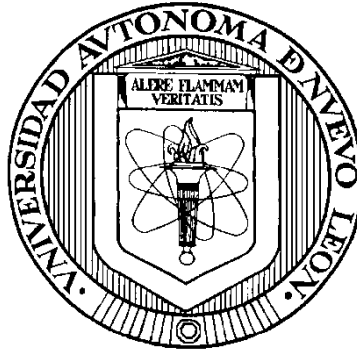


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS PROTEINAS EXTRACELULARES DE *M. tuberculosis* SOBRE LA ESTABILIZACIÓN DE HIF-1 α Y LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS IN VITRO

Por

M.C. ANTONIO MUÑIZ BUENROSTRO

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

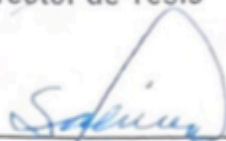
MONTERREY, NUEVO LEÓN, FEBRERO 2024

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS PROTEINAS EXTRACELULARES DE *M. tuberculosis* SOBRE LA ESTABILIZACIÓN DE HIF-1 α Y LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS IN VITRO

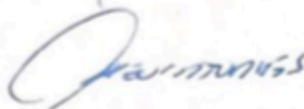
Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza
Director de Tesis



Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Co-Director de Tesis



Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres
Miembro de la Comisión



Dra. C. Nallely López López
Miembro de la Comisión



Dr. C. Bruno Rivas Santiago
Miembro de la Comisión



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

DEDICATORIA

A Dios

Por darme la sabiduría y paciencia para terminar el proyecto.

A mi esposa

Por estar a mi lado en todos los momentos difíciles del Doctorado, gracias por escucharme, te amo.

A mis hijos

Por ser la alegría de mi vida.

A mis padres

Por su apoyo, comprensión y amor a lo largo de toda mi vida.

"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.C. Mario Cesar Salinas Carmona, al Dr.C. Manuel Guadalupe Mejía Torres, a la Dra.C. Nallely López López y al Dr.C. Bruno Rivas Santiago por todo su apoyo durante el Doctorado.

A CONACYT por la beca otorgada.

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

A todos los maestros del Departamento de Inmunología, por todas sus enseñanzas.

Al Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco por apoyarme en el proyecto, aunque no era parte de la comisión de tesis.

Al Dr. C. Oscar Rojas Espinosa por continuar la colaboración entre su grupo de trabajo y el nuestro que generó varias publicaciones.

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

A todos mis compañeros de maestría y Doctorado, por los buenos momentos que pasamos juntos en estos años.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	8
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
METODOLOGÍA	11
Aislamiento de proteínas extracelulares de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
Desalinización y cuantificación de proteínas.....	11
Electroforesis de proteínas extracelulares obtenidas de <i>Mtb</i>	12
Aislamiento de neutrófilos de sangre venosa periférica.....	12
Determinación de HIF-1 α por Western Blot	13
Visualización de trampas extracelulares de neutrófilos	16
Determinación de IFN- γ por ELISA.....	17
PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR)	17
Análisis estadístico	19
RESULTADOS	20
Extracción de proteínas extracelulares de <i>Mtb</i>	20
Viabilidad celular.....	21
Western blot de HIF-1 α	22
Producción de ROS	23
Formación de trampas extracelulares de neutrófilos	24
ELISA de IFN- γ	27
PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR)	28
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN	37
PERSPECTIVAS	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Lista de figuras

Figura 1. Foto representativa de la cámara de hipoxia y del sensor de oxígeno	15
Figura 2. Curva de calibración de albumina sérica bovina.....	20
Figura 3. Imagen representativa del SDS-PAGE de las proteínas extracelulares de <i>Mtb</i> H37Rv.....	21
Figura 4. Viabilidad celular de los neutrófilos después de 5 horas de incubación con 100 μ M de CoCl ₂ o 10 μ g/ml de pMtb.....	22
Figura 5. Las proteínas extracelulares de <i>Mtb</i> H37Rv estabilizan HIF-1 α en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia.	23
Figura 6. Las proteínas extracelulares de <i>Mtb</i> H37Rv aumentaron la producción del estallido respiratorio en neutrófilos humanos	24
Figura 7. . Las proteínas extracelulares de <i>Mtb</i> incrementan la formación de trampas extracelulares en neutrófilos humanos incubados en normoxia	25
Figura 8. <i>Las proteínas extracelulares de Mtb incrementan la formación de trampas extracelulares en neutrófilos humanos incubados en hipoxia.....</i>	26
Figura 9. <i>Las proteínas extracelulares de Mtb incrementan la formación de trampas extracelulares en neutrófilos humanos incubado en normoxia e hipoxia.....</i>	27
Figura 10. <i>Las proteínas extracelulares de Mtb en conjunto con un ambiente de hipoxia incrementan la producción de IFN-γ en neutrófilos humanos.....</i>	27
Figura 11. <i>Las pMtb en conjunto con un ambiente de hipoxia incrementaron tanto la expresión de HIF-1α como de VEGF en neutrófilos humanos.....</i>	30

Lista de tablas

Tabla 1. Características de los sujetos de estudio.....	13
Tabla 2. Secuencias forward y reverse de los cebadores utilizados y sus temperaturas de amplificación	18
Tabla 3. Cálculo de la expresión génica relativa de HIF-1 α en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia	28
Tabla 4. Cálculo de la expresión génica relativa de HIF-1 α en neutrófilos humanos estimulados con las pMtb e incubados en condiciones de normoxia e hipoxia	29
Tabla 5. Cálculo de la expresión génica relativa de VEGF en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia	29
Tabla 6. Cálculo de la expresión génica relativa de VEGF en neutrófilos humanos estimulados con las pMtb e incubados en condiciones de normoxia e hipoxia.....	29
Tabla 7. Cálculo de la expresión génica relativa de GLUT-1 en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia.....	29
Tabla 8. Cálculo de la expresión génica relativa de GLUT-1 en neutrófilos humanos estimulados con las pMtb e incubados en condiciones de normoxia e hipoxia.....	30

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
BSA	Albúmina sérica bovina
CO ₂	Dióxido de carbono
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
HIF-1 α	Factor Inducible de Hipoxia 1-alpha
HRP	Peroxidasa de rábano
IFN- γ	Interferón gamma
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-8	Interleucina 8
kDa	Kilodalton
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
μ M	Micromolar
mm	Milimetro
mA	Miliamper
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
Ng	Nanogramos
O ₂	Oxígeno
PBS	Buffer fosfato salino
PHD	Prolilhidroxilasa
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
PPD	Derivado proteico purificado
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
V	Volt
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE *M. tuberculosis* SOBRE LA ESTABILIZACIÓN DE HIF-1 α Y LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS IN VITRO

Introducción: La tuberculosis pulmonar se caracteriza por la formación de un granuloma el cual está compuesto por macrófagos alveolares, células espumosas, linfocitos, neutrófilos, fibroblastos y tejido conectivo. En el granuloma las células se enfrentan a un ambiente de hipoxia el cual estabiliza el factor inducible de hipoxia-1 alfa (HIF-1 α). A su vez, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) libera proteínas de secreción temprana las cuales modulan diferentes respuestas del sistema inmunitario en el granuloma. Se ha descrito que en la infección por *Mtb*, se aumenta la acumulación de HIF-1 α en los macrófagos y neutrófilos, esto genera un efecto dual el cual es protector en la fase aguda de la infección y en etapas tardías disminuye la eliminación de *Mtb*.

Objetivo: Analizar el efecto de las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* H37Rv sobre la estabilización de HIF-1 α y la activación de neutrófilos in vitro.

Metodología: Se utilizaron proteínas extracelulares de un cultivo de *Mtb* H37Rv en caldo Middlebrook 7H9, posteriormente las proteínas fueron precipitadas con sulfato de amonio y finalmente desalinizadas. Se utilizó SDS-PAGE para evaluar el patrón electroforético en el cual, cuatro proteínas con pesos de 6, 38, 49 y 62 kDa fueron las más abundantes. Los neutrófilos se aislaron de la sangre de individuos sanos y se incubaron con proteínas extracelulares de *Mtb* en condiciones de normoxia (O₂ 21%) e hipoxia (O₂ 1%) para

evaluar la estabilización de HIF-1 α y se evaluó la producción de ROS, formación de NETs y producción de IFN- γ . Se determinó expresión génica de HIF-1 α y sus genes blanco VEGF y GLUT-1.

Resultados: Se detectó HIF-1 α en neutrófilos estimulados con proteínas extracelulares de *Mtb* por western blot en normoxia e hipoxia. Los neutrófilos estimulados con las proteínas extracelulares de *Mtb* en hipoxia tuvieron un incremento en la producción de ROS, formación de NETs, producción de IFN- γ y expresión de HIF-1 α y VEGF.

Conclusión: La estabilización de HIF-1 α en los neutrófilos con las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* potenció la activación de los neutrófilos mejorando sus funciones microbicidas.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE EFFECT OF *M. tuberculosis* EXTRACELLULAR PROTEINS ON HIF-1A STABILIZATION AND NEUTROPHIL ACTIVATION IN VITRO

Introduction: Pulmonary tuberculosis is characterized by the formation of a granuloma which is composed of alveolar macrophages, foamy cells, lymphocytes, neutrophils, fibroblasts and connective tissue. In the granuloma, the cells face a hypoxic environment which stabilizes the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α). In turn, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) releases early-secreting proteins which modulate different immune system responses in the granuloma. It has been described that in *Mtb* infection, the accumulation of HIF-1 α in macrophages and neutrophils is increased, this generates a dual effect which is protective in the acute phase of the infection and in late stages decreases the elimination of *Mtb*.

Objective: Analyze the effect of extracellular proteins from *M. tuberculosis* H37Rv on the stabilization of HIF-1 α and the activation of neutrophils in vitro.

Methodology: Extracellular proteins of *Mtb* H37Rv from a Middlebrook 7H9 broth were used. The proteins were precipitated with ammonium sulfate and finally desalted. SDS-PAGE was used to evaluate the electrophoretic pattern in which four proteins with weights of 6, 38, 49 and 62 kDa were the most abundant. Neutrophils were isolated from the blood of healthy individuals and incubated with *Mtb* extracellular proteins under normoxia (21% O₂) and hypoxia (1% O₂) to assess HIF-1 α stabilization, ROS production, formation of

NETs and production of IFN- γ . Genetic expression of HIF-1 α and its target genes VEGF and GLUT-1 were determined.

Results: HIF-1 α was detected in neutrophils stimulated with *Mtb* extracellular proteins by western blot in normoxia and hypoxia. Neutrophils stimulated with *Mtb* extracellular proteins in hypoxia had an increase in ROS production, NET formation, IFN- γ production, and HIF-1 α and VEGF expression.

Conclusion: The stabilization of HIF-1 α in neutrophils with extracellular proteins from *M. tuberculosis* enhanced the activation of neutrophils, improving their microbicidal functions.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es el agente causal de la tuberculosis pulmonar, y se estima que al menos una cuarta parte de la población mundial tiene una infección latente ya que no muestra síntomas de la enfermedad [1]. En 2021, se notificaron 10.6 millones de nuevos casos de tuberculosis y provocaron 1.6 millones de muertes en todo el mundo[1]. *Mtb* inicia su ciclo de vida al invadir el tracto respiratorio y los pulmones, ya que se cree clásicamente que el microorganismo solo prospera dentro de organismos vivos [2,3]. Esta interacción inicial, comúnmente referida como infección primaria, marca el comienzo del contacto entre el patógeno y el sistema respiratorio. Ha habido una controversia de que la coevolución entre el *Mtb* y su huésped humano no sigue la trayectoria convencional de una carrera armamentista evolutiva. En cambio, se sugiere que se caracteriza por mecanismos de manipulación [3]. Tras la exposición a múltiples receptores de células huésped (incluyendo receptores tipo toll TLRs, receptores lectina tipo C CLRs, receptores de manosa MRs y receptores tipo NOD NLRs) y la internalización por macrófagos alveolares y células dendríticas, *Mtb* pasa por una fase de replicación intracelular. Posteriormente, las células infectadas se extienden a los ganglios linfáticos mientras intentan destruir las bacterias con varias enzimas proteolíticas y citoquinas (por ejemplo, TNF- α e IFN- γ), perpetuando la propagación del patógeno a través del parénquima pulmonar del huésped al llegar [4]. La activación de los macrófagos resulta en el reclutamiento de células inmunitarias innatas adicionales,

fomentando así respuestas inflamatorias que contribuyen a la defensa del huésped contra el patógeno. Los neutrófilos demuestran una intensidad aumentada de fagocitosis en comparación con los macrófagos, junto con niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) [5]. Al reclutar linfocitos al sitio de infección, se inicia una cascada de respuestas inmunes mediadas por células, lo que lleva a la llegada de células inmunitarias adicionales destinadas a localizar la colonización bacteriana e inhibir su proliferación [6,7]. Durante las etapas iniciales, se observa un retraso característico en la respuesta de las células T, lo que ayuda al patógeno a establecer una infección persistente [6]. En este punto, la erradicación completa del *Mtb* es factible si la capacidad inmune del huésped permanece intacta [8]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la respuesta inmune no es suficiente para erradicar a *Mtb*. Los monocitos se acumulan en las proximidades de los macrófagos infectados, precipitando la formación de granulomas sólidos, una característica patológica de la TB [9], estos granulomas contienen macrófagos alveolares, células espumosas, linfocitos, neutrófilos, fibroblastos y tejido conectivo [10]. A pesar de que los macrófagos han sido el foco de la mayor parte de la investigación en la infección por *Mtb* [11–14], los neutrófilos han ganado recientemente la atención como una célula que juega un papel importante en esta infección. En 2004, Arce Mendoza et al. encontraron que el 70% de las células en un lavado broncoalveolar de pacientes con tuberculosis pulmonar eran neutrófilos, y que monocitos y linfocitos eran alrededor del 20% y 10% respectivamente [15]. Los neutrófilos están involucrados principalmente en la respuesta inmune temprana, sin embargo, también se encuentran en el granuloma de la fase crónica de la infección por *Mtb* [16]. La célula fagocítica más abundante en el granuloma necrótico es el neutrófilo, y la presencia de ESAT-6 en el

granuloma ocasiona un proceso de necrosis y de liberación de trampas extracelulares en el neutrófilo [17]. ESAT-6 forma parte de un sistema de secreción de proteínas (ESX-1) de *Mtb*, el cual libera ESAT-6 y CFP-10 en la etapa temprana de la infección y son cruciales para su virulencia y patogenia [18–20]. Recientemente se identificaron aproximadamente 1314 proteínas de secreción temprana en el filtrado de cultivo de *Mtb* [21]. Se ha descrito que las proteínas secretoras y sus sistemas de secreción contribuyen al desarrollo de enfermedades [22]. Se ha demostrado también que la expresión de HIF-1 α es regulada por ESAT-6 y que HIF-1 α promovía la inmunidad innata protectora en el macrófago THP-1 activado por ESAT-6. Por lo tanto, es fundamental comprender la función de las proteínas de secreción temprana de *Mtb* en la patogenia de la tuberculosis pulmonar. HIF-1 α se transcribe y traduce continuamente, pero se degrada rápidamente debido a la hidroxilación de las prolin hidroxilasas (PHD). Bajo normoxia (21% O₂), HIF-1 α es ubiquitinado y degradado por el proteasoma [23]. En condiciones de hipoxia (<5% O₂) [23] o en presencia de cloruro de cobalto [24], las PHD son incapaces de hidroxilar HIF-1 α , y esto incrementa sus niveles celulares. La regulación de HIF-1 α ha sido ampliamente estudiada en el contexto de la tuberculosis, específicamente en modelos murinos. Baay-Guzman et al demostró que en las primeras etapas de la infección por *Mtb* en un modelo murino, los macrófagos aumentan la expresión de HIF-1 α . La principal fuente de expresión de HIF-1 α fueron los macrófagos espumosos, que son células resistentes a la apoptosis y directamente implicadas en el control de la infección. Cuando los autores bloquearon la vía de HIF-1 α durante la infección temprana, los ratones desarrollaron una enfermedad más grave, a diferencia de la enfermedad leve que se produce después del bloqueo de HIF-1 α en la etapa tardía de la infección. Finalmente,

los autores concluyeron que la regulación de los niveles de la proteína HIF-1 α tiene consecuencias heterogéneas en la TB experimental [25]. Se ha demostrado que la estabilización de HIF-1 α a través de la activación de neutrófilos, brinda protección al huésped durante la infección por *Mtb* in vivo [26]. Por otro lado, en modelos de pez cebra de inflamación crónica, se ha encontrado que HIF-1 α en ambiente hipóxico, retarda la apoptosis de los neutrófilos y promueve que los neutrófilos migren lejos del sitio de infección, ambas situaciones pudieran estar relacionadas con una menor eliminación de la micobacteria [27]. Otros hallazgos indican que la estabilización de HIF-1 α puede cambiar la dinámica de la migración de neutrófilos a escala local, pero brindando protección al huésped a nivel sistémico [26]. Se ha demostrado que los neutrófilos participan en el control de infecciones por varios mecanismos que incluyen la fagocitosis, la desgranulación, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) [5,28–31]. Desde el 2009, Ramos-Kichick, et.al., demostraron en un estudio in vitro con neutrófilos de sujetos sanos, que *M. tuberculosis* H37Rv y *M. canettii* 9600046 inducían cambios nucleares como picnosis y decondensación de la cromatina que conducían a la formación de NETs de forma dependiente del tiempo, lo que provocaba la muerte de los neutrófilos infectados. La liberación de NETs capturaba a las micobacterias pero no las eliminaba [32]. En 2021 Rojas-Espinosa, et.al., estudió de manera in vitro y utilizando neutrófilos de sujetos sanos, el efecto de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 de *Mtb* y descubrió que ambas proteínas eran capaces de inducir cambios nucleares como picnosis y decondensación de la cromatina en los neutrófilos. ESAT-6 provocó mayores cambios nucleares en comparación con CFP-10 [33].

En respuesta a la infección por *Mtb*, los neutrófilos liberan una variedad de citocinas, como IL-8, IL-1- β e IFN- γ . Es bien sabido que las citocinas juegan un papel importante en la respuesta del huésped contra *Mtb*. Esto se demostró por primera vez en estudios de silenciamiento de genes realizados en un modelo murino, que documentaron el efecto del IFN- γ , TNF- α e IL-12 en la regulación del crecimiento bacteriano [34–37]. Las células asesinas naturales (NK) y las células T pueden producir más IFN- γ como resultado de la estimulación proporcionada por la IL-12, secretada por las células presentadoras de antígeno al comienzo de la infección. El IFN- γ activa los macrófagos para producir TNF- α [7,38,39]. El TNF- α contribuye al mantenimiento del granuloma, lo que ayuda a contener el patógeno [7,39,40], mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que promueven la destrucción intracelular del patógeno [41–43]. En consecuencia, activan a macrófagos, neutrófilos y linfocitos T distantes, provocando su quimiotaxis hacia el lugar de la infección [44]. Los linfocitos T y monocitos activados mantienen la producción de TNF- α importante en la respuesta antiinfecciosa contra *Mtb* [7,38,39]. Los neutrófilos liberan trampas extracelulares en la infección por *Mtb* y está respuesta esta relacionada con la inflamación y el deterioro pulmonar debido al proceso NETosis que liberan enzimas que dañan al tejido pulmonar [5,45–48].

Se ha descrito que un aumento en el número de neutrófilos en banda esta directamente relacionado con el daño pulmonar, la propagación de la infección y la mortalidad de los pacientes [48]. Por otro lado, hay informes que afirman que los bajos niveles de neutrófilos en banda y los altos niveles de neutrófilos CD16/CD62 que expresan IL-10 están relacionados con una patología pulmonar reducida en el momento del diagnóstico [46]. Por lo tanto, los neutrófilos pudieran asociarse como elementos importantes para

modular la interacción *Mtb*-huésped y posiblemente como los primeros predictores de gravedad en la tuberculosis pulmonar [46]. Los neutrófilos al entrar en el granuloma ocasionado por *Mtb* se exponen a una hipoxia patológica, como lo documentaron Belton et al. En biopsias de pulmón de pacientes con tuberculosis pulmonar se describió como *Mtb* provoca la acumulación de HIF-1 α [49]. Se ha documentado que en los macrófagos durante la infección por *Mtb*, la expresión de NF- κ B aumenta en modelos experimentales de ratón y conejo, así como en los granulomas de pacientes con tuberculosis pulmonar [50,51]. Este factor de transcripción NF- κ B se dimeriza y se traslada al núcleo para activar la transcripción de HIF-1 α y otros genes blanco [50–53]. NF- κ B también está involucrada en la formación de ROS [54,55] y una de las vías por la cual HIF-1 α se estabiliza, es mediante ROS [56].

Se sabe que *Mtb* induce a que los macrófagos expresen y secreten factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los espacios extracelulares, porque a través de la angiogénesis, VEGF es uno de los factores responsables de proveer la permeabilidad vascular en el granuloma [57–59]. Los vasos sanguíneos proporcionarán una ruta eficiente para que las células del sistema inmune viajen al granuloma y puedan combatir la infección por la acción de las quimiocinas secretadas por las células infectadas en el granuloma [60]. VEGF también actúa como una quimiocina de macrófagos, lo que le permite participar en la progresión de la tuberculosis a través del reclutamiento de monocitos y macrófagos de una manera independiente de la angiogénesis. Este reclutamiento ayuda al progreso de la infección bacteriana mediante el suministro de células huésped adicionales y también contribuye a la señalización de la muerte celular. VEGF también contribuye en el desarrollo de inflamación en la infección por *Mtb*. Esta

inflamación, en vez de proteger, contribuye a la patología pulmonar, así como a los síntomas de la enfermedad. Se ha demostrado que la inhibición del VEGF reduce la inflamación, y que el tratamiento antifímico de los pacientes con tuberculosis pulmonar en conjunto con corticoesteroides reduce las tasas de mortalidad en un 17 % [59]. Cuando se consideran como un todo, los procesos de angiogénesis, reclutamiento de macrófagos e inflamación establecen al VEGF como uno de los contribuyentes más significativos en la fisiopatología de la tuberculosis pulmonar [61,62].

En base a los resultados anteriores, nuestro enfoque fue evaluar el efecto de las proteínas extracelulares de *Mtb* en la estabilización de HIF-1 α y las implicaciones que esto tiene sobre la función celular y la expresión génica en neutrófilos humanos, ya que estas proteínas, como se informó en un estudio anterior, estabilizan HIF-1 α en macrófagos [63]. Esto es importante, ya que HIF-1 α es un mediador clave de la inmunidad dependiente de IFN- γ contra *Mtb* [64].

Utilizamos un ensayo in vitro para estimular los neutrófilos humanos con proteínas extracelulares de *Mtb* en condiciones de normoxia e hipoxia y detectamos la presencia de HIF-1 α mediante western blot, además de una mayor producción de ROS, formación de NETs, producción de IFN- γ y expresión de VEGF al combinar el estímulo de proteínas extracelulares de *Mtb* con hipoxia. Estos datos muestran que La estabilización de HIF-1 α en los neutrófilos con las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* potencio la activación de los neutrófilos mejorando sus funciones microbicidas.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Las proteínas de secreción temprana de *Mtb* modulan diferentes respuestas del sistema inmune en el granuloma. Se ha descrito que en la infección por *Mtb* existe un aumento en la expresión de HIF-1 α en los macrófagos donde se induce un efecto dual, protector en la fase aguda de la infección y en etapas tardías, HIF-1 α disminuye la eliminación de *Mtb*. Sin embargo, existe poca información sobre el papel de las proteínas extracelulares de *Mtb* en la estabilización de HIF-1 α y que efecto tienen sobre las funciones microbicidas del neutrófilo en un ambiente de normoxia e hipoxia. Con esto se busca agregar información sobre la probable participación de los neutrófilos en un ambiente de hipoxia en la inmunopatología causada por *Mtb*.

HIPÓTESIS

Las proteínas extracelulares de secreción temprana de *M. tuberculosis* estabilizan HIF-1 α y potencian la activación de neutrófilos in vitro.

CAPÍTULO 3

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* H37Rv sobre la estabilización de HIF-1 α y la activación de neutrófilos in vitro.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto in vitro de las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis H37Rv* sobre la estabilización de HIF-1 α en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia.
2. Evaluar el efecto in vitro de las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis H37Rv* sobre las funciones microbicidas y la producción de IFN- γ en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia.
3. Analizar el efecto in vitro de las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis H37Rv* sobre la expresión génica de *HIF-1 α* , *VEGF* y *GLUT1* en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia.

CAPÍTULO 5

METODOLOGÍA

Aislamiento de proteínas extracelulares de *Mycobacterium tuberculosis*

Se utilizó la cepa *Mtb* H37Rv, la cual se cultivó a 37 °C durante 3 semanas en agar Middlebrook 7H10 (Cat. 262710, BD Biosciences) suplementado con glicerol al 1 %, Tween 80 al 0,05 % (Sigma) y enriquecido con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa de Middlebrook al 10 % (Cat. 211886, BD Biosciences). Se congelaron alícuotas de cultivos en la fase exponencial de crecimiento logarítmico en PBS/glicerol al 10 %. Para obtener las proteínas extracelulares, la cepa *Mtb* H37Rv se cultivo en medio liquido Middlebrook 7H9 (Cat. 271310, BD Biosciences) durante 4 semanas a 37 °C. A continuación, el sobrenadante se filtró utilizando un poro de 0.22 µm. Posteriormente, las proteínas fueron precipitadas con sulfato de amonio al 80% en relación 1:1. Las proteínas obtenidas se sedimentaron por centrifugación a 5000 rpm a 4°C durante 30 minutos y finalmente se disolvieron en PBS. El manejo de *Mtb* H37Rv dentro de nuestro laboratorio fue revisado y aprobado por el comité de ética e investigación de nuestra institución con el número IN20-00002.

Desalinización y cuantificación de proteínas

Después se continuo con la desalinización y cuantificación proteica que consistió en agregar las proteínas a una tira de diálisis de celulosa con tamaño de poro de 3.5 kDa (Cat. 88242, Thermo Fisher Scientific), la cual se introdujo en un vaso de precipitado que contenía agua destilada y se incubó durante siete días a 4 °C, cambiando el agua destilada cada 2 días. Tras la desalinización, las proteínas se centrifugaron a 5000 rpm

durante 5 minutos y el sobrenadante se filtro utilizando un poro de 0.22 μm . Para la determinación de la concentración proteica obtenida se utilizo el ensayo de Bradford. Las proteínas se almacenaron en alícuotas de 1 y 5 ml a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Electroforesis de proteínas extracelulares obtenidas de *Mtb*

Para la separación e identificación de las proteínas de la cepa *Mtb* H37Rv se realizo una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Después de descongelar una alícuota con las proteínas, estas se resuspendieron en buffer Laemmli 1x (Cat. S3401, Sigma-Aldrich) y se calentaron a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida Bolt Bis-Tris Plus al 4-12 % de 15 pocillos y 1 mm de espesor (Cat. NW04125BOX, Thermo Fisher Scientific), se aplico corriente eléctrica a 200 V y 160 mA durante 20 min en buffer de corrimiento Bolt MES SDS (Cat. B000202, Thermo Fisher Scientific) y se tiño el gel con azul de Coomasie.

Aislamiento de neutrófilos de sangre venosa periférica

Las muestras de neutrófilos se obtuvieron de 4 sujetos sanos de entre 20 a 30 años sin antecedente personales patológicos y PPD negativos, fueron reclutados en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Tabla 1). Todos los procedimientos fueron revisados y aprobados por el comité de ética e investigación de nuestra institución con el número IN20-00002; los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. Para el aislamiento de neutrófilos seguimos el método descrito previamente por nuestro grupo de trabajo [65]. La pureza del aislamiento de neutrófilos se evaluó mediante tinción de Wright y la viabilidad con azul tripano.

Tabla 1. Características de los sujetos de estudio

Sujeto	Edad	Sexo	Peso (kg)	Altura (cm)	Nivel de actividad física	Antecedentes personales patológicos	PPD
1	26	M	76	178	Alto	Negados	Negativo
2	23	M	90	177	Moderado	Negados	Negativo
3	22	M	73	175	Moderado	Negados	Negativo
4	30	M	85	168	Bajo	Negados	Negativo

Determinación de HIF-1 α por Western Blot

Para la determinación de HIF-1 α , se incubaron 7×10^5 neutrófilos en placas de 12 pozos en diferentes condiciones por triplicado. En una primera condición se incubaron los neutrófilos en PBSG como control negativo y en una segunda condición se incubaron los neutrófilos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas extracelulares de *Mtb H37Rv* en normoxia durante 5 horas. Para verificar que las condiciones experimentales no inducían muerte celular, se realizó una curva de viabilidad celular utilizando azul tripano, con la concentración de proteínas extracelulares de *Mtb H37Rv* antes mencionada.

Las condiciones de hipoxia (oxígeno al 1%) se obtuvieron en una cámara de hipoxia diseñada por nuestro grupo de trabajo (Figura 1). Para evaluar que se alcanzara el 1% de oxígeno dentro de la cámara, utilizamos el sensor de oxígeno (Cat. AT8100, Smart Sensor) (Figura 1). Una vez establecidas estas condiciones se incubaron los neutrófilos en PBSG sin estímulo como control negativo y estimulados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas extracelulares de *Mtb H37Rv* en normoxia durante 5 horas a 37°C. Después de la

incubación por 5 horas a 37 °C, los neutrófilos se lisaron con 50 µl de buffer Laemmli 1x (Cat. S3401, Sigma-Aldrich) con una concentración final de CoCl₂ 100 µM. El lisado celular se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida Bolt Bis-Tris Plus al 4-12 % de 15 pocillos y 1 mm de espesor (Cat. NW04125BOX, Thermo Fisher Scientific), se aplicó corriente eléctrica a 200 V y 160 mA durante 20 min en buffer de corrimiento Bolt MES SDS (Cat. B000202, Thermo Fisher Scientific). Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Cat. 77012, Thermo Fisher Scientific) a 10 V y 160 mA durante 1 hora usando el buffer de transferencia Bolt 1x (Cat. BT0006, Thermo Fisher Scientific) que contiene metanol al 10 %. Las membranas se bloquearon con BSA al 5% durante la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario para HIF-1 α (Cat. ab51608, abcam) usado a una dilución de 1:200 durante 2 horas, enseguida se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (Cat. ab205718, abcam) en una dilución de 1:5000 durante 2 horas. Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (ChemiDoc MP, Bio-Rad) siguiendo el protocolo del fabricante. Se usó un anticuerpo primario anti β -actina (Cat. ab20272, abcam) en una dilución de 1:2000 como control.



Figura 1. Foto representativa de la cámara de hipoxia y del sensor de oxígeno que se utilizó para corroborar las condiciones de hipoxia experimental. A la izquierda se observa el porcentaje de

oxígeno que se alcanza dentro del laboratorio que es de 19.4% y a la derecha se observa el porcentaje de oxígeno dentro de la cámara de hipoxia que es del 1%.

Producción de ROS

La producción de ROS se evaluó utilizando el método descrito por Mendoza-Aguilar, et.al., con algunas modificaciones [66]. Se incubaron 5×10^5 neutrófilos por triplicado en condiciones de normoxia e hipoxia con 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas *Mtb* en una placa de 96 pozos, los neutrófilos sin estímulo sirvieron como control negativo y los neutrófilos con PMA (100 nM) (Cat. P-1585, Sigma-Aldrich) sirvieron como control positivo de estallido respiratorio. Posteriormente, se añadió NBT (Cat. N6876, Sigma-Aldrich) al 0,1 % a todos los pocillos. La placa se incubó durante 5 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Una vez finalizada la incubación, se eliminó el sobrenadante y las monocapas celulares se resuspendieron en 200 μl de SDS al 5%. Finalmente, la placa se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche y se midió la absorbancia (A_{620 nm}) de las muestras utilizando un espectrofotómetro (Multiskan FC; Thermo Scientific, EE. UU.) al día siguiente.

Visualización de trampas extracelulares de neutrófilos

Para evaluar la presencia de NETs, seguimos un método descrito previamente por nuestro grupo de trabajo [67]. Brevemente, se agregaron 3×10^4 neutrófilos a un portaobjetos de vidrio que tenía un papel adherente (Polipap) obtenido de la papelería Lumen, el cual se recorta a un tamaño de 24 x 50 mm y se le hacen 3 orificios. Se evaluaron varias condiciones, en un portaobjetos se agregan los neutrófilos sin estímulo que sirven como control negativo de formación de trampas extracelulares, el segundo

portaobjetos contenía neutrófilos estimulados con 100 nM de PMA (Cat. P-1585, Sigma-Aldrich) como control positivo de formación de trampas extracelulares y el tercer portaobjetos contenía neutrófilos estimulados con 10 µg/ml de proteínas de *Mtb* H37Rv. Todos los portaobjetos se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 5 horas. Una vez completada la incubación, los neutrófilos se fijaron con formaldehído al 4 % y se tiñeron con safranina al 0,5 %. Se añadió solución al 60% de resina sintética en xileno como medio de montaje y los neutrófilos se visualizaron en un microscopio óptico a 40x y 100x con aceite de inmersión.

Determinación de IFN-γ por ELISA

Se incubaron 5 x 10⁵ neutrófilos por triplicado en condiciones de normoxia e hipoxia estimulados con y sin proteínas de *Mtb* H37Rv a una concentración de 10 µg/ml en una placa de 96 pozos. La placa se incubó durante 5 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Una vez finalizada la incubación, se retiró el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se utilizó un kit de ELISA para IFN-γ humano (Cat. RAB0222; Sigma-Aldrich).

PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR)

Se incubaron 5 x 10⁵ neutrófilos por triplicado en condiciones de normoxia e hipoxia estimulados con y sin proteínas de *Mtb* H37Rv a una concentración de 10 µg/ml en una placa de 96 pozos. La placa se incubó durante 5 horas a 37 °C con 5% de CO₂. El ARN total se extrajo con el RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADNc se generó utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) y se ejecutó en un termociclador PTC-200 (MJ

Research). El ADNc se amplificó en un volumen final de 20 μ L que contenía 100 ng de ADNc, 5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix y cebadores específicos a una concentración final de 300 nM. La desnaturalización inicial se realizó a 95°C por 3 min, la amplificación comprendió de 40 ciclos realizados de la siguiente manera: 95°C por 10s, seguido de 63°C por 30s (*GAPDH*), 56.5°C (*HIF-1 α*), 66°C (*VEGF*) y 61.2°C (*GLUT-1*) para finalizar con 72°C por 1 min. La extensión final se realizó a 72°C por 8 min. Los cebadores para qPCR que se utilizaron fueron de la casa comercial T4 oligo (Tabla 2). Los niveles de expresión de los genes HIF-1a, GLUT y VEGF se normalizaron por GAPDH. Se utilizó el método $\Delta\Delta$ Ct para la cuantificación de los niveles de expresión génica. Los ensayos con muestras de ARN se realizaron por triplicado.

Tabla 2. Secuencias forward y reverse de los cebadores utilizados y sus temperaturas de amplificación.

Gen	Forward	Reverse	Temperatura de amplificación
<i>HIF-1α</i>	5'- CAAGAACCTACTGCTAATGC-3'	5'- TTATGTATGTGGGTAGGAGATG-3'	56.5°C
<i>VEGF</i>	5'- TCCGGCCTTTAGTCTCAGGA-3'	5'- GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA-3'	66°C
<i>GLUT-1</i>	5'- TATGTGGAGCAACTGTGTGGT-3'	5'- TCCGGCCTTTAGTCTCAGGA-3'	61.2°C
<i>GAPDH</i>	5'- GACAGTCAGCCGCATCTTCT-3'	5'- AAATGAGCCCCAGCCTTCC-3'	63°C

La especificidad de las reacciones de PCR se verificó mediante el análisis de la curva de fusión de cada producto amplificado utilizando el software CFX Manager 3.1 de BioRad. Cada reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo por triplicado. La expresión génica relativa se calculó utilizando el valor del ciclo umbral objetivo (Ct) y el método $2^{-\Delta\Delta$ Ct [68].

Análisis estadístico

Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó ANOVA unidireccional con comparación múltiple de Tukey para comparar tres o más grupos y la prueba t de Student para comparar 2 grupos tomando como significativo un valor de $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism v7.0.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

Extracción de proteínas extracelulares de *Mtb*

Después de la precipitación y desalinización de las proteínas extracelulares de *Mtb*, realizamos un ensayo de Bradford para medir la concentración de proteínas en el cual se obtuvo 7.46 μ g/10 μ l y finalmente se almacenaron alícuotas a -20°C (Figura 2). Se utilizó SDS-PAGE para evaluar el patrón electroforético en el cual cuatro proteínas con pesos de 6, 38, 49 y 62 kDa fueron las más abundantes (Figura 3).

Proteínas Mtb	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Promedio - BL
Directa	1.16	1.121	1.201	1.16066667	0.900333333
1/2	1.005	1.007	1.018	1.01	0.749666667
1/4	0.855	0.844	0.884	0.861	0.600666667
1/8	0.723	0.718	0.682	0.70766667	0.447333333
Blanco	0.252	0.268	0.261	0.26033333	0

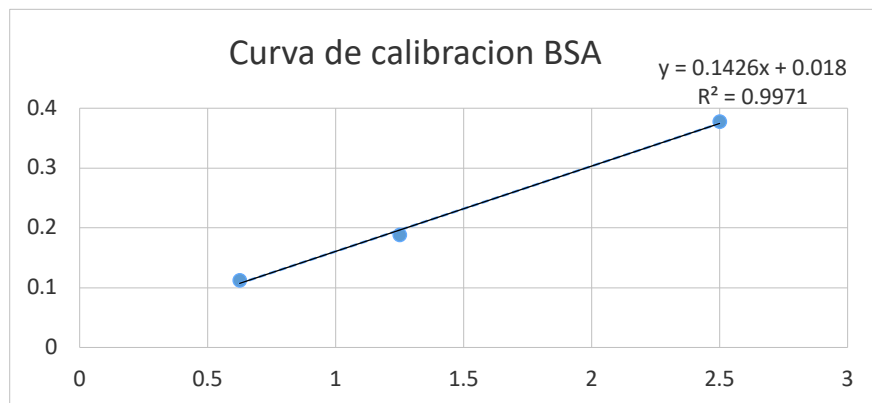


Figura 2. Lecturas del ensayo de Bradford de las proteínas extracelulares de *Mtb* y curva de calibración de albumina sérica bovina que se utilizo para calcular la concentración de proteínas extracelulares de *Mtb* utilizando las lecturas del ensayo de Bradford.

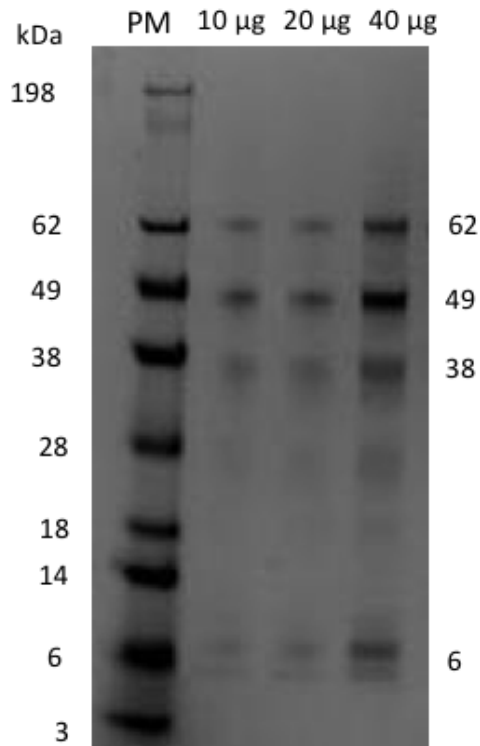


Figura 3. Imagen representativa de la separación electroforética por SDS-PAGE de las proteínas extracelulares de *Mtb* H37Rv precipitadas con sulfato de amonio al 80%. En la electroforesis se evaluaron diferentes concentraciones de proteínas (10, 20 y 40µg), se observa que las 4 proteínas mas abundantes fueron las de 62, 49, 38 y 6 kDa.

Viabilidad celular

La concentración de 100 µM de CoCl₂ y la concentración de 10 µg/ml de p*Mtb* tuvieron una reducción del 30% en la viabilidad celular después de 5 horas de incubación, lo cual es considerado como una citotoxicidad leve ya que se encuentra dentro del 80 al

60% de viabilidad celular [69] (Figura 4). Se utilizó la concentración de 10 µg/ml de p*Mtb* en base a un estudio donde se reportó que esta concentración de proteínas no era citotóxica y promovía la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos [70].

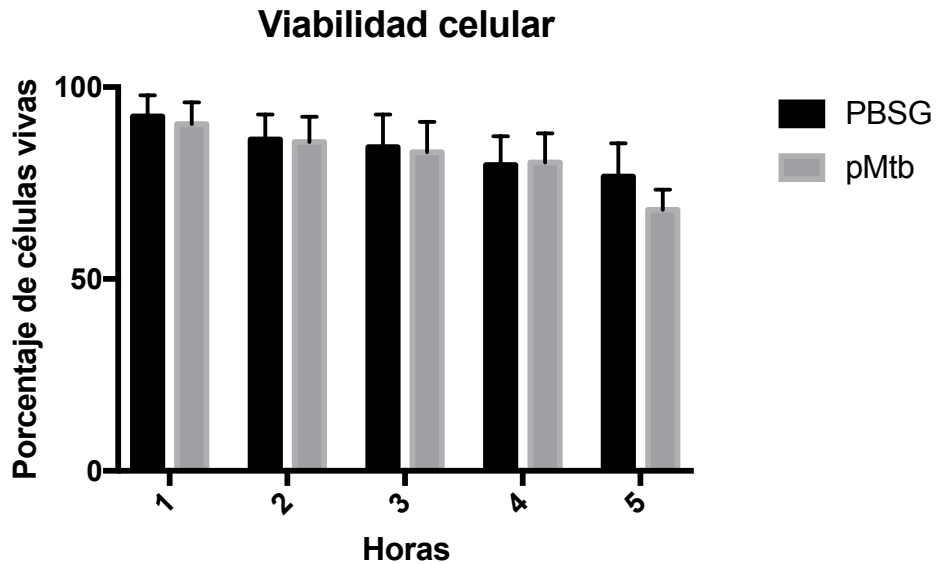


Figura 4. Viabilidad celular de los neutrófilos después de 5 horas de incubación con PBSG o 10 µg/ml de p*Mtb*. Los datos representan la media ± desviación estándar (n = 4). No hay diferencia estadística entre los grupos, calculada con la prueba ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Sidak.

Western blot de HIF-1 α

La estabilización de HIF-1 α estuvo presente en neutrófilos incubados en condiciones de normoxia con CoCl₂ o proteínas extracelulares de *Mtb* H37Rv. En neutrófilos incubados en PBSG no se detectó la estabilización de HIF-1 α . En condiciones de hipoxia, la estabilización de HIF-1 α estuvo presente en los neutrófilos y cuando se incubaron con p*Mtb*, la concentración de HIF-1 α fue mayor en comparación con la incubación con p*Mtb* en normoxia (P<0.0001) (Figura 5).

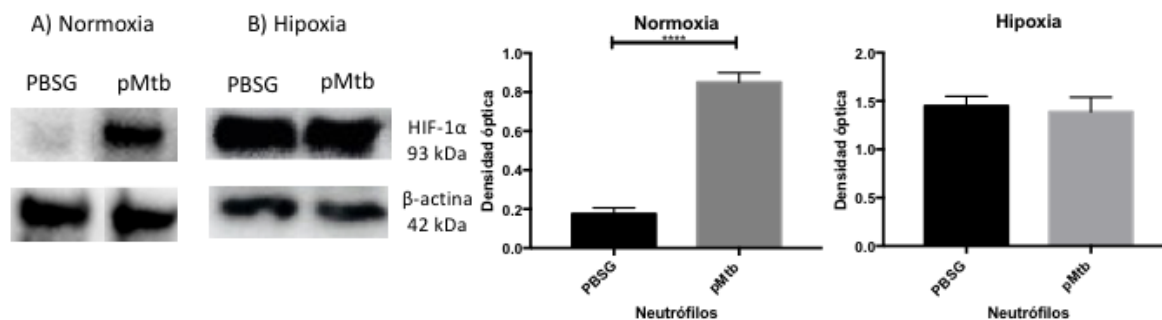


Figura 5. Las proteínas extracelulares de *Mtb H37Rv* estabilizan HIF-1 α en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia. A) En normoxia, la expresión de HIF-1 α estuvo ausente en los neutrófilos incubados en PBSG. La expresión de HIF-1 α estuvo presente en los neutrófilos incubados con pMtb (10 μ g/ml). B) En hipoxia, la expresión de HIF-1 α estuvo presente en los neutrófilos incubados en PBSG o con pMtb (10 μ g/ml) en mayor cantidad que en normoxia. La grafica representa la densitometría del western blot evaluada mediante ImageJ. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n = 4). Los asteriscos indican la significancia estadística calculada con la prueba ANOVA con comparación múltiple de Tukey y la prueba t de Student. *P < 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

Producción de ROS

La producción de ROS aumentó en los neutrófilos incubados con las pMtb con un resultado similar a la estimulación con PMA. Los neutrófilos incubados en hipoxia y estimulados con PMA tuvieron una mayor producción de ROS que cuando se incubaron en normoxia (P < 0,05). Se obtuvo un resultado similar con las pMtb, donde la producción de ROS en hipoxia aumentó en comparación con la normoxia, aunque no hubo diferencia estadística (Figura 6).

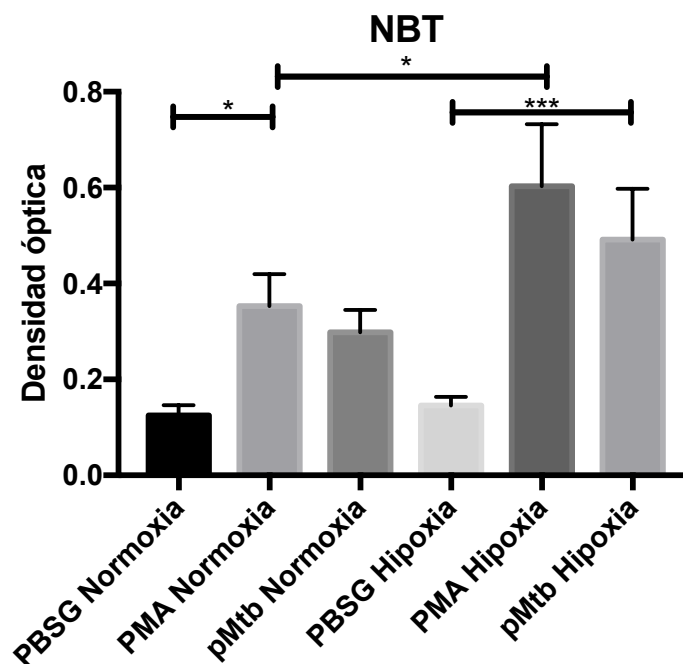


Figura 6. Las proteínas extracelulares de *Mtb* H37Rv aumentaron la producción del estallido respiratorio en neutrófilos humanos. La producción del estallido respiratorio se evaluó mediante NBT en placa, se incubaron 3×10^5 neutrófilos durante 5 horas en condiciones de normoxia e hipoxia con PBSG, estimulados con PMA a una concentración de 100 nM como control positivo y con pMtb (10 $\mu\text{g/ml}$). Los datos representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$). Los asteriscos indican la significancia estadística calculada con la prueba ANOVA con comparación múltiple de Tukey. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Formación de trampas extracelulares de neutrófilos

La formación de NETs estuvo presente en los neutrófilos incubados con las pMtb en normoxia (Figura 7). En un ambiente de hipoxia, la formación de NETs fue mayor en los neutrófilos incubados con las pMtb, en comparación con un ambiente de normoxia ($P < 0,0001$) (Figura 8 y 9).

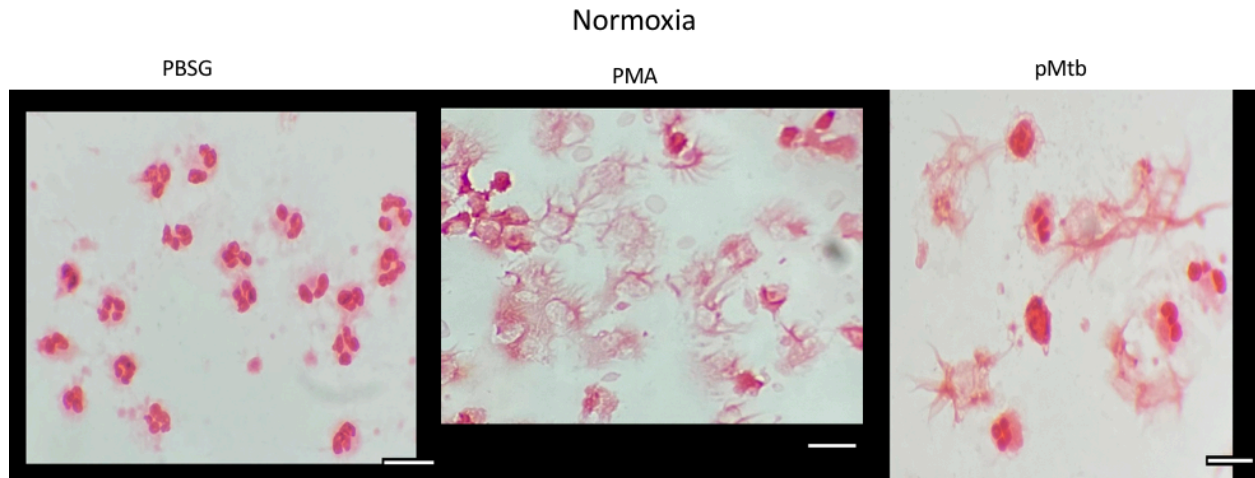


Figura 7. Las proteínas extracelulares de *Mtb* incrementan la formación de trampas extracelulares en neutrófilos humanos incubados en normoxia. Se evaluó mediante microscopia óptica la formación de trampas extracelulares utilizando una tinción de safranina. 3×10^4 neutrófilos fueron incubados durante 5 horas en condiciones de normoxia a 37°C , llevando a cabo una incubación con PBSG, una incubación con PMA (100 nM) y una incubación con pMtb (10 $\mu\text{g/ml}$). Las pMtb estimularon la formación de trampas extracelulares. La observación microscópica se llevo a cabo con un objetivo de 400x. Barras de escala = 10 μm . Conteo de 5 campos por triplicado.

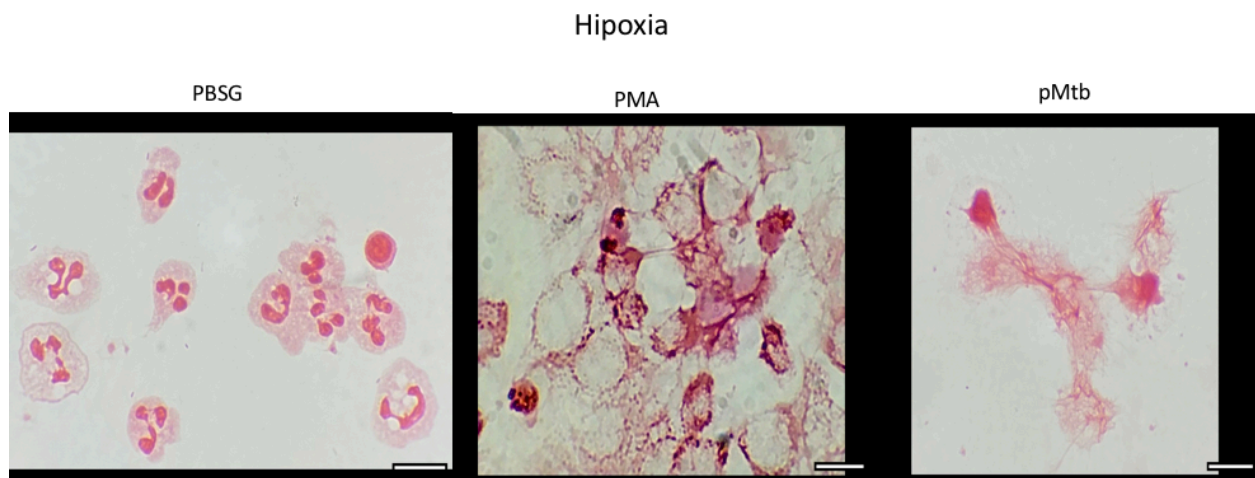


Figura 8. Las proteínas extracelulares de *Mtb* incrementan la formación de trampas extracelulares en neutrófilos humanos incubados en hipoxia. Se evaluó mediante microscopia óptica la formación de trampas extracelulares utilizando una tinción de safranina. 3×10^4 neutrófilos fueron incubados durante

5 horas en condiciones de hipoxia a 37°C, llevando a cabo una incubación con PBSG, una incubación con PMA (100 nM) y una incubación con p*Mtb* (10 µg/ml). Las p*Mtb* estimularon la formación de trampas extracelulares en hipoxia. La observación microscópica se llevo a cabo con un objetivo de 400x. Barras de escala = 10 µm. Conteo de 5 campos por triplicado.

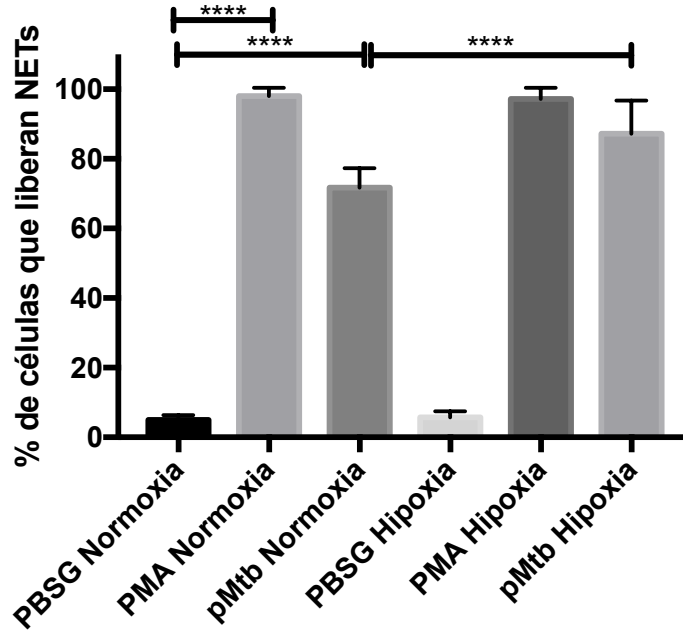


Figura 9. Las proteínas extracelulares de *Mtb* incrementan la formación de trampas extracelulares en neutrófilos humanos incubado en normoxia e hipoxia. Se evaluó mediante microscopia óptica la formación de trampas extracelulares utilizando una tinción de safranina. 3×10^4 neutrófilos fueron incubados durante 5 horas, tanto en normoxia como en hipoxia a 37°C, llevando a cabo una incubación con PBSG, una incubación con PMA (100 nM) y una incubación con p*Mtb* (10 µg/ml). Las p*Mtb* estimularon la formación de trampas extracelulares en normoxia y aún más en hipoxia. Los datos representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$). Los asteriscos indican la significancia estadística calculada con la prueba ANOVA con comparación múltiple de Tukey, **** $P < 0.0001$.

ELISA de IFN- γ

La producción de IFN- γ en los neutrófilos fue mayor en hipoxia en comparación con normoxia ($P < 0,01$). Los neutrófilos incubados en hipoxia y estimulados con las pMtb tuvieron una mayor producción de IFN- γ en comparación con los neutrófilos que solo estuvieron en el ambiente de hipoxia sin ser estimulados con las pMtb ($P < 0,0001$) (Figura 10).

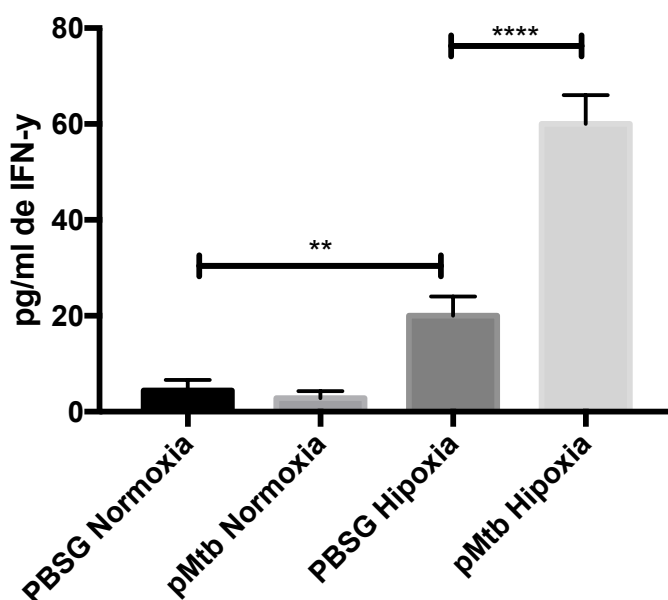


Figura 10. Las proteínas extracelulares de *Mtb* en conjunto con un ambiente de hipoxia incrementan la producción de IFN- γ en neutrófilos humanos. La producción de IFN- γ se evaluó mediante el método de ELISA. Los neutrófilos a una concentración de 3×10^5 se incubaron durante 5 horas en normoxia e hipoxia, sin estímulo (control) y con pMtb (10 $\mu\text{g/ml}$). Los datos representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$). Los asteriscos indican la significancia estadística calculada con la prueba ANOVA con comparación múltiple de Tukey, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR)

La expresión génica de HIF-1 α y VEGF aumento en neutrófilos incubados en hipoxia en comparación con los fueron incubados en normoxia (P <0,0001) (Tabla 3 y 4) (Figura 11). Los neutrófilos incubados en hipoxia y estimulados con p*Mtb* tuvieron una mayor expresión de HIF-1 α y VEGF en comparación con los neutrófilos incubados en hipoxia sin las p*Mtb* (control) (P <0,0001) (Tabla 5 y 6)(Figura 12). No se observó diferencia significativa en la expresión de GLUT1, independientemente si los neutrófilos estuvieron en un ambiente de normoxia o hipoxia, y si fueron estimulados o no con las p*Mtb* (Tabla 7 y 8) (Figura 12).

Tabla 3. Cálculo de la expresión génica relativa de HIF-1 α en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Se consideró significancia estadística ante un valor P <0.05.

Sample	GOI Ct1	GOI Ct2	GOI Average Ct	HKG Ct1	HKG Ct2	HKG Average Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Control 1	30.5	30.46	30.48	31.35	31.32	31.34	-0.86	-0.10	1.07
Control 2	30.86	30.77	30.815	31.07	31.09	31.08	-0.27	0.49	0.71
Control 3	31.1	31.14	31.12	32.28	32.23	32.26	-1.13	-0.38	1.30
Treated 1	28.13	28.19	28.16	30.80	30.87	30.84	-2.68	-1.92	3.79
Treated 2	28.24	28.2	28.22	31.10	31.13	31.12	-2.90	-2.14	4.42
Treated 3	28.26	28.21	28.235	31.87	31.85	31.86	-3.63	-2.87	7.33

Tabla 4. Cálculo de la expresión génica relativa de HIF-1 α en neutrófilos humanos estimulados con las p*Mtb* e incubados en condiciones de normoxia e hipoxia mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Se consideró significancia estadística ante un valor P <0.05.

Sample	GOI Ct1	GOI Ct2	GOI Average Ct	HKG Ct1	HKG Ct2	HKG Average Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Control 1	30.5	30.47	30.485	31.35	31.33	31.34	-0.86	-0.78	1.72
Control 2	30.86	30.83	30.845	30.07	30.1	30.09	0.76	0.83	0.56
Control 3	31.1	31.18	31.14	31.28	31.25	31.27	-0.13	-0.05	1.04
Treated 1	28.13	28.18	28.155	30.08	30.04	30.06	-1.91	-1.83	3.56
Treated 2	28.24	28.27	28.255	31.10	31.14	31.12	-2.87	-2.79	6.92
Treated 3	28.26	28.3	28.28	30.87	30.84	30.86	-2.58	-2.50	5.66

Tabla 5. Cálculo de la expresión génica relativa de VEGF en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Se consideró significancia estadística ante un valor $P < 0.05$.

Sample	GOI Ct1	GOI Ct2	GOI Average Ct	HKG Ct1	HKG Ct2	HKG Average Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Control 1	35.91	35.84	35.875	32.3	32.37	32.34	3.54	-0.49	1.40
Control 2	34.45	34.38	34.415	30.07	30.03	30.05	4.37	0.34	0.79
Control 3	35.43	35.47	35.45	31.28	31.25	31.27	4.19	0.15	0.90
Treated 1	31.64	31.69	31.665	30.68	30.73	30.71	0.96	-3.07	8.40
Treated 2	32.34	32.32	32.33	31.00	31.06	31.03	1.30	-2.73	6.63
Treated 3	31.43	31.47	31.45	30.87	30.84	30.86	0.59	-3.44	10.82

Tabla 6. Cálculo de la expresión génica relativa de VEGF en neutrófilos humanos estimulados con las pMtb e incubados en condiciones de normoxia e hipoxia mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Se consideró significancia estadística ante un valor $P < 0.05$.

Sample	GOI Ct1	GOI Ct2	GOI Average Ct	HKG Ct1	HKG Ct2	HKG Average Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Control 1	35.91	35.84	35.875	31.35	31.37	31.36	4.52	0.17	0.89
Control 2	34.45	34.47	34.46	30.07	30.12	30.10	4.37	0.02	0.99
Control 3	35.43	35.41	35.42	31.28	31.25	31.27	4.16	-0.19	1.14
Treated 1	31.64	31.66	31.65	30.68	30.63	30.66	0.99	-3.35	10.20
Treated 2	32.34	32.38	32.36	32.40	32.43	32.42	-0.05	-4.40	21.11
Treated 3	31.43	31.37	31.4	30.87	30.84	30.86	0.54	-3.80	13.93

Tabla 7. Cálculo de la expresión génica relativa de GLUT-1 en neutrófilos humanos incubados en condiciones de normoxia e hipoxia mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Se consideró significancia estadística ante un valor $P < 0.05$.

Sample	GOI Ct1	GOI Ct2	GOI Average Ct	HKG Ct1	HKG Ct2	HKG Average Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Control 1	31.5	31.5	31.5	32.10	32.05	32.08	-0.58	-0.89	1.85
Control 2	34.16	34.22	34.19	32.34	32.38	32.36	1.83	1.52	0.35
Control 3	32.25	32.27	32.26	32.56	32.58	32.57	-0.31	-0.62	1.54
Treated 1	31.45	31.47	31.46	31.07	31.04	31.06	0.41	0.09	0.94
Treated 2	32.87	32.89	32.88	32.41	32.38	32.40	0.48	0.17	0.89
Treated 3	33.13	33.18	33.155	32.29	32.34	32.32	0.84	0.53	0.69

Tabla 8. Cálculo de la expresión génica relativa de GLUT-1 en neutrófilos humanos estimulados con las pMtb e incubados en condiciones de normoxia e hipoxia mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se consideró significancia estadística ante un valor $P < 0.05$.

Sample	GOI Ct1	GOI Ct2	GOI Average Ct	HKG Ct1	HKG Ct2	HKG Average Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Control 1	31.87	31.85	31.86	31.95	31.92	31.94	-0.08	-0.03	1.02
Control 2	30.84	30.78	30.81	31.57	31.54	31.56	-0.74	-0.70	1.63
Control 3	33	33	33	32.28	32.33	32.31	0.70	0.74	0.60
Treated 1	31.17	31.22	31.195	31.08	31.03	31.06	0.14	0.18	0.88
Treated 2	30.87	30.84	30.855	31.40	31.33	31.37	-0.51	-0.47	1.38
Treated 3	31.45	31.48	31.465	31.87	31.83	31.85	-0.39	-0.34	1.27

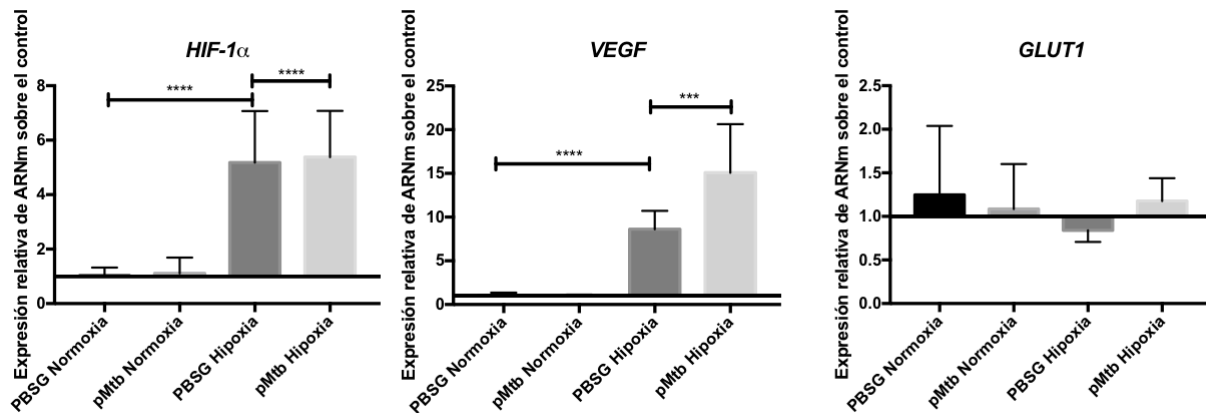


Figura 11. Las pMtb en conjunto con un ambiente de hipoxia incrementaron tanto la expresión de HIF-1 α como de VEGF en neutrófilos humanos. La expresión de HIF-1 α y sus genes blanco (VEGF y GLUT1) fue evaluada mediante qRT-PCR, en los cuales una concentración de 3×10^5 neutrófilos se incubaron durante 5 horas en normoxia y en condiciones de hipoxia con y sin pMtb (10 $\mu\text{g/ml}$). Los datos representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$). Los asteriscos indican la significancia estadística calculada con la prueba ANOVA con comparación múltiple de Tukey, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los neutrófilos participan en el control de infecciones agudas por varios mecanismos por medio de los cuales inducen la actividad microbicida para poder eliminarlo [71–73]. En los procesos infecciosos crónicos principalmente por microorganismos intracelulares como lo es *Mtb*, ya se ha descrito que el neutrófilo juega un papel importante la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar [5,44,45], La célula fagocítica más abundante en el granuloma necrótico es el neutrófilo, y la presencia de ESAT-6 en el granuloma ocasiona un proceso de necrosis y de liberación de trampas extracelulares en el neutrófilo [17]. A pesar de todo lo anteriormente descrito, poco se ha evaluado como las proteínas de secreción temprana de *Mtb* regulan, a través de la estabilización de HIF-1 α los mecanismo microbicidas de los neutrófilos.

Las funciones microbicidas más importantes para los neutrófilos en la eliminación de microorganismos extracelulares e intracelulares son la fagocitosis, la desgranulación, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) [71]. La presencia de la proteína HIF-1 α ha sido involucrada en las funciones microbicidas de las células fagocíticas [74–82]. Se ha demostrado que las proteínas de secreción temprana de *Mtb* (Ej. ESAT-6, CFP-10) modulan la función microbicida de macrófagos [20,83,84]. Para correlacionar la función de HIF-1 α sobre las funciones microbicidas de los neutrófilos estimulados con proteínas extracelulares de *Mtb* en estado de normoxia e hipoxia planteamos el estudio: efecto de

las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* sobre la estabilización de HIF-1 α en neutrófilos incubados en normoxia e hipoxia.

Se han documentado diferentes métodos para extraer proteínas extracelulares de *Mtb*, en los cuales se varia el método de extracción y la cepa de *Mtb* empleada [85,86]. Khosrobeygi et al. empleó un enfoque de extracción bastante similar al nuestro en 2021, solo varió en la cepa de *Mtb* utilizada (*Mtb* cepa C, ATCC 35808) y la concentración de sulfato de amonio al 20% [86]. Las bandas mas abundantes que encontraron fueron proteínas que oscilaban entre 14 y 41 kDa. Nosotros utilizamos una concentración de sulfato de amonio al 80% debido a que las proteínas de bajo peso molecular requieren una concentración mayor de sulfato de amonio para poder precipitarlas [87]. Esto genero que las bandas mas abundantes que nosotros encontramos fueran proteínas que oscilaban entre 6 y 62 kDa.

Los neutrófilos incubados con las *pMtb* en normoxia, indujeron un incremento en la estabilización de HIF-1 α ; por lo cual, decidimos ver el efecto de estas *pMtb* en un ambiente de hipoxia, ya que este ambiente de hipoxia esta presente en el granuloma de pacientes con tuberculosis pulmonar [49]. Nosotros observamos en estudios in vitro que en el ambiente de hipoxia se obtuvo una mayor concentración de HIF-1 α en los neutrófilos estimulados con *pMtb* en comparación con los neutrófilos incubados en normoxia estimulados con *pMtb*. Se ha reportado en humanos que la presencia de HIF-1 α en los neutrófilos promueve la secreción de metaloproteinasas y de elastasa que destruyen la matriz extracelular lo cual afecta el tejido pulmonar [88]. La estabilización de HIF-1 α aumenta la actividad microbicida en los macrófagos [63,89]. Lo que puede indicar que, ante la presencia de las *pMtb* y el ambiente de hipoxia, los neutrófilos

estarían activados y listos para eliminar a la micobacteria. Este efecto benéfico está enfocado en las etapas tempranas de la enfermedad, ya que en etapas tardías, la presencia de HIF-1 α disminuye la apoptosis y esto genera que la micobacteria pueda tener más tiempo para multiplicarse dentro de la célula, aumentando así la carga bacilar [25].

La producción de ROS se vio incrementada en los neutrófilos incubados en hipoxia y que fueron estimulados con PMA o con p*Mtb*, en comparación con los neutrófilos incubados en normoxia. Este incremento de ROS se ha asociado a que en un ambiente de hipoxia, las mitocondrias aumentan la producción de mROS (Especies reactivas de oxígeno mitocondriales) y esto a su vez estabiliza HIF-1 α [90,91].

Se ha reportado que la formación de NETs, en el caso de *Mtb*, no tienen función microbicida, sin embargo, artículos recientes mencionan que las NETs pudieran estar asociadas a la aparición de enfermedades autoinmunes [92,93], incluso al desarrollo de cáncer [94]. Esto debido al estado inflamatorio crónico ocasionado por la presencia de las NETs lo cual activa a los macrófagos y células cercanas al sitio donde se formaron las NETs [95]. Desde el 2009, Ramos-Kichick, et.al., demostraron en un estudio in vitro con neutrófilos de sujetos sanos, que *M. tuberculosis* H37Rv y *M. canettii* 9600046 inducían cambios nucleares como picnosis y decondensación de la cromatina que conducían a la formación de NETs de forma dependiente del tiempo, lo que provocaba la muerte de los neutrófilos infectados. La liberación de NETs capturaba a las micobacterias pero no las eliminaba [32]. En 2021 Rojas-Espinosa, et.al., estudió de manera in vitro y utilizando neutrófilos de sujetos sanos, el efecto de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 de *Mtb* y descubrió que ambas proteínas eran capaces de inducir cambios

nucleares como picnosis y decondensación de la cromatina en los neutrófilos. ESAT-6 indujo mayores cambios nucleares en comparación con CFP-10 [33]. Las proteínas extracelulares de *Mtb* con las que trabajamos en este proyecto, indujeron cambios nucleares en los neutrófilos similares a los encontrados por Rojas-Espinosa, et.al. en 2021. Se ha descrito que *Mtb* aumenta la producción de ROS [96], y la producción de ROS esta asociada a la liberación de NETs [97–100], por lo que esto pudiera explicar por que se generaron los cambios nucleares en los neutrófilos que evaluamos en nuestro estudio. En estudios posteriores se valorará si las proteínas extracelulares (6, 38, 49 y 62 kDa) por separado también serian capaces de inducir cambios nucleares en los neutrófilos mediante el aumento en la producción de ROS.

El IFN- γ producido principalmente por los linfocitos Th1, activa a los macrófagos promoviendo un aumento en la producción de TNF- α [7,38,39]. El TNF- α contribuye al mantenimiento del granuloma, lo que ayuda a contener el patógeno [7,39,40], mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que promueven la destrucción intracelular del patógeno [41–43]. Nosotros encontramos que los neutrófilos aumentan la producción de IFN- γ en un ambiente de hipoxia. La producción IFN- γ se ve aun mas incrementada en los neutrófilos incubados en hipoxia que fueron estimulados con *pMtb*. El IFN- γ producido por los neutrófilos pudiera estar regulando la actividad microbicida de los macrófagos presentes en el granuloma, disminuyendo la carga bacilar [7,35,36]. Otro papel importante del IFN- γ en el granuloma seria la regulación en el reclutamiento de los neutrófilos, ya que previene una acumulación excesiva de los neutrófilos que pudiera afectar al huésped; esto establece un papel antiinflamatorio de IFN- γ en la protección del huésped contra *Mtb* [101].

Para comprobar que el aumento en la expresión génica de HIF-1 α mediante las *pMtb*, tuviera un impacto en la señalización de genes blanco de HIF-1 α , decidimos evaluar la expresión génica de VEGF y GLUT-1, los cuales son genes blanco de HIF-1 α [102,103]. Se observó que ante el estímulo de *pMtb* en un ambiente de hipoxia, VEGF tuvo una mayor expresión génica en comparación con los neutrófilos que solo estaban incubados en hipoxia sin el estímulo de las *pMtb*. Esto es relevante ya que VEGF está involucrado en la respuesta inflamatoria de las células mieloides en un ambiente de hipoxia [76,103]. Se ha reportado también que en la infección por *Mtb* existe un aumento en la expresión de VEGF [58] y que este juega un papel importante en la patofisiología de la enfermedad [62].

En cuanto a GLUT-1, nosotros no encontramos diferencia en su expresión génica en los neutrófilos, independientemente que estuvieran en un ambiente de hipoxia y/o estimulados con *pMtb*. En estudios previos se ha reportado que ESAT-6 promueve un aumento en la entrada de glucosa a la célula mediante GLUT-1 en un ambiente de normoxia [104]. Se ha reportado también que la hipoxia promueve el aumento en la expresión de GLUT-1 en células endoteliales y células tumorales [102,105]. Por lo que sería importante, seguir explorando que papel tiene GLUT-1 en los neutrófilos que se enfrentan a un ambiente hipóxico e inflamatorio.

Es importante recordar que los pocos estudios que se han realizado sobre los efectos de la hipoxia en la función de los neutrófilos han arrojado resultados contradictorios. Esto puede deberse a importantes diferencias metodológicas, como el grado de hipoxia logrado en los medios de cultivo celular, la reoxigenación celular durante el experimento,

el uso de agentes miméticos de la hipoxia como el cloruro de cobalto o la manipulación genética de las vías de señalización de HIF-1 α en lugar de la hipoxia con gas [106]. En conclusión, la estabilización de HIF-1 α en los neutrófilos con las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* potencio la activación de los neutrófilos mejorando sus funciones microbicidas.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIÓN

La estabilización de HIF-1 α en los neutrófilos con las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* potencio la activación de los neutrófilos mejorando sus funciones microbicidas.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

- Determinar si las p*Mtb* de 6, 38, 49 y 62 kDa por separado tendrán el mismo efecto sobre los neutrófilos.
- Repetir los experimentos en macrófagos de sujetos sanos o en la línea celular THP-1 para confirmar que estas células al ser infectadas por *Mtb*, también incrementan su capacidad microbicida ante la presencia de las proteínas HIF-1 α .
- Evaluar la expresión de otros genes blanco de HIF-1 α que pudieran mejorar o disminuir las funciones microbicidas de las células infectadas.
- Evaluar si los neutrófilos activan a los linfocitos TH1 para la producción de IFN- γ en un ambiente de hipoxia, que a su vez incremente la capacidad microbicida de los macrófagos.
- Estudiar biopsias de pulmón obtenidas de pacientes con tuberculosis pulmonar para determinar mediante inmunohistoquímica la presencia de HIF-1 α y los mecanismos microbicidas que en nuestro estudio in vitro se incrementaron en condiciones de hipoxia.
- Evaluar el efecto de la modulación de HIF-1 α en ratones con tuberculosis pulmonar.
- Evaluar el efecto de la modulación de HIF-1 α en pacientes con tuberculosis pulmonar.

CAPÍTULO 11

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization. Annual Report of Tuberculosis. vol. 4. 2022.
- [2] Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Parkhill J, et al. Mycobacterium tuberculosis with modern humans. *Nat Genet* 2014;45:1176–82.
<https://doi.org/10.1038/ng.2744>.Out-of-Africa.
- [3] Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2012;367:850–9. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0316>.
- [4] Leung AN. Pulmonary tuberculosis: The essentials. *Radiology* 1999;210:307–22.
<https://doi.org/10.1148/radiology.210.2.r99ja34307>.
- [5] Hilda JN, Das S, Tripathy SP, Hanna LE. Role of neutrophils in tuberculosis: A bird's eye view. *Innate Immun* 2020;26:240–7.
<https://doi.org/10.1177/1753425919881176>.
- [6] Winslow GM, Cooper A, Reiley W, Chatterjee M, Woodland DL. Early T-cell responses in tuberculosis immunity. *Immunol Rev* 2008;225:284–99.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00693.x>.
- [7] Cooper AM. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2009;27:393–422.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703>.Cell.
- [8] Schluger NW. The pathogenesis of tuberculosis: The first one hundred (and

- twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:251–6.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.F293>.
- [9] Bermudez LE, Goodman J. Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* 1996;64:1400–6.
<https://doi.org/10.1128/iai.64.4.1400-1406.1996>.
- [10] Tukiman MH, Norazmi MN. Immunometabolism of Immune Cells in Mucosal Environment Drives Effector Responses against Mycobacterium tuberculosis. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23158531>.
- [11] Shi L, Eugenin EA, Subbian S. Immunometabolism in tuberculosis. *Front Immunol* 2016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00150>.
- [12] Prosser G, Brandenburg J, Reiling N, Barry CE, Wilkinson RJ, Wilkinson KA. The bacillary and macrophage response to hypoxia in tuberculosis and the consequences for T cell antigen recognition. *Microbes Infect* 2017;19:177–92.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.001>.
- [13] Refai A, Gritli S, Barbouche MR, Essafi M. Mycobacterium tuberculosis virulent factor ESAT-6 drives macrophage differentiation toward the pro-inflammatory M1 phenotype and subsequently switches it to the anti-inflammatory M2 phenotype. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00327>.
- [14] Behura A, Mishra A, Chugh S, Mawatwal S, Kumar A, Manna D, et al. ESAT-6 modulates Calcimycin-induced autophagy through microRNA-30a in mycobacteria infected macrophages. *J Infect* 2019;79:139–52.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.06.001>.
- [15] Arce Mendoza A, Arellano Rangel G, Revol A, Rendón A, Salinas MC, Rosas

- Taraco AG. Citocinas en el lavado broncoalveolar de pacientes con tuberculosis. *Med Univ* 2004;6:88–95.
- [16] Alcantara CA, Glassman I, Nguyen KH, Parthasarathy A, Venketaraman V. Neutrophils in *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccines* 2023;11:1–11. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030631>.
- [17] Francis RJ, Butler RE, Stewart GR. *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 is a leukocidin causing Ca²⁺ influx, necrosis and neutrophil extracellular trap formation. *Cell Death Dis* 2014;5:e1474-7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.394>.
- [18] Tiwari S, Casey R, Goulding CW, Hingley-Wilson S, Jacobs, Jr. WR. Infect and Inject: How *Mycobacterium tuberculosis* Exploits Its Major Virulence-Associated Type VII Secretion System, ESX-1. *Microbiol Spectr* 2019;7:1–23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bai-0024-2019>.
- [19] Gröschel MI, Sayes F, Simeone R, Majlessi L, Brosch R. ESX secretion systems: *Mycobacterial* evolution to counter host immunity. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:677–91. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.131>.
- [20] Wong KW. The role of ESX-1 in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Tuberc Tuberc Bacillus Second Ed* 2017:627–34. <https://doi.org/10.1128/9781555819569.ch29>.
- [21] Tucci P, Portela M, Chetto CR, González-Sapienza G, Marín M. Integrative proteomic and glycoproteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *PLoS One* 2020;15:1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221837>.
- [22] Pal R, Bisht MK, Mukhopadhyay S. Secretory proteins of *Mycobacterium tuberculosis* and their roles in modulation of host immune responses: focus on

- therapeutic targets. *FEBS J* 2022;289:4146–71.
<https://doi.org/10.1111/febs.16369>.
- [23] Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9630–5.
<https://doi.org/10.1073/pnas.181341498>.
- [24] Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J Biol Chem* 2003;278:15911–6.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M300463200>.
- [25] Baay-Guzman GJ, Duran-Padilla MA, Rangel-Santiago J, Tirado-Rodriguez B, Antonio-Andres G, Barrios-Payan J, et al. Dual role of hypoxia-inducible factor 1 α in experimental pulmonary tuberculosis: Its implication as a new therapeutic target. *Future Microbiol* 2018;13:785–98. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0168>.
- [26] Schild Y, Mohamed A, Wootton EJ, Lewis A, Elks PM. Hif-1 α stabilisation is protective against infection in zebrafish comorbid models. *FEBS J* 2020;287:3925–43. <https://doi.org/10.1111/febs.15433>.
- [27] Elks PM, Van Eeden FJ, Dixon G, Wang X, Reyes-Aldasoro CC, Ingham PW, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α (hif-1 α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood* 2011;118:712–22. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324186>.
- [28] Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, et al. Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against

- Intracellular Pathogens. *J Immunol* 2006;177:1864–71.
- [29] Hahn I, Klaus A, Janze AK, Steinwede K, Ding N, Bohling J, et al. Cathepsin G and neutrophil elastase play critical and nonredundant roles in lung-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun* 2011;79:4893–901. <https://doi.org/10.1128/IAI.05593-11>.
- [30] Filio-Rodríguez G, Estrada-García I, Arce-Paredes P, Moreno-Altamirano MM, Islas-Trujillo S, Ponce-Regalado MD, et al. In vivo induction of neutrophil extracellular traps by *Mycobacterium tuberculosis* in a Guinea pig model. *Innate Immun* 2017;23:625–37. <https://doi.org/10.1177/1753425917732406>.
- [31] Nancy Hilda J, Das S. Neutrophil CD64, TLR2 and TLR4 expression increases but phagocytic potential decreases during tuberculosis. *Tuberculosis* 2018;111:135–42. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.06.010>.
- [32] Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.09.009>.
- [33] Rojas-Espinosa O, Rivero-Silva MA, Hernández-Solís A, Arce-Paredes P, Arce-Mendoza AY, Islas-Trujillo S. Sera from Patients with Tuberculosis Increase the Phagocytic-Microbicidal Activity of Human Neutrophils, and ESAT-6 is Implicated in the Phenomenon. *Int J Mycobacteriology* 2021;10:271–8. <https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy>.
- [34] Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-distrupted mice. *JExpMed*

1993;178:2243–7.

- [35] Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 1997;186:39–45. <https://doi.org/10.1084/jem.186.1.39>.
- [36] Flynn JAL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon γ in resistance to mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 1993;178:2249–54. <https://doi.org/10.1084/jem.178.6.2249>.
- [37] Flynn JAL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 1995;2:561–72. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90001-2](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90001-2).
- [38] Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol* 2011;4:252–60. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.13>.
- [39] O’Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The immune response in tuberculosis. vol. 31. 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>.
- [40] Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2012;12:352–66. <https://doi.org/10.1038/nri3211>.
- [41] Zahrt TC, Deretic V. Reactive Nitrogen and Oxygen Intermediates and Bacterial Defenses: Unusual Adaptations in Mycobacterium tuberculosis. *Antioxidants Redox Signal* 2002;4:141–59.
- [42] Voskuil MI, Bartek IL, Visconti K, Schoolnik GK. The response of Mycobacterium

- tuberculosis to reactive oxygen and nitrogen species. *Front Microbiol* 2011;2:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00105>.
- [43] Yang C-S, Yuk J-M, Jo E-K. The Role of Nitric Oxide in Mycobacterial Infections. *Immune Netw* 2009;9:46. <https://doi.org/10.4110/in.2009.9.2.46>.
- [44] Pagán AJ, Ramakrishnan L. Immunity and immunopathology in the tuberculous granuloma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5:1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018499>.
- [45] Borkute RR, Woelke S, Pei G, Dorhoi A. Neutrophils in tuberculosis: Cell biology, cellular networking and multitasking in host defense. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22094801>.
- [46] Nwongbouwoh Muefong C, Owolabi O, Donkor S, Charalambous S, Bakuli A, Rachow A, et al. Neutrophils Contribute to Severity of Tuberculosis Pathology and Recovery From Lung Damage Pre- and Posttreatment. *Clin Infect Dis* 2022;74:1757–66. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab729>.
- [47] Gaffney E, Murphy D, Walsh A, Connolly S, Basdeo SA, Keane J, et al. Defining the role of neutrophils in the lung during infection: Implications for tuberculosis disease. *Front Immunol* 2022;13:1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.984293>.
- [48] Panteleev A V., Nikitina IY, Burmistrova IA, Kosmiadi GA, Radaeva T V., Amansahedov RB, et al. severe tuberculosis in humans correlates best with neutrophil abundance and lymphocyte deficiency and does not correlate with antigen-specific CD4 T-cell response. *Front Immunol* 2017;8:1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00963>.

- [49] Belton M, Brilha S, Manavaki R, Mauri F, Nijran K, Hong YT, et al. Hypoxia and tissue destruction in pulmonary TB. *Thorax* 2016;71:1145–53.
<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207402>.
- [50] Shi L, Salamon H, Eugenin EA, Pine R, Cooper A, Gennaro ML. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* induces the Warburg effect in mouse lungs. *Sci Rep* 2015;5:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep18176>.
- [51] Subbian S, Tsenova L, Kim MJ, Wainwright HC, Visser A, Bandyopadhyay N, et al. Lesion-specific immune response in granulomas of patients with pulmonary tuberculosis: A pilot study. *PLoS One* 2015;10:1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132249>.
- [52] Subbian S, Tsenova L, Yang G, O'Brien P, Parsons S, Peixoto B, et al. Chronic pulmonary cavitary tuberculosis in rabbits: A failed host immune response. *Open Biol* 2011;1. <https://doi.org/10.1098/rsob.110016>.
- [53] Beinke S, Ley SC. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004;382:393–409. <https://doi.org/10.1042/BJ20040544>.
- [54] Lingappan K. NF- κ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol* 2018;7:81–6.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801473>.The.
- [55] Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 2011;21:103–15. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>.
- [56] Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible Factor-1 α by reactive oxygen species: New developments in an old debate. *J Cell Biochem* 2015;116:696–703. <https://doi.org/10.1002/jcb.25074>.
- [57] Maison DP. The vascular endothelial growth factor pathway of angiogenesis in

- tumors: Associated pharmaceutical targets and treatments. *Chiang Mai Univ J Nat Sci* 2018;17:321–38. <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2018.0023>.
- [58] Polena H, Boudou F, Tilleul S, Dubois-Colas N, Lecoïnte C, Rakotosamimanana N, et al. *Mycobacterium tuberculosis* exploits the formation of new blood vessels for its dissemination. *Sci Rep* 2016;6:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep33162>.
- [59] Harding JS, Herbath M, Chen Y, Rayasam A, Ritter A, Csoka B, et al. VEGF-A from Granuloma Macrophages Regulates Granulomatous Inflammation by a Non-angiogenic Pathway during *Mycobacterial* Infection. *Cell Rep* 2019;27:2119-2131.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.072>.
- [60] Batista LAF, Silva KJS, da Costa e Silva LM, de Moura YF, Zucchi FCR. Tuberculosis: A granulomatous disease mediated by epigenetic factors. *Tuberculosis* 2020;123:101943. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101943>.
- [61] Ehlers S, Schaible UE. The granuloma in tuberculosis: Dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol* 2012;3:1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>.
- [62] Maison DP. Tuberculosis pathophysiology and anti-VEGF intervention. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 2022;27:100300. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2022.100300>.
- [63] Zenk SF, Hauck S, Mayer D, Grieshober M, Stenger S. Stabilization of Hypoxia-Inducible Factor Promotes Antimicrobial Activity of Human Macrophages Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol* 2021;12:1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.678354>.
- [64] Braverman J, Sogi KM, Benjamin D, Nomura DK, Stanley SA. HIF-1 α Is an

- Essential Mediator of IFN- γ -Dependent Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* .
J Immunol 2016;197:1287–97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600266>.
- [65] Antonio M-B, Alma Y A-M, Edgar I M-Z, Rubi C C-M, Maricruz J M-R. Simplified Neutrophil Isolation Protocol. Int J Immunol Immunother 2020.
<https://doi.org/10.23937/2378-3672/1410041>.
- [66] Mendoza-Aguilar M, Garcíá-Elorriaga G, Arce-Paredes P, González-Bonilla C, Del Rey-Pineda G, Rojas-Espinosa O. Functional state analysis of phagocytic cells of patients with type 2 diabetes and pulmonary tuberculosis. Clin Lab 2012.
- [67] Muñiz-Buenrostro A, Arce-Mendoza AY, Montes-Zapata EI, Calderón-Meléndez RC, Vaquera-Alfaro HA, Huerta-Polina JA, et al. A novel methodology for NETs visualization under light microscopy. Biochem Biophys Reports 2023;34:0–3.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101437>.
- [68] Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath 2013;3:71–85.
- [69] López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. J Funct Biomater 2014;5:43–57.
<https://doi.org/10.3390/jfb5020043>.
- [70] Park HS, Back YW, Jang IT, Lee KI, Son YJ, Choi HG, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2145c Promotes Intracellular Survival by STAT3 and IL-10 Receptor Signaling. Front Immunol 2021;12:1–16.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.666293>.

- [71] Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity* 2021;54:1377–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006>.
- [72] Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol* 2018;9:1–17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>.
- [73] Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's role during health and disease. *Physiol Rev* 2019;99:1223–48. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>.
- [74] Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009. <https://doi.org/10.1038/nri2607>.
- [75] Stothers CL, Luan L, Fensterheim BA, Bohannon JK. Hypoxia-inducible factor-1 α regulation of myeloid cells. *J Mol Med* 2018;96:1293–306. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1710-1>.
- [76] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen B, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1 Is Essential for Myeloid Cell Inflammation. *Cell* 2015;112:645–57.
- [77] Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, et al. HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 2005;115:1806–15. <https://doi.org/10.1172/JCI23865>.
- [78] McGettrick AF, O'Neill LAJ. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell Metab* 2020;32:524–36. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.002>.
- [79] Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med* 2007;85:1339–46. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0282-2>.
- [80] Devraj G, Beerlage C, Brüne B, Kempf VAJ. Hypoxia and HIF-1 activation in bacterial infections. *Microbes Infect* 2017;19:144–56.

- <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.11.003>.
- [81] Colgan SP, Furuta GT, Taylor CT. Hypoxia and Innate Immunity: Keeping Up with the HIFsters 2020;341–63.
- [82] Bernis ME, Zweyer M, Maes E, Schleeuber Y, Sabir H. Neutrophil Extracellular Traps Release following Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Newborn Rats Treated with Therapeutic Hypothermia. *Int J Mol Sci* 2023;24.
<https://doi.org/10.3390/ijms24043598>.
- [83] Li F, Luo J, Xu H, Wang Y, Jiang W, Chang K, et al. Early secreted antigenic target 6-kDa from *Mycobacterium tuberculosis* enhanced the protective innate immunity of macrophages partially via HIF1 α . *Biochem Biophys Res Commun* 2020;522:26–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.045>.
- [84] Pattanaik KP, Ganguli G, Naik SK, Sonawane A. *Mycobacterium tuberculosis* EsxL induces TNF- α secretion through activation of TLR2 dependent MAPK and NF- κ B pathways. *Mol Immunol* 2021;130:133–41.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.11.020>.
- [85] Tasbiti A. Membrane and Secretory Protein Extraction of *Mycobacterium Tuberculosis* and *Mycobacterium Bovis* Using One Dimensional Electrophoresis (SDS-PAGE). *J Clin Microbiol Biochem Technol* 2017;3:040–4.
<https://doi.org/10.17352/jcmbt.000025>.
- [86] Khosrobeygi M, Mosavari N, Salehi M, Mojgani N, Akbari M. Isolation and purification of low molecular weight proteins from culture filtrate of *mycobacterium tuberculosis* strain c. *Arch Razi Inst* 2021;76:273–81.
<https://doi.org/10.22092/ari.2020.127691.1390>.

- [87] Wingfield P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Curr Protoc Protein Sci* 2001;13:1–10. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>.
- [88] Ong CWM, Fox K, Ettore A, Elkington PT, Friedland JS. Hypoxia increases neutrophil-driven matrix destruction after exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29659-1>.
- [89] Kling L, Schreiber A, Eckardt KU, Kettritz R. Hypoxia-inducible factors not only regulate but also are myeloid-cell treatment targets. *J Leukoc Biol* 2021;110:61–75. <https://doi.org/10.1002/JLB.4RI0820-535R>.
- [90] Kaplan MJ. Mitochondria shape neutrophils during hypoxia. *Blood* 2022;139:159–60. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013440>.
- [91] Willson JA, Arienti S, Sadiku P, Reyes L, Coelho P, Morrison T, et al. Neutrophil HIF-1 α stabilization is augmented by mitochondrial ROS produced via the glycerol 3-phosphate shuttle. *Blood* 2022;139:281–6. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011010>.
- [92] Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. *Cells* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/cells9040915>.
- [93] Cavalcante-Silva LHA, Almeida FS, Andrade AG de, Comberlang FC, Cardoso LL, Vanderley SER, et al. *Mycobacterium tuberculosis* in a Trap: The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Tuberculosis. *Int J Mol Sci* 2023;24. <https://doi.org/10.3390/ijms241411385>.
- [94] Chen Y, Hu H, Tan S, Dong Q, Fan X, Wang Y, et al. The role of neutrophil extracellular traps in cancer progression, metastasis and therapy. *Exp Hematol*

- Oncol 2022;11:1–14. <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00345-3>.
- [95] Braian C, Hoge V, Stendahl O. Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J Innate Immun* 2013;5:591–602. <https://doi.org/10.1159/000348676>.
- [96] Lee HM, Shin DM, Jo EK. Mycobacterium tuberculosis induces the production of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and CXCL8 in pulmonary epithelial cells through reactive oxygen species-dependent mitogen-activated protein kinase activation. *J Bacteriol Virol* 2009;39:1–10. <https://doi.org/10.4167/jbv.2009.39.1.1>.
- [97] Kirchner T, Mller S, Klinger M, Solbach W, Laskay T, Behnen M. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm* 2012;2012. <https://doi.org/10.1155/2012/849136>.
- [98] Björnsdóttir H, Welin A, Michaëlsson E, Osla V, Berg S, Christenson K, et al. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2015;89:1024–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398>.
- [99] Azzouz D, Khan MA, Palaniyar N. ROS induces NETosis by oxidizing DNA and initiating DNA repair. *Cell Death Discov* 2021;7. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00491-3>.
- [100] Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules* 2015;5:702–23. <https://doi.org/10.3390/biom5020702>.
- [101] Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J Exp Med* 2011;208:2251–62.

- <https://doi.org/10.1084/jem.20110919>.
- [102] Ancey PB, Contat C, Meylan E. Glucose transporters in cancer – from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J* 2018;285:2926–43.
<https://doi.org/10.1111/febs.14577>.
- [103] Ramakrishnan S, Anand V, Roy S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014;9:142–60.
<https://doi.org/10.1007/s11481-014-9531-7>.
- [104] Singh V, Kaur C, Chaudhary VK, Rao KVS, Chatterjee S. M. tuberculosis Secretory Protein ESAT-6 Induces Metabolic Flux Perturbations to Drive Foamy Macrophage Differentiation. *Sci Rep* 2015;5:1–12.
<https://doi.org/10.1038/srep12906>.
- [105] Mamun A Al, Hayashi H, Yamamura A, Nayeem MJ, Sato M. Hypoxia induces the translocation of glucose transporter 1 to the plasma membrane in vascular endothelial cells. *J Physiol Sci* 2020;70. <https://doi.org/10.1186/s12576-020-00773-y>.
- [106] Pavlacky J, Polak J. Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:1–15.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00057>.

