



División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica

Informe de Conclusión de Servicio Social

Efecto bactericida de la proteína antimicrobiana BPI de macrófagos humanos contra
Mycobacterium tuberculosis.

Presenta:

Mayra Abigail Santos Méndez
Matrícula: 2182035312

Asesor Externo: Dra. Silvia Guzmán Beltrán

No. de cédula: 4677035
3251920

Asesor Interno: Dr. Alejandro Azaola Espinosa.

No. Eco. 5616

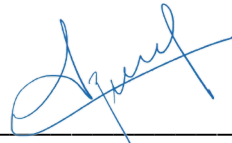
Lugar de realización:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas".

Fecha inicio: 16 de enero del 2023

Fecha término: 16 de julio del 2023

ASESOR INTERNO



Dr. Alejandro Azaola Espinosa
No. Económico 5616
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.

ASESOR EXTERNO



Dra. Silvia Guzmán Beltrán
No. de cédula 4677035/3251920
Departamento de Investigación en Microbiología.
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael
Cosío Villegas”.

ALUMNO QUE PRESENTA



Mayra Abigail Santos Méndez
Matrícula: 2182035312
Universidad Autónoma Metropolitana.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, es considerada una enfermedad reemergente a nivel mundial, pues aproximadamente una cuarta parte de la población mundial está infectada, aunque sólo del 5 al 10% desarrollan la TB activa. Diversos desafíos se han presentado para erradicarla, por ejemplo, el aumento en la prevalencia de cepas con resistencia a antibióticos de primera y segunda línea, falta de vacunas efectivas y la presencia de enfermedades que afectan la función inmunológica [14]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha planteado que para erradicar la enfermedad es fundamental contar con varias estrategias como: lograr el acceso universal a la atención para todas las personas con TB, desarrollar nuevos métodos para su diagnóstico, disponer de nuevas vacunas y medicamentos complementarios contra casos de TB resistente.

Los péptidos y las proteínas antimicrobianas son moléculas que forman parte de la defensa de diversas especies de organismos y participan mediando la respuesta inmune primaria hacia patógenos como bacterias, parásitos, virus y hongos. Las moléculas antimicrobianas son sintetizadas en la piel, las mucosas o los sitios propensos a infección. La proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI por sus siglas en inglés) es una proteína catiónica con actividad antimicrobiana que recientemente ha recibido gran atención en el campo médico por su participación en enfermedades inflamatorias e infecciosas [11, 21]. Comprender los mecanismos moleculares de interacción entre el hospedero y la micobacteria es crucial para el desarrollo de mejoras en el tratamiento y prevención de la TB [14, 18]. El presente reporte forma parte de la investigación de los mecanismos de BPI en la respuesta inmune contra *Mtb*, dicha investigación podrá permitir proponer a esta proteína como una posible alternativa terapéutica.

2.MARCO TEORICO

2.1 La TB como problema de salud pública

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente hay 9.9 millones de personas infectadas con *Mtb*. De los cuales se registraron 1.5 millones de muertes en 2020 [22].

De acuerdo con el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) en México se presentó una tasa de morbilidad de 13.8 por cada 100.000 habitantes (2016), mientras que la tasa de mortalidad fue de 1.7 (2015) [8]. La figura 1 muestra los estados con la mayor tasa de morbilidad y mortalidad a nivel nacional.

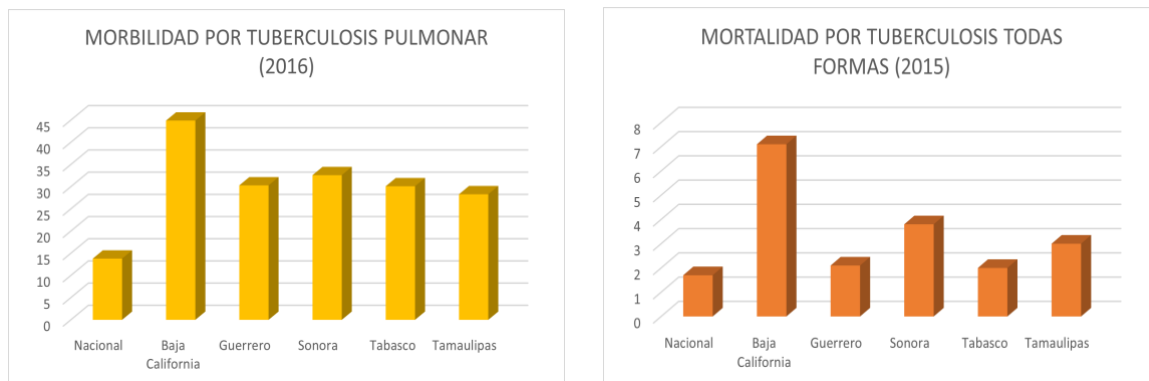


Figura 1. Datos de morbilidad y mortalidad de la TB en México. Figuras realizadas de acuerdo con los datos publicados por CENAPRECE [8].

En 2019 se presentaron 22 mil 285 casos, principalmente en los estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Guerrero y Tamaulipas; mientras que los estados de México, Tlaxcala, Zacatecas, Michoacán y Aguascalientes registraron menor incidencia. Los grupos de edad con mayor número de personas infectadas fueron los de entre 20 y 64 años con un 76.6%, de los cuales el 63 % son hombres.

2.2 Inmunología de la TB.

La vía de entrada de *Mtb* al hospedero es principalmente al inhalar pequeñas gotas de secreciones producidas por una persona infectada al toser, hablar o estornudar. Debido a que el agente causal ingresa comúnmente por vía aérea, este se localiza principalmente en los pulmones [14]. Al ingresar la bacteria al hospedero, es capturada y reconocida por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los Receptores tipo Toll (TLR), Receptor tipo Nod (NOD) y Receptores de Lectina tipo C (CLR) presentes en las células del sistema inmune, adicionalmente están involucrados en el inicio de diversas funciones celulares como la autofagia, fagocitosis y apoptosis [18,24].

Los PRR son expresados en células polimorfonucleares (PMN), células dendríticas (CD), células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) y los macrófagos [18].

Una de las primeras células en infiltrar los pulmones tras la infección por *Mtb* son los neutrófilos, su reclutamiento y función están regulados por diversas citocinas y quimiocinas, estas células ejercen acción bactericida y forman parte de los granulomas que contienen al patógeno [18,24]. Por otro lado, las CD y macrófagos desempeñan un papel fundamental en la presentación de antígenos de la micobacteria ya que capturan, interiorizan y migran a los ganglios linfáticos para presentar los diferentes antígenos a los linfocitos por lo que resalta su importancia como puente entre la inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Cabe destacar que se ha informado que este mecanismo dura menos de una semana en infecciones normales; sin embargo, en infección por *Mtb* suele retrasarse varias semanas lo que permite al bacilo proliferar dentro del macrófago sin ningún ataque de los componentes del sistema inmunitario [24]. Las células NK poseen actividades citolíticas que pueden controlar el crecimiento bacteriano indirectamente a través de sus mecanismos citotóxicos. En un estudio en ratones inmunodeficientes de células T se pudo observar que las NK son necesarias para eliminar a las micobacterias, lo que sugiere que las NK tienen un papel fundamental en pacientes inmunocomprometidos [18]

Los macrófagos son células que desarrollan funciones especiales de acuerdo con los estímulos exógenos que se presentan y constituyen la primera línea de defensa inmunitaria [10,17,19,29]. En adultos esta línea celular surge de la célula madre pluripotencial que posteriormente madura en monocitos que ingresan y circulan en la sangre para pasar luego a los tejidos donde se convierten en macrófagos residentes [1], estos se distinguen de los monocitos por la expresión de determinados marcadores de superficie, por ejemplo, los macrófagos poseen en su membrana varios receptores y moléculas que facilitan reconocer patógenos e interactuar con otras células, los más importantes son CD15, CD16, TLR, NOD, CR1, CR3, y algunos receptores para citocinas como IL-4, TNF- α , IL-7, etc. [24].

Una vez que *Mtb* ha ingresado al tejido, se encuentra con los macrófagos residentes que fagocitan al patógeno activando dos mecanismos de defensa principales; producción de especies reactivas de oxígeno y liberación de proteínas y péptidos antimicrobianos. En este sentido los mecanismos bactericidas dependientes de las proteínas y péptidos antimicrobianos, como las granulinas, defensinas y catelicidinas (LL37), son esenciales para la eliminación de las micobacterias en macrófagos alveolares [1,2,13,23]. Sin embargo, se ha reportado que en algunos casos la *Mtb* es capaz de evitar la activación de

la respuesta inmune innata por lo que el macrófago se convierte en su hábitat principal y su principal protector contra anticuerpos y linfocitos T [24].

2.3 Función de la proteína bactericida que incrementa la permeabilidad bacteriana (BPI) frente a patógenos.

La proteína BPI es una molécula de interés dentro del grupo de las proteínas antimicrobianas. Se expresa principalmente en los precursores mieloides de los neutrófilos y se almacena en sus gránulos azurófilos, en menor medida en monocitos de sangre periférica, macrófagos, eosinófilos, fibroblastos dérmicos y ciertas células epiteliales, así como en la superficie mucosa [7,17,28,29]. Esta proteína catiónica se caracteriza por exhibir 2 dominios en forma de barril, que poseen múltiples funciones, actividad bactericida, opsonización y respuesta antiinflamatoria, para eliminar a las bacterias Gram negativas [29].

En los últimos años se ha reportado que el extremo N-terminal de la BPI es el responsable de la actividad bactericida ya que al interactuar con los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana de bacterias Gram negativas, se altera la disposición de la membrana permitiendo la entrada de granulosinas y granzimas favoreciendo su muerte. Además, se ha reportado que BPI es capaz de formar poros en la membrana provocando pérdida de la fuerza protón-motriz [3,29]. De hecho, la capacidad de la proteína catiónica para unirse a antígenos antibacterianos contribuye a la presentación de antígenos a las células del sistema inmune (opsonización) y a la neutralización de los LPS (actividad antiinflamatoria), ya que, al producirse una respuesta contra una infección bacteriana la proteína de unión a LPS (LBP) se une a los LPS y a los receptores CD14/TLR-4 activando la liberación de citocinas proinflamatorias, mientras que BPI ejerce un efecto antibacteriano selectivo y suprime la actividad de los LPS ya que su región C-terminal se une a los LPS evitando la unión a la proteína LBP, disminuyendo la inflamación. Aún no se tiene claro el mecanismo de opsonización; sin embargo, se propone que este efecto se ejerce mediante la unión directa de la BPI con la bacteria o al promover la activación del complemento en la superficie bacteriana para facilitar la fagocitosis [15,28,29].

Recientemente, se demostró que BPI interactúa con lipopéptidos derivados de bacterias Gram positivas [4]. En este sentido, los LPS y los lipoarabinomananos (LAM), glucolípidos de la pared celular de la *Mtb*, poseen características similares. Se ha descrito que LAM comparte afinidad con otras proteínas que interactúan con LPS como la LBP y también se pueden unir al receptor CD14 por lo que se sugirió la posibilidad de que BPI interactúe con LAM. Se ha descrito que BPI, se induce por algunos patrones moleculares asociados a

patógenos (PAMPs) como: flagelina, lipopolisacáridos (LPS) y lipopeptidos de Gram positivas [3, 4]. Por lo que es posible que BPI pueda neutralizar diversos tipos de endotoxinas.

Por otro lado, se ha evidenciado que macrófagos infectados con *Mtb* reducen la expresión de BPI [26], esto podría ser una estrategia de las micobacterias para evadir la muerte, promoviendo su persistencia. Además, lípidos inmunomoduladores aumentan la expresión de BPI en macrófagos infectados con *Mtb*, mostrando disminución en el crecimiento intracelular bacteriano y la producción de citocinas proinflamatorias [6]. Recientemente, se demostró que la BPI pura se internaliza y disminuye el crecimiento de *M. tuberculosis* intracelular en macrófagos humanos (Guzmán-Beltrán, datos no publicados).

En diversos estudios se ha observado niveles altos de BPI en suero de pacientes con TB meníngea, pleural, gastrointestinal, pulmonar entre otras [26]. Sin embargo, se desconoce si BPI llega al sitio de la infección y si ejerce su actividad. Por ello, es indispensable conocer los niveles de BPI en suero y en pulmón con el fin de determinar su papel funcional en pacientes con TB y proponer una estrategia para inducir su expresión y mejorar la salud del paciente.

3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con el CENAPRECE, la TB sigue prevaleciendo como un problema de salud pública a nivel nacional y mundial. A pesar de las estrategias implementadas para erradicar esta enfermedad reemergente, se han presentado diversos desafíos como el surgimiento de nuevas cepas con resistencia a antibióticos de primera y segunda línea, falta de vacunas efectivas, y la presencia de enfermedades que afectan la funcionalidad de la respuesta inmune [14].

En la actualidad las proteínas y péptidos antimicrobianos se han descrito como una solución terapéutica que puede ser efectiva [21] ya que tienen un papel fundamental en distintas infecciones, incluyendo la TB, pues participan en la eliminación o inhibición del crecimiento del bacilo. Se han observado niveles elevados de BPI en fluidos corporales y tejidos locales durante diversas enfermedades infecciosas e inflamatorias [11] por lo que al inducir a BPI con lisados bacterianos comerciales se busca estimular su expresión y poder proponer a esta proteína como una terapia alternativa al tratamiento de la tuberculosis.

4.OBJETIVO GENERAL

- I. Determinar el papel funcional de BPI durante la infección por TB.

4.1 Objetivos específicos

- I. Determinar el efecto de lisados bacterianos comerciales y moléculas asociadas a patógenos sobre la viabilidad de células THP-1 y macrófagos aislados y purificados de sangre periférica.
- II. Inducir la expresión de la proteína BPI mediante lisados bacterianos comerciales en un modelo de infección de macrófagos humanos con *M. tuberculosis H37 Ra*.
- III. Evaluar la internalización de BPI en MDM y en la línea celular premonocítica THP-1 mediante microscopía de fluorescencia en condiciones de infección.

5. METODOLOGÍA.

Los experimentos reportados a continuación se realizaron en la línea celular premonocítica THP-1 y en Macrófagos Derivados de Monocitos (MDM) en algunos casos con el fin de modelizar el comportamiento de los MDM, ya que las células THP-1 se propagan y se puede obtener más fácilmente a las células. Cabe destacar que el estado de diferenciación de las células THP-1 tratadas con PMA se compara con el estado de los MDM pues ambas líneas celulares presentan la capacidad de adaptar su fenotipo a estímulos externos [9, 10].

La línea celular humana THP-1 (TIB-202) fue obtenida comercialmente por la ATCC (The American Type Culture Collection). Estas células se trataron con 50 nM de Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), y se dejaron diferenciar por 3 días. Por otro lado, los MDM fueron obtenidos de sangre periférica obtenidos de paquetes leucocitarios del banco de sangre de donadores sanos y se dejan diferenciar durante 7 días.

5.1 Separación de células mononucleares de sangre periférica.

Para la obtención de monocitos de sangre periférica primero, las células se colocaron en un tubo cónico con medio RPMI (Lonza, EU) y ficol, que es una solución separadora de linfocitos, se centrifugó a 1200 rpm durante 45 minutos y se separó el anillo leucocitario formado. Se agregaron 40 ml de medio RPMI sin suplementar y se centrifugó a 1200 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se colocó 5 ml de buffer de lisis de eritrocitos e incubó 5 minutos a 4°C. Luego se realizaron 2 lavados más en las condiciones antes descritas y al finalizar los lavados el pellet celular se resuspendió por agitación en vortex.

En este estudio se requirieron monocitos clásicos que se caracterizan por la expresión de CD14 y la nula expresión de CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁻) [1]. Para extraer a los monocitos de

sangre periférica, a la suspensión celular se le agregó un anticuerpo específico de CD14 acoplado a microperlas magnéticas. Posteriormente la suspensión se incubó a 4°C y resuspendió en buffer Miltenyi, ésta fue colocada en una columna acoplada a un magneto. Luego de pasar la suspensión a través de la columna se recolectaron los monocitos en un nuevo tubo y se resuspendieron en medio RPMI. Se realizó un conteo celular en la cámara de Neubauer.

Finalmente, se colocó el volumen con la concentración requerida de células en las placas de 96 u 8 pozos. Las células se incubaron 3 o 7 días a 37°C con 5% CO₂.

5.3 Efecto de lisados bacterianos comerciales sobre la viabilidad celular.

Los lisados bacterianos son obtenidos de cepas patógenas que producen infecciones pulmonares o infecciones urogenitales, estimulan la inmunidad general del organismo y actúan sobre mecanismos de defensa no específicos provocando actividad fagocítica, aumento de anticuerpos, etc. [5]. Los MDM suelen activarse por unión directa a las Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) presentes en el microorganismo o cuando receptores presentes en su membrana plasmática se unen a opsoninas en la superficie de los microbios, una vez activados estos secretan distintas citocinas y proteínas con la finalidad de fagocitar y matar microorganismos invasores [1,25]

Antes de inducir la expresión de BPI en MDM mediante múltiples PAMP's y lisados bacterianos comerciales se evaluó si dichos estímulos presentan efectos tóxicos sobre la viabilidad celular. Para esto se utilizaron los siguientes PAMP obtenidos comercialmente: flagelina FLA-BS aislada de la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*, FLA-ST aislada de *Salmonella typhimurium* una bacteria Gram negativa, lipopolisacárido LPS-B5 aislado de *Escherichia coli* y Pam3-Cys-OH (PAM), que es una lipoproteína bacteriana sintética. Los lisados bacterianos comerciales fueron UROVAXOM, ISMIGEN y PULMONARON, cabe destacar que este último solo se utilizó en MDM.

El experimento se realizó en placas de 96 o 48 pozos. Primero, se retiró el medio con el que se dejaron diferenciar las células, se realizó un lavado y se adicionó medio fresco, luego se adicionaron 40 µl de solución de lisados o antígenos a cada pozo basándose en el diseño de placa y se dejaron incubar 24 horas. Para determinar el efecto tóxico de los lisados se detectó la viabilidad celular por el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este compuesto se reduce a formazán por la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables. La concentración de la sal de formazán puede cuantificarse por espectrofotometría a 570 nm de longitud de onda [30].

Para evaluar la reproducibilidad de los resultados se realizaron 5 experimentos independientes.

5.4 Western Blot.

Esta técnica se utiliza para detectar una proteína específica en una muestra, el método implica el uso de electroforesis en gel y el uso de una membrana que expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio, esta unión del anticuerpo se detecta usando un marcador quimioluminiscente [20].

Para separar las proteínas de acuerdo con su peso molecular se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Se utilizaron muestras de células tratadas con los diferentes estímulos (LPS, PAM, FLA-Bs, FLA-St y diferentes concentraciones de ISMIGEN) con el fin de observar si estos eran capaces de inducir BPI aumentando la presencia de la proteína. Una vez terminado el procedimiento de electroforesis el gel se colocó en el cassette de transferencia junto con papel filtro y la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para transferir las proteínas procesadas en la electroforesis, se dejó correr aproximadamente 1 hora a 300 miliamperes, luego de este procedimiento las membranas se bloquearon con 15 ml de leche en polvo al 5% en buffer TBS y tween 20 al 0.05% en agitación durante 16 horas. Esta membrana se colocó en solución de leche con un anticuerpo primario anti-BPI y anti-actina (como control de carga), se incubaron durante 3 horas, se realizaron 5 lavados (5 minutos/lavado) con buffer TBS y luego las membranas se incubaron 1 hora más con un anticuerpo secundario anti-mouse, luego de realizar 4 lavados en las condiciones antes descritas esta se incubó con Luminol Sustrato (Bio Rad) para visualizar la expresión de la proteína.

5.5 Infección de macrófagos.

Los macrófagos se infectaron con la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra y con la cepa Mtb H37 Ra transformada con el gen que codifica constitutivamente mCherry, una proteína roja fluorescente. Primero los viales se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, agregó 1ml de Suero Fetal Bovino (SFB) y para disgregar las bacterias presentes en esta suspensión se agregaron perlas de vidrio a cada uno de los viales, se les dio vortex por 5 minutos, se centrifugaron y el sobrenadante con las bacterias disgregadas se transfirió a un tubo nuevo. Se realizaron los cálculos para preparar un volumen final de suspensión de 1 ml que contenía la concentración suficiente para que al agregarla a cada uno de los pozos se tuviera un índice de infección de 1:20 (macrófago: bacteria). Esta se dejó incubar durante 1 hora, después se retiró el medio y realizaron 3 lavados, se agregó BPI y se incubó por 24 h.

5.6 Tinción por fluorescencia para la detección de BPI y *Mtb*

La microscopía de fluorescencia es una herramienta común donde un haz de luz paralelo ilumina simultáneamente toda la muestra para excitar los fluorocromos, lo que implica la absorción de energía luminosa (un fotón) por un indicador seguido de la emisión de parte de esta energía luminosa unos nanosegundos más tarde.

Frecuentemente se utilizan dos o más indicadores para realizar estudios comparativos, debido a que sus espectros de emisión y excitación son relativamente amplios el monitoreo simultáneo de múltiples indicadores puede presentar un desafío debido al cruce de longitudes de onda de un indicador a otro. Con la finalidad de obtener un enfoque más limpio se toman imágenes separadas y secuenciales con filtros diseñados específicamente para cada indicador [27].

La evaluación de la expresión proteica de BPI en macrófagos infectados con *Mtb* se llevó a cabo de la siguiente manera. Las células se cultivaron en cámaras de cultivo de 8 pozos sobre un portaobjetos, aproximadamente 0.2×10^6 células por pozo. Estas se infectaron con *Mtb* que expresa constitutivamente la proteína fluorescente mCherry, (rojo) se añadió la proteína recombinante y se dejó incubar durante 1 hora, luego se añadió 2 veces la solución de lavado y se agregó la BPIr, esta se dejó incubar 24 horas.

Luego de 24 horas las células se fijaron con paraformaldehído, se realizó un lavado y se bloquearon cada uno de los pozos para evitar la unión de los anticuerpos a lugares inespecíficos. Luego de esto, se agregó el anticuerpo primario para el reconocimiento de BPIr y se incubó 1 hora, se realizó un lavado y se añadió un segundo anticuerpo unido al fluorocromo Alexa 488 (verde), se dejó durante 45 minutos y se agregó Hoechst (azul), un fluorocromo que se une a DNA nuclear. Para la fijación de la muestra se adicionó el reactivo Prolong antifade reagent (Life Technologies), se colocó el cubreobjetos limpio y se dejó la laminilla toda la noche a temperatura ambiente para permitir la polimerización de la solución de montaje.

6. RESULTADOS.

6.1 Viabilidad celular.

Los valores de absorbancia de cada experimento se utilizaron para calcular el porcentaje de viabilidad celular. El 100% de viabilidad corresponde a la absorbancia de las células sin tratar (control). Los resultados se representaron en gráficas como variable independiente la concentración y como dependiente el porcentaje de viabilidad, con el fin de observar si se presentaba algún efecto tóxico sobre la población celular.

6.1.1 Efecto de PAMP comerciales sobre células THP-1.

Los datos presentados a continuación representan el promedio de 4 experimentos independientes. Al comparar las siguientes gráficas podemos observar que LPS (Fig. 2A) y Flagelina Bs (Fig. 2C) tienen un mayor efecto negativo sobre la viabilidad en comparación con PAM y Flagelina St (Fig. 2B y D) donde no se observan valores por debajo del 100 % y una menor variación en su error estándar.

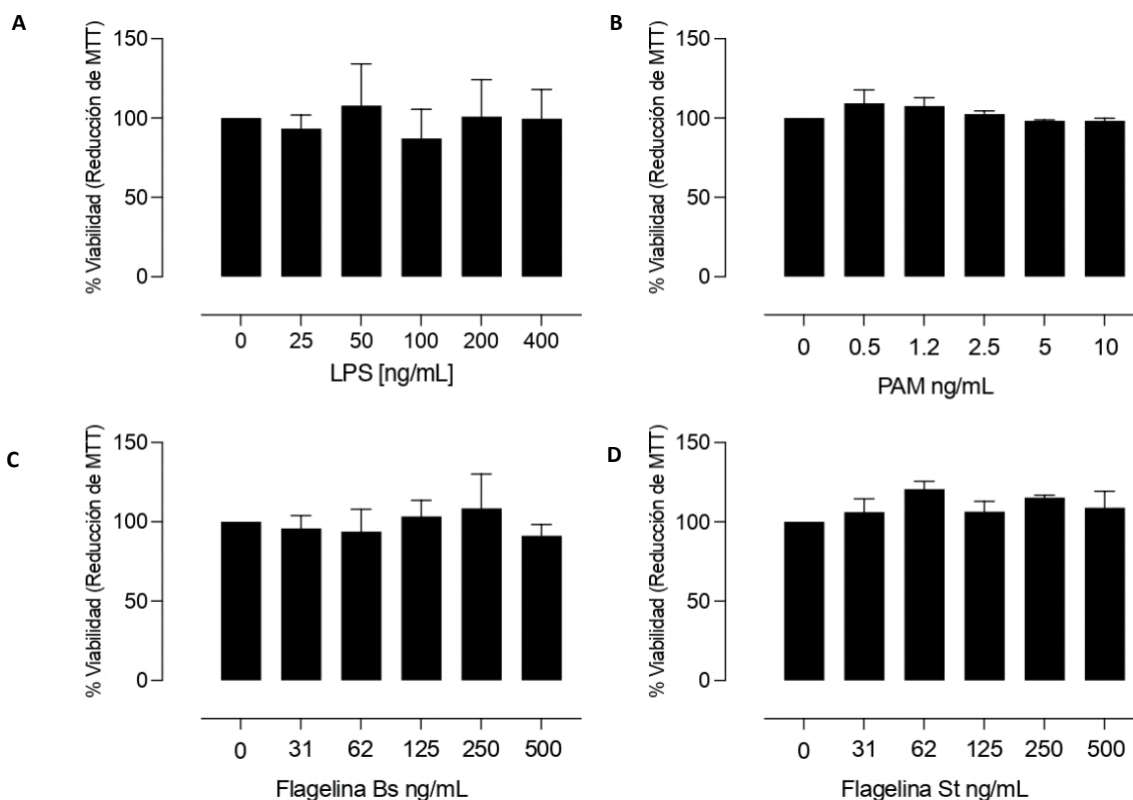


Figura. 2. Efecto sobre la viabilidad celular en la línea THP-1 tratadas con PAMP(A) LPS aislado de *E. coli* (B) PAM (C) Flagelina Bs aislada de *Bacillus subtilis* (D) FLA-ST aislada de *Salmonella typhimurium*.

Estos estudios solo se realizaron en células THP-1, como se mencionó anteriormente, antes de evaluar la inducción de la proteína BPI en MDM mediante lisados bacterianos comerciales se requirió de una línea celular para predecir el comportamiento de los macrófagos, del mismo modo se consideró utilizar estos PAMP para evaluar que lisado bacteriano comercial era el óptimo para estimular la respuesta inmune.

6.1.2 Efecto de lisados bacterianos comerciales sobre células THP-1 y macrófagos.

Para evaluar el efecto de ISMIGEN y UROVAXOM sobre células THP-1 se realizaron 5 experimentos independientes para cada lisado comercial, los valores de porcentaje de

viabilidad se calcularon como se mencionó anteriormente, y al final se promediaron. A las 24 h de incubación con cada lisado.

En la figura 3A podemos observar que ISMIGEN provoca una disminución de la viabilidad celular a 86% en 24 horas. Por otro lado, UROVAXOM (fig. 3B) no causó ningún efecto sobre la viabilidad luego de 24 horas.

En MDM se realizaron 3 experimentos para evaluar el efecto de los fármacos sobre la viabilidad, cabe mencionar que el efecto de PULMONAROM en la viabilidad solo se ha evaluó una vez. De acuerdo con lo observado en la figura 6 y 7 podemos demostrar que ISMIGEN tiene un mayor efecto sobre la viabilidad de MDM; sin embargo, este no es menor a 80% al incubar por 24 horas. Respecto a UROVAXOM y PULMONAROM (fig. 3D y 3E) no se observó efecto significativo.

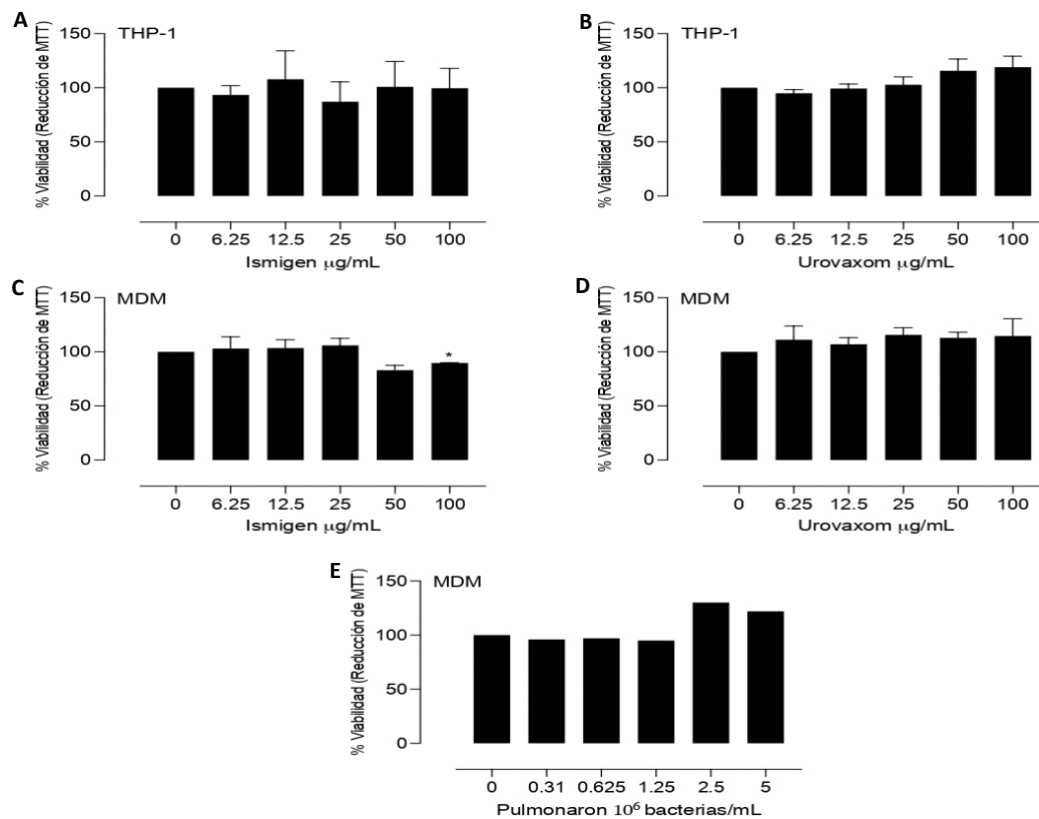


Figura. 3. Efecto de lisados bacterianos comerciales sobre la viabilidad celular en la línea premonocítica THP-1 y MDM. Efecto de ISMIGEN (A) y UROVAXOM (B) en células THP-1. MDM tratados con ISMIGEN(C), UROVAXOM (D) y PULMONARON (E).

6.2 Inducción de BPI mediante PAMP e ISMIGEN.

Con la finalidad de inducir una respuesta inmune en los macrófagos y junto con ella la producción de BPI se trataron las células MDM con distintos PAMP. Luego de procesar las

muestras mediante western blot se pudieron observar algunas bandas tenues en cada uno de los estímulos, especialmente al tratarse con LPS. Para determinar la expresión con los diferentes tratamientos se hizo una normalización con la expresión de actina, para hacer los datos comparables. Con base en ello, se puede mostrar que detectó por western blot a la proteína BPI, sin embargo, no hay diferencia en la expresión entre el control y los tratamientos al menos a las 24 h. Cabe resaltar que se las células se estimularon con LPS y loperamida (Lop) como controles de inducción de la BPI, se observa que ambos tratamientos no aumentan la expresión de la BPI de forma significativa.

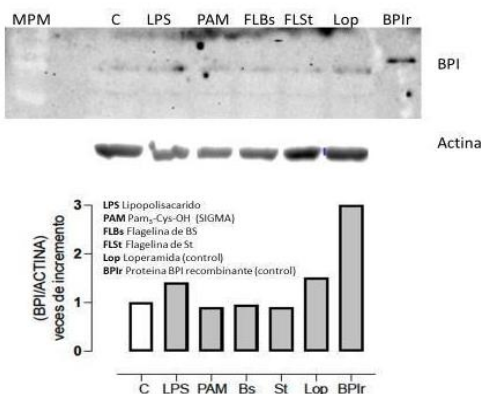


Figura. 4 células MDM tratadas con PAMP obtenidos comercialmente.

Adicionalmente, los MDM fueron tratados con ISMIGEN a concentraciones de 0, 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, estas se evaluaron luego de 24 y 48 horas de incubación. En la figura 5 podemos observar que no se observó la inducción de BPI en dichas células en comparación con el control (sin tratamiento).

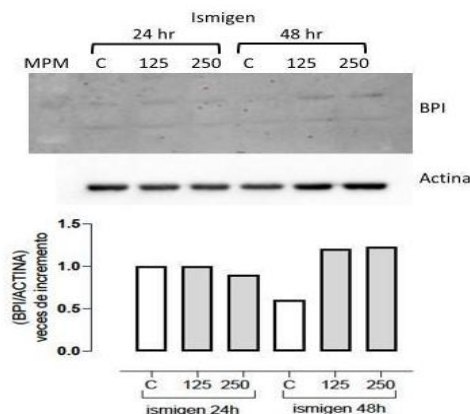


Figura. 5 células MDM tratadas con ISMIGEN un lisado bacteriano comercial.

6.3 Internalización de BPI en macrófagos derivados de THP-1 y MDM en condiciones de infección.

La inmunotinción de un anticuerpo específico de BPI en MDM infectados y sin infectar mostró que ambas condiciones generan fluorescencia verde correspondiente a BPI, al sobreponer las imágenes, núcleo Hoechst, Mtb mCherry y BPI, se puede observar a la proteína catiónica internalizada en MDM sin infección (fig. 6A) y MDM con infección, donde también es posible visualizar que Mtb se ha internalizado en el macrófago (fig. 6B).

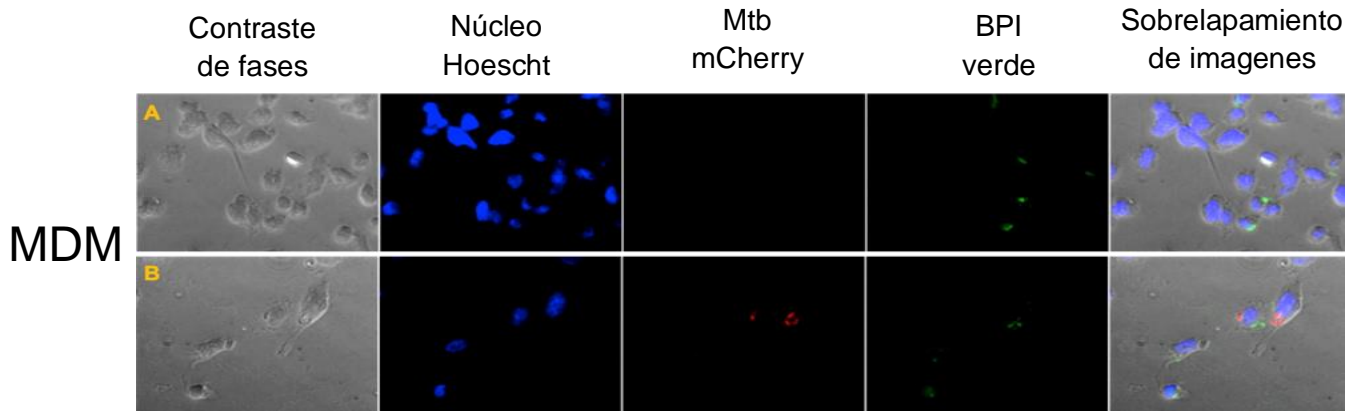


Figura 6. Internalización de BPI en MDM no infectados (A) e infectados (B). Las células se infectaron con *Mtb* y luego se trataron con BPI durante 24 h.

Al mismo tiempo, al evaluar las mismas condiciones en macrófagos derivados de THP-1 se pudo observar un comportamiento similar a los MDM. En la figura 7A se observa fluorescencia relacionada a la BPI; sin embargo, la cantidad es menor en comparación con las THP-1 que se encuentran en condiciones de infección (fig. 7B), como se mencionó anteriormente, se observa la internalización de la proteína de interés y Mtb en las THP-1.

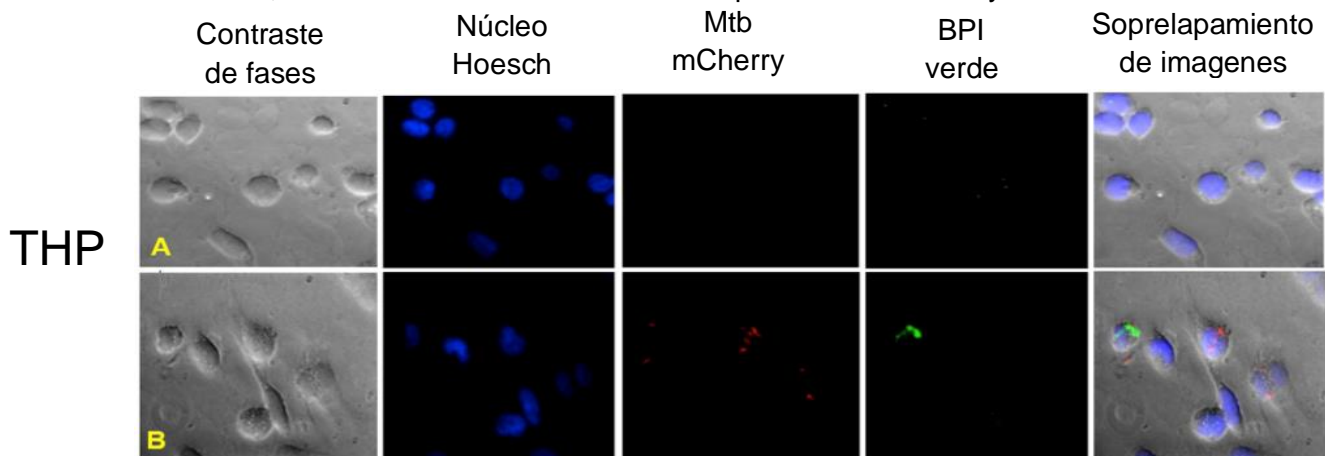


Figura 7. Internalización de BPIr en THP-1 no infectado (A) e infectado (B). Células infectadas con *M. tuberculosis* y tratadas con BPIr durante 24 h. BPIr y Mtb-mCherry se detectaron en las células mediante microscopía de fluorescencia.

7. DISCUSIÓN

El estado de diferenciación de las células THP-1 tratadas con PMA se compara al observado en Macrófagos Derivados de Monocitos (MDM). Al diferenciarse los MDM y las células THP-1 muestran un aumento en su volumen citoplasmático, así como el aumento de la concentración de lisosomas y mitocondrias. Aunque ambas células presentan una morfología celular similar, se demostró que las células THP-1 producen mayores niveles de IL-1 β y TNF- α luego de la estimulación de TLR2 o TLR4 [10]. Con relación a lo anterior se ha reportado que al estimular las THP-1 con LPS se observa la expresión de genes MD2, CD14 y My88 [9]. Lo que podría explicar porque LPS tienen un mayor efecto sobre el porcentaje de viabilidad de THP-1 en comparación con los demás PAMP, pues generalmente las células se mantienen en condiciones basales mediante procesos celulares primordiales que son estructurados de manera continua por receptores que envían información hacia el interior de la célula, al sufrir alguna modificación se establece una reacción adaptativa conocida como respuesta de estrés. A partir de mecanismos intrínsecos las células intentan retornar a sus parámetros basales, si no lo consiguen entonces se inician los procesos de muerte celular: primero apoptosis y después necrosis [25].

Por otro lado, los lisados bacterianos comerciales consisten en orgánulos aislados de varias especies o células bacterianas muertas que son sometidas a lisis mecánica, química o enzimática [16].

Al interactuar un patógeno con las células inmunitarias innatas del hospedero, se induce la expresión de diversos genes, cuyos productos desempeñan un papel importante en los mecanismos de defensa. Balakrishnan et al [4] analizaron la expresión de ARNm de BPI en monocitos y macrófagos de la línea celular U937. Se demostró que luego de que los monocitos se diferenciaron a macrófagos hubo un aumento de la presencia de ARNm de BPI, además se demostró por western blot que la flagelina induce una mayor expresión de proteína en comparación con LPS u otros estímulos [4].

Nuestros resultados muestran algunas bandas tenues al estimular a los MDM con PAMP, en base a los resultados y a la metodología presentada por Balakrishnan et al. quizá podríamos sugerir el uso de la técnica de RT-PCR para evaluar si hay inducción de BPI a nivel ARNm, con los estímulos antes mencionados, con el propósito de descartar que el

uso de estos PAMP o sus concentraciones son insuficientes para la estimulación de los MDM. Así mismo, cabe la posibilidad de que las concentraciones de células utilizadas en cada condición no sean suficientes para detectar la proteína, ya que el estudio antes descrito utiliza 1×10^6 células mientras que nosotros utilizamos 0.15 a 0.2×10^6 células. Lo anterior podría aplicarse a los MDM estimulados con ISMIGEN pues existe la posibilidad de que la conservación de antígenos particulares determine el potencial inmunogénico y con ello su eficacia clínica [16].

La microscopía de fluorescencia de MDM y THP-1 muestran la presencia de la BPI recombinante humana, así como su internalización en células con infección y sin infección. Los macrófagos son fagocitos mononucleares, que se caracterizan por ingerir microbios y células muertas que posteriormente son destruidas en las vesículas intracelulares. Se ha observado que estas células tienen la capacidad de activarse al unirse a opsoninas presentes en la superficie de los microorganismos, lo que se relaciona con la capacidad de opsonización de BPI y por ello hay disminución de las micobacterias intracelulares [1, 29]. Por otro lado, es posible que BPI pueda inducir autofagia, que es la aparición de orgánulos de membrana en el citoplasma denominados autofagosomas, este proceso participa en la defensa celular eliminando bacterias. Ambos mecanismos se estarán explorando en un futuro para poder explicar los resultados obtenidos en células infectadas [12].

8. CONCLUSION

La línea celular THP-1 y los MDM no presentaron efectos tóxicos en presencia de los lisados bacterianos y los PAMP, ya que no hubo cambios significativos sobre la viabilidad celular después de ser tratadas durante 24 horas con los PAMP. En este estudio preliminar se evaluó la expresión de BPI en células tratadas con los diferentes estímulos por Western Blot en MDM, se pudo observar solo la expresión basal de la proteína BPI en todos los tratamientos. Finalmente observamos que la proteína BPI recombinante humana se internaliza, la cual se puede detectar en el citoplasma celular, ejerciendo efecto en THP-1 y MDM.

REFERENCIAS.

1. Abbas, Abul. L. Andrew. P. S. (2015). *INMUNOLOGÍA. Celular y molecular*. (8th ed., Vol. 1). ELSEVIER.
2. Babior, B. M. (1984). The Respiratory Burst of Phagocytes. . *Clin. Invest*, 73(599–601).
3. Balakrishnan, A., Marathe, S. A., Joglekar, M., & Chakravorty, D. (2013). Bactericidal/permeability increasing protein: A multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. In *Innate Immunity* (Vol. 19, Issue 4, pp. 339–347). <https://doi.org/10.1177/1753425912465098>
4. Balakrishnan, A., Schnare, M., & Chakravorty, D. (2016). Of men not mice: Bactericidal/permeability-increasing protein expressed in human macrophages acts as a phagocytic receptor and modulates entry and replication of gram-negative bacteria. *Frontiers in Immunology*, 7(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00455>
5. Bessler, W. G., Kleine, B., Martinez Alonso, C., Biesert, L., Strecker, M., Wiesmiller, K., Metzger, J., & Jung, G. (n.d.). *Lung (1990) Suppl:707-715 Biological Activity of Bacterial Surface Components: Bacterial Extracts and Defined Bacterial Cell Wall Components as Immunomodulators*.
6. Bülow, S., Zeller, L., Werner, M., Toelge, M., Holzinger, J., Entzian, C., Schubert, T., Waldow, F., Gisch, N., Hammerschmidt, S., & Gessner, A. (2018). Bactericidal/permeability-increasing protein is an enhancer of bacterial lipoprotein recognition. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02768>
7. Canny, G., Levy, O., Furuta, G. T., Narravula-Alipati, S., Sisson, R. B., Serhan, C. N., & Colgan, S. P. (n.d.). *Lipid mediator-induced expression of bactericidal permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052533799
8. CENAPRECE. (2017, May 17). *Casos oficiales de tuberculosis*. [Http://Www.Cenaprece.Salud.Gob.Mx/Programas/Interior/Micobacteriosis/Tuberculosis/Cifras_oficiales.Html](http://www.Cenaprece.Salud.Gob.Mx/Programas/Interior/Micobacteriosis/Tuberculosis/Cifras_oficiales.Html).
9. Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. In *International Immunopharmacology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 37–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
10. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>
11. Demirci, M. B., Daltaban, Ö., & Üstün, K. (2023). Salivary bactericidal/permeability-increasing protein: A novel inflammatory marker associated with periodontitis. *Clinical Oral Investigations*, 27(6), 3159–3167. <https://doi.org/10.1007/s00784-023-04922-6>
12. Deretic, V. (2014). Autophagy in tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018481>

13. Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. In *The Journal of The American Society of Hematology* (Vol. 92).
14. Herrera, M. T., Guzmán-Beltrán, S., Bobadilla, K., Santos-Mendoza, T., Flores-Valdez, M. A., Gutiérrez-González, L. H., & González, Y. (2022). Human Pulmonary Tuberculosis: Understanding the Immune Response in the Bronchoalveolar System. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12081148>
15. Iovine, N. M., Elsbach, P., & Weiss, J. (1997). An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains (Vol. 94). www.pnas.org.
16. Jurkiewicz, D., & Zielnik-Jurkiewicz, B. (2018). Bacterial lysates in the prevention of respiratory tract infections. *Otolaryngologia Polska*, 72(5), 1–8. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7216>
17. Levy, O. (2004). Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(5), 909–925. <https://doi.org/10.1189/jlb.0604320>
18. Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 14, Issue 12, pp. 963–975). Chinese Soc Immunology. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>
19. Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (n.d.). *Inmunobiología de Janeway*.
20. NHGRI. (s. f.). Western Blot | Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot>
21. Olascoaga-Del Angel, K. S., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., Galicia-Sánchez, M. del C., Gómez-Luna, A., Islas-Arrollo, S. J., & Castañeda-Sánchez, J. I. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gaceta Medica de Mexico*, 154(6), 681–688. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003445>
22. OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. (n.d.). *Tuberculosis*. <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis>.
23. Rivas-Santiago, B., Hernandez-Pando, R., Carranza, C., Juarez, E., Contreras, J. L., Aguilar-Leon, D., Torres, M., & Sada, E. (2008). Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infection and Immunity*, 76(3), 935–941. <https://doi.org/10.1128/IAI.01218-07>
24. Rojas Juan-Manuel Anaya C Beatriz Aristizábal B Luz Elena Cano R Luis Miguel Gómez O Damaris Lopera H, W. M., Miguel Gómez, L. O., Rojas, W. M., Anaya, J.-M. C., Lopera, D. H., Elena Cano, L. R., Aristizábal, B. B., & Anaya J-M Aristizábal B Cano LE Gómez LM Lopera D, R. W. (n.d.). *Inmunología de Rojas Células linfoides de la inmunidad innata LB-1 LBZM Inmunología de Rojas* (Vol. 57, Issue 4). www.cib.org.co/fec
25. Romero, Lenin. M. M. & G. M. (n.d.). *INMUNOLOGIA. Molecular, celular y traslacional*. Wolters Kluwer.
26. Ruiz, A., Sarabia, C., Torres, M., & Juárez, E. (2019). Resolvin D1 (RvD1) and maresin 1 (Mar1) contribute to human macrophage control of M. tuberculosis

- infection while resolving inflammation. *International Immunopharmacology*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105694>
27. Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. D. (2014). Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(10), 1042–1065. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
28. Schultz, H., & Weiss, J. P. (2007). The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 384, Issues 1–2, pp. 12–23). <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.07.005>
29. Theprungsirikul, J., Skopelja-Gardner, S., & Rigby, W. F. C. (2021). Killing three birds with one BPI: Bactericidal, opsonic, and anti-inflammatory functions. In *Journal of Translational Autoimmunity* (Vol. 4). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2021.100105>
30. Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>