

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

**Informe del servicio social**  
**Papel funcional de la proteína BPI durante la tuberculosis pulmonar activa**

Alumna: Mitzi Rubí Hernández García  
Matrícula: 2203058139

Asesora interna: Dra. Norma Noguez Méndez. No. Eco. 17902

Asesora externa: Dra. Silvia Guzmán Beltrán No. Ced.4677035



**Lugar de realización:** Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael  
Cosío Villegas

**Fecha de inicio:** 03/12/2024

**Fecha de término:** 03/06/2025

## **Introducción**

La tuberculosis pulmonar activa (TB) es una de las principales causas de la morbilidad y mortalidad a nivel mundial, especialmente en poblaciones vulnerables. Esta enfermedad desencadena una compleja respuesta inmune en la que diversas moléculas como especies reactivas de oxígeno, así como proteínas y péptidos antimicrobianos desempeñan un papel fundamental en la defensa del organismo.

En este contexto la proteína con actividad bactericida BPI (por sus siglas en inglés Bactericidal/Permeability-Increasing protein) ha despertado interés científico por sus propiedades antimicrobianas y su potencial para disminuir la respuesta inflamatoria exacerbada. Comprender su comportamiento durante la TB podría ofrecer nuevas alternativas para mejorar el pronóstico de los pacientes.

Por otro lado, los lisados bacterianos comerciales han demostrado ser potentes inmunoestimulantes que fortalecen las defensas del organismo frente a infecciones respiratoria. Evaluar específicamente su efecto inductor sobre la expresión de BPI y efecto anti-inflamatorio es una estrategia prometedora que podría abrir nuevas vías para el tratamiento de la TB.

Durante este periodo se evaluará la expresión de BPI en presencia de lisados bacterianos utilizando técnicas como Western Blot, microscopia de fluorescencia y un modelo celular utilizando monocitos diferenciados a macrófagos (MDM) aislados de sangre periférica humana. El desarrollo de estas actividades se basa en los conocimientos adquiridos en los módulos cursados en la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica.

### **Beneficio Social:**

- Fomentar la investigación en prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de enfermedades respiratorias.
- Impartir posgrados y capacitar a personal de salud en este campo.
- Brindar atención médica especializada en enfermedades respiratorias.

### **Justificación**

El presente protocolo se enmarca en la necesidad de profundizar en el estudio de la proteína BPI y su papel en la respuesta inmune durante la TB pulmonar activa, así como la evaluación de lisados comerciales sobre la expresión de esta proteína.

Este proyecto permitirá integrar y aplicar los conocimientos adquiridos en la carrera de Química Farmacéutica Biológica, particularmente en los siguientes módulos:

### **Prevención y control de la propagación microbiana:**

Durante la estancia de servicio social se abordarán conceptos clave sobre microbiología, inmunología y técnicas de bioseguridad lo que resulta de suma importancia para el manejo de cultivos celulares, aislamiento de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells), obtenidas de paquetes leucocitarios del banco de sangre institucional. Luego, a partir de PBMC la obtención de monocitos por técnicas inmunológicas y su posterior diferenciación a macrófagos. Esto proporciona las bases para la manipulación segura de muestras biológicas y agentes microbianos, garantizando el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio durante los experimentos.

### **Obtención de metabolitos de interés industrial para la salud:**

Este módulo brinda herramientas para comprender los procesos de producción, purificación y caracterización de compuestos biológicos, de igual forma da el conocimiento. Para optimizar el diseño experimental como es en las técnicas de Western Blot y microscopía de fluorescencia.

La combinación de ambos módulos proporciona bases teóricas y prácticas necesarias para el correcto desarrollo del protocolo, garantizando el cumplimiento de los objetivos planteados y ayudando a fortalecer la formación integral de áreas como el control biológico. Este proyecto no solo permitirá aplicar los conocimientos adquiridos en la licenciatura, sino que también contribuirá al desarrollo de la investigación.

### **Marco teórico**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. La TB es considerado uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2023 se registraron aproximadamente 10 millones de casos y cerca de 1.5 millones de muertes relacionadas a dicha enfermedad (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>).

Durante la TB pulmonar activa se desencadena una respuesta inflamatoria exacerbada lo que genera daño al tejido pulmonar, lo que causa una mala calidad de vida en los pacientes, aún después de meses de haber controlado la infección.

Por otro lado, la proteína BPI tiene efecto bactericida sobre bacterias Gram negativas, su modo de acción principal es unirse a lipopolisacáridos de la pared celular generando alteración de la membrana externa, inhibiendo así el crecimiento bacteriano y disminuyendo la inflamación exacerbada durante la infección por este grupo de bacterias (Weiss et al. 2013).

El sistema inmunológico es la red de células, tejidos y órganos encargados de defender al organismo frente a infecciones y otros agentes patógenos, dentro de este sistema los macrófagos desempeñan un papel clave en la respuesta inmune, por ello la obtención de monocitos y su diferenciación a macrófagos es una técnica fundamental en la investigación para evaluar dicha respuesta (Zhang, X at. 2017).

Por otro lado, en un estudio se evaluó las propiedades antimicobacterianas y de regulación inmunológica de BPI en macrófagos humanos infectados con *M. tuberculosis*. Los resultados mostraron que BPI recombinante se internaliza en los

macrófagos infectados y se reduce significativamente el crecimiento intracelular, además de inhibir la producción de la citocina proinflamatoria TNF-alfa. Lo que sugiere que BPI tiene efectos bactericidas directos y potenciando la respuesta inmune en macrófagos humanos (Guzmán-Beltran, 2024). Por lo que, la BPI podría asociarse a mecanismos de defensa generando un impacto positivo para la evolución de la TB disminuyendo la carga bacteriana y disminuyendo la inflamación exacerbada. Es posible que la inducción de esta proteína durante la infección podría contribuir a la mejora del paciente y aumentar su calidad de vida.

Por otro lado, los lisados bacterianos comerciales son preparaciones obtenidas a partir de bacterias patógenas que han sido fragmentadas mecánicamente o degradadas químicamente que contienen componentes bacterianos que, al ser administrados, puedes estimular el sistema inmunológico del huésped aumentando la expresión de proteínas y péptidos antimicrobianos durante una infección (Esposito, S. 2019). Es posible que el uso de lisados bacterianos comerciales podría ser una estrategia terapéutica adyuvante en un modelo celular, con el fin de inducir la producción de BPI, reducir la carga bacteriana y disminuir la producción de citocinas proinflamatorias para reducir el daño inflamatorio.

### **Métodos de análisis de expresión de BPI**

Para evaluar la presencia de BPI y algunas citocinas proinflamatorias, se utilizarán diversas técnicas, entre ellas destaca el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) donde se emplea el formato sándwich que ofrece alta especificidad y sensibilidad con la captura del antígeno; un anticuerpo específico contra BPI se inmoviliza en una placa de microtitulación, un segundo anticuerpo biotinilado se introduce para unirse al complejo antígeno-anticuerpo para con esto al adicionar un conjugado de estreptavidina-peroxidasa produzca una señal colorimétrica proporcional a la cantidad de BPI en la muestra.

El western Blot es una técnica ampliamente utilizada para detectar y cuantificar proteínas específicas en muestras biológicas, la separación de proteínas mediante electroforesis, seguida de transferencia a membranas de nitrocelulosa o PVDF, el resultado se visualiza mediante inmunodetección y desarrollo de quimioluminiscencia

proporcionando información precisa sobre la presencia y concentración de la molécula de interés en diferentes condiciones experimentales (Moritz, C.2020).

En la microscopia de fluorescencia se utilizan fluoroforos para marcar moléculas de interés, permitiendo su visualización con alta especificidad y sensibilidad, la fluorescencia permite detectar incluso pequeñas cantidades de BPI esta se puede visualizar fijando las células para preservar su estructura y posteriormente siendo permeabilizadas para permitir la entrada de anticuerpos, lo que proporciona información para estudiar la distribución y función de BPI en células tratadas con lisados bacterianos (Lichtman,J.2005).

### **Objetivo general**

Contribuir al desarrollo de la investigación en la evaluación de la expresión de la proteína BPI en macrófagos humanos mediante técnicas de Western Blot, microscopia de Fluorescencia y detección de BPI en muestra de pacientes con TB por ELISA, con el fin de aportar al avance del conocimiento en inmunología y microbiología.

### **Objetivos específicos**

- Manipulación de cultivos primarios de células, primero la separación de PBMCs y a partir de éstas la purificación de monocitos y su posterior diferenciación a macrófagos.
- Evaluar el efecto inductor de lisados bacterianos comerciales sobre la expresión de BPI en macrófagos humanos con y sin infección con *M. tuberculosis* por técnicas de microscopia de EPI fluorescencia.
- Desarrollar y optimizar el ensayo de Western Blot para la detección de BPI, en macrófagos humanos tratados con lisados bacterianos comerciales. Este ensayo incluye electroforesis, transferencia en membrana y revelado de la proteína BPI por inmunodetección.
- Implementar la técnica de ELISA para la detección de BPI en muestras de pacientes con TB pulmonar activa.

## Metodología



## Análisis de resultados

Mediante análisis de Western Blot, se observó un incremento en la expresión de la proteína BPI (Bactericida/Permeability-Increasing protein) en macrófagos humanos tratados durante 48 horas con distintos lisados bacterianos, en comparación con el control sin tratamiento. Las bandas correspondientes a BPI mostraron mayor intensidad en las condiciones tratadas con lisados, y se utilizó la actina (ACT) como control de carga, al ser una proteína de expresión constitutiva. La cuantificación relativa, expresada como veces de expresión respecto al control, confirmó este aumento, siendo estadísticamente significativo en los tratamientos con PUL, URO y LMtb (\*p < 0.05). Estos hallazgos indican que la estimulación con lisados bacterianos induce la expresión de BPI en macrófagos, lo cual sugiere un papel importante de esta proteína en la respuesta inmunitaria frente a componentes bacterianos.

El incremento en la expresión de BPI podría estar relacionado con la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los TLRs, que detectan componentes bacterianos presentes en los lisados. La inducción de BPI probablemente forma parte de una respuesta antimicrobiana natural del sistema inmune innato, lo que respalda el potencial inmunomodulador de estos lisados como adyuvantes terapéuticos en infecciones respiratorias, como la tuberculosis.

A través de microscopía de fluorescencia, se analizó la localización subcelular de BPI endógena en macrófagos derivados de monocitos (MDM) tratados con lisados bacterianos durante 24 horas. En ausencia de infección, los macrófagos tratados con lisados mostraron una mayor señal de fluorescencia verde, correspondiente a BPI, especialmente en los grupos tratados con ISM y URO. En contraste, en el grupo control (Medium), la señal fue muy tenue o inexistente, lo que indica una baja expresión basal. Estos resultados sugieren que el tratamiento con lisados bacterianos induce la producción endógena de BPI, incluso sin la presencia de un patógeno, lo cual apunta a un efecto directo de estos lisados sobre los macrófagos.

En condiciones de infección con *Mycobacterium tuberculosis*, también evaluadas mediante microscopía de fluorescencia, se observó una ecolocalización parcial entre la señal roja correspondiente a la bacteria y la señal verde de BPI, principalmente en las células tratadas con lisados PUL e ISM. Esta observación sugiere una posible interacción directa de BPI con la bacteria dentro de los macrófagos. La infección con *M. tuberculosis* podría potenciar la expresión o relocalización de BPI, y el tratamiento previo con lisados bacterianos parece favorecer esta respuesta. Estos datos apoyan la hipótesis de que BPI podría actuar como un mediador antimicrobiano directo o como modulador de la respuesta inflamatoria inducida por la infección.

Finalmente, se realizó un ensayo tipo ELISA en suero para cuantificar la concentración total de BPI en pacientes con tuberculosis pulmonar activa y en voluntarios sanos. Los resultados mostraron que los pacientes con tuberculosis presentaban concentraciones significativamente más altas de BPI en suero en comparación con los controles. A pesar de la variabilidad interindividual, el incremento fue estadísticamente significativo

en la población infectada. Esto sugiere que la tuberculosis pulmonar activa se asocia con un aumento sistémico de BPI, probablemente como parte de una respuesta inmune compensatoria para controlar la infección y la inflamación. Estos hallazgos refuerzan el valor potencial de BPI como biomarcador de infección activa y sugieren que su medición podría tener utilidad clínica tanto en el seguimiento de la enfermedad como en la evaluación de terapias inmunomoduladores.

## **Discusión**

Los hallazgos obtenidos en este proyecto respaldan la hipótesis planteada en el protocolo, que sugiere un papel funcional importante de la proteína BPI durante la tuberculosis pulmonar activa. La evidencia indica que los lisados bacterianos comerciales son capaces de inducir significativamente la expresión de BPI en macrófagos humanos, incluso en ausencia de infección, lo cual es indicativo de su efecto inmunoestimulante directo.

La presencia aumentada de BPI en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, especialmente en condiciones pretratadas con lisados, sugiere que dicha proteína podría actuar en la contención intracelular del patógeno, tal como ha sido reportado por Guzmán- Beltrán et al. (2024), quien demostró que BPI recombinante inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* y reduce la producción de TNF- $\alpha$ . De manera similar, en este estudio, la ecolocalización parcial entre BPI y *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos tratados refuerza el potencial efecto antimicobacteriano de esta proteína. Por otro lado, los niveles elevados de BPI en suero de pacientes con TB activa observados mediante ELISA apuntan a una respuesta sistémica compensatoria del sistema inmune. Esta elevación podría estar relacionada con un intento del organismo por limitar la replicación bacteriana y reducir el daño inflamatorio característico de la tuberculosis pulmonar.

La capacidad de los lisados bacterianos de activar receptores como los TLRs y promover la expresión de proteínas antimicrobianas como BPI, los posiciona como una estrategia terapéutica adyuvante prometedora en enfermedades infecciosas crónicas. Además, el hecho de que BPI pueda ser cuantificada en suero refuerza su valor como biomarcador para diagnóstico o monitoreo de la evolución clínica de pacientes con

tuberculosis.

## **Conclusión**

La presente investigación integró herramientas de biología celular, inmunología y técnicas moleculares para evaluar el papel funcional de la proteína BPI en el contexto de la tuberculosis pulmonar activa. Los resultados muestran que la proteína BPI se expresa en mayor cantidad en macrófagos humanos tratados con lisados bacterianos comerciales, lo cual demuestra su capacidad inmunoestimulante y su participación en la activación del sistema inmune innato.

De forma notable, la expresión de BPI se incrementó incluso en ausencia de infección, y se intensificó en condiciones de infección por *Mycobacterium tuberculosis*, particularmente cuando los macrófagos fueron pretratados con lisados bacterianos. Esta observación sugiere un efecto sinérgico entre la estimulación previa y la exposición al patógeno, fortaleciendo la hipótesis de que BPI podría actuar como un mediador en la respuesta antimicobacteriana intracelular.

Asimismo, la ecolocalización parcial de BPI con *M. tuberculosis* en macrófagos infectados, y el incremento significativo de sus niveles en suero de pacientes con tuberculosis activa, apoyan su relevancia biológica y clínica. Estos hallazgos respaldan el potencial de BPI como biomarcador de infección activa y como posible blanco terapéutico en el diseño de estrategias inmunomoduladores.

En conjunto, este trabajo contribuye al entendimiento de los mecanismos de defensa del hospedero frente a infecciones respiratorias crónicas, y plantea nuevas perspectivas sobre el uso de lisados bacterianos como adyuvantes terapéuticos que podrían potenciar la respuesta inmune y mejorar el pronóstico de pacientes con tuberculosis.

## Bibliografía

- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Esposito, S., Soto-Martínez, M. E., Feleszko, W., Jones, M. H., & Shen, K. L. (2019). Immunostimulants in respiratory diseases: focus on OM-85. *Frontiers in Pediatrics*, 7, 431. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00431>
- Guzmán-Beltrán, S., Juárez, E., Cruz-Muñoz, B. L., Páez-Cisneros, C. A., Sarabia, C., & González, Y. (2024). La proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI) inhibe Mycobacterium tuberculosis Crecimiento. *Biomoléculas*, 14(4), 475. <https://doi.org/10.3390/biom14040475>
- Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2(12), 910-919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>
- Moritz, C. P. (2020). 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *Journal of Proteomics*, 212, 103575. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103575>
- Weiss, J., & Olsson, I. (2013). The role of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in host defense against Gram-negative bacterial infections. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(5), 863-870. <https://doi.org/10.1189/jlb.0912468>
- Zhang, X., Zhivaki, D., & Lo-Man, R. (2017). A modified Ficoll-Paque gradient method for isolating mononuclear cells from the peripheral and umbilical cord blood of humans for biobanks and clinical laboratories. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 31(6), e22199. <https://doi.org/10.1002/jcla.22199>