetos sanos y DMT2c ($P < 0.05$), tanto en los pozos con PBSG como en los de Mtb, entre los demás grupos no hubo una diferencia significativa, figuras 14, 15 y 16.

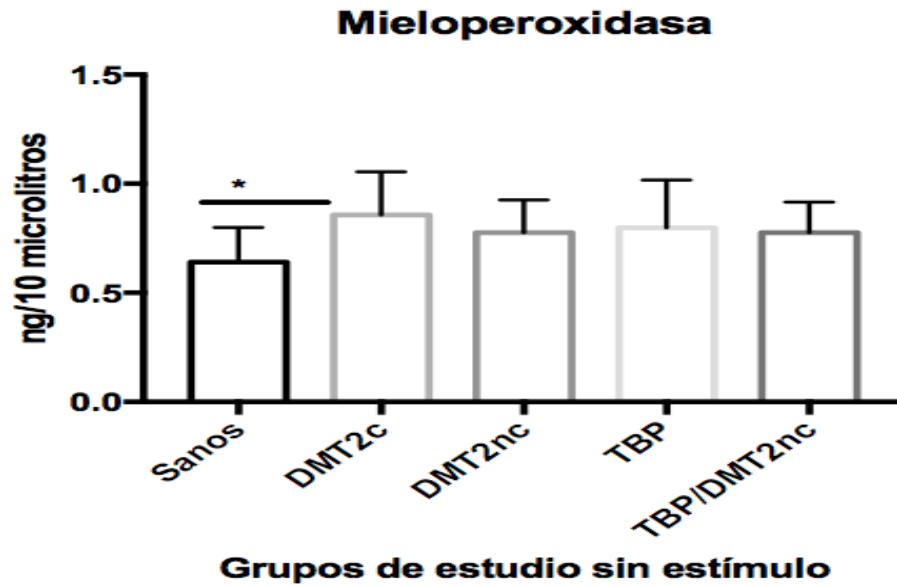


Figura 14. Producción de mieloperoxidasa de neutrófilos en pozos con PBSG. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$, * $P < 0.05$).

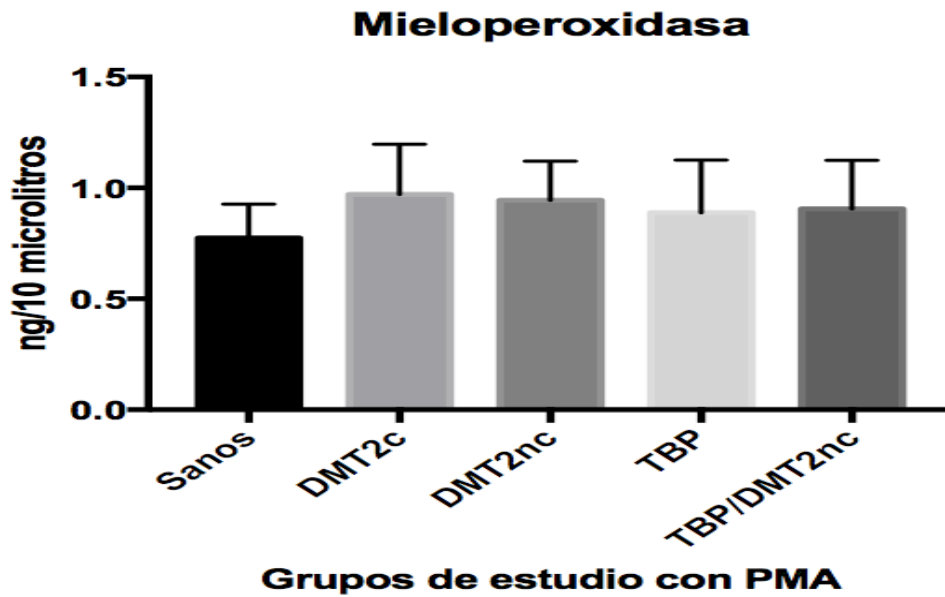


Figura 15. Producción de mieloperoxidasa de neutrófilos en pozos con PMA. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

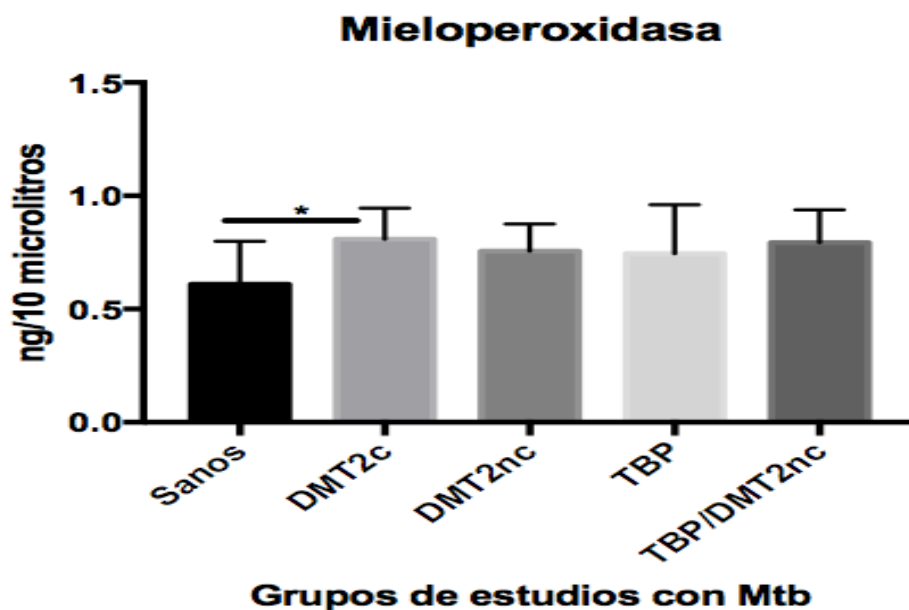


Figura 16. Producción de mieloperoxidasa de neutrófilos en pozos con Mtb. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$, * $P < 0.05$).

7.2.4 Estallido respiratorio

En el estallido respiratorio se pudo observar una diferencia significativa entre los diferentes grupos de estudio en los pozos que estaban únicamente con PBSG, en los pozos con PMA o Mtb no se observó diferencia significativa entre los grupos de estudio, figuras 17, 18 y 19.

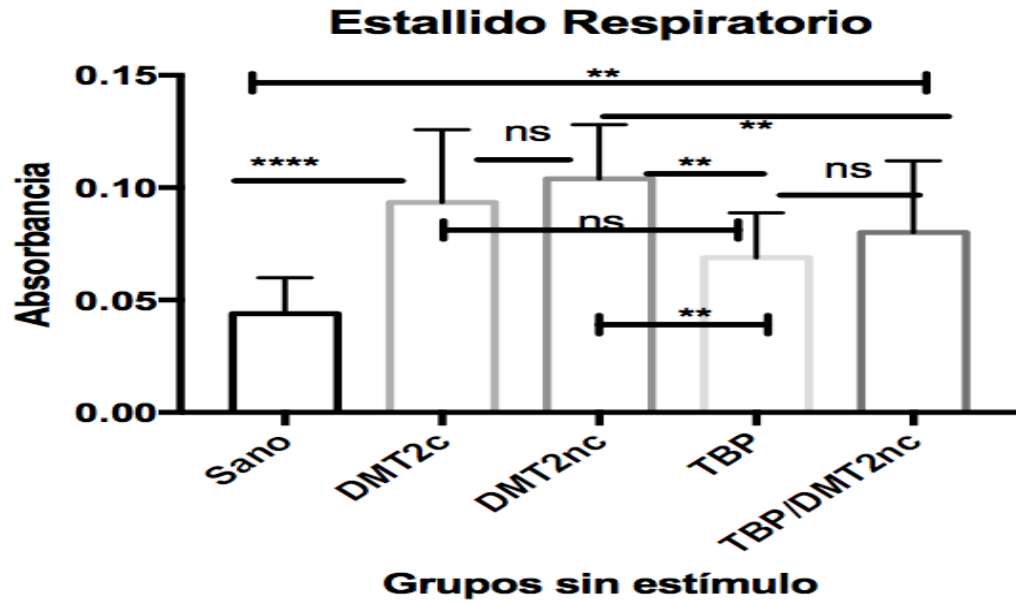


Figura 17. Estallido respiratorio de neutrófilos en pozos con PBSG. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey (ns $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.005$).

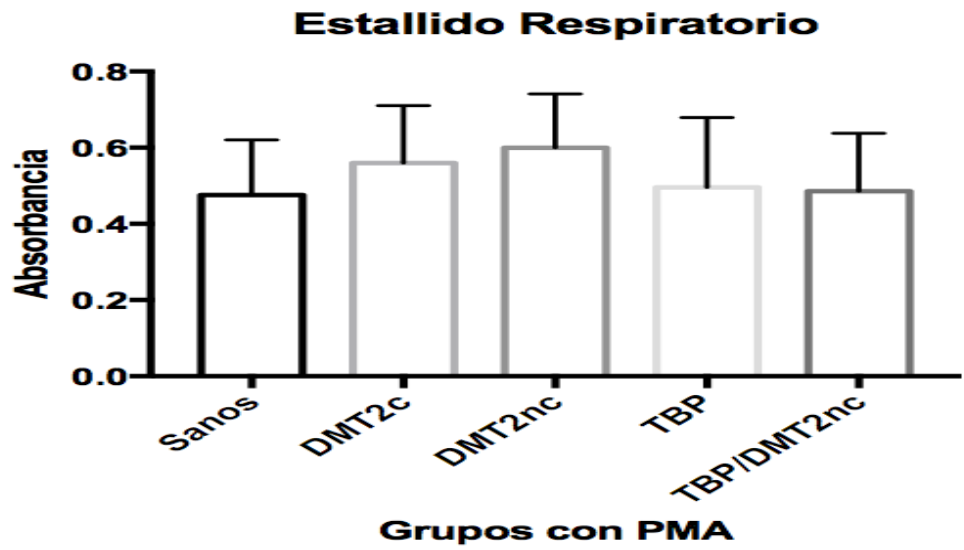


Figura 18. Estallido respiratorio de neutrófilos en pozos con PMA. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

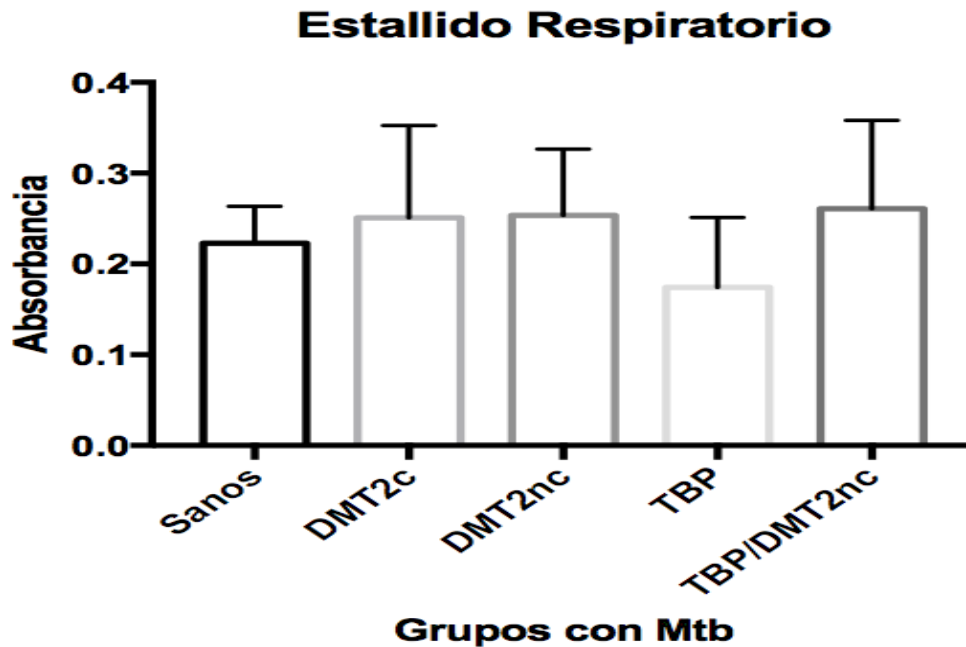


Figura 19. Estallido respiratorio de neutrófilos en pozos con Mtb. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

7.2.5 Producción de NETs

En la producción de NETs se pudo observar que en las células sin estímulo de los grupos DMT2c, DMT2nc, TBP y TBP/DMT2nc había una producción espontánea de trampas extracelulares, esto no ocurre en las células de los sujetos sanos. Existe una mayor producción de NETs en los neutrófilos del grupo TBP/DMT2nc cuando se utilizó suero autólogo en comparación con los demás grupos, figuras 20-27.

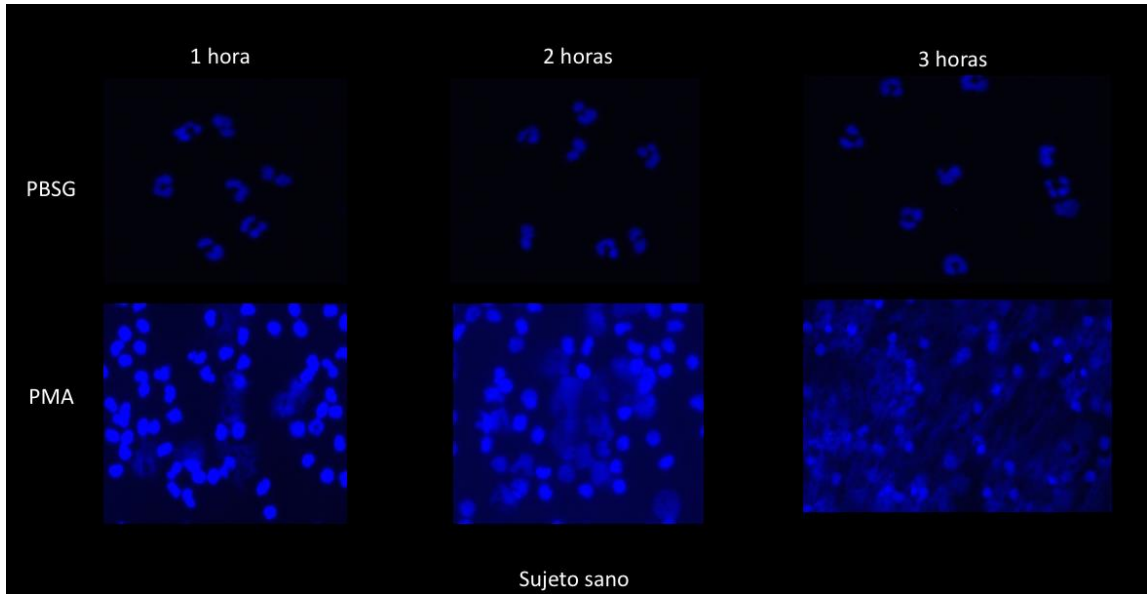


Figura 20. NETs de sujetos sanos con PBSG y PMA a la 1, 2 y 3 horas.

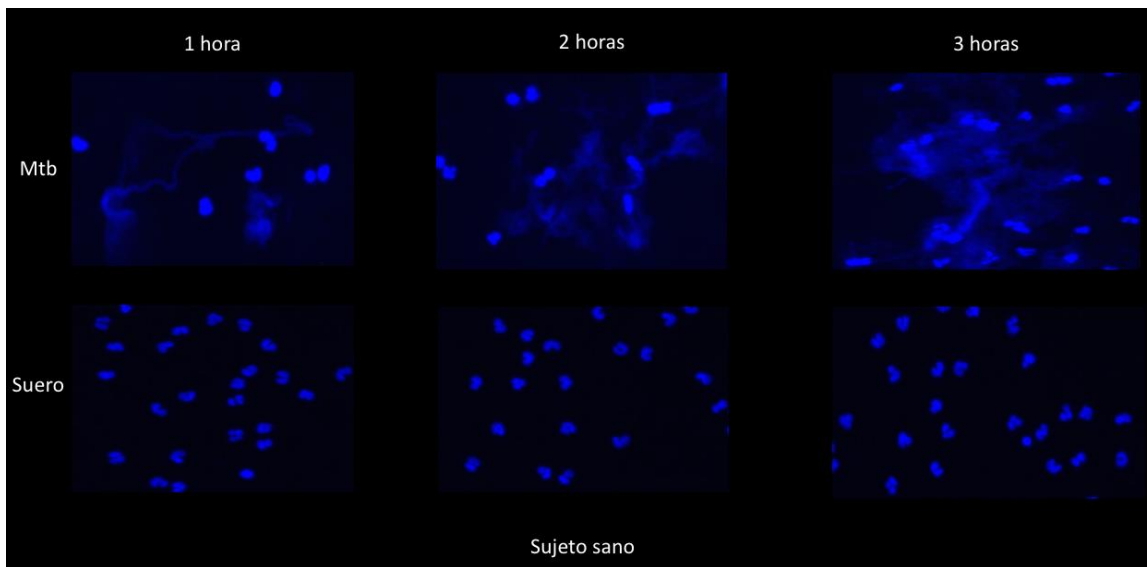


Figura 21. NETs de sujetos sanos con Mtb y suero autólogo a la 1, 2 y 3 horas.

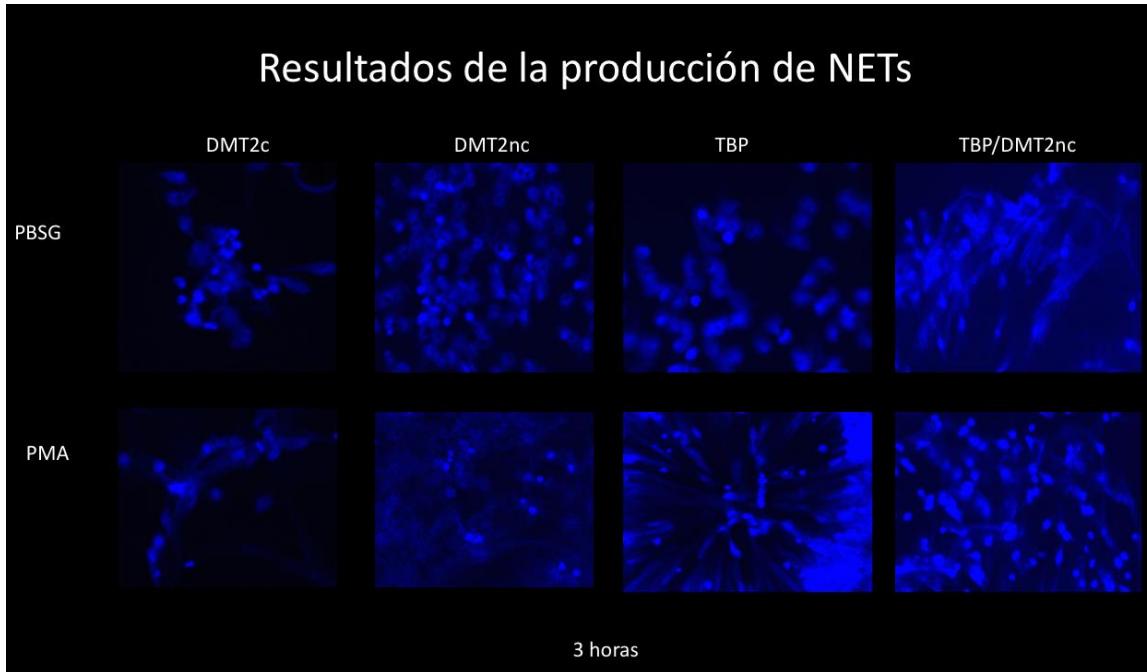


Figura 22. NETs de pacientes con DMT2c, DMT2nc, TBP y TBP/DMT2nc con PBSG y PMA a las 3 horas.

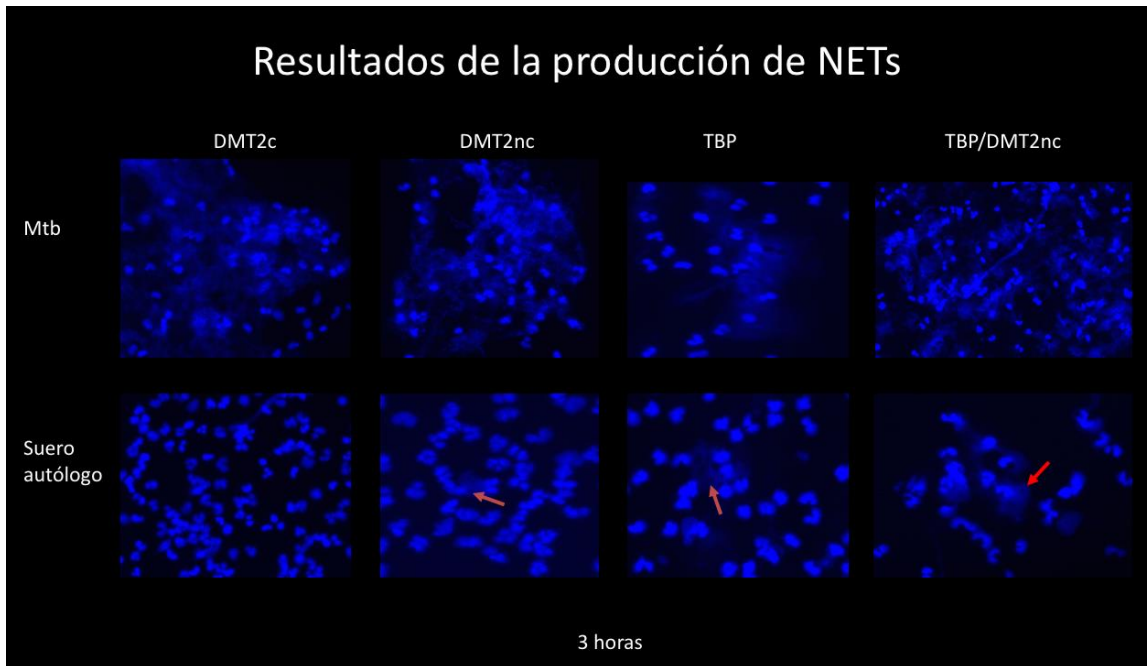


Figura 23. NETs de pacientes con DMT2c, DMT2nc, TBP y TBP/DMT2nc con Mtb y suero autólogo a las 3 horas.

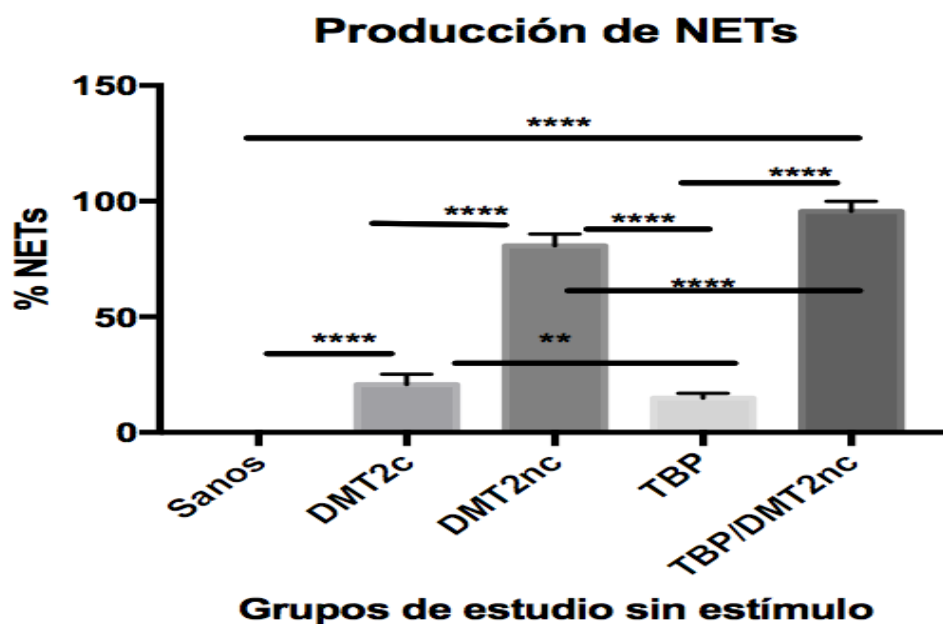


Figura 24. Producción de NETs sin estímulo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.005$).

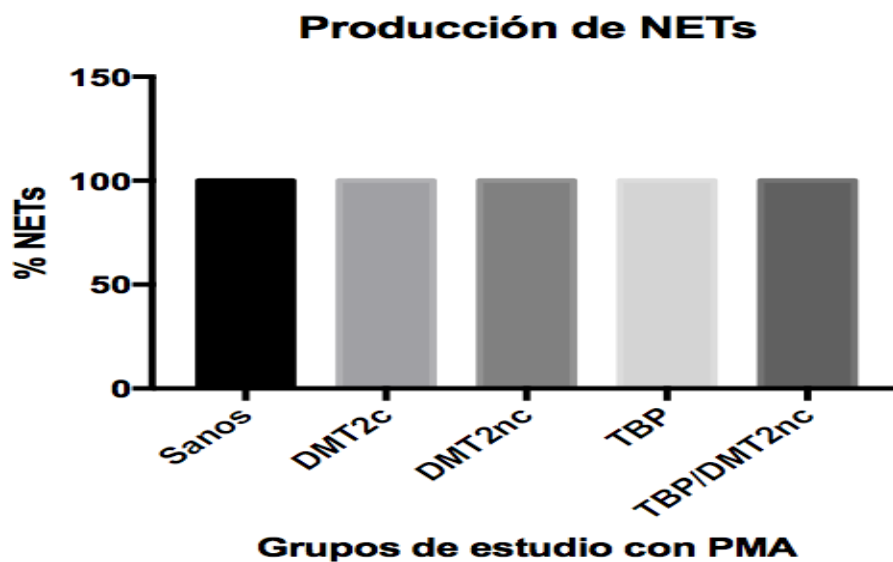


Figura 25. Producción de NETs con PMA. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.005$).

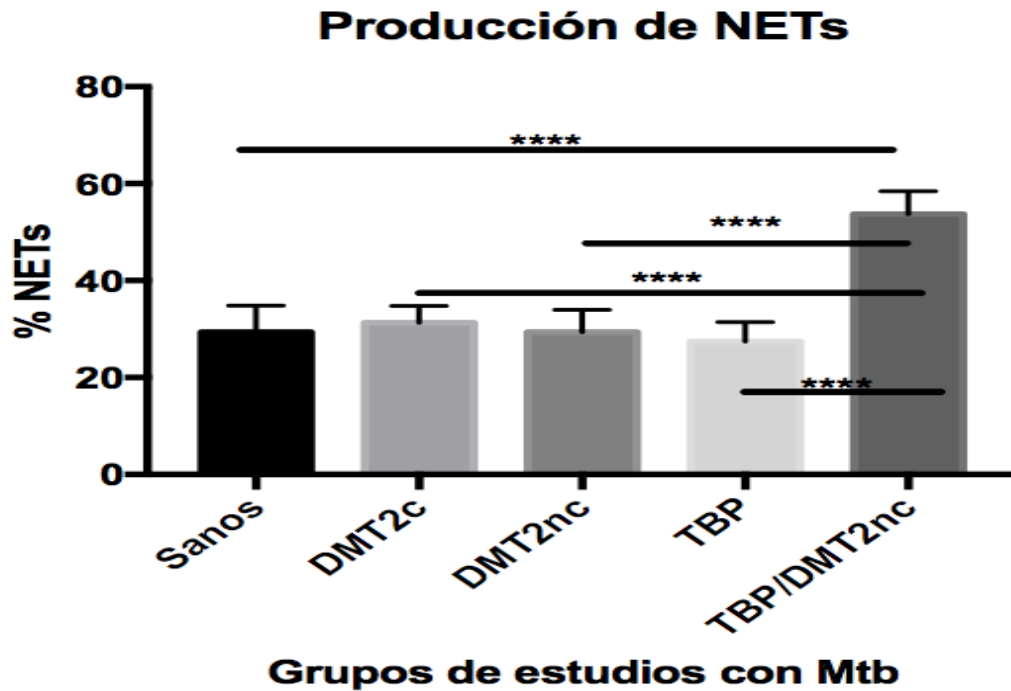


Figura 26. Producción de NETs con Mtb. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.005$).

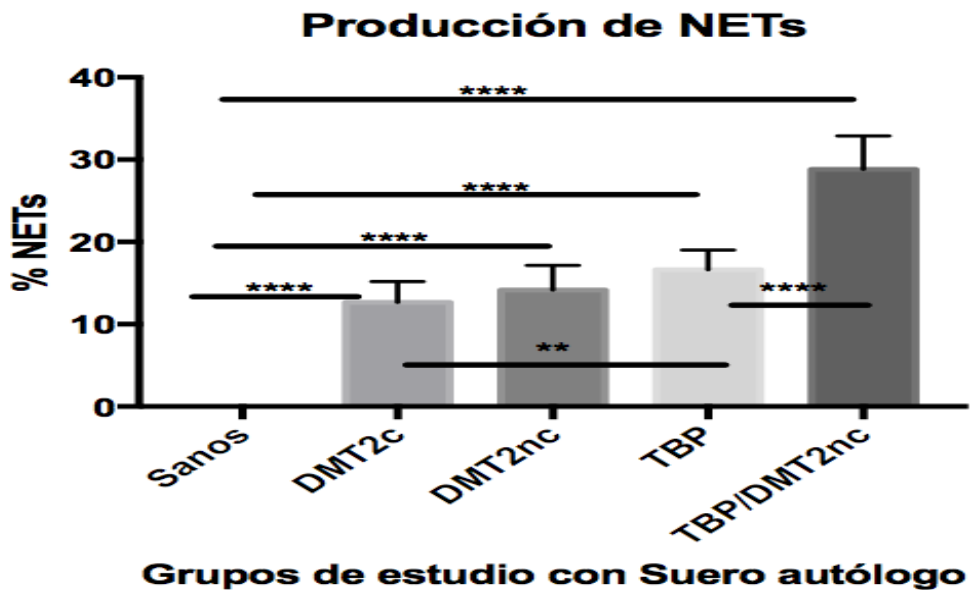


Figura 27. Producción de NETs con suero autólogo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.005$).

7.3 Cuantificación de la capacidad microbicida de los neutrófilos mediante UFC

En cuanto a la muerte intracelular de Mtb en el neutrófilo se pudo observar que existe diferencia significativa entre los diferentes grupos de estudio excepto entre los grupos de DMT2c y TBP así como entre DMT2nc y TBP/DMT2nc, figuras 28 y 29.

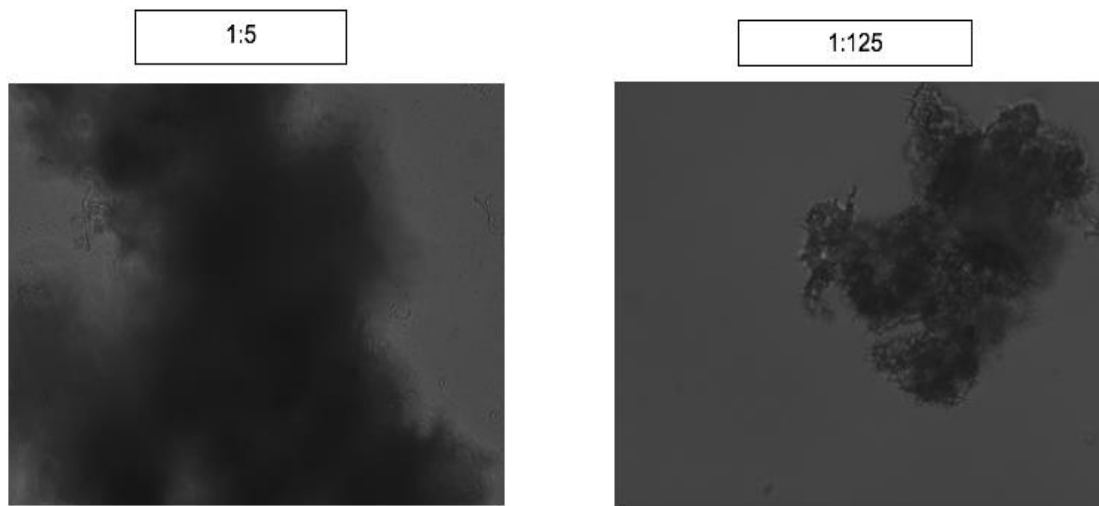


Figura 28. Visualización de colonias de *M. tuberculosis* en diferentes diluciones.

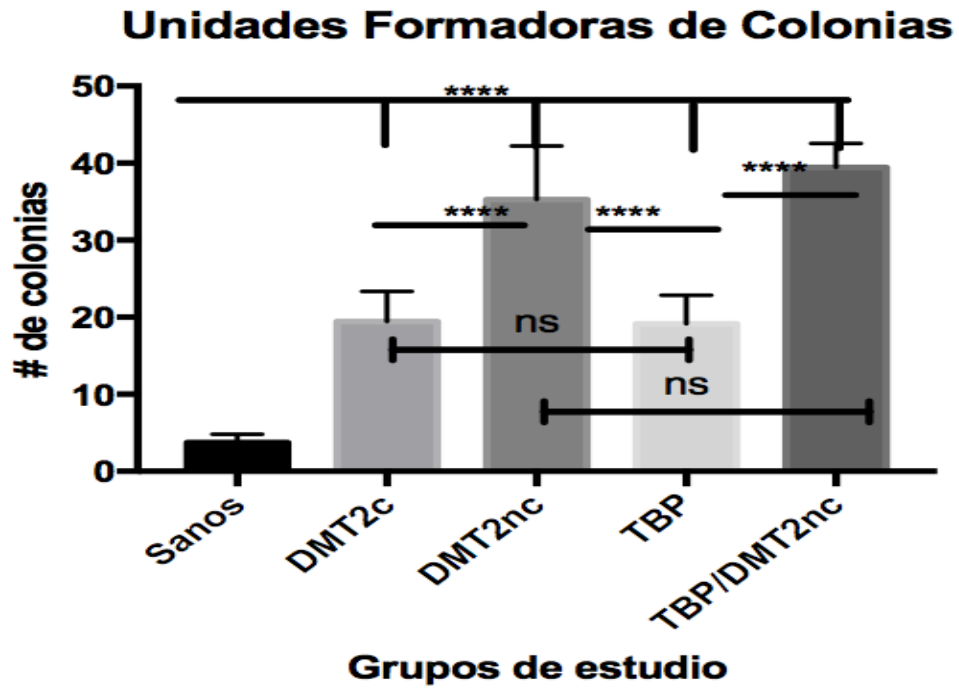


Figura 29. Muerte intracelular de Mtb en neutrófilos mediante UFC. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey (ns $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$).

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

8.1 Aislamiento de neutrófilos a partir de sangre venosa periférica en humanos

Se probaron diferentes metodologías para el aislamiento de neutrófilos, en una se utilizaba dos tipos de Ficoll-Hypaque, el 1077 y el 1119 para formar dos halos celulares, uno que contenía células mononucleares y otro con células polimorfonucleares, con este procedimiento no pudimos observar ambos halos y al momento de recuperar el halo de polimorfonucleares existía una contaminación de mononucleares por lo cual fue descartado este procedimiento (61, 62). Nuestro enfoque fue tener un procedimiento en el cual se pudiera obtener una buena cantidad de células polimorfonucleares con una población rica en neutrófilos de manera rápida y que se pudiera hacer con varias muestras a la vez sin tener el riesgo de contaminación de células mononucleares. Este procedimiento también es económico ya que solo se utilizan 3 ml de Ficoll-Hypaque independientemente de la cantidad de plasma rico en leucocitos que se agregue por encima de este en un tubo cónico de 15 ml. Tenemos entonces un procedimiento reproducible, económico, rápido y eficaz que puede ser utilizado para futuras investigaciones que requieran la evaluación de células polimorfonucleares.

8.2 Adherencia celular, fagocitosis, producción de MPO y estallido respiratorio

En nuestro estudio observamos que no existió diferencia en la adherencia celular en los diferentes grupos de estudio con los diferentes estímulos, esto difiere de lo reportado en el 2012 por Rojas Espinosa, *et.al.* (52) y por Bogna *et.al* en 1988 (53), esto se puede deber a las diferentes técnicas utilizadas ya que en el estudio de Bogna *et.al* de 1988 (53) midieron la adherencia celular mediante el conteo de células adheridas en una placa de petri por mm². Nosotros utilizamos la técnica descrita por Rojas Espinosa *et.al* en el 2012 (52) en la cual se utiliza el método de Lowry para medir la cantidad de proteínas de las células adheridas en una placa de 96 pozos, el hecho de no encontrar una diferencia significativa entre los grupos se puede deber a la n empleada. Además, se necesitaría una n mayor para ver si se sigue manteniendo el mismo resultado o exista una diferencia significativa entre los grupos, Rojas Espinosa *et.al* en el 2012 (52) por ejemplo tuvo un n de 44 para sujetos sanos y una n de 10 para la co-morbilidad de TBP/DMT2, lo ideal sería tratar de tener una misma n entre los grupos como lo tratamos de hacer en nuestro estudio, ya que la diferencia entre las n de los grupos es un factor importante al momento del análisis estadístico.

En cuanto a la fagocitosis, nuestro estudio obtuvo un resultado similar a lo ya publicado por Bogna *et.al* en 1988 (53) donde reportan que a mayor concentración de glucosa disminuye la capacidad fagocítica del neutrófilo. Nosotros obtuvimos que los pacientes con DMT2c y DMT2nc presentan una disminución en el índice fagocítico a comparación del sujeto sano. No se

observó una diferencia significativa entre el índice fagocítico de los pacientes con DMT2nc y la co-morbilidad TBP/DMT2nc, esto nos puede hacer pensar que no necesariamente por tener la co-morbilidad TBP/DMT2nc habrá una mayor afectación del índice fagocítico en comparación con los pacientes que solo tienen DMT2nc, como lo fue pensado en nuestra hipótesis. También es importante recalcar que se debe hacer otro estudio con una n mayor para ver si este patrón se sigue manteniendo. La posible explicación por lo cual los pacientes con DMT2c, DMT2nc y la co-morbilidad TBP/DMT2nc presentan una disminución en el índice fagocítico en comparación con un sujeto sano se puede deber a los productos finales de glicación avanzada. En 1995 Schmidt et.al (66) publicó un esquema que explica como la presencia de los productos finales de glicación avanzada disminuyen la capacidad fagocítica de las células de la inmunidad innata. La presencia de estos productos finales de glicación avanzada inducen la producción de citocinas proinflamatorias, inactivan los péptidos antimicrobianos liberados por los neutrófilos y las células de la inmunidad innata tienen una mayor afinidad para fagocitar estos productos finales de glicación avanzada que a los microorganismos. Estos productos finales de glicación avanzada se producen en etapas crónicas de la DMT2 que no esta controlada, por ende la importancia que un paciente con esta enfermedad llegue a un control glicémico.

En cuanto a la MPO, nuestro estudio es uno de los primeros en analizar la producción de MPO en los neutrófilos utilizando una placa de 96 pozos y un espectrofotómetro. En nuestros resultados no encontramos diferencia significativa entre los diferentes grupos de estudio, excepto entre el grupo

DMT2c y sujetos sanos, en los pozos sin estímulo y los pozos con Mtb. A pesar de lo encontrado la tendencia es que no exista diferencia entre los grupos, ya que se está midiendo la MPO preformada en los gránulos primarios del neutrófilo, pero se pudo observar que los sujetos sanos tuvieron menor absorbancia comparado con los demás grupos de estudio, se tendría que hacer un estudio con una n mayor para ver si esta tendencia continúa. Este resultado se puede deber a que los pacientes tanto con DMT2 como con TBP están en un estado de inflamación basal, lo cual puede explicar la mayor producción de MPO. Lo encontrado por Unubol, *et.al* en el 2015 (58) difiere de nuestros hallazgos, ya que ellos detectaron una menor actividad de MPO en los pacientes con DMT2nc, pero ellos realizaron la detección de MPO en laminillas y realizaron conteo manual de las células positivas para la tinción de MPO. Gorudko *et.al* en el 2011 (54) reportó que la cantidad y actividad de MPO se encontraba aumentada en plasma de pacientes con DMT2c y cardiopatía isquémica, cabe mencionar que en cuanto a la cantidad de MPO entre el sujeto sano y el paciente con DMT2c sin cardiopatía isquémica no hubo diferencia significativa. Tomando todo esto en cuenta se tendría que hacer un estudio donde se comparen las tres técnicas con un n mayor para determinar si se encuentran resultados similares entre las técnicas y los diferentes grupos de pacientes evaluados en este estudio.

En cuanto al estallido respiratorio, encontramos que en los pozos sin estímulo de los pacientes con DMT2c, DMT2nc, TBP y TBP/DMT2nc, se tenía una producción espontánea del estallido respiratorio, esto no sucede así con el grupo de sujetos sanos, en cuanto a los pozos con PMA o Mtb no se

encontraron diferencias entre los grupos de estudio. Este hallazgo es importante ya que la activación espontánea del estallido respiratorio genera un daño endotelial en el ser humano y permite la producción de trampas extracelulares de neutrófilos lo cual genera un daño endotelial aún mayor, esto se puede ver en el daño vascular que hay en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 cuando hay varios años de evolución (9). Rojas Espinosa et.al en el 2012 (52) reportó que no existía diferencia entre pacientes con DMT2, TBP/DMT2 o sujetos sanos en cuanto al estallido respiratorio, en ese estudio se restó la absorbancia del pozo con PMA con el pozo sin estímulo, en nuestro estudio decidimos separar esos resultados ya que observamos una activación espontánea en los grupos con DMT2 y la co-morbilidad TBP/DMT2, algo que no pasaba con los sujetos sanos.

8.3 Producción de NETs

Los resultados de nuestro estudio coinciden con lo antes reportado en el 2015 por Caretsia *et.al* (60) y en el 2019 por Wang, *et.al* (59), en donde ambos estudios demostraron que los neutrófilos de pacientes con DMT2 presentaban una liberación espontánea de NETs, nosotros observamos el mismo fenómeno en los pacientes con TBP/DMT2nc. Lo anterior pudiera explicarse a que los pacientes con DMT2 y la co-morbilidad TBP/DMT2nc presentan un estado de inflamación basal con una constante producción de citocinas proinflamatorias, entonces es probable que las células ya estén activadas al momento de aislarlas de sangre venosa periférica (63, 64). Además, la presencia de estos neutrófilos con liberación espontánea de NETs nos pudiera explicar el por qué

el sistema inmune de estos pacientes no es capaz de eliminar por completo a *M. tuberculosis*, ya que estas trampas extracelulares de neutrófilo permiten la división extracelular de *M. tuberculosis* aumentando así la carga bacteriana en el paciente (56). En cuanto a la producción de NETs con el suero autólogo encontramos que el suero de los pacientes con DMT2nc, TBP o la co-morbilidad TBP/DMT2nc indujeron la producción de NETs, resultados similares a lo encontrado en el 2018 por Juárez-Ortega, *et.al* (58). Así mismo encontramos que los pacientes con TBP/DMT2nc tenían una mayor producción de NETs cuando estaban en contacto con el suero autólogo, esto se puede deber a la presencia de proteínas solubles de *M. tuberculosis* como ESAT-6 y CFP-10 las cuales inducen la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (58).

8.4 Capacidad microbicida por medio del conteo de colonias

Fazal *et.al* en 1992 (67) describió por primera vez un método para el conteo de microcolonias de *M. tuberculosis* en caldo Middlebrook 7H9. En nuestro estudio realizamos esta técnica obteniendo que el método fue reproducible, resultando un método económico y sencillo para la cuantificación de colonias de *M. tuberculosis*. En nuestro estudio pudimos observar un aumento en el número de colonias de *M. tuberculosis* de los pacientes con DMT2c, DMT2nc, TBP y la co-morbilidad TBP/DMT2nc, lo cual nos indica que hay una disminución en la capacidad microbicida de los neutrófilos de estos pacientes en comparación con los sujetos sanos. En cuanto a los pacientes con DMT2nc y la co-morbilidad TBP/DMT2nc no se obtuvo una diferencia significativa, lo cual nos indica que el

principal protagonista de la afectación en la inmunidad innata es la DMT2. En la hipótesis del proyecto se pensaba que tal vez la presencia de ambas enfermedades ocasionaría una afectación mayor de la inmunidad innata a comparación de las enfermedades por separado, nosotros encontramos que no fue así al menos en los parámetros estudiados en este proyecto. También es importante mencionar de nueva cuenta que se necesita un estudio con una n mayor para ver si los resultados obtenidos en esta investigación se mantienen o cambian.

8.5 Neutrófilo exhausto

En nuestro estudio pudimos observar que cuando los neutrófilos de los pacientes con DMT2c, DMT2nc, TBP y la co-morbilidad TBP/DMT2nc se estimulaban con PMA o con *M. tuberculosis* no había diferencia entre los grupos en la pruebas de MPO y estallido respiratorio; aunque no había diferencia significativa con los sujetos sanos, este grupo de estudio tenía una menor cantidad de MPO y de absorbancia del NBT comparado con los grupos con enfermedades. Por ello es importante mencionar la posibilidad de que los neutrófilos de los pacientes con DMT2c, DMT2nc, TBP y la comorbilidad TBP/DMT2nc tengan un agotamiento o se encuentren exhaustos debido a la inflamación basal que existe por ser padecimientos crónicos (63, 64), y al momento de ser estimulados con PMA y *M. tuberculosis* solo lleguen a un límite y no puedan pasar de ahí (65); esto podría ser una explicación más por la cual los neutrófilos de estos pacientes son incapaces de eliminar la micobacteria por

completo y ser susceptibles a cualquier tipo de infección. Se tendría que aumentar la n para ver si estos resultados se mantienen o cambian.

8.6 Selección de pacientes con tuberculosis pulmonar y la comorbilidad TBP/DMT2

En los grupos de estudio de TBP y la co-morbilidad TBP/DMT2nc surge la pregunta sobre el porqué seleccionarlos dentro del primer mes de tratamiento. En 1999 Al-Moamary et.al (68) hicieron un estudio en el cual querían ver la importancia de que los pacientes con TBP permanecieran BAAR positivos a pesar del tratamiento y cuánto tiempo se tardaba en tener un resultado BAAR negativo en los pacientes. De 428 pacientes con TBP, 205 (48%) fueron BAAR positivos al primer mes de tratamiento, 30 (7%) fueron BAAR positivos a los 5 meses de tratamiento y 12 (3%) a los 9 meses de tratamiento. Tomando estos datos en cuenta tenemos que al mes 50% de los pacientes con TBP siguen siendo BAAR positivos, entonces podríamos decir que a las 2 semanas de tratamiento el 75% de los pacientes sigue siendo BAAR positivo. En nuestro estudio tuvimos el criterio de inclusión de que los pacientes con TBP y aquellos con la co-morbilidad TBP/DM2 estuvieran dentro del primer de tratamiento. También es importante mencionar que todos los pacientes de ambos grupos estuvieron dentro de las primeras dos semanas de tratamiento, por lo que la presencia de *M. tuberculosis* era elevada en todos los pacientes a pesar de haber iniciado el tratamiento, por eso a la hora de realizar nuestros experimentos vimos como los sueros de estos pacientes indujeron las NETs

debido a la presencia de ESAT-6 y CFP-10 que son las proteínas solubles de secreción temprana de *M. tuberculosis*.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIÓN

Los neutrófilos de los pacientes con la co-morbilidad TBP/DMT2nc no presentaron una disminución en sus funciones microbicidas en comparación con los pacientes que solo presentan DMT2nc.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

1. Cuantificar la producción de óxido nítrico en los neutrófilos
2. Analizar la expresión génica de iNOS en los neutrófilos
3. Cuantificar la producción de H₂O₂ en los neutrófilos
4. Determinar la presencia de EBP50 en Mtb que tiene la capacidad de suprimir iNOS.
5. Determinar si la ESAT-6 y CFP-10 modulan la activación génica de NF- κ B en todas las funciones del neutrófilo.
6. Cuantificar la producción de citocinas proinflamatorias en los neutrófilos sin estímulo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, tuberculosis pulmonar y la comorbilidad TBP/DMT2.

CAPÍTULO 11

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carl Nathan (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* 6, 173-182.
2. Niels. Borregaard, Ole, E., Sorensen, Kim, Theilgaard-Mönch. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology*, Vol. 28, No 8.
3. Niels, Borregaard, Jack, B., Cowland. (1997) Granules of the human polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, Vol 89, No 10, May 15, pp. 3503-3521.
4. Scott, D., Kobayashi, Frank, R., DeLeo. (2009) Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 1(3): 309-333.
5. Nathalie, D., Burg, Michael, H. Pillinger. (2001) The Neutrophil: Function and Regulation in Innate and Humoral Immunity. *Clinical Immunology*, Vol. 99 No. 1, April, pp. 7-17.
6. *Wang X, Qiu L, Li Z, Wang X-Y and Yi H (2018) Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. Front. Immunol. 9:2456.*
7. AMIR Medicina. 1ra edición. AMIR. MARBAN. 2013. Pag. 381-390.

8. <http://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2017/04/ENSANUT2016-mc.pdf>
9. <http://www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>
10. Rask-Madsen, C., & King, G. L. (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell metabolism*, 17(1), 20–33.
11. Microbiología médica. Séptima edición. Patrick R. Murray, PhD, Ken S. Rosenthal, PhD, Michael A. Pfaller, MD. Elsevier Saunders. 2013. Español. Pag. 235-237.
12. Hossain, M. M., & Norazmi, M. N. (2013). Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword?. *BioMed research international*, 2013, 179174.
13. AMIR Medicina. 1ra edición. AMR. MARBAN. 2013. Pag. 664-670.
14. www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html
15. Alma Yolanda Arce Mendoza, et.al. (2018). Efficacy of ELISA test in diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbiology Research International*. Vol. 6(4) pp. 54-60.
16. Leslie C.G., María del Carmen A. Del A., Isabel S. O., Ricardo L. (2009) Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por Mycobacterim tuberculosis. *Gac. Méd Méx*. Vol. 145 No. 4.
17. Tan, B.H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M.T., et al. (2006) Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial

- activity against intracellular pathogens. *J Immunol* **177**: 1864–1871.
18. Karima M, et al. (2005) Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. *J Leukoc Biol.* 78:862–870.
 19. Hanses F, Park S, Rich J, Lee JC. (2011) Reduced neutrophil apoptosis in diabetic mice during staphylococcal infection leads to prolonged TNF α production and reduced neutrophil clearance. *PLoS One.* 6:e23633.
 20. Thomas GM, et al. (2012) Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood.* 119:6335–6343.
 21. Alexandraki KI, et al. (2008) Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation. *J Clin Immunol.* 28:314–321.
 22. Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, Balakrishnan A, Ramachandra L, Satyamoorthy K. (2013) High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS letters.* 587:2241–6. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.053 PMID: 23735697
 23. Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. (2015) NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta diabetologica.* 52:497–503. doi: 10.1007/s00592-014-0676-x PMID: 25387570
 24. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. (2015) Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature medicine.* 21:815–9. doi: 10.1038/nm. 3887 PMID: 25387570

26076037

25. Turina M, Miller FN, Tucker C, Polk HC: (2006) Effects of hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperosmolarity on neutrophil apoptosis. *Surg Infect (Larchmt)* 7(2):111–121.
26. Fukase S, Sato S, Mori K, Secchi EF, Kador PF. (1996) Polyol pathway and NADPH- dependent reductases in dog leukocytes. *J Diabetes Complications.* 10(6):304–313.
27. Monouchehr-Pour M, Spagnuolo HM, Bissada NF. (1981) Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis. *J Dent Res.* 60: 729-730.
28. Bissada NF, Monouchehr-Pour M, Haddow M, Spagnuolo PJ. (1982) Neutrophil functional activity in juvenile and adult onset diabetic patients with mild and severe periodontitis. *J Periodont Res* 17: 500-502.
29. Lecube, A., Pachón, G., Petriz, J., Hernández, C., & Simó, R. (2011). *Phagocytic Activity Is Impaired in Type 2 Diabetes Mellitus and Increases after Metabolic Improvement. PLoS ONE, 6(8), e23366.*
30. Dolhofer R, Siess EA, Wieland OH. (1985) Nonenzymatic glycation of immunoglobulins leads to an impairment of immunoreactivity. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 366:361–6.
31. Niemann MA, Bhowan AS, Miller EJ. (1991) The principal site of glycation of human complement factor B. *Biochem J.* 274(Pt 2):473–80.
32. Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414:813–20.

33. Stevenson CR, Critchley JA, Forouhi NG, Roglic G, Williams BG, Dye C, et al. (2007) Diabetes and the risk of tuberculosis: a neglected threat to public health? *Chronic Illn.* 3:228–45.
34. Al-Rifai RH, Pearson F, Critchley JA, Abu- Raddad LJ (2017) Association between diabetes mellitus and active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 12(11): e0187967.
35. Hernandez-Pando R, Orozco H, Aguilar D. (2009) Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57: 355-367.
36. Arce-Mendoza A, Rodriguez-de Ita J, Salinas-Carmona MC, Rosas Taraco AG. (2008) Expression of CD64, CD206, and RAGE in adherent cells of diabetic patients infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res.* 39: 306-311.
37. Bacakoglu F, Basoglu OK, Cok G, Sayiner A, Ates M. (2001) Pulmonary tuberculosis in patients with diabetes mellitus. *Respiration.* 68: 595–600.
38. Mboussa J, Monabeka H, Kombo M, Yokolo D, Yoka-Mbio A, Yala F. (2003) Course of pulmonary tuberculosis in diabetics. *Rev Pneumol Clin.* 59: 39–44.

39. Fisher-Hoch SP, Whitney E, McCormick JB, Crespo G et al. (2008) Type 2 diabetes and multidrug-resistant tuberculosis. *Scand J Infect Dis.* 40: 888-93.
40. Wang CS, Yang CJ, Chen HC et al. (2009) Impact of type 2 diabetes on manifestations and treatment outcome of pulmonary tuberculosis. *Epidemiol Infect.* 137: 203–310.
41. Hendy M, Stableforth D. (1983) The effect of established diabetes mellitus on the presentation of infiltrative pulmonary tuberculosis in the immigrant Asian community of an inner city area of the United Kingdom. *Br J Dis Chest.* 77: 87–90.
42. Dooley KE, Tang T, Golub JE, Dorman SE, Cronin W. (2009) Impact of diabetes mellitus on treatment outcomes of patients with active tuberculosis. *Am J Trop Med Hyg.* 80: 634–639.
43. Atkin SL, Masson EA, Bodmer CW, Walker BA, White MC. (1993) Increased insulin requirement in a patient with Type 1 diabetes on rifampicin [letter]. *Diabet Med.* 10:392.
44. Lebovitz HE. (1990) Oral hypoglycemic agents. Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus, theory and practice. 4th ed. New York: Elsevier: Rifkin H, Porte Jr D, eds; 554–574.

45. Madsbad S. (2009) Treatment of type 2 diabetes with incretin-based therapies. *Lancet*. 373(9662):438–439.
46. Kumar Nathella, P., & Babu, S. (2017). *Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis*. *Immunology*, 152(1), 13–24.
47. Stew, S. S., Martinez, P. J., Schlesinger, L. S., & Restrepo, B. I. (2013). *Differential expression of monocyte surface markers among TB patients with diabetes co-morbidity*. *Tuberculosis*, 93, S78–S82.
48. Walsh MC, et al. (2011) The sensitivity of interferon-gamma release assays is not compromised in tuberculosis patients with diabetes. *Int J Tuberc Lung Dis*;15:179-184.
49. Sun Q, Zhang Q, Xiao H, Cui H, Su B. (2012) Significance of the frequency of CD4+CD25+CD127- T-cells in patients with pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus. *Respirology*. 17:876-882.
50. Dana T Graves, Rayyan A Kayal (2008). Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Front Biosci*: 13: 1227-1239.
51. Hodgson, K., Morris, J., Bridson, T., Govan, B., Rush, C., & Ketheesan, N. (2015). *Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections*. *Immunology*, 144(2), 171–185.
52. Oscar Rojas Espinosa, et.al. (2012). Functional State Analysis of Phagocytic Cells of Patients with Type 2 Diabetes and Pulmonary Tuberculosis. *Clin. Lab*. 58: 299-305.

53. Bogna Wierusz-Wysocka, et.al (1988). *The influence of increasing glucose concentration on selected functions of polymorphonuclear neutrophils. Acta diabetol. Lat. 25, 283.*
54. Gorudko, I. V., Kostevich, V. A., Sokolov, A. V., Buko, I. V., Konstantinova, E. E., Tsapaeva, N. L., ... Panasenko, O. M. (2011). *Increased myeloperoxidase activity is a risk factor for ischemic heart disease in patients with diabetes mellitus. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 5(3), 307–312.*
55. Unubol, M., Yavasoglu, I., Kacar, F., Guney, E., Omurlu, I. K., Ture, M., Bolaman, Z. (2015). Relationship between glycemic control and histochemical myeloperoxidase activity in neutrophils in patients with type 2 diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome, 7, 119.*
56. Ramos-Kichik, V., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Castelán, M., Gonzalez-Pozos, S., Muñiz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O., Estrada-García, I. (2009). *Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis, 89(1), 29–37.*
57. Rachel J. Roth, Michael P. Czech (2015). *NETs and traps delay wound healing in diabetes. Trends Endocrinol Metab.: 26(9): 451-452.*
58. Juárez-Ortega, M., Rojas-Espinosa, O., Muñiz-Salazar, R., Becerril-Villanueva, E., Hernández-Solís, A., Arce-Paredes, P., ... Cicero-Sabido, R. (2018). Sera from patients with active pulmonary tuberculosis and their household contacts induce nuclear changes in neutrophils. *Infection and drug resistance, 11, 1685–1702.*

59. Wang, L., Zhou, X., Yin, Y., Mai, Y., Wang, D., & Zhang, X. (2019). Hyperglycemia Induces Neutrophil Extracellular Traps Formation Through an NADPH Oxidase-Dependent Pathway in Diabetic Retinopathy. *Frontiers in immunology*, 9, 3076.
60. Carestia A, Frechtel G, Cerrone G, Linari MA, Gonzalez CD, Casais P, et al. (2016) NETosis before and after Hyperglycemic Control in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *PLoS ONE* 11(12): e0168647.
61. English D, Andersen BR. (1974). Single step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods*. 5(3), 249–52.
62. Strasser A, Kalmar E, Niedermüller H. (1998). A simple method for the simultaneous separation of peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells in the dog. *Vet Immunol Immunopathol*. 18;62(1): 29-35.
63. Swaroop, J. J., Rajarajeswari, D., & Naidu, J. N. (2012). Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *The Indian journal of medical research*, 135(1), 127–130.
64. Hatanaka, E., Monteagudo, P. T., Marrocos, M. S., & Campa, A. (2006). Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clinical and experimental immunology*, 146(3), 443–447.
65. Hong C. W. (2017). Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune network*, 17(5), 298–306.

66. Schmidt AM, et al. (1995). The dark side of glucose.. *Nat Med.* Oct; 1(10): 1002-4.
67. Fazal, N., Bartlett, R., Lammas, D. A., & Kumararatne, D. S. (1992). *A comparison of the different methods available for determining BCG-macrophage interactions in vitro, including a new method of colony counting in broth. FEMS Microbiology Letters, 105(5-6), 355–362.*
68. Al-Moamary, M. S., Black, W., Bessuille, E., Elwood, R. K., & Vedal, S. (1999). *The Significance of the Persistent Presence of Acid-fast Bacilli in Sputum Smears in Pulmonary Tuberculosis. Chest, 116(3), 726–731.*

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Antonio Muñiz Buenrostro

Candidato para el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Título de Tesis: Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 en las funciones microbicidas de neutrófilos de pacientes con tuberculosis pulmonar

Área de Estudio: Inmunología

Datos Personales: Nacido el 25 de agosto de 1992 en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

Educación:

1998-2004: Colegio Amado Nervo (Primaria)

2004-2006: Crockett Middle School (Secundaria)

2006-2007: Esc.Sec. #2 Jesús M. Montemayor (Secundaria)

2007-2009: C.I.D.E.B. (Preparatoria)

2009 – 2015: Médico Cirujano y Partero, Facultad de Medicina, U.A.N.L.