



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

“Efecto de los antígenos de Mycobacterium  
tuberculosis LprG y PE\_PGRS33 en  
neutrófilos de pacientes con Lupus  
Eritematoso”

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Presenta:

Jonatan Alejandro Mendoza Ortega

Director de tesis

M. en C. Oscar Rodríguez Espinosa

Co-asesor interno

M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto de los antígenos de Mycobacterium tuberculosis LprG y PE\_PGRS33 en neutrófilos de pacientes con Lupus Eritematoso.

Que presenta el pasante: Jonatan Alejandro Mendoza Ortega  
Con número de cuenta: 309168856 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Julio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>M. en C. Erik González Ballesteros</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>M. en C. Paola Edith Briseño Lugo</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

## **Agradecimientos**

Agradezco en primer lugar a las personas que ni en buenas ni en malas me dejaron, encabezando en mi cielo siempre a mi madre que sin su ayuda y apoyo jamás podría llegar hasta donde estoy, por ti siempre adelante mami. A mi padre que sabe que en mí llevo más que su imagen y genio, porque nunca me dejó solo y me dio ejemplo de profesionalidad. A mi hermana que me apoyó a su manera siempre.

A Oscar que fue más que un asesor, se convirtió en gran parte en un guía y en un amigo, (me enseñaste a creer en mí más de lo que ni yo podía imaginar) a la maestra Ana Laura que a mí como a todos siempre mostró su apoyo y completa disposición y apoyo para lograr éste paso.

## **Dedicatorias**

Lo dedico al camino que pase para lograrlo, porque conocí lo más profundo, la desesperación, pero así también el cielo y la hermosa Luna y al conejito que nunca me dejaron y me aportaron un mundo de saber a su manera y modificaron la mía, Y dedico mi trabajo a todos los que acompañaron mi camino.

# Índice

	Página
1. Índice.....	5
2. Índice de figuras.....	6
3. Índice de acrónimos y abreviaturas.....	7
4. Resumen.....	11
5. Introducción.....	12
5.1. Lupus Eritematoso Sistémico.....	12
5.1.1. Factores predisponentes al LES.....	13
5.1.2. Inmunopatología del LES.....	14
5.2. Neutrófilos.....	14
5.2.1. Trampas extra celulares de neutrófilos (NETs).....	16
5.2.2. Activadores.....	19
5.2.3. Receptores estimulantes.....	19
5.3. Neutrófilos en enfermedades autoinmune.....	20
5.4. Mitocondria.....	24
5.4.1. Metabolismo y dinámica mitocondrial.....	26
5.5. Enfermedades autoinmunes con presencia de microorganismos.....	30
5.6. Mycobacterium tuberculosis.....	32
6. Hipótesis.....	35
7. Objetivo.....	35
8. Justificación.....	35
9. Material y métodos.....	36
10. Resultados.....	39
11. Discusión.....	50
12. Conclusiones.....	54
13. Referencias.....	55
14. Anexos.....	57

## Índice de figuras

	Página
1. Subtipos descritos de neutrófilos reguladores (RN) y sus principales mecanismos de acción.....	16
2. Papel de las NETs en las infecciones y en procesos no infecciosos.....	18
3. Activación y control de la NETosis .....	23
4. Movilización de calcio mitocondrial.....	24
5. Diversas actividades metabólicas de la mitocondria.....	25
6. Dinámica mitocondrial.....	26
7. Mecanismo de fisión, fusión y transporte mitocondrial.....	29
8. Estructura y localización de las proteínas micobacterianas.....	34
9. Leucocitos en sangre total de pacientes con LES.....	39
10. Porcentaje de las diferentes estirpes celulares en el conteo de leucocitos totales en sangre total de pacientes con LES.....	40
11. Estandarización de MitoTracker®.....	41
12. Antígenos microbianos si actividad marcada en pacientes sanos.....	43
13. Los antígenos micobacterianos modifican la producción de ROS mitocondriales.....	44
14. Actividad de ROS mitocondrial por grupo analizado.....	45
15. Los antígenos micobacterianos modifican la movilización de calcio mitocondrial de neutrófilos de pacientes con LES.....	46
16. Movilización de calcio por medida de tiempo.....	47
17. El potencial de membrana mitocondrial no se modifica con los antígenos micobacterianos.....	48
18. Análisis estadístico de la movilización de calcio en mitocondria.....	49
19. Actividad de antígenos microbianos comparados en pacientes con LES y sanos.....	52

## Índice de acrónimos y abreviaturas

A	Páginas
Ácido desoxirribonucleico= DNA.....	(11, 17, 20, 23, 27 y 50)
Ácido Ribonucleico= ARN	
Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos= ANCA.....	20
C	
Calciolipina= CL.....	27
Células dendríticas=DC.....	(21 y 31)
Célula supresora derivadas de línea granulocítica mieloide= G-MDSC.....	16
Células T cooperadoras= Th.....	(14, 30 y 31)
Células T reguladoras= Treg.....	(14, 30 y 31)
Células T citotóxicas= Tc	
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos= TCA	
Complejo principal de histocompatibilidad= MHC.....	13
Clúster de diferenciación= CD.....	(15, 16, 19, 20, 31 y 51)
D	
Dinamina mitocondrial tipo GTPasa = Opa.....	(27, 28, 29 y 33)
DNA mitocondrial= DNAm.....	27
E	
Enzima peptidilarginina desaminasa 4= PAD4.....	(17 y 23)
Especies Reactivas de oxígeno= ROS (11, 13, 17, 14, 20, 21, 23, 24, 26, 32, 33, 43, 44, 45, 50, 52, y 53)	



## F

Factor activador de células T= NFAT.....	51
Factor de activación de células B = BAFF.....	(21 y 22)
Factor de elongación mitocondrial= Mief.....	27
Factor de necrosis tumoral= TNF.....	(14, 19, 21 y 33)
Factor estimulante de colonia granulocítico-macrofago= GM-CSF.....	19
Factor nuclear B= NF- B.....	(19 y 23)
Forbol miristato acetato: PMA.....	(19 y 20)

## G

Ganglios linfáticos mesentéricos= MLN.....	(30 y 31)
Granulocito de baja densidad= LDG.....	(16, 20 y 21)
Guanín trifosfato= GTP.....	27

## H

Hormona folículo-estimulante= FSH.....	31
Hormona leutinizante= LH.....	31

## I

Interferón= INF.....	14
Interleucina= IL.....	(14, 19, 21, 30, 31, 32 y 35)

## L

Leucocitos polimorfonucleares= PMN.....	(16 y 33)
Ligando de membrana proteinasa 3= mPR3.....	20
Ligando inductor de proliferación= APRIL.....	21
Lipopolisacaridos= LPS.....	19
Lipoproteína de baja densidad oxidada= oxLDL.....	19

LprG= p27 .....52

Lupus Eritematoso Sistémico = LES

## M

Macrófagos alveolares= AM.....33

Moléculas asociadas a Patógenos= PAMPS.....15

Muerte celular por formación de trampa extra celular de neutrófilos=  
NETosis..... (11, 16, 17, 19, 20, 21, 23 y 32)

*Mycobacterium tuberculosis* = Mtb..... (11, 32 y 51)

## N

Neutrófilos reguladores= NR

Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato= NADPH.....17

NADPH oxidasa 2= NOX2..... (20, 21 y 22)

## P

Patrones moleculares asociados a daño= DAMPS.....15

PE\_PGRS33= p33.....52

Polimorfismos de un solo nucleótido= SNP..... (13 y 50)

Proteína asociada a diferenciación inducida por gangliósido= Gdap.....27

Proteína cinasa C= PKC..... (20 y 23)

Proteína citosólica con necesidad de reclutamiento de membrana externa=  
OMM.....27

Proteína de choque térmico= Hsp.....33

Proteína de diferenciación primaria mieloide 88 = MyD88.....11

Proteína de fisión = Fis

Proteína de proceso mitocondrial= Mtfp.....27

Proteína del grupo 1 de alta movilidad= HMGB1

Proteína tipo dinamina = Dnml

## R

Receptor de quimiocina tipo 4= CXCR4.....	(16 y 31)
Receptor de reconocimiento de patógenos= PRR.....	19
Receptor de superficie celular= ERK.....	(19 y 23)
Receptor tipo toll= TLR.....	(14, 16, 19, 21, 23, 31, 32 y 33)
Revoluciones por minuto= rpm.....	36

## T

Tampón de fosfato salino= PBS.....	(36 y 37)
Trampas extracelulares de neutrófilos= NETs (10, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 32, 33 y 50)	

## V

Virus de hepatitis B= VHB.....	30
Virus de inmunodeficiencia Humana= HIV.....	19

## Resumen

En los últimos años las enfermedades autoinmunes han aumentado en Latinoamérica, en el caso particular de México, el lupus eritematoso sistémico (LES) es uno de los padecimientos con mayor prevalencia. El LES es una enfermedad multifactorial, crónica, que afecta la calidad de vida de las personas, donde la carga genética y el sistema inmune tienen una participación crucial en el desarrollo de la enfermedad.

Hasta el momento, no existe ningún tratamiento que llegue a la remisión de la enfermedad, sólo se ha tratado con fármacos modificadores, como lo son corticoides, antiinflamatorios no esteroideos y productos biológicos, por lo que el uso de inmunomoduladores ha tenido un auge en los últimos años.

Al parecer, los neutrófilos tienen un papel importante en la generación de autoantígenos para el desarrollo del LES, se pueden encontrar anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilo, elastasa, doble cadena de DNA o histonas citrulinadas, estos dos últimos podrían provenir de la generación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés). Las NETs tienen la capacidad de inmovilizar diversos microorganismos, y pueden o no producir la muerte de los mismos. Se conocen tres mecanismos distintos que disparan el proceso de NETosis, uno de ellos es iniciado por las mitocondrias.

También existen productos que son capaces de modificar la respuesta inmune, algunos provienen de microorganismos patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Éste bacilo causante de la tuberculosis, es capaz de evadir la respuesta inmune de múltiples formas, evasión del estallido respiratorio del oxígeno y nitrógeno, evita la unión fagosoma lisosoma, así como la activación de la vía MyD88. A inicios del año 2000 se supo que la liberación de citocromo C de la mitocondria estaba relacionado con la virulencia de Mtb, en el 2013 Moreno-Altamirano reportó que los antígenos de Mtb LprG y PE\_PGRS33 co-localizaban con la mitocondria, Aguilar-López demostró que estos antígenos tenían un efecto en la dinámica mitocondrial de macrófagos derivados de monocitos.

Sabiendo que en el LES las mitocondrias de los neutrófilos tienen una participación importante y que los antígenos micobacterianos pueden modificar la dinámica mitocondrial, en el presente trabajo se analizaron, mediante técnicas de microscopía y citometría, la dinámica y metabolismo mitocondrial de los neutrófilos provenientes de pacientes con LES estimulados con LprG y PE\_PGRS33, siendo éste último el que tiene un efecto mayor en la generación de ROS, sin embargo, ambos antígenos disminuyen la movilización de calcio mitocondrial y ninguno tiene efecto sobre el potencial de la membrana.

Los resultados de este trabajo abren la posibilidad de que las mitocondrias de estos pacientes sean un posible blanco terapéutico con estos antígenos, además de poder profundizar en el papel que ellas tienen en éste tipo de enfermedades.

# Introducción

## 5.1. Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es considerada una enfermedad autoinmune multisistémica muy compleja, caracterizada por generar alteraciones en la tolerancia o reconocimiento y rechazo a lo propio, generándose una respuesta autoreactiva con presencia de autoanticuerpos y formación de complejos inmunes. (Ali Khan, 2017)

Esta enfermedad tiene una prevalencia mundial que oscila de 20 a 150 por cada 100,000, teniéndose una mayor prevalencia en personas asiáticas, nativos australianos, afroamericanos e hispanos. La tasa de incidencia se ha elevado en los últimos años, relacionándose con la mejoras en las técnicas de diagnóstico aumentando la sobrevivencia de los pacientes con un 90% de estos alcanzando 10 años después del diagnóstico. Así también ha mejorado el tratamiento generalmente combinado de esteroides con inmunosupresores, así como la utilización de diálisis y trasplantes renales. (Ali Khan, 2017) Más del 50% de pacientes de LES sufren de inflamación renal o nefritis lúpica (NL) que es la principal causa de muerte por LES. Los tratamientos actuales son principalmente inmunosupresores no selectivos, mientras que la inmunosupresión puede tratar eficazmente los síntomas, el uso de dichos fármacos se relaciona con efectos adversos importantes, que son de las principales preocupaciones en esta enfermedad. De igual manera los pacientes que consumen a largo plazo inmunosupresores suelen ser propensos a infecciones. (Mu. 2017)

La piel representa el segundo órgano más frecuentemente para las afectado del LES después de los daños articulares, las manifestaciones cutáneas ocurren en aproximadamente en el 80% de los pacientes durante el curso de la enfermedad, y cabe destacar que las manifestaciones cutáneas son usualmente el primer signo del LES en hasta el 25% de los casos (Ribero, 2017)

La afección de tipo cutánea se observa a menudo en pacientes con LES, y se clasifica en manifestaciones cutáneas bi-específicas y las no específicas, dependiendo de la presencia de una dermatitis subcutánea facial en la evaluación histopatológica, por lo tanto la clasificación adecuada de las características cutáneas típicas o más inusuales es crucial para el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes afectados con manifestaciones cutáneas inespecíficas. Las manifestaciones cutáneas inespecíficas del lupus eritematoso son amplias y heterogéneas, como la alopecia sin cicatrices y diferentes tipos de alteraciones vasculares asociadas a la forma variable del LES. (Ribero, 2017)

### 5.1.1. Factores predisponentes al LES

En el desarrollo del LES existen diversos factores asociados o predisponentes, por ejemplo, se ha reportado que las mujeres son las más afectadas y constituyen el 80-90% de los casos reportados, por lo que es probable que el factor hormonal juegue un papel decisivo en el establecimiento de la enfermedad (Ali Khan, 2017). Confirma esta idea también el hecho de que otros estudios realizados en niños, los cambios hormonales parecen críticos en la aparición de esta autoinmunidad, pues hormonas como el estrógeno poseen propiedades antiinflamatorias o proinflamatorias en diferentes condiciones (Ali Khan, 2017; Ramsey-Goldman & Manzi, 2000).

La alimentación se ve también implicada: las vitaminas, el exceso o restricción calórica, la composición de ácidos grasos poliinsaturados, el consumo excesivo de sodio y los compuestos que contienen hormona exógena influyen en los signos clínicos y en las respuestas celulares del sistema inmune, la vitamina D, los ácidos grasos omega-3 y el ácido linoleico conjugado parecen tener efectos beneficiosos sobre algunos parámetros del lupus, mientras que altos niveles de vitamina E, ácidos grasos omega-6, una moderna "dieta occidental" y altos niveles de las adipocinas circulantes pueden exacerbar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Los fitoestrógenos comúnmente consumidos ejercen efectos complejos y diferenciales, lo que conduce a la regulación o exacerbación de los signos clínicos del LES. La modulación del sistema inmune a través de la intervención dietética para promover la regulación de la respuesta puede formar un tratamiento adyuvante para reducir los signos de LES tanto para el mantenimiento como durante los brotes de enfermedad, al tiempo que disminuye las dosis necesarias de medicamentos sistémicos. (Luo, 2017)

Existen factores predisponentes en el genoma; dentro de los genes involucrados se encuentran los relacionados con la vía de señalización del interferón siendo estos IRF5, IF1H1 y STAT4 (Ali Khan, 2017). Otros genes involucrados son con los de la vía del complemento así como la producción de la endonucleasa 3', así como la alta presencia de SNP en la región que codificación para el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) incluyendo HLADR2, HLADR3, y HLA-DRB1 (Barcellos, May, & Ramsay, 2009).

También existen diferentes factores tóxicos y ambientales predisponentes para el desarrollo del LES, dentro de los principales se encuentra el consumo de tabaco, alcohol, exposición a luz ultra violeta, agentes infecciosos (véase más adelante) y algunos fármacos. (Ali Khan, 2017)

### 5.1.2. Inmunopatología del LES

La principal característica del LES es la presencia de linfocitos B productores de autoanticuerpos, éstas células son estimuladas por linfocitos T mediante la alta expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$ , producción e INF- $\gamma$ . La producción de anticuerpos también se eleva debido a otras moléculas que son capaces de inhibir la muerte celular por apoptosis. La acumulación y actividad de estos anticuerpos desencadenan la patogenia que se presenta en diversos tejidos (Ali Khan, 2017).

En el LES también se presentan otras alteraciones o anomalías inmunológicas como una activación exacerbada del sistema del complemento, la deficiencia en la eliminación de complejos inmunes que al depositarse en los tejidos conduce a lesiones en los mismos por actividad de la respuesta inmune innata (vía de receptores Tipo Toll (TLR)) y por activación atípica de linfocitos T y B (Ribero, 2017)

Los IFN de tipo 1 se han relacionado también como un riesgo de tipo genético en el desarrollo del LES, puesto que estas citocinas ejercen varios efectos biológicos, incluyendo la activación de células dendríticas, la diferenciación de monocitos a células presentadoras de antígeno y de linfocitos B a células plasmáticas, estimuladas por la vía Th1, inhibición de la apoptosis de T citotóxicos activados y la supresión de las Treg. (Ribero, 2017)

## 5.2. Neutrófilos

Dentro de la patogenia del LES se ven implicados en gran medida los neutrófilos, estos son las células polimorfonucleares con mayor abundancia en la sangre (60% en leucocitos). (Moreno, 2017)

Estas células se han clasificado como una población bastante homogénea, siendo importantes pro inflamatorias, de migración rápida (Martins, 2017) consideradas como la primera línea de respuesta de la inmunidad innata frente a agentes infecciosos, reportados por primera vez por Ilya Ilych Mechnikov. Años después Carl Friedrich Claus describió el término de fagocitosis asociado al proceso de ingestión de patógenos por células inmunes. (Moreno, 2017). La alta eficiencia de los neutrófilos frente a agentes infecciosos se debe principalmente a la serie de factores con los que cuenta para combatirlos. El mecanismo más conocido es la fagocitosis, que consiste en la captura de células patógenas, su internalización y eliminación dentro de los fagolisosomas. Este mecanismo a pesar de su alta eficiencia y bajos efectos secundarios para el hospedero suele ser eficiente para combatir las infecciones bacterianas comunes, sin embargo, en el caso de infecciones con alta carga bacteriana o con patógenos de un tamaño superior resulta insuficiente (de Oliveira, 2016).

Para la identificación de neutrófilos humanos se utiliza la identificación morfológica, siempre relacionada a una inspección visual que debe identificarse como una célula con una banda o un núcleo hipercromico con un citoplasma lleno de gránulos (Martins, 2017). Con el desarrollo de nuevos marcadores de superficie identificados en citometría de flujo, incluso identificando diferencias fenotípicas en neutrófilos circulantes y aquellos ya activados como lo son:

Siendo los marcadores más mencionados los CD11b, CD16 y CD62L, también nuevos marcadores identificados como lo son CDw198, CDw199, CD322 y CD328 (Lakschevitz, 2016).

Anteriormente se creía que la vida media de los neutrófilos era de 24 horas en humanos y 8 horas en ratones, sin embargo, en estudios recientes con agua tritiada, demostraron que los neutrófilos humanos en condiciones de homeostasis presentan una vida de 4 o 5 días, se piensa que la diferencia se debe a la manipulación “*ex vivo*” de neutrófilos, afectando su vitalidad y distribución “*in vivo*”. Esta vida alargada contribuye a condiciones para desarrollar alteraciones fenotípicas y funcionales, incluyendo la secreción de un buen perfil de citocinas, esta vida media puede estar condicionada por factores como condiciones inflamatorias, las citocinas en su medio, infecciones celulares PAMPS y DAMPS, que podrían inhibir la apoptosis y prolongar su vida o disminuirla. Por estas alteraciones con todo tipo de estímulos sugiere la presencia de nuevos subtipos reguladores. (Martins, 2017)



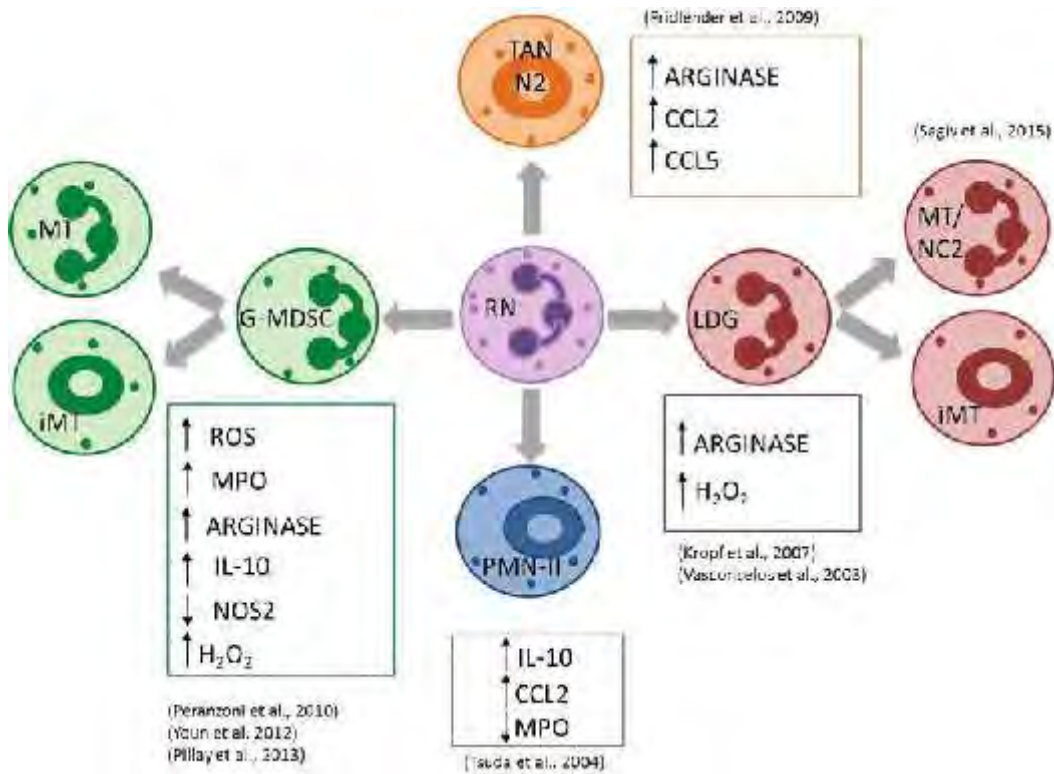


Figura 1. Subtipos descritos de neutrófilos reguladores (RN) y sus principales mecanismos de acción. TAN-N2 (neutrófilo asociado al tumor tipo 2); G-MDSC (célula supresora derivada mielóide granulocítica); PMN - II (Polimorfonuclear tipo II); LDG (granulocito de baja densidad); NC2 (neutrófilos circulantes tipo 2); MT (maduro); IMT (inmaduro) (Martins, 2017).

Existe un perfil poco común de neutrófilos en enfermedades autoinmunes, de los cuales podemos destacar el fenotipo de neutrófilos envejecidos o senescentes. Este subconjunto particular expresa CXCR4 en altas densidades (CXCR4 hi). CXCR4 media la retención celular en la médula ósea junto con la baja expresión de CD62L (CD62L low). Expresan alta CD11b y tienen núcleos hipersegmentados. Recientemente, se describió que los neutrófilos envejecidos son regulados por la microbiota en un receptor de tipo toll (TLR) (Casanova-Acebes, 2013)

### 5.2.1. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET)

Otra forma que utilizan los neutrófilos para la eliminación de patógenos es un mecanismo descrito en el 2004 por Brinkmann y colaboradores que involucra una red extracelular. Los cambios morfológicos de los neutrófilos asociados a la formación de NETs implica la descondensación de cromatina nuclear (Brinkmann, 2004). A este mecanismo se le conoce como “NETosis”, la cual causa cambios drásticos en la morfología de los neutrófilos que implica la descondensación de la cromatina, seguida por la lisis y liberación de contenido de gránulos y alteración de membrana celular para expulsión de material nuclear provocando una muerte

“programada” (Brinkmann, 2004). Sin embargo existen estudios que describen que en algunos casos forman y liberan las redes extracelulares sin la ruptura de membrana, en un proceso al que se le llamo “NETosis vital”. En algunos trabajos se ha sugerido que este procesos está más relacionado a la expulsión de DNA mitocondrial, con base en que es una menor cantidad de red la que se expulsa en comparación con la NETosis clásica (Zawrotniak, 2017).

La vía clásica para la formación de NETs se desencadena con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), resultante de la actividad de NADPH oxidasa. Esta vía dependiente de ROS tiene una actividad que dura aproximadamente 4 horas, mientras que la vía rápida conocida como NETosis vital es independiente de ROS (Rochae, 2015).

Un mecanismo recientemente informado para la inducción de NETosis, lo relaciona con la vía de activación de la autofagia, se menciona también que los neutrófilos no son las únicas capaces de formar trampas extracelulares, también se ha comprobado que células cebadas, eosinófilos y macrófagos (Luo, 2017).

Los principios moleculares que preceden a la liberación de las trampas extracelulares de todas estas células, al parecer son similares, pero en los neutrófilos, existe una diferencia notoria, y es que se liberan principalmente ácidos nucleicos tanto nucleicos como mitocondriales (Luo, 2017). Dependiendo del agente estimulante, la formación de las NETs está relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la explosión oxidativa y con la descondensación de la cromatina mediada por la peptidilarginil desaminasa 4 (PAD4) (Kienhöfer, 2017).

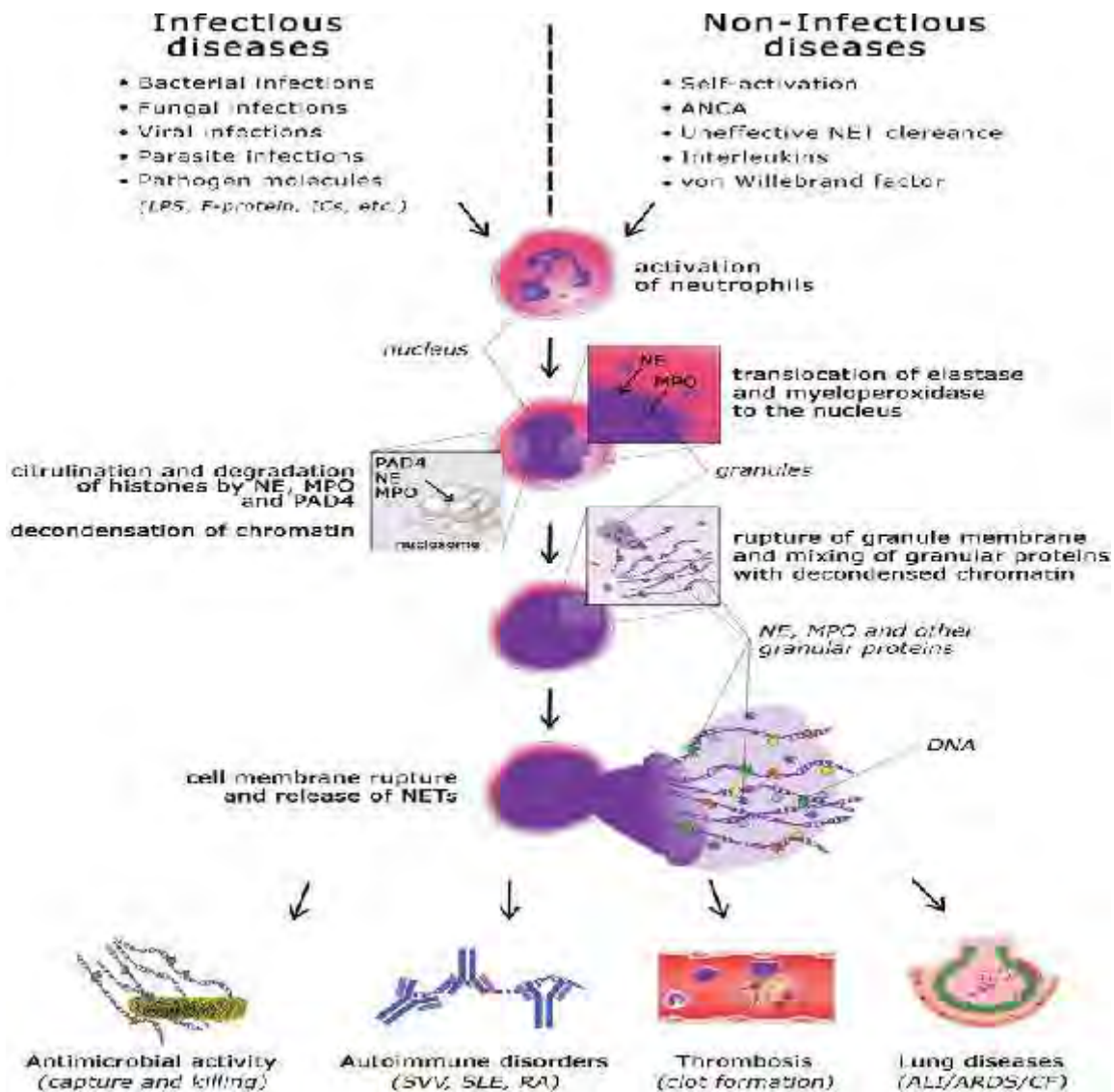


Figura 2. Papel de las NETs en las infecciones y en procesos no infecciosos. La activación de los neutrófilos puede darse por mecanismos endógenos (no infecciosos) y exógenos (infecciosos), dependiendo de cuál de ellos se trata, se induce la activación celular que tiene como consecuencia cambios nucleares y la expulsión de ácidos nucleicos, estos tienen funciones inmunológicas como actividad antimicrobiana en la captura y matanza de microorganismos, algunos desordenes como enfermedades autoinmunes, la formación de trombos y enfermedades pulmonares (Zawrotniak, 2017).

### 5.2.2. Activadores

Los mecanismos de producción de las NETs puede ser activada por muchas moléculas, principalmente por aquellas que se clasifican como antígenos de superficie de patógenos, este primer reconocimiento determina la liberación de las redes y las vías metabólicas involucradas, la intensidad y el tiempo de respuesta de los neutrófilos. (Zawrotniak, 2017) y también la interacción con diversos patógenos como lo son bacterias, hongos, así como organismos parasitarios (Hermosilla, 2014)

Los principales activadores de NETs son las bacterias clasificadas como patógenas, pero también algunos hongos como los géneros de *Aspergillus sp* y *Candida sp*, los virus como el HIV-1 y Hantavirus y parásitos protozoarios como *Toxoplasma gondii* y *Leishmania sp* (Hermosilla, 2014). La expulsión de redes extracelulares se ha asociado a factores presentes en la sepsis al mismo tiempo que el contenido de estas redes (histonas, el ADN y las proteínas de los gránulos) son reconocidos como DAMPs y estos intensifican la inflamación (Hu, 2017) Además de los microorganismos existen otros factores químicos, incluyendo el forbol miristato acetato (PMA), peróxido de hidrogeno, óxido nítrico, ionomicina, iones de calcio, glucanos, mananos y lipopolisacaridos (LPS), así como mediadores de inflamación tales como el factor estimulante de colonia granulocítico-macrofago (GM-CSF), algunas interleucinas y complejos inmunes que han sido identificado como posibles factores desencadenantes de la “NETosis” (Zawrotniak, 2017)

### 5.2.3. Receptores estimulantes

Para la activación de NETs se ven implicados varios estímulos pro inflamatorios como son el LPS, IL-8 y TNF (Remijsen, 2011), pero cada mecanismo requiere su receptor para activar a la célula. De los principales receptores activadores de NETs se encuentran los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) implicados en el reconocimiento de patógenos y moléculas asociadas a patógenos como son los receptores tipo Toll (TLR). Entre los principales TLRs involucrados se encuentran el TLR2, TLR4 y TLR7 (Zawrotniak, 2017).

La otra molécula implicada en la activación de NET a través de TLR es la proteína del grupo uno de alta movilidad (HMGB1). Por otra parte, una lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) es capaz de inducir la NETosis dependiente de ROS activado por TLR4 y TLR6 (Remijsen, 2011). Además de que pueden ser inducidas por la vía de NF- $\kappa$ B, a través de ERK, Akt, p38 (Camicia, 2014)

Otros de los receptores implicados en la NETosis son los receptores para anticuerpos (Fc), pero aún no se ha confirmado que los receptores de conocimiento de superficie (CD) CD32 o CD16, tengan un mayor impacto Los inductores de NET más conocidos a través de receptores Fc son los complejos inmunes (CIs). Algunos

estudios mostraron que Fc RIIa media la activación de la NETosis por endocitosis de los Cls. (Zawrotniak, 2017)

Se ha presentado en últimos trabajos que la lectina- 1 puede indirectamente mediar la NETosis dependiendo del tamaño del microorganismo. Los neutrófilos en contacto con *C. albican* o *Mycobacterium bovis* fueron capaces de inducir la NETosis. Se ha propuesto que la fagocitosis de microorganismos mediada por lectina-1 desempeña la función de regulador de NETosis, mediante la regulación negativa de la translocación de la elastasa desde el núcleo (Zawrotniak, 2017). Curiosamente, la regulación de la producción de NET por PMA utilizando modelos *in vitro* se produce sin la activación de receptores pero directamente por la acción sobre la proteína cinasa c (PKC), un importante mediador de la NETosis dependiente de ROS (Remijsen, 2011).

### **5.3. Neutrófilos en enfermedades autoinmunes**

Los neutrófilos no solo se encuentran en enfermedades infecciosas también se han visto implicados en diferentes enfermedades autoinmunes, como el LES. Los neutrófilos circulantes muestran una expresión aumentada de marcador específico CD177, tratándose de una molécula formada de gránulos secundarios específicos, que se co-expresa con su ligando de membrana proteinasa 3 (mPR3), en neutrófilos con pacientes de AVS (Kienhöfer, 2017).

El mPR3 es uno de los principales objetivos de los autoanticuerpos anti citoplasma de neutrófilos (ANCA) y, en este caso, CD177 es importante para la expresión de mPR3 que influye en el potencial de los neutrófilos a ser activado por los ANCA que normalmente se dirigen a mPR3. Sin embargo, los niveles de expresión de CD177 en pacientes y su influencia en ANCA no se han definido como biomarcadores de la enfermedad (Martins, 2017).

Se conoce una fuerte correlación entre una baja capacidad para producir ROS derivada de NADPH oxidasa 2 (NOX2) y una enfermedad autoinmune a partir de modelos de roedores con artritis, esclerosis múltiple, psoriasis y síndrome de Guillain-Barré. Una respuesta inflamatoria aumentada en ausencia de ROS también se ha observado en condiciones que no se consideran enfermedades autoinmunes clásicas, por ejemplo, en la inflamación inducida por cristal de urato de zimosano o monosódico. Esto indica que ROS también regula las vías inflamatorias independientes de células T. (Kienhöfer, 2017)

Es importante destacar que en el caso de LES, donde la respuesta se dirige contra los antígenos nucleares de diversos órganos como la piel, el riñón y las articulaciones, los neutrófilos han sido descritos como la fuente de antígenos de DNA. Además de los neutrófilos CD177<sup>+</sup> NB1, los granulocitos de baja densidad (LDG) son otra subpoblación, que se ha descrito en el LES. En concreto, en este

caso, los LDG pueden asumir un perfil altamente inflamatorio, incluida la liberación de NET, que amplifica la enfermedad fisiopatología. (Martins, 2017) la Fagocitosis y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), el cual es un proceso de muerte celular de neutrófilos en el cual el ADN se excluye con contenido citoplasmático (Nathan, 2006) Aunque es beneficiosa desde el punto de vista del hospedero-patógeno, la activación exagerada de estos neutrófilos se ha relacionado con la autoinmunidad, en particular con la enfermedad reumática del lupus eritematoso sistémico (Garcia-Romo, 2011)

En el LES, las anomalías de los neutrófilos se describieron hace más de 70 años con el descubrimiento de la células del lupus eritematoso (célula LE), un desprendimiento de neutrófilos de IgG y de los fragmentos nucleares opsonizados por complemento (Gullstrand, 2012). Los inmunocomplejos que contienen un ácido nucleico circulante (CI) participan en la patogénesis del LES a través de la activación de FcγR y el complemento, y también mediante la interacción de TLR intracelular. Recientemente se demostró que los CI que contienen RNP que causan que los neutrófilos liberen ADN mitocondrial oxidado durante NETosis. Los neutrófilos humanos expresan todos los TLR excepto TLR3, con TLR8 en lugar de TLR7 que es el receptor de ARN de cadena sencilla más expresado. (Lood, 2017)

En el LES se sabe que los neutrófilos generan daños a través de una respuesta aberrante de células dendríticas (DC) plasmacitoides. Los componentes específicos de los neutrófilos están dirigidos por autoanticuerpos en el 10-20% de los pacientes con LES, probablemente debido a una alta tasa de recambio de neutrófilos, deterioro de la depuración de las células moribundas y elevada propensión a la formación de NETs. Así como células dendríticas DC plasmacitoides productoras de IFN (Bird, 2017)

Se ha propuesto que el efecto de los neutrófilos activados por ROS puede ser protector, como se describió en estudios con ratones MRL/lpr deficientes de NADPH oxidasa (NOX2, la enzima responsable de la explosión oxidativa en neutrófilos). Además de ROS, los neutrófilos circulantes en el LES también producen cantidades elevadas de mediadores pro inflamatorios incluyendo IL-6, TNF- $\alpha$ , factor de activación de células B (BAFF) y un ligando inductor de proliferación (APRIL), factores conocidos por promover la desregulación inmune adaptativa en Lupus. (Bird, 2017)

El perfil de citocinas de los neutrófilos en el LES sigue siendo incompletamente caracterizado, particularmente la producción de neutrófilos de factores antiinflamatorios como TGF- $\beta$  e IL-1RA. (Bird, 2017)

En particular, las células secretoras de autoanticuerpos se acumulan en órganos como el riñón, así como en la médula ósea, lo que sugiere efectos sistémicos de la ausencia de neutrófilos en el proceso autoinmune. (Bird, 2017)

Los hallazgos de que el agotamiento tardío de los neutrófilos no influyeron en la enfermedad, el cambio en las interacciones de los neutrófilos con las células T y las células B y el cambio en el perfil transcripcional a lo largo de la enfermedad resaltan la plasticidad de los neutrófilos en el LES. Se ha demostrado que los neutrófilos tanto de la sangre periférica como de la médula ósea expresan elevadas cantidades de BAFF, un factor conocido como subyacente al fracaso de la anergia autoreactiva de células B. (Bird, 2017)

Un efecto amortiguador de NOX2 en el lupus murino se informó previamente en una cepa de ratón deficiente en NOX2 cruzada con ratones MRL. Las NET también pueden tener un papel protector contra el desarrollo de ciertas formas de lupus, como por ejemplo el lupus inducido por fármacos. Teniendo en cuenta el desarrollo pendiente de la terapéutica con el objetivo de inhibir la formación de NET para el tratamiento del lupus en los seres humanos, debe ejercerse extrema precaución para identificar las condiciones clínicas precisas y las etapas de desarrollo del lupus que garantiza el uso de tales agentes terapéuticos. (Kienhöfer, 2017)

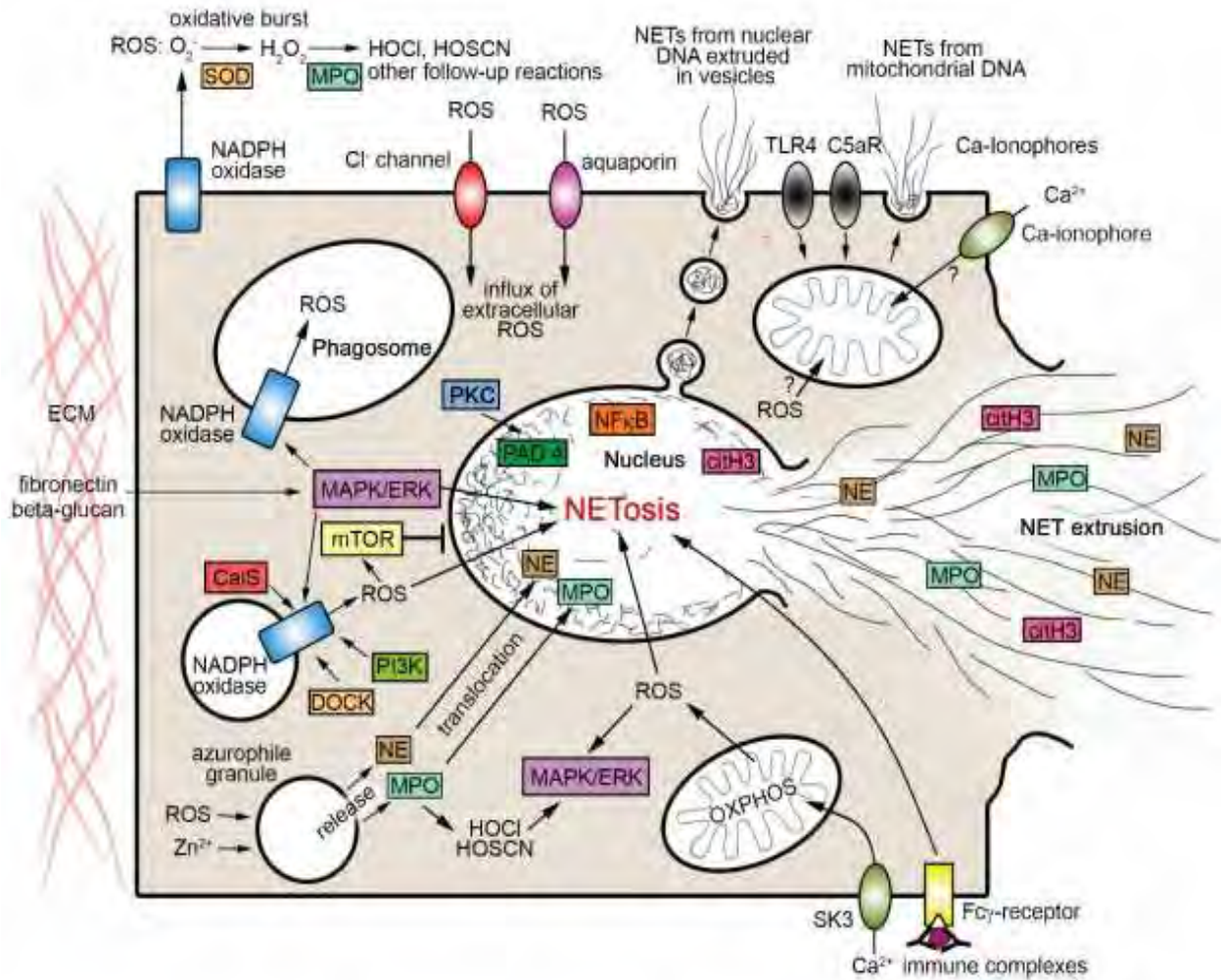


Figura 3. Activación y control de la NETosis. Descripción de diferentes mecanismos de activación de la NETosis, comenzando por la influencia de ROS por canales iónicos y acuaporinas, la influencia de TLR4 y C5aR a la activación vía mitocondrial y correspondiente formación de ROS mitocondrial, así como entrada de  $Ca^{+2}$  a mitocondria por ionóforo o complejo del canal menor de calcio (SK3) e influencia de la enzima NADPH oxidasa. Siendo ROS punto intermedio para diferentes vías como activación del complejo MAPK/ERK o activación de mTOR. También por translocación nuclear de NE o MOP, PKC y factor nuclear (NF- $\kappa$ B). Para la expresión de NETs mediante vesículas cargadas de DNA vía nuclear o mitocondrial, o bien la expresión clásica de NETs cargadas con MPONE citH3. (CatS= catepsina S, CitH3= histona citrulinada H3, C5aR= receptor para 5a del complemento, DOCK= controlador de proteín de citocinesis, ERK= regulador extracelular de mitógenos, HOCl= ácido hipocloroso, HOCSN= ácido hipocianidroso, MASP= protein quinasas activadoras de mitógenos, MPO= mieloperoxidasa, mTOR objetivo de mamífero de rapamicina, NE= elastasa de neutrófilos, factor nuclear NF- $\kappa$ B= factor nuclear  $\kappa$ B, OXPHOS fosforilación oxidativa, PAD4= peptidilarginina deiminasa, PI3K= fosfoinosítido-3-quinasa de, PKC= proteína cinasa C, activabilidad de calcio de SK3= canal menor de potasio 3, SOD= superóxido dismutasa) (Stoiber & Obermayer, 2015)



## 5.4. Mitocondria

Uno de los organelos que cumple mayores funciones dentro de la célula son las mitocondrias, ya que no sólo son capaces de proveer energía, controlar el metabolismo y la homeostasis celular a través de la dinámica mitocondrial, también regulan el ciclo circadiano (Cohen, & Aviram, 2015) y participan en la respuesta inmune. En últimos años se les ha implicado en la señales de especies reactivas de oxígeno (ROS), regulación del potencial de membrana, las vías de apoptosis y la señalización del calcio, entre otros aspectos del metabolismos celular. Las mitocondrias están constantemente adaptándose en varios aspectos como: fusión, división y motilidad en respuesta a los cambios en la demanda y el suministro energético. (Khan, 2014)

El pH mitocondrial es un factor fisiológico importante que influye en diversas actividades celulares, en mitocondrias intactas el pH generalmente es alcalino por la influencia de la cadena de transporte de electrones, con valores de pH mitocondrial en reposo. El pH mitocondrial en reposo se altera en respuesta a la estimulación, dependiendo de las células en cuestión. En algunas mitocondrias un aumento de pH que puede ser inducido por modulación en niveles de calcio (Hou, 2017)

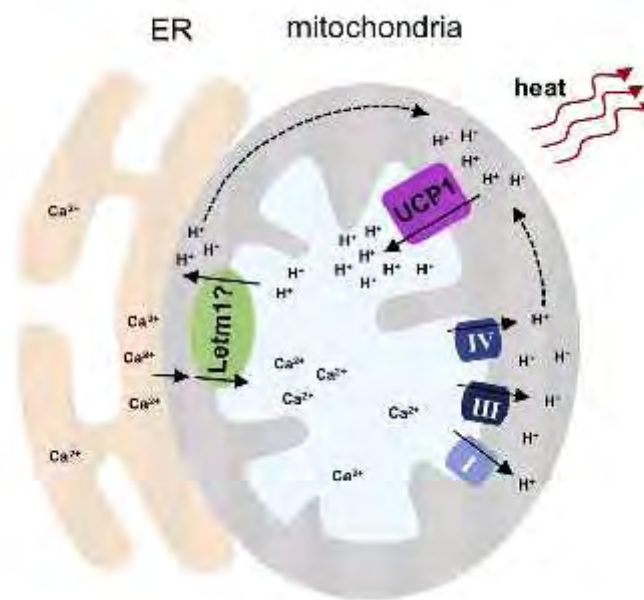


Imagen 4. Movilización de calcio mitocondrial. Mediante diversos mecanismos como son la difusión pasiva y canales iónicos propios de la membrana mitocondria externa, y control del PH dentro y fuera de la misma (Hou, 2017).

Una de las alteraciones en la mitocondria se ve relacionada en la polarización de la membrana, alterando su potencial y haciéndose permeable a la entrada o salida de calcio y alteraciones de pH, asociadas a los ciclos de fisión y fusión mitocondrial (Hou, 2017)

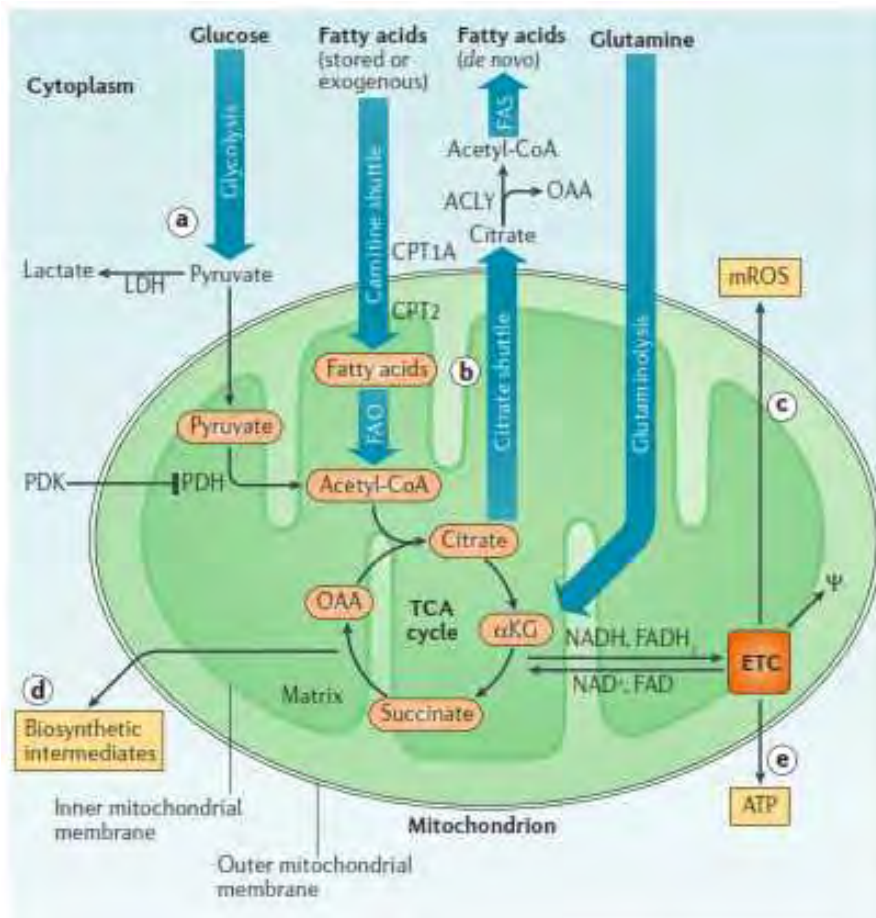


Figura 5. Diversas actividades metabólicas de la mitocondria. Donde se ejemplifican la entrada de piruvato y posterior ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), entrada de ácidos grasos y acetil coenzima A y algunos aminoácidos gluconeogénicos para formación de ATP y mROS (Mehta, 2017).

### 5.4.1. Dinámica mitocondrial

En últimos años las mitocondrias han sido implicadas en diferentes vías de señalización relacionadas con especies reactivas de oxígeno (ROS) y en el potencial de membrana, vías apoptóticas y movilizaciones de calcio entre otros aspectos del metabolismo celular. Suelen tener una dinámica caracterizada por ciclos de fisión, fusión y movilidad en respuesta a diferentes necesidades de energía y como ciclo vital. Esta dinámica es esencial para el mantenimiento de la homeostasis. (Nasrallah, 2014)

Estos procesos de fisión y fusión se ven relacionados también con la mitofagia que ayuda a la homeostasis mitocondrial y la calidad de la mitocondria. Este proceso dinámico es sensible a los cambios celulares o metabólicos, también juegan un importante papel en la diferenciación celular, cáncer, neurodegeneración y otras patologías (Khan, 2014)

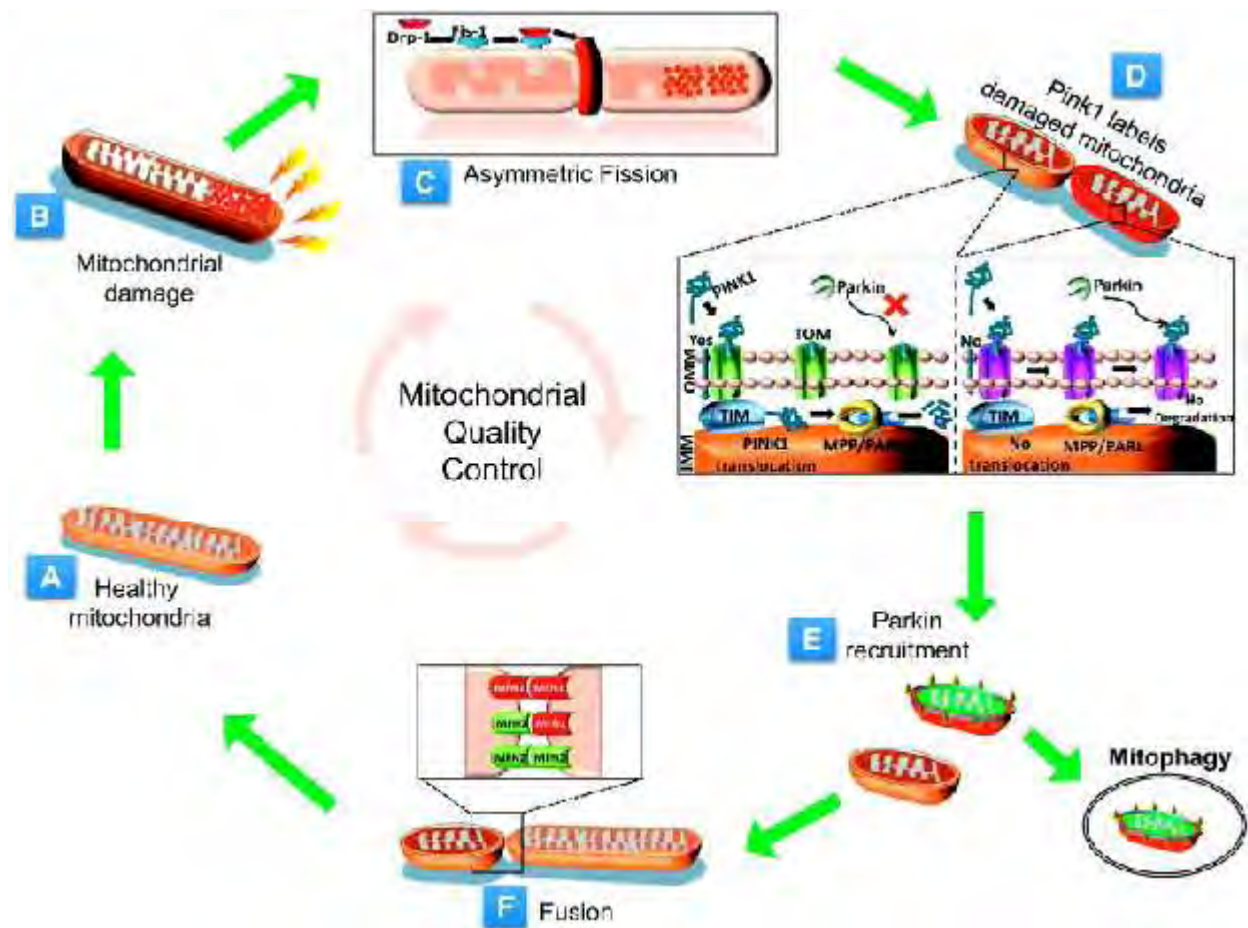


Figura 6. Dinámica mitocondrial. A) Mitocondria normal y sana, B) mitocondria que ha recibido daño o estrés C) activación de mecanismos para la fisión mitocondrial excluyendo el fragmento dañado D) división completa de ambas partes identificando la dañada de la que no lo está E) fragmentos marcados por la molécula Parkin llevados a mitofagia F) el fragmento no dañado reconoce a otro y por reconocimiento de moléculas específicas comienza nuevamente la fusión (Khan, 2014)

La fisión ocurre cuando las mitocondrias están dañadas, acumulando daños en sus componentes (por ejemplo, ADN mitocondrial mutado o proteínas modificadas) o se encuentran en un alto estrés celular. El proceso funciona para separar las mitocondrias dañadas de componentes celulares y lleva a autofagia. (Khan, 2014).

Se han implicado varias proteínas en la conducción de la fisión mitocondrial, incluida la proteína similar a dinamina-1 (codificada por Drp1), proteína de fisión mitocondrial 1 y factor de fisión mitocondrial, que son miembros de la superfamilia de las dinaminas (Nasrallah, 2014).

La fisión se ha implicado en la clasificación de mitocondrias con material genético mutante, en este proceso se sigue una ruta en la que las mitocondrias intercambian equilibrada y rápidamente, su matriz de metabolismo intacta y con copias de DNAmT y respectivos componentes de membrana mitocondrial (Khan, 2014).

La fisión mitocondrial requiere la organización local de Fis1 y la contratación de Gtpasa de DRP1 para el montaje de la fisión de la maquinaria que posteriormente conduce a la escisión de la membrana (Lupi, 2012).

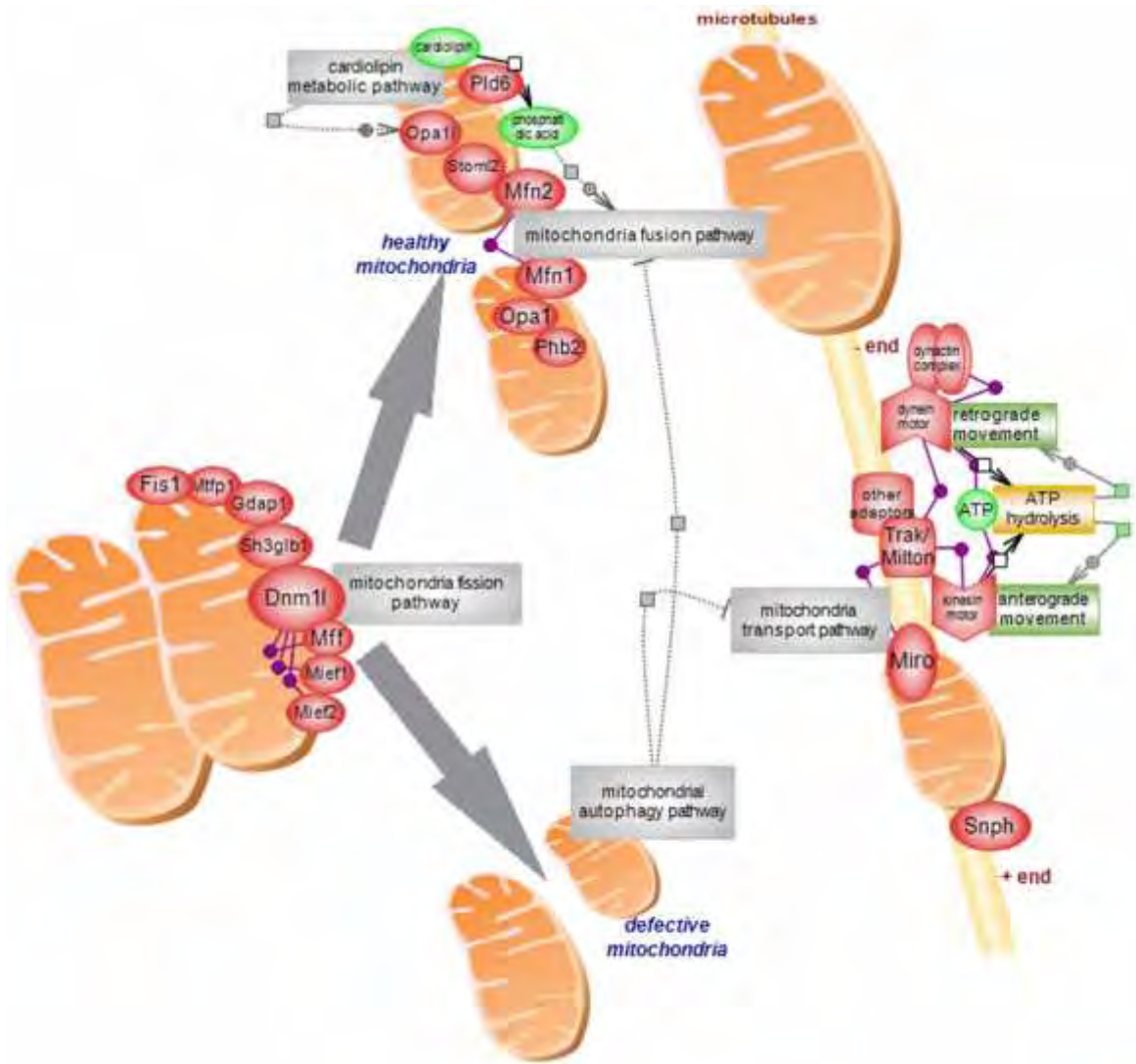
El principal efector de fisión es el Dnm1I (conocido como Drp1) Gtpasa. La proteína citosólica con necesidad de reclutamiento de membrana externa (OMM); el factor que produce a Dnm1I, y la translocación puede ser diferente dependiendo del porqué de la fisión. La proteína tiene un N-terminal de dominio GTPasa, y dominios variables intermedios con un C-terminal de GTP de dominio efector (GED), este interactúa con el medio de moléculas adyacentes para forma un anillo de un complejo que contrae un GDP-dependiente que promueve la escisión y separación. Proteínas OMM tales como Fis1, Mtfp1 (Mtp18), Gdap1 o Sh3glb1 (endophilin B1), se sabe que juegan un papel importante en la fisión, mientras otros como Mfp, Mief2 (MiD49) y Mief1 (MiD51) son más de reclutamiento y activación. (Medical College of Wisconsin, 2018)

La fusión es un mecanismo que permite a la mitocondria compensar un defecto funcional de ARN o proteínas. Fusión de las membranas del interior mitocondrial están mediadas por la proteína 1 atrofia óptica; y la fusión entre las membranas externas está controlada por otros miembros de la superfamilia dinamina, mitofusina 1 y mitofusina 2 (también conocida como Mfn1 y Mfn2, respectivamente), que están codificados por ADN nuclear (Nasrallah, 2014)

La fusión depende de la acción de tres grandes GTPasas, mitofusinas (Mfn1 y Mfn2) que intervienen durante el primer paso de la fusión de la membrana externa, y Opa1 que es esencial para la fusión de la membrana interna. (Lupi, 2012). La fosfolipasa D mitocondrial hidroliza la calciolipina (CL) de la OMM; el resultado de ácido fosfatídico puede inducir a la curvatura de la membrana y es conocido por promover la fusión, aunque los mecanismos no son bien entendidos. (Khan, 2014)

Existen varias isoformas de Opa 1, entre ellas la larga y la corta, que juegan un papel importante en la fusión, esta última puede ser completa o transitoria por un mecanismo denominado “kiss and run”. Existen diversas mutaciones en varios componentes de la fusión (Medical College of Wisconsin, 2018).

Existe una etapa previa llama pre fusión en la cual las mitocondrias se encuentran individuales y después de la fusión se organizan en una red de varios de estos organelos (Khan, 2014)



ELSEVIER

Imagen 7. Mecanismo de fisión, fusión y transporte mitocondrial. Mostrando al extremo izquierdo el mecanismo de fisión mitocondrial comenzando por las moléculas de la familia de las mitofusinas formando un complejo de reconocimiento y de corte para la separación de las 2 nuevas mitocondrias, mostrando en la parte superior el mecanismos de fusión implicando moléculas como la Opa1, Mfn 1 y 2 de reconocimiento para la fusión y otras no expresadas por la mitocondria como el calciolipina inductor de fusión. En la parte derecha se ejemplifica el movimiento mitocondrial por microtúbulos dependiente de ATP y reconocimientos específicos de moléculas de mitocondria con estos microtúbulos. En la parte inferior se hace una referencia a los que pasa con mitocondrias dañadas que suelen ir a la vía de la mitofagia (Medical College of Wisconsin, 2018)

## 5.5. Enfermedades autoinmunes con presencia de microorganismos

Se ha estudiado la relación de diferentes patógenos con las enfermedades autoinmunes, en algunos caso como el LES se ha demostrado un papel protector o precursor, como el caso de *Helicobacter pylori*, virus de la hepatitis B (VHB), *Toxoplasma gondii*, parásitos de la malaria tales como *Plasmodium berghei* y *Plasmodium chabaudi* y helmintos más recientemente descritos (Luo, 2017).

En un estudio realizado en personas afroamericanas infectados con *H pylori* se descubrió un mayor riesgo y un inicio más temprano de las manifestaciones clínicas del LES. En el caso del VHB, sólo un 2.5% de los pacientes con LES resultó ser positivo para un anticuerpo específico del VHB, lo que sugiere una infección previa, mientras que en la población general >10% de las personas son positivas para el mismo anticuerpo. Además de los estudios en seres humanos, se ha demostrado que la infección de *T. gondii* protege a los ratones propensos al lupus híbrido neozelandés (NZB) / blanco neozelandés (NZB), demostrando una disminución en la mortalidad, mejora de la nefritis lúpica y reducción de autoanticuerpos circulantes (Luo, 2017).

Se reconoce que la permeabilidad intestinal se incrementa en los ratones hembra antes de la aparición de la enfermedad renal (refiriéndose a un intestino “permeable”) y que el aumento de la colonización intestinal de Lactobacilos restablece la función de barrera por parte de la mucosa y la patología renal se ve reducida. Este cambio en la microbiota intestinal promueve un medio antiinflamatorio en este, suprimiendo la expresión de IL-6 en ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) aunado al aumento de IL-10. Además la producción y la acumulación renal de IgG2a patógena se reprimen con el aumento de Lactobacillales, lo que sugiere un posible mecanismo para una disminución de la patología renal, además de que estos reequilibran los subconjuntos de linfocitos T en riñón, polarizando más a favor de células Treg y disminuyendo las Th 17. Curiosamente estos efectos solo se presentan en hembras y machos castrados, pero no en machos completos, sugiriendo un papel en de hormonas sexuales en la función reguladora de la microbiota intestinal en el LES. (Mu, 2017)

Tres mecanismos podrían explicar los efectos protectores de los agentes infecciosos contra el LES:

- ) El primer mecanismo es la competencia. Es probable que las respuestas inmunes fuertes provocadas por agentes infecciosos puedan competir exitosamente por señales homeostáticas (citocinas, factores de crecimiento, etc.) contra la respuesta autoinmune provocada por autoantígenos más débiles.
- ) El segundo mecanismo es que las células reguladoras estimuladas por agentes infecciosos pueden amortiguar la respuesta autoinmune. Por

ejemplo, los interferones de tipo I inducidos por algunos agentes infecciosos pueden inducir la generación de células T reguladoras productoras de IL-10 (células Treg o Tr1) y limitar la producción de IL-17 a partir de células T (Ambos mecanismos son para suprimir la autoinmunidad. Además de las células T reguladoras, células dendríticas (DCs) anti-inflamatorias que producen factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) e IL-10 y conducen a un perfil tipo TH1 siendo respuestas que puede ser también inducidas por infecciones parasitaria. Por otra parte, los productos bacterianos han demostrado inducir directamente IL-10 con células Treg. (Luo, 2017)

) Por último, TLR parecen mediar los efectos de los agentes protectores infecciosos, que son TLR agonistas, en la prevención de autoinmunidad. (Luo, 2017) Con una barrera mucosa del intestino mejorada, menos bacterias son capaces de trasladarse a través del epitelio lo que conduce a la reducción de la actividad y migración de CX3CR1+ y/o CD103+ de células presentadoras de antígeno (APC) al drenaje de ganglios linfáticos del tracto intestinal inferior. La disminución de la migración de las APC puede disminuir la actividad de células TCD4+, de hecho se encuentra una disminución significativa en los niveles de CX3CR1 específicamente en MLN con *lactobacillus* por lo que sugiere que esto puede disminuir la migración de APC. Se ha descrito un elevación significativa de los niveles de transcripción de IL10 en riñón de ratones con tratamiento con *lactobacillus* promoviendo un ambiente anti inflamatorio tanto sistémico como en riñón. Se observa una participación conjunta tanto de la microbiota como de las hormonas sexuales en la patogénesis del lupus, en el estudio en el modelo murino de lupus, utilizando la castración como método de eliminación de testosterona, y por consecuencia un aumento en la hormona leutinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH), da un aumento en la patogenia del lupus así como la acumulación de IgG2a en riñón aumentada. Con el tratamiento de *lactobacillus* se observó un control de la LH y FSH aunado a una disminución en la patogenia de la enfermedad (Mu, 2017)



## 5.6. *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que causó 10.4 millones de casos y 1.8 millones de muertes en todo el mundo en 2015. Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que actualmente un tercio de la población mundial está latentemente infectada con el complejo. La tuberculosis es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y se transmite de persona a persona a través de gotitas de aerosol. (Warren, 2017) La dosis infecciosa es 1-200 bacilos, pero cada gotita de aerosol puede contener 1-400 bacilos, haciendo contacto sin infección casi imposible. Además de su infección en el aire, Mtb es experto en el uso de las defensas naturales del cuerpo para su propia ventaja. (Niemi, 2014). Ramos-Kichik y colaboradores, demostraron que tanto *M. tuberculosis* como *Mycobacterium canetti* pueden inducir a las NET, que atrapan pero no matan a estas especies micobacterianas. Por otro lado, la micobacteria derivados de la secreción temprana antígeno objetivo de la proteína de 6 kDa (ESAT-6) puede inducir la formación de NET en *M. tuberculosis* de neutrófilos infectados (Moreno, 2017)

La *Mycobacterium bovis*, el agente etiológico de la tuberculosis bovina, es una bacteria Gram-positiva, con una distribución mundial, fácilmente transmitida a los bovinos y a los seres humanos. (Moreno, 2017)

La formación de trampas extracelulares se ha demostrado en neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos pueden detectar el tamaño de los patógenos y, basándose en su tamaño, los neutrófilos son inducidos a sufrir necrosis, apoptosis o NETosis. (Moreno, 2017)

Después del primer contacto, el hospedero desarrolla una infección primaria inmediata, o puede no presentar síntomas convirtiéndose en una enfermedad latente. Tras la inhalación, la bacteria viaja a los alveolos, donde es reconocida y atacada por macrófagos intentando fagocitar al agente infeccioso y disminuir su número; sin embargo este es el objetivo de esta bacteria, la cual no se logra eliminar dentro de las células inmunes, aumentando su población dentro de estas. Estos sitios infectados tienden a desarrollar granulomas producto de la respuesta inmune. Esto también permite que el *M. tuberculosis* continúe creciendo y abrumando las células que ha infectado hasta que mueren. Con el tiempo los centros de estos granulomas se necrosan, lo que lleva a la mezcla de sangre y esputo en los pulmones. (Niemi, 2014)

La *M. tuberculosis* ha adoptado un mecanismo indirecto similar que suprime la liberación de NETs. Este microorganismo que provoca la liberación NET durante la primera etapa de la infección activa la producción de IL-10 que inhibe la producción de ROS inducida por TLR y suprime la generación adicional NET. (Zawrotniak, 2017)

Aunque la tuberculosis afecta principalmente al parénquima pulmonar, también puede afectar el hueso, el sistema nervioso central y otros sistemas de órganos. Las células inmunes innatas tales como los leucocitos polimorfonucleares (PMN), o los neutrófilos han demostrado ser circunstancialmente desfavorables durante la infección. El objetivo inicial de los inmunólogos fue el de comprender la evasión de fagocitosis por parte de monocitos y macrófagos. Los neutrófilos también segregan especies reactivas de oxígeno (ROS), elastasa, colagenasa y mieloperoxidasa, factores que han demostrado dañar tanto las células micobacterianas invasoras como las células del hospedero de una manera no selectiva. (Warren, 2017)

También se sabe que los neutrófilos ayudan a modular los mecanismos efectores de los macrófagos alveolares residentes (AM). Hay varias maneras en que los neutrófilos aumentan la muerte por *M. tuberculosis* por los macrófagos. Se ha demostrado que la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), atrapa a las micobacteria invasoras y por tanto previene la propagación de la tuberculosis a otros órganos. Se piensa que el exudado de estas estructuras por los neutrófilos no sólo limita la propagación y diseminación microbiana, sino también para aumentar las concentraciones efectivas de agentes microbicidas liberados. Además, se ha demostrado que las NETs inducidas por *M. tuberculosis* secuestran contenidos tóxicos para proteger los tejidos circundantes. Los macrófagos también pueden adquirir y utilizar los péptidos antimicrobianos derivados de Fagocitosis por NETs (Warren 2017).

Por último, la liberación de la proteína de choque térmico 72 (Hsp72) por NETs en respuesta a la bacteria desencadena una respuesta pro-inflamatoria en macrófagos alveolares residentes, causando de este modo la liberación de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 (Warren 2017).

En el genoma de Mtb que codifica para diversas proteínas inmunoreguladoras entre ellos varios miembros de multigénicos de PE\_PPE de la familia de la PE\_PGRS donde curiosamente 56 de 61 proteínas contienen múltiples copias de dominios ricos en glicina que se cree se unen a  $Ca^{+2}$ , dentro de esta familia multigénica se encuentra las proteínas de interés LprG y PE\_PGRS33, de PE\_PGRS33 se ha reportado que puede desencadenar muerte celular en macrófagos al inducir la secreción de citocinas pro inflamatorias y activación de señales pro apoptóticas o pro necróticas que involucran la mitocondria, se ha observado que esta proteína media la entrada a macrófagos mediante el TLR2 así como la interacción en la concentración de  $Ca^{+2}$  citosólico en macrófagos (Yeruva, 2016)

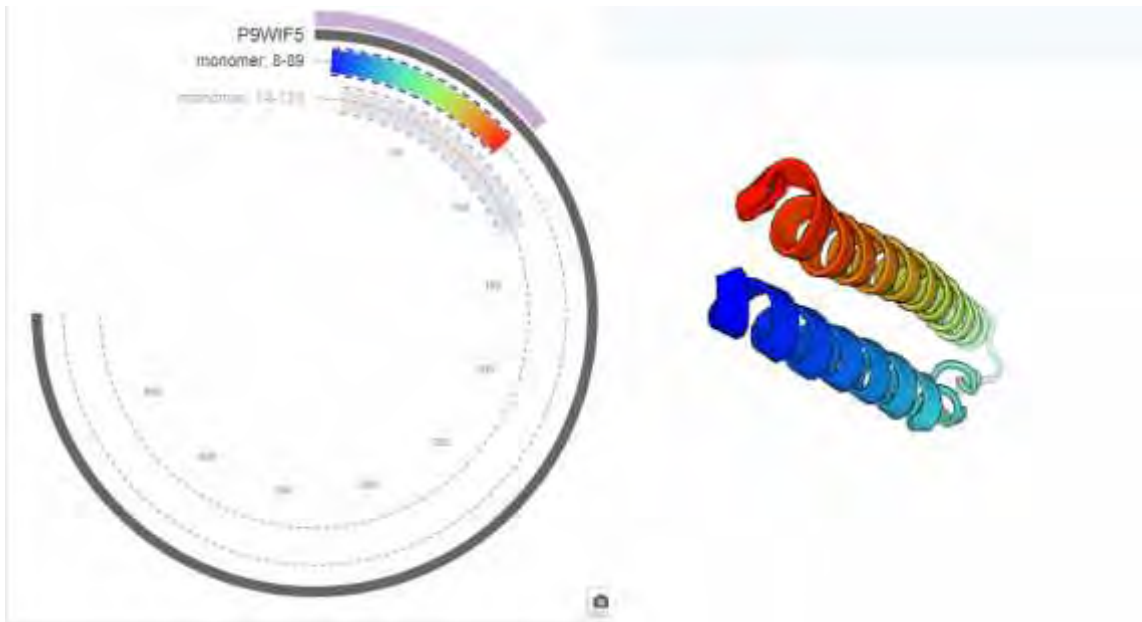
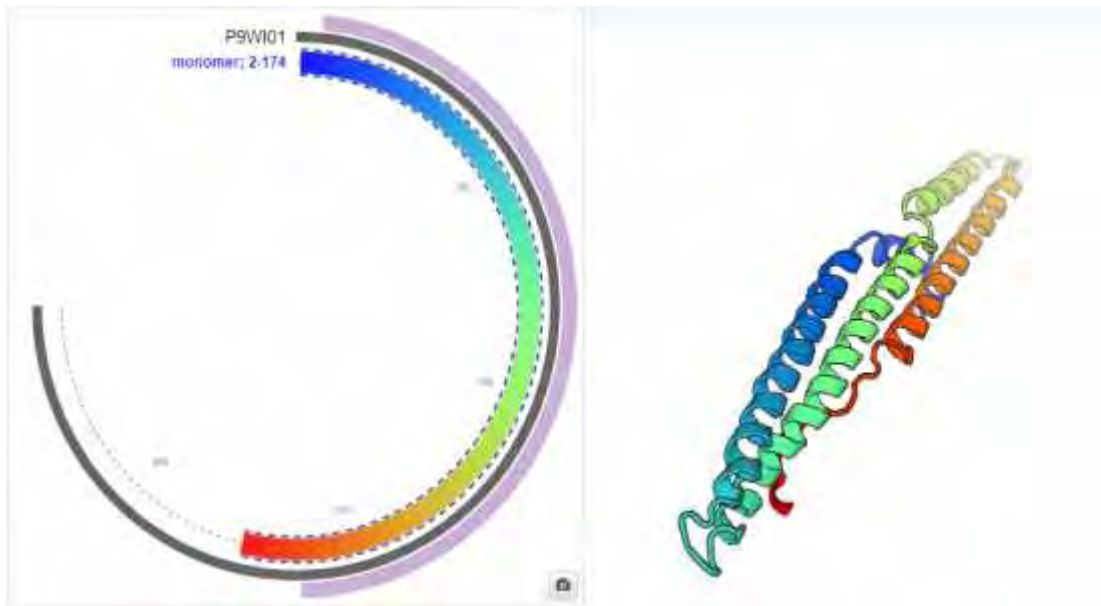


Figura 8. Estructura y localización de las proteínas micobacterianas. Mostrándose en la parte superior la localización y dimensiones de LprG (EMBL-EBI, 2018), junto a este mapa se encuentra la estructura tridimensional de la misma, en la parte inferior se muestra la misma información de la proteína PE\_PGRS33 (EMBL-EBI, 2018)

## Objetivo General

Determinar el efecto que tienen los antígenos micobacterianos LprG y PE\_PGRS33 sobre la dinámica mitocondrial de neutrófilos provenientes de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico.

## Objetivos particulares

- ) Estandarizar la concentración necesaria de MitoTracker CMXRos® para la determinación de especies reactivas del oxígeno y la dinámica mitocondrial en neutrófilos estimulados y no estimulados con LprG y PE\_PGRS33 provenientes de donadores sanos y pacientes con LES.
- ) Analizar la movilización de calcio mitocondrial en neutrófilos estimulados y no estimulados con LprG y PE\_PGRS33 provenientes de donadores sanos y pacientes con LES.
- ) Determinar el potencial de membrana mitocondrial que tienen los neutrófilos estimulados y no estimulados con LprG y PE\_PGRS33 provenientes de donadores sanos y pacientes con LES.

## Hipótesis

Los antígenos micobacterianos LprG y PE\_PGRS33 modifican la dinámica mitocondrial afectando la activación celular del neutrófilo.

## Justificación

En la actualidad, con los avances tecnológicos, de higiene y en medicamentos se ha logrado el control en gran medida de las enfermedades infecciosas, disminuyendo en buena parte la mortalidad por estas, pero la balanza se está inclinando a otro tipo de enfermedades como lo son el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes. Siendo el Lupus eritematoso una de las enfermedades autoinmunes más comunes, generando problemas en la población tanto mexicana como mundial, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, como los inmunomoduladores, pueden ayudar a los tratamientos ya utilizados.

## Material y métodos

### Extracción de neutrófilos

Los neutrófilos fueron obtenidos de sangre periférica de pacientes con LES y de donadores sanos a partir de punción venosa con anticoagulante, la cual fue mezclada en proporción 1:4 con solución de Alsever-gelatina al 3%, se dejaron sedimentar de 20-30 min a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, transcurrido éste tiempo se recolectó el plasma rico en leucocitos, se lavaron las células 2 veces con PBS y se re suspendieron en 3 mL de PBS. Se estratificaron en Ficoll (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) en una proporción 1:1, se centrifugaron durante 25 min a 1800 rpm sin freno, se descartaron las células mononucleares y el botón celular fue re suspendido en PBS, se lavaron y se lisaron los eritrocitos con agua estéril y KCl 0.6 M en relación 1:1:1, posteriormente fueron lavados 2 veces más con PBS y re suspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 hasta su uso.

### Conteo diferencial y porcentajes de leucocitos

La muestra sanguínea fue analizada en equipo automatizado localizado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional S. XXI perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social.

### Obtención de antígenos

La clonación, expresión y purificación de los antígenos micobacterianos fue realizada en el departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en el laboratorio de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón. Los genes codificantes para las proteínas LprG y PE\_PGRS33 fueron clonados en el plásmido pET15b y unidos a una marca de histidinas, con éste plásmido fueron transformadas bacterias *E. coli* de la cepa Rosetta. Las proteínas fueron obtenidas por sonicación y purificadas mediante columnas de afinidad a la marca de histidinas utilizando el sistema AKTA FLPC de GE Healthcare.

### Estimulación de neutrófilos

Se sembraron  $3 \times 10^5$  neutrófilos por pozo en placas de 6 pozos con cubreobjetos de vidrio de 20x20 mm con medio de cultivo RPMI 1640 con glucosa y con glutamina (In vitro, México). Las células fueron o no estimuladas con 1.5 µg de proteína total de cada uno de los antígenos micobacterianos, LprG y PE\_PGRS33, se incubaron a 37 °C en una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron 2 veces más con PBS y se

montaron en laminillas con el fluorocromo nuclear Vectashied®-DAPI (Vector, Alemania).

### Dinámica mitocondrial

Para obtener la concentración óptima del fluorocromo a utilizar, se realizó una curva dosis efecto con las concentraciones finales de 3, 0.3 y 0.03 µg/mL durante 30 min en las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. Una vez obtenida la concentración óptima de trabajo se realizó la tinción a las 2 horas con 30 min de estímulo con los antígenos, a las 3 horas de estímulo se prosiguió con la fijación con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se lavaron 2 veces con PBS y se montaron con Vectashied®-DAPI (Vector, Alemania). Las imágenes fueron analizadas mediante el software “ImageJ” del NIH para obtener la intensidad media de fluorescencia.

### Movilización de calcio mitocondrial

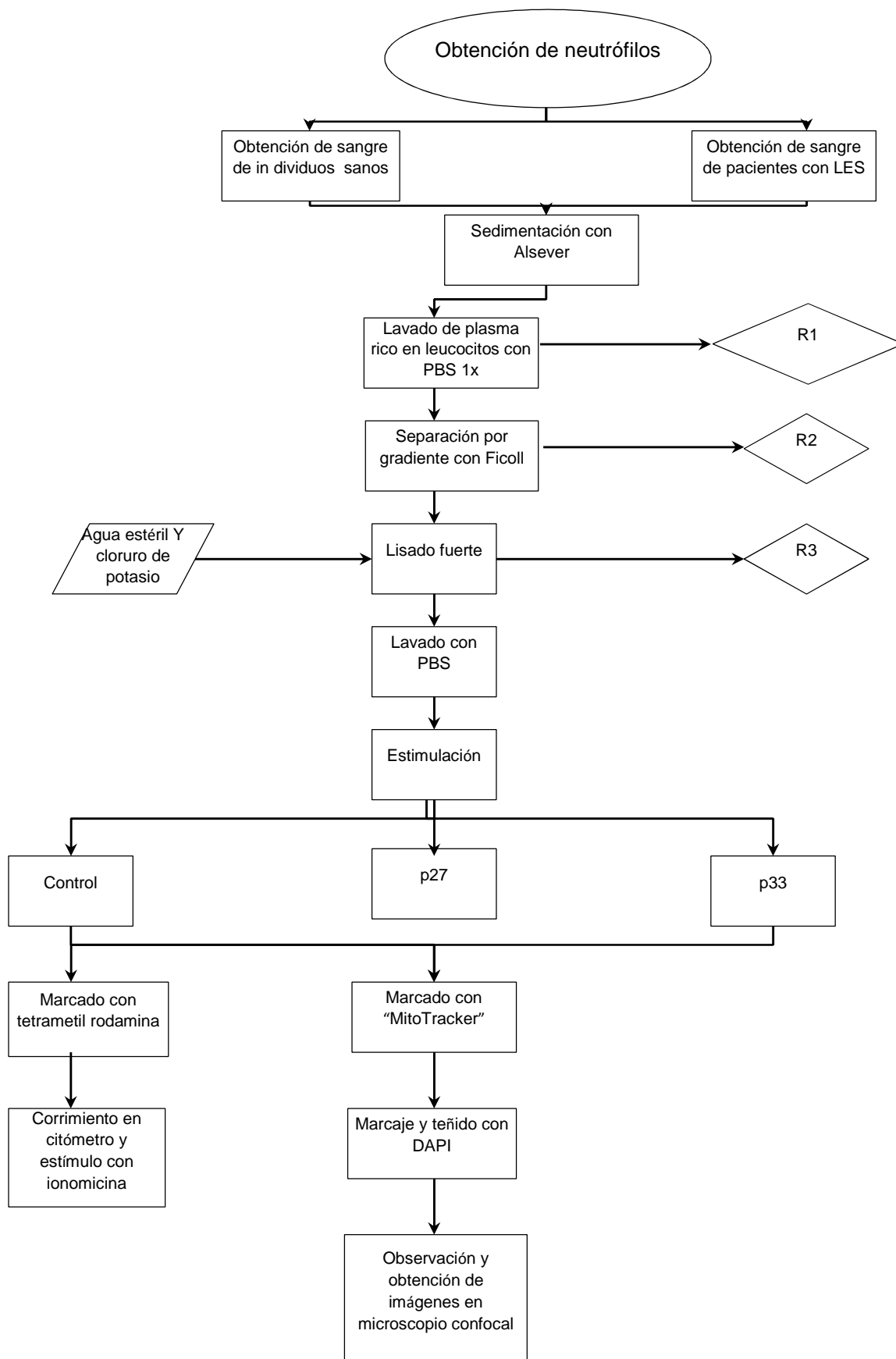
Se sembraron  $1 \times 10^6$  neutrófilos en microtúbos de 1.5 mL con las condiciones de estímulo anteriormente mencionadas, transcurridos 120 min del estímulo, se adicionó Rhod-2 a una concentración final de 5 nM, en medio libre de calcio, 30 min después, se lavaron 3 veces con PBS y se adicionó medio fresco y 30 min después se agregó  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 5 mM. Se tomó lectura en el citómetro de flujo FACSCalibur durante 30 segundos, se retiró el tubo y se adicionaron 2 nM de ionomicina, se reincorporó el tubo al citómetro para un total de 3 minutos 30 segundos.

### Potencial de membrana mitocondrial

Se sembraron  $1 \times 10^6$  neutrófilos en microtúbos de 1.5 mL con las condiciones de estímulo anteriormente mencionadas, 30 min antes de concluir el tiempo de estímulo se adicionó MitoTracker Red FM a una concentración final de 5 nM. Concluido el estímulo con los antígenos, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y leídas en el citómetro de flujo FACSCalibur.

### Análisis estadístico

En el caso de los conteos diferenciales se realizó con una n de 45 pacientes de LES y análisis por prueba de t. Para la intensidad media de fluorescencia mitocondrial, los datos fueron recabados de 100 células por condición y analizados mediante prueba de ANOVA de una vía y análisis post-hoc de Tukey. La movilización de calcio se recabo mediante los resultados arrojados por el equipo y analizados estadísticamente por grupos por parámetro y obtención de diferencias estadísticas, de la misma manera se hizo el tratamiento estadístico para evaluar la diferencia de potencial de membrana. Todos los análisis realizados en el programa Graphpad Prism 7®.



## Resultados

### Conteo de las diferentes poblaciones celulares

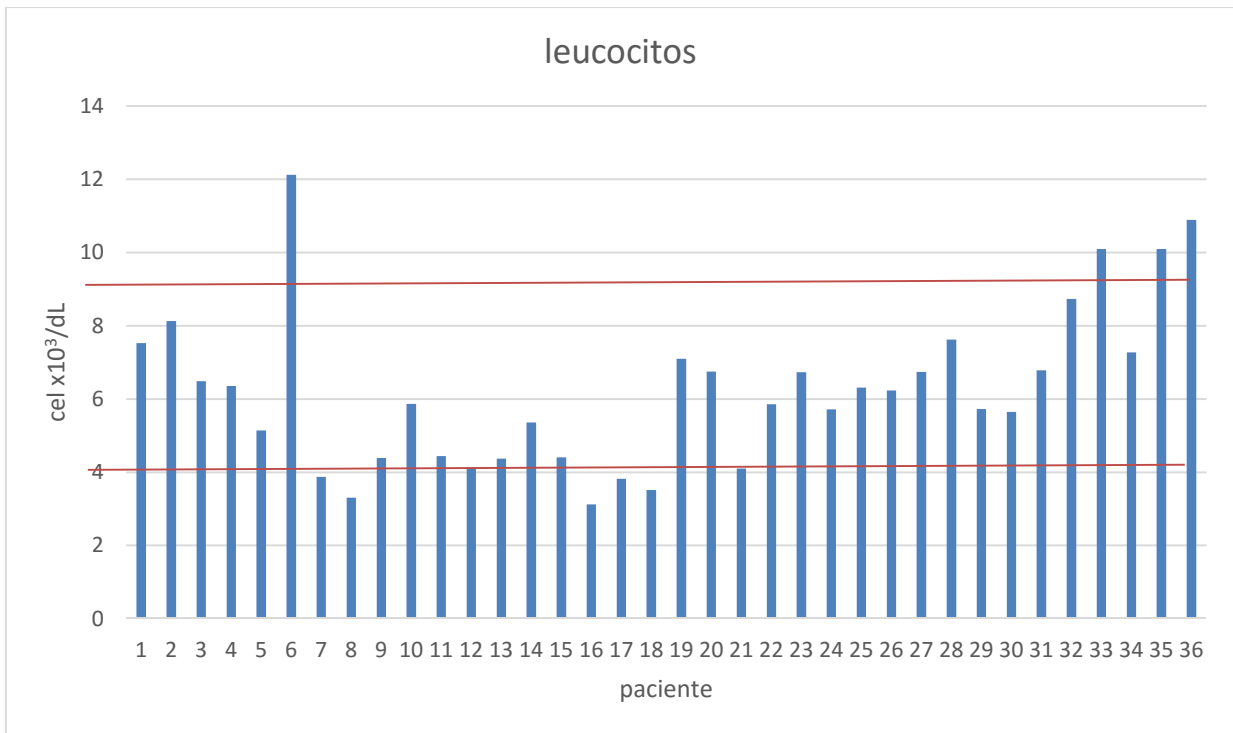


Figura 9. Leucocitos en sangre total de pacientes con LES. Se muestra los conteos de leucocitos totales en sangre, marcados con bandas rojas los límites de los valores de referencia. Se observa una leve disminución del conteo celular, sin ser significativa, manteniéndose dentro de los límites normales en la mayoría de los casos.



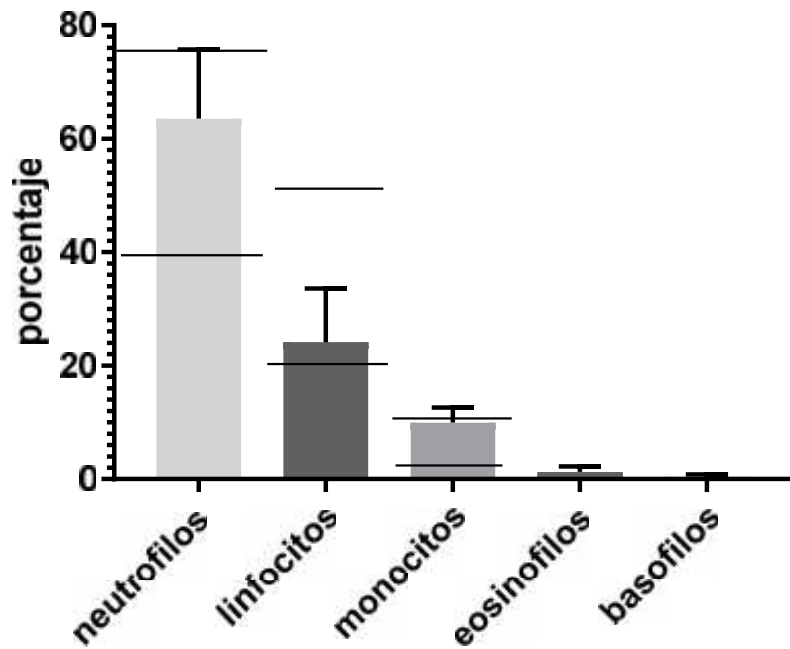
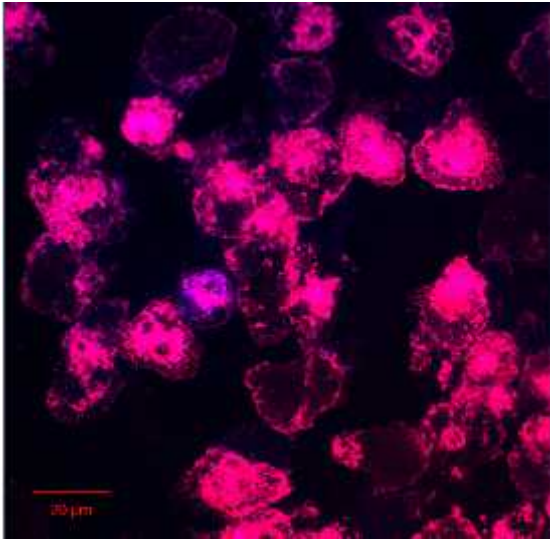


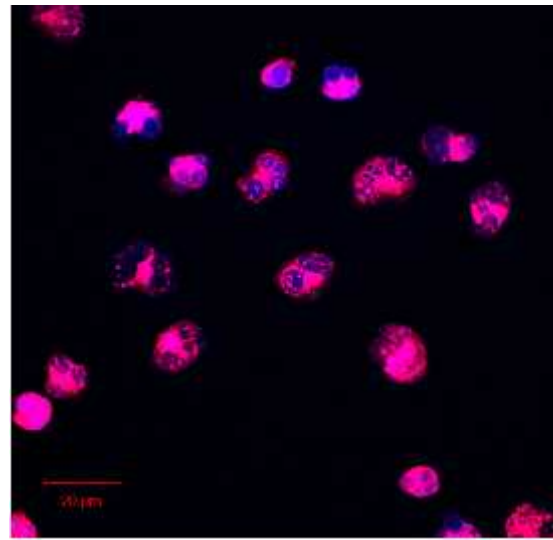
Figura 10. Porcentaje de las diferentes estirpes celulares en el conteo de leucocitos totales en sangre total de pacientes con LES. Se muestra que ninguno de los diferentes linajes se encuentra fuera de los valores de referencia reportados en la literatura.

## Estandarización de MitoTracker®

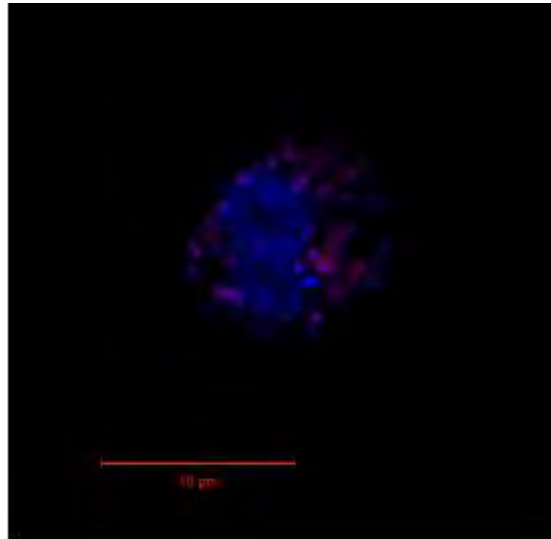
Para la utilización del microscopio confocal se debía primero estandarizar los fluorocloromos a una concentración óptima para su detección en el microscopio confocal para lo cual se realizaron diferentes pruebas, utilizando las indicadas por el fabricante como punto de partida.



**A) 30ng/mL**



**B) 3ng/mL**

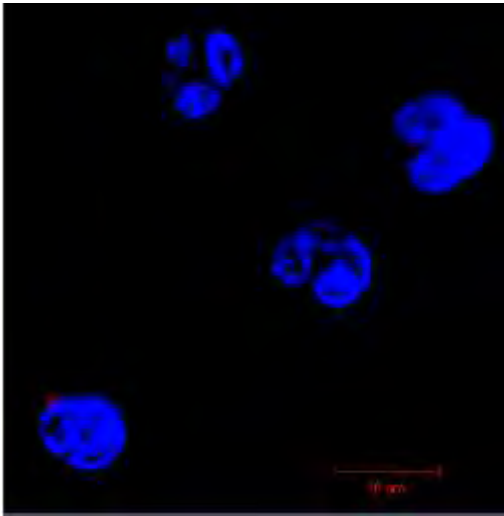


**C) 0.3ng/mL**

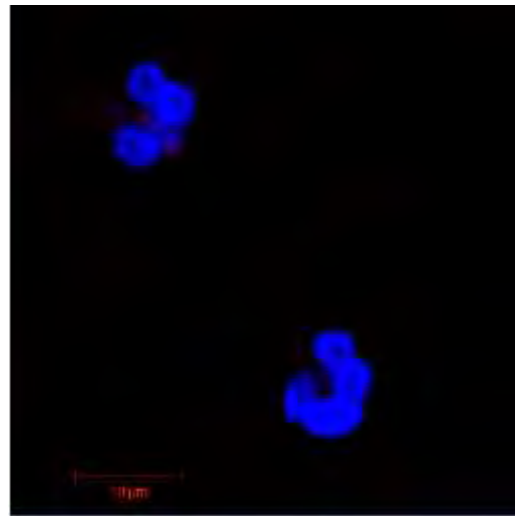
Figura 11. Estandarización de MitoTracker®. A) Marcado con MitoTracker® a una concentración de 30ng/mL con respecto del B) concentración de 3ng/mL C) concentración de 0.3ng/mL

La observación de esta estandarización arrojó los resultados encontrados en la figura 11 A) 30ng/mL muestra un marcado en exceso e inespecífico de mitocondria puesto se observa marcada toda la célula, con una integridad baja de estas, ya que se conoce que el marcador es citotóxico en altas concentraciones. La figura 8B) (30ng/mL) al igual que la anterior, aún está muy concentrado por lo que el marcador se distribuye en todo el citoplasma, se observa una co-localización con el fluorocromo en el núcleo y no es posible apreciar una marca específica de la mitocondria a esta concentración, sin embargo, disminuye la citotoxicidad y mantiene la integridad de las células. La concentración de 0.3ng/mL (8C) se observa mejor el núcleo ya que no tiene co-localización con el marcador mitocondrial, y este último se encuentra solo marcando las mitocondrias mejorando su observación, y sin estar en el citoplasma, por lo tanto, esta fue la concentración elegida para continuar con los siguientes análisis.

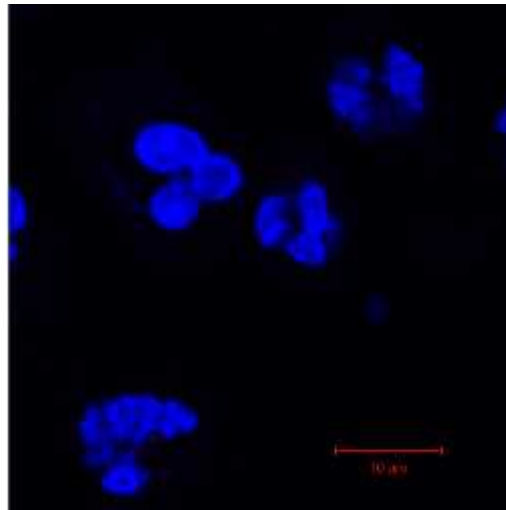
## Microscopia confocal



**A) NE**

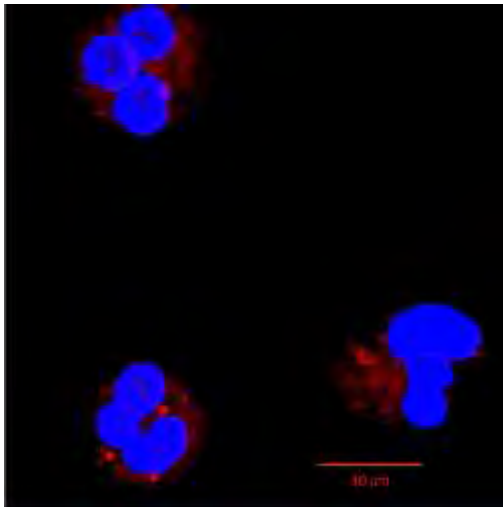


**B) LprG**

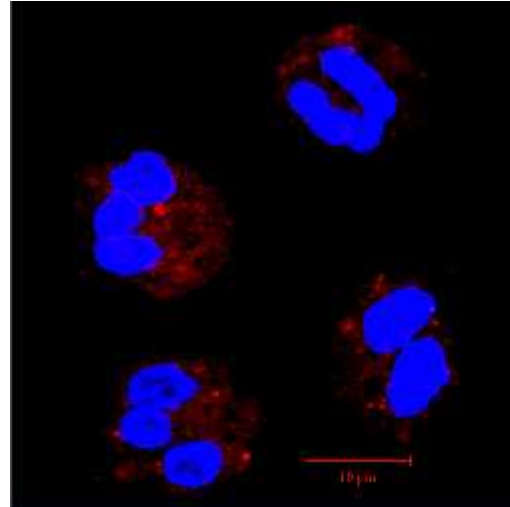


**C) PE\_PGRS33**

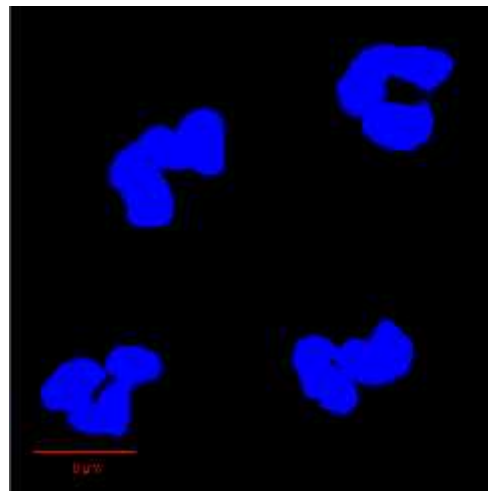
Figura 12. Antígenos micobacterianos no tienen actividad en neutrófilos de donadores sanos. Los neutrófilos de donadores sanos no muestran un aumento en la fluorescencia correspondiente a MitoTracker CMXRos (A), sin embargo, la estimulación con LprG (B) y PE\_PGRS33 (C) durante 3 hrs no genera ningún cambio en producción de ROS.



**A) NE**



**B) LprG**



**C) PE\_PEGRS33**

Figura 13. Los antígenos micobacterianos modifican la producción de ROS mitocondriales. (A), Los neutrófilos provenientes de pacientes con LES tienen una mayor fluorescencia en color rojo (MitoTracker CMXRos) que corresponde a la generación de ROS, (B) al ser estimuladas con LprG durante 3 h, ésta no se modifica (C) y en algunos casos aumenta, pero al ser tratados con PE\_PEGRS33 disminuye casi por completo la producción de ROS mitocondriales, en ninguno de los casos se observa la modificación en la morfología del núcleo (azul, DAPI).

La figura (12A) muestra los neutrófilos de un donador sano sin ningún estímulo, en el cual no se observa actividad mitocondrial, a pesar de ser estimulados con LprG (11 B) no hay un aumento en la producción de ROS en ninguno de las condiciones en el donador sano, en contraste con el paciente de LES sin estimular (13 A) donde ya se observa la actividad de ROS mitocondriales al igual que el estimulado con LprG (12 B), en contraste con el estimulado con el antígeno PE\_PEGRS33 (13 C) en el cual los ROS se ven disminuidos asemejándose más a los neutrófilos de un donador sano.

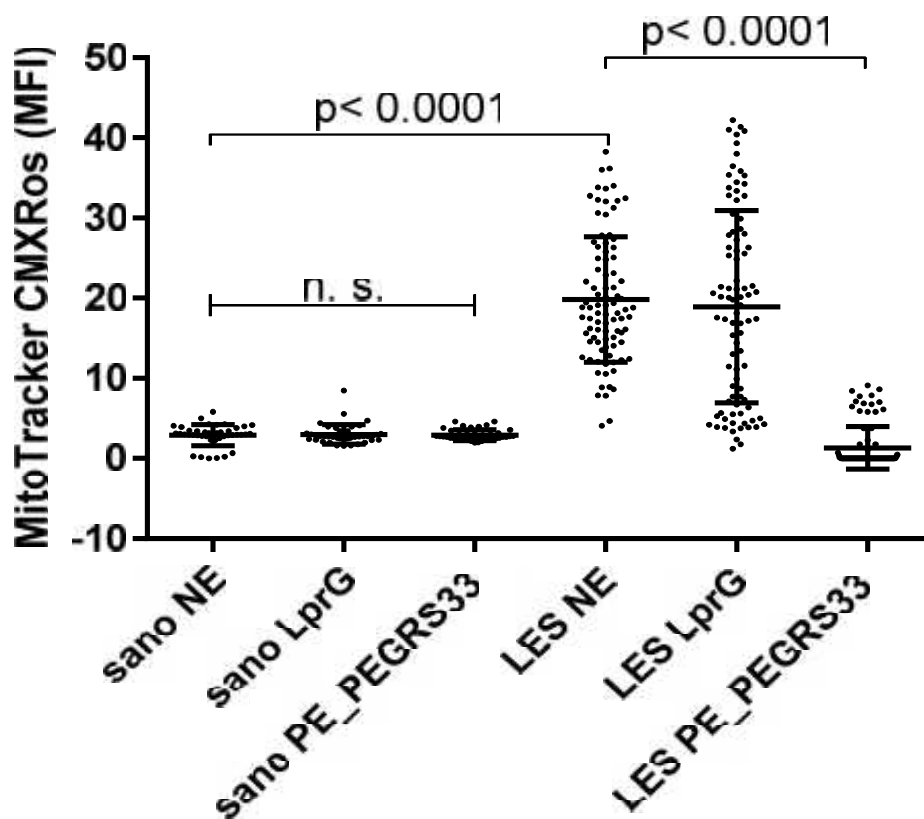


Figura 14. Actividad de ROS mitocondrial por grupo analizado. El análisis de máximas florescencias por célula analizada, presentando nula significancia estadística los grupos:

- ) sano NE, sano LprG, sano PE\_PEGRS33 y LES PE\_PEGRS33 entre ellos
- ) LES LprG con LES NE
- ) con diferencias significativas entre LES NE con todos los grupos de sanos y LES PE\_PEGRS33,

) así como también LES LprG contra todos los grupos de sanos y LES PE\_PEGRS33 con un valor de p evaluado  $< 0.0001$ . Repitiéndose las significancias tanto para máximos de fluorescencia y promedios de fluorescencias por células analizadas.

### Citometría de flujo

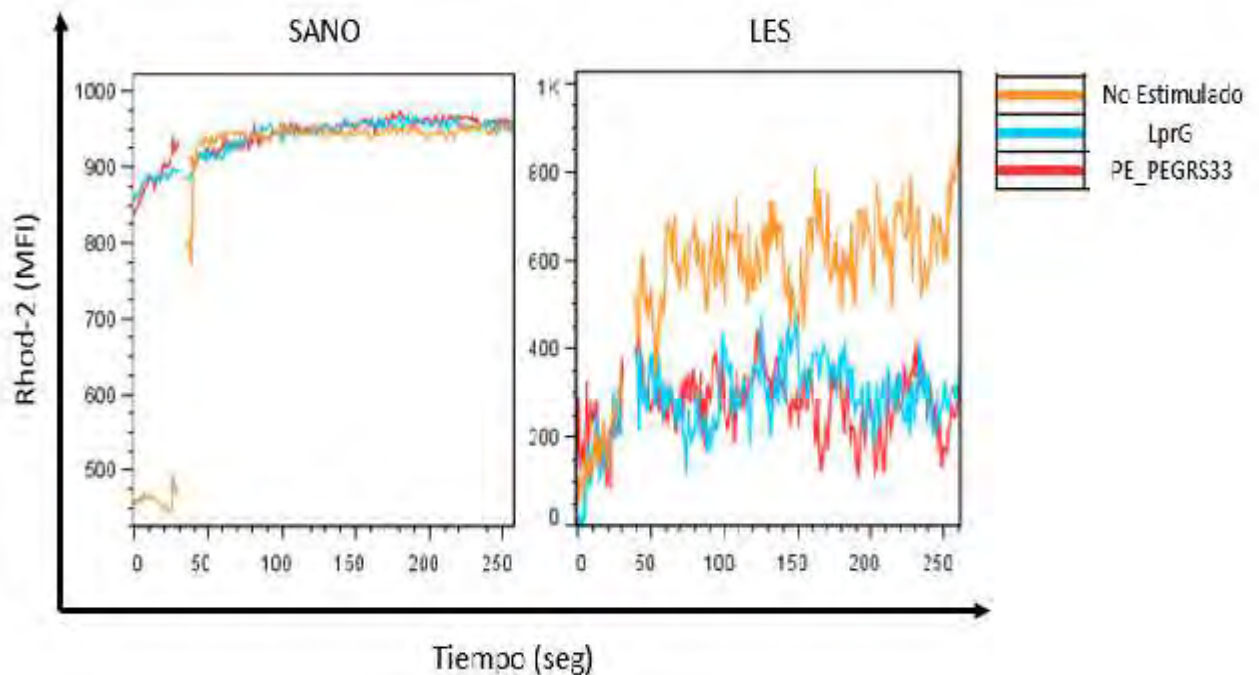
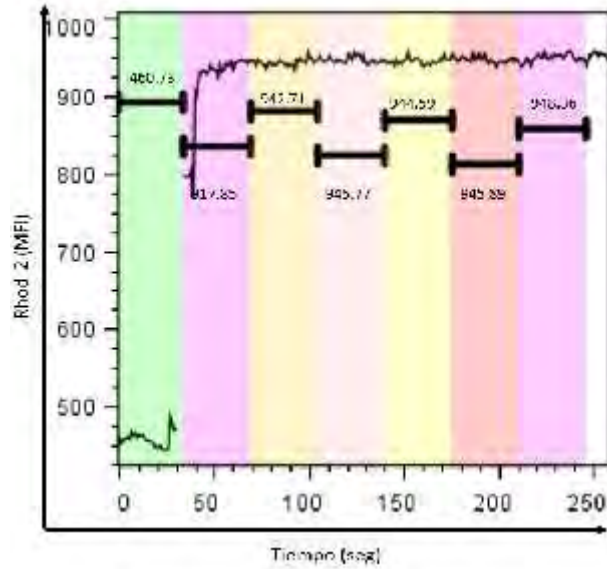


Figura 15. Los antígenos micobacterianos modifican la movilización de calcio mitocondrial de neutrófilos de pacientes con LES. Los antígenos LprG y PE\_PGRS33 no modifican la movilización de calcio mitocondrial en neutrófilos de donadores sanos, pero si en los provenientes de pacientes con LES, cabe resaltar que en éstos últimos, de manera basal la movilización de calcio es menor.

Se observa en la figura que un donador sano se ve la movilización del calcio de manera uniforme en las 3 condiciones al abrir los canales de calcio con ionomicina. Para el caso del LES, las células que no fueron estimuladas tienen una menor entrada de calcio, este efecto se ve potenciado cuando las células son estimuladas tanto con LprG o PE\_PEGRS33 donde existe una disminución en la movilización de calcio.

A)



B)

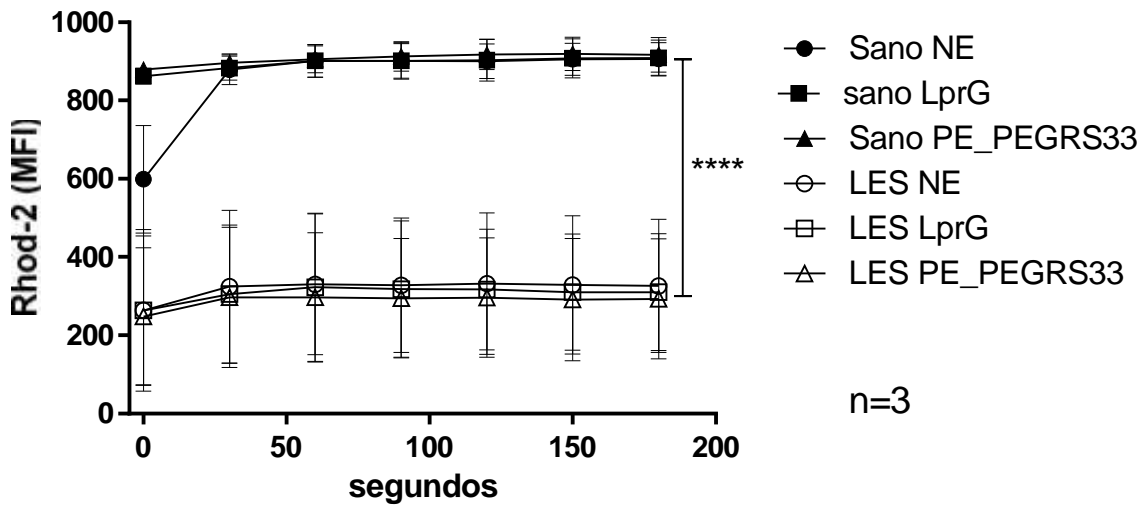


Figura 16. Movilización de calcio por medida de tiempo. (A) El lapso utilizado para el análisis de la movilización de calcio mostrado en bandas de colores y en las barras se observa la MFI de ese lapso de tiempo. El análisis estadístico de la movilización de calcio en mitocondria confirma que los pacientes con LES tienen una menor movilización, pero no se ve un efecto sinérgico cuando son estimuladas con los antígenos micobacterianos (B). Se demuestra que existe una diferencia significativa de una  $p < 0.0001$  entre los grupos de sanos y pacientes de LES como lo muestra en la gráfica.



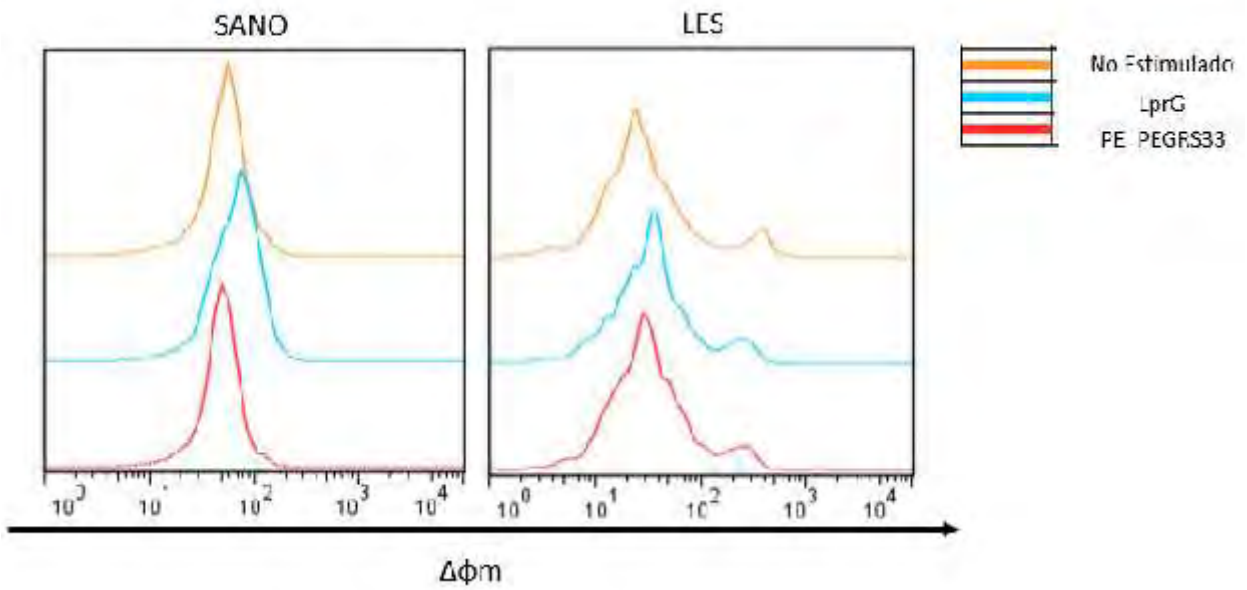


Figura 17. El potencial de membrana mitocondrial no se modifica con los antígenos micobacterianos. Se realizó también el análisis del potencial de membrana mitocondrial para comprobar si el movimiento de calcio se debe a difusión pasiva en donde no se observa alguna diferencia apreciable entre grupos y diferentes estímulos.

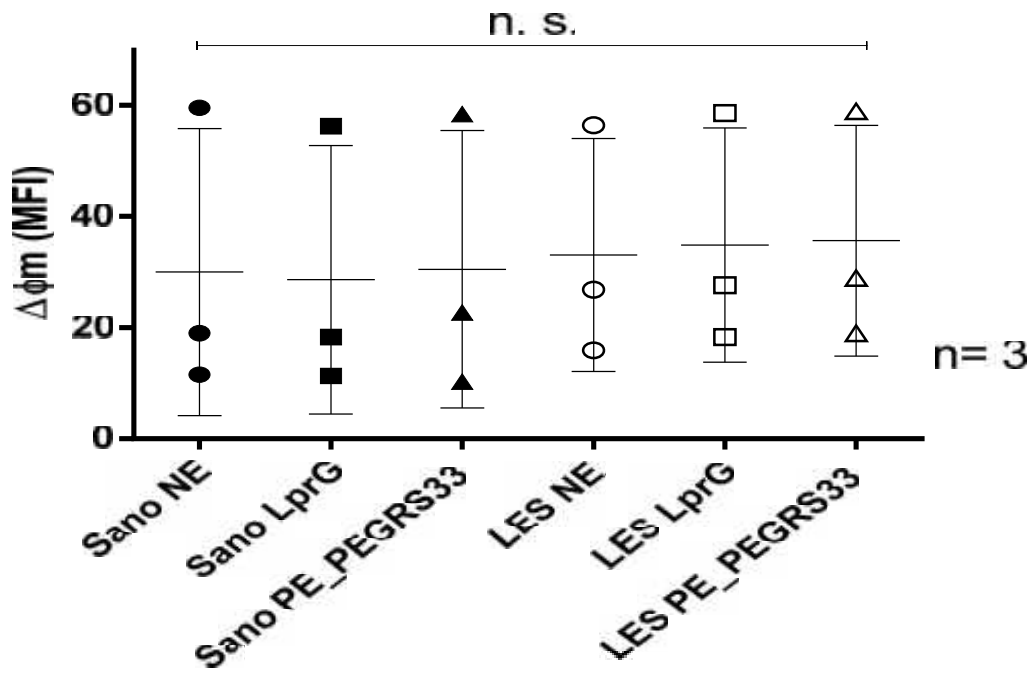


Figura 18. Análisis estadístico de potencial de membrana mitocondrial. En el análisis estadístico realizado con el programa GraphPad Prism® se observa que no existe ninguna diferencia estadística en ninguno de los grupos analizado para potencial de membrana mitocondrial.

## Discusión de resultados

### Conteo de las diferentes poblaciones celulares

Los leucocitos en pacientes con LES no muestran una diferencia en comparación con los valores de referencia reportados en la literatura, tampoco alguna modificación en los porcentajes del conteo diferencial de leucocitos, exceptuando en momentos de la enfermedad activa en los cuales existen lapsos de leucopenia y neutropenia (ROSOVE, 2013), y en algunos casos se ve un aumento en el conteo de monocitos. Por esta falta de diferencias es que se desarrollan comúnmente métodos más específicos para el diagnóstico del LES (Lin, 2013).

### ROS mitocondrial

En pacientes con LES existe una actividad mitocondrial en células sin estímulo y con LprG, a diferencia de las células estimuladas con PE\_PEGRS33, presentando una disminución de la marca de mitocondria asemejándose a las de los sanos, con respecto a estos últimos en los cuales para los controles sin estimular y el par de grupos sometidos a estímulos no se observa alguna diferencia entre la producción de ROS mitocondrial, sin prácticamente cambio entre estos. Estos resultados se han asociado con lo reportado en linfocitos en los cuales en el LES se ve implicado el DNA mitocondrial en el que se ve disminuido su contenido de este material genético en los pacientes en comparación con los individuos sanos (Lee, 2012) así como la asociación de diversos polimorfismos específicos de DNA mitocondrial en la presencia de esta autoinmunidad como los son los SNP nt16189C, nt13708A y nt10398A; lo que podría asociar la enfermedad mitocondrial con el desarrollo del LES y su patogénesis (Jönsen, 2009).

Con los análisis se demostró que existe una diferencia significativa entre los grupos, denotando una homogeneidad en los individuos sanos tanto sin estímulo como los estímulos con ambos antígenos, y en los pacientes de LES una actividad de ROS mitocondrial aumentada exceptuando al grupo que se estimuló con PE\_PEGRS33, y siendo esta diferencia significativa con el par de grupos de LES restantes. Además se ha comprobado que las trampas extracelulares en pacientes con LES contienen una buena carga de DNA mitocondrial aún más que las NETs en personas sanas; el mecanismo de estas NETs se atribuye que son ROS dependientes por previa activación mitocondrial y que estas redes es 2 veces más fuertes para activar las vías de IFN por células dendríticas plasmacitoides; así también se ha encontrado que existen anticuerpos que son específicamente anti-DNA mitocondrial, adjudicándole a estos organelos parte de la patogénesis de la enfermedad (Wan, 2015)

También sea encontrado que existen diversos patógenos que expresan moléculas que tienen como blanco las mitocondrias, utilizando este organelo como medida de control no solo del metabolismo sino también en la homeostasis celular, como lo hace Mtb, a través de sus proteínas LprG y PE\_PEGRS33 descritas para modulación de la actividad mitocondrial en macrófagos (Sanchez-Garcia. 2012)

## **Movilización de calcio**

En la comparación de los individuos sanos y de los pacientes con LES, en los individuos sanos se observó una movilización de calcio mayor al inducirla con ionomicina, siendo uniforme tanto en el no estimulados, como en los estimulados con LprG y PE\_PEGRS33. Para el caso de las células con LES en las cuales el no estimulado presento una disminución en la movilización de calcio y aun menor en los grupos estimulados con LprG y PE\_PEGRS33, se confirmó estadísticamente este evento, que es atribuible a un posible cierre de los canales iónicos de la mitocondria o una disminución en el calcio citosólico en estas condiciones por influencia de los antígenos (Yeruva, 2016). Corroborando más adelante que no existe actividad en la membrana mitocondrial al no existir una diferencia de potencial en ningún caso. Además de estas diferencias iónicas principalmente el calcio está implicado en la dinámica mitocondrial y actividad de este mismo organelo (Hou, 2017)

Se han descrito un par de proteínas de función antitumoral presentes en mitocondria que en condiciones normales actúan en la regulación de entrada de calcio en mitocondria llamadas FUS1/TUSC2; que tienen una regulación epigenética disminuida en condiciones de estrés como el tabaquismo y en ratones knock-out con ausencia de FUS1 se ha presentado condiciones de autoinmunidad (Uzhachenko, 2014)

Así también FUS1 tiene participación como inhibidor de Ca<sup>2+</sup>/miristoil y bajo estas condiciones participa en los ciclos de fusión y fisión mitocondrial; esta misma proteína también se ha descrito en la regulación de la proliferación y activación de linfocitos CD4<sup>+</sup>, así como la correcta actividad de NF-kB y NFAT (Uzhachenko, 2014) lo que podría estar relacionado en gran parte de la enfermedad y lo que explicaría los resultados obtenidos en la citometría de flujo y posible blanco de PE\_PEGRS33

## Potencial de membrana

En la experimentación se observó que no existe una diferencia de potencial o alteración en este mismo en ningún grupo para probar algún cambio, corroborado con el análisis estadístico que no muestra alguna diferencia estadística entre ninguno de los grupos. A pesar de saber que ambos antígenos tienen como blanco la mitocondria y se asocian en macrófagos a inducción de apoptosis (Cadieux, 2011).

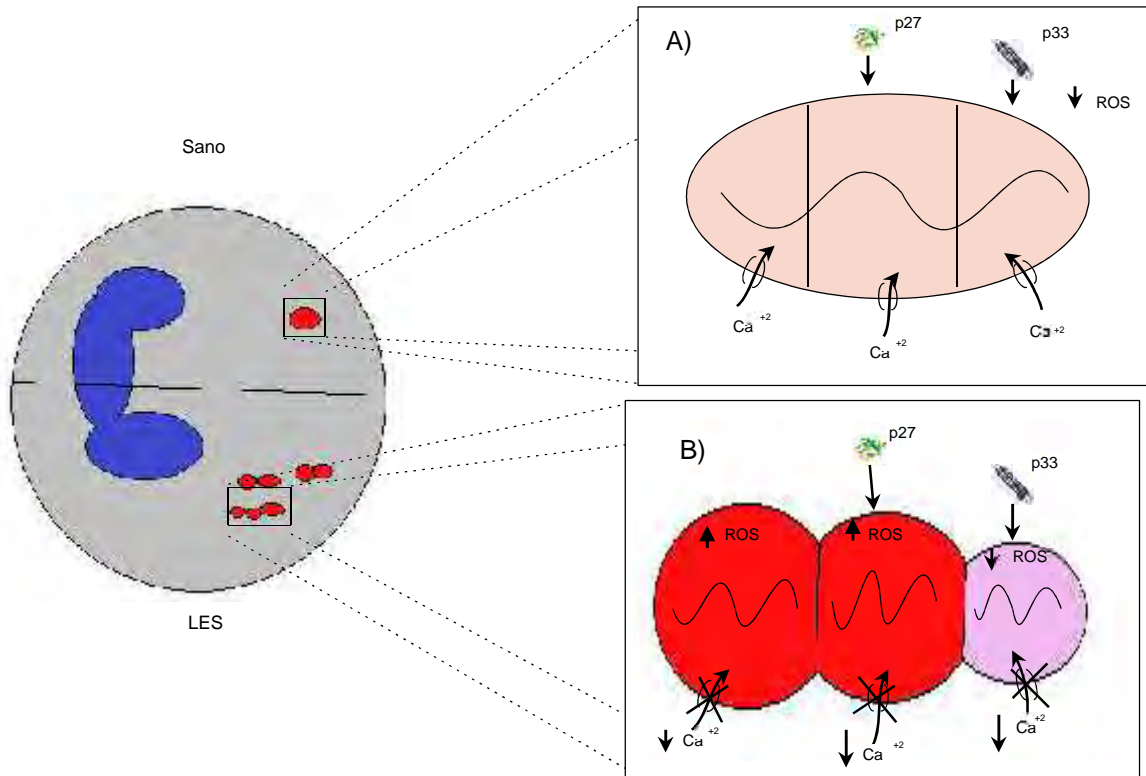


Figura 19. Actividad de antígenos microbianos comparados en pacientes con LES y sanos. El antígeno PE\_PEGRS33 disminuye la actividad de ROS mitocondrial (asemejándose a la del donador sano) en pacientes con LES en los cuales se tiene una disminución en la entrada de calcio (p27=LprG y p33= PE\_PEGRS33)

## **Conclusiones**

Se logró la estandarización correcta del MitoTracker® para el análisis de la actividad de ROS mitocondrial en células de individuos sanos y pacientes con LES. Con los datos obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que la generación de ROS mitocondriales de neutrófilos se ve aumentada en los pacientes con LES, el tratamiento con LprG no disminuye o aumenta la cantidad de ROS pero PE\_PGRS33 si disminuye los mismos a niveles de un donador sano, los neutrófilos con LES movilizan una menor cantidad de calcio mitocondrial de manera basal y esto no se ve afectado por los antígenos, no hay cambios en el potencial de membrana mitocondrial en ninguno de los tratamientos

## Referencias

- Ali Khan, W. (2017). Introductory Chapter: Systemic Lupus Erythematosus - Different Predisposing Factors.
- Barcellos, L., May, S., & Ramsay, P. (2009). High-density SNP screening of the major histocompatibility. *PLoS Genetics*.
- Bird, A., Chang, M., Barnard, J., Goldman, B., & Meednu, N. (2017). Neutrophils Slow Disease Progression in Murine Lupus via Modulation of Autoreactive Germinal Centers. *the journal of immunology*.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., & Fauler, B. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*.
- Cadieux, N., Parra, M., & Morriss, S. (2011). Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the Mycobacterium tuberculosis PE\_PGRS33 protein. *Microbiology*.
- Camicia, G., Pozner, R., & Larrañaga, G. (2014). Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *SHOCK*.
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L., & Nombela-Arrieta, C. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through. *Cell*.
- Cohen, N., & Aviram, R. (2015). Circadian control of oscillations in mitochondrial enzymes: limitation of velocity and nutrient utilization by the PERIOD of proteins. *PNAS*.
- de Oliveira, S., Rosowski, E., & Huttenlocher, A. (2016). Neutrophil migration in infection. *Nat Rev Immunol*.
- EMBL-EBI. (junio de 2018). *UniProt*. Obtenido de <https://www.uniprot.org/uniprot/P9WIF5>
- EMBL-EBI. (junio de 2018). *UniProt*. Obtenido de <https://www.uniprot.org/uniprot/P9WK45>
- Hermosilla, C., Muñoz, T., & Silva, L. (2014). The intriguing host innate immune response: Novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps. *parasitology*.
- Hou, Y., Kitaguchi, T., & Kriszt, R. (2017). Ca<sup>2+</sup>-associated triphasic pH changes in mitochondria during brown adipocyte activation. *molecular metabolims*.
- Hu, Z., Murakami, T., & Tamura, H. (2017). Neutrophil extracellular traps induce IL-1 $\beta$  production by macrophages in combination with lipopolysaccharide. *International Journal of molecular Medicine*.
- Jönsen, U., Truedsson, L., & Yu, X. (2009). El ADN mitocondrial polimorfismos asociados con la susceptibilidad y el fenotipo de lupus eritematoso sistémico. *SAGE Journal*.
- Khan, M., Hussain, G., & Kim, S. (2014). Mitochondrial dynamics and viral infections: A close nexus. *Biochimica et Biophysica*.

- Kienhöfer, D., Hahn, J., Stoof, J., Csepregi, J., Reinwald, C., Urbonaviciute, V., . . . Maueröder, C. (2017). Experimental lupus is aggravated in mouse strains with impaired induction of neutrophil extracellular traps. *JCI*.
- Lakschevitz, F., Hassanpour, S., Rubin, & Fine, N. (2016). Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *ECR*.
- lee, H.-T., Lin, C.-S., & Chen, W.-S. (2012). Leucocitos ADN Mitochondrial de la Alteración en el Lupus Eritematoso Sistémico y Su Relevancia para la Susceptibilidad a la Nefritis Lúpica. *international journal of molecular sciences* .
- Lin , M., Ho, J., & Harrison , L. (2013). Un anticuerpo-basada en leucocitosde captura de microarray para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico. *plos one*.
- Lood, C., Arve, S., Ledbetter, J., & Elkon, K. (2017). TLR7/8 activation in neutrophils impairs immune. *JEM*.
- Luo, X., Edwards, M., Reilly, C., Qinghui, M., & Ahmed , A. (2017). Diet and Microbes in the Pathogenesis of Lupus.
- Lupi, R., & Campanella, m. (2012). Mitochondrial dynamics, mitophagy and autophagy. *abcam*.
- Martins Perobelli, S., Gonçalves Silva, T., & Bonomo , A. (2017). Neutrophils Plasticity: The Regulatory Interface in Various Pathological Conditions.
- Medical College of Wisconsin. (21 de marzo de 2018 ). *rat genome data base* . Obtenido de [https://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?acc\\_id=PW:0001961](https://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?acc_id=PW:0001961)
- Mehta, M., Weinberg, S., & Chandel, N. (2017). Mitochondrial control of immunity:. *nature immunology* .
- Moreno-Altamirano, M., Cruz-Gómez, C., & López-Luis, L. (2017). Beneficial and Deleterious Effects of Neutrophil Extracellular Traps on Infection. En M. Khajah, *Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis*. INTECH.
- Moreno-Altamirano, M., Paredes-Gonzalez, I., & Espitia , C. (2012). Bioinformatic identification of Mycobacterium tuberculosis proteins likely to target host cell mitochondria: virulence factors? *BioMed central* .
- Mu, Q., Zhang, H., Liao, X., & Lin , K. (2017). Control of lupus nephritis by changes of gut microbiota. *BioMed central*.
- Nasrallah , C., & Horvath, T. (2014). Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism . *Nature reviews endocrinology*.
- Niemi, R. (22 de octubre de 2014). *An Overview of the Pathogenesis of tuberculosis*. Obtenido de intellectualventureslab.com: <http://www.intellectualventureslab.com/invent/overview-of-tuberculosis-pathogenesis>
- Ramsey-Goldman, R., & Manzi, S. (2000). Systemic lupus erythematosus. *W and H*.



- Remijsen, Q., Kuijpers, T., Lippens, S., & Vandenabeele, P. (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death and Differentiation*.
- Ribero, S., Sciascia, S., Borradori, L., & Lipsker, D. (2017). The Cutaneous Spectrum of Lupus Erythematosus. *Clinic Rev Allerg Immunol*.
- Rochael, N., Guimarães-Costa, A., Nascimento, M., & DeSouza-Vieira, T. (2015). Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent. *Scientific Reports*.
- ROSOVE, M. (03 de 09 de 2013). *national resource center on lupus* . Obtenido de <https://resources.lupus.org/entry/white-blood-cells>
- Sanchez-Garcia, F., Moreno-Altamirano, M., & Paredes-Gonzalez, I. (2012). Bioinformatic identification of Mycobacterium tuberculosis proteins likely to target host cell mitochondria: virulence factors? *BioMed Central*.
- Stoiber, W., & Obermayer, A. (2015). The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of *biomolecules* .
- Uzhachenko, R., & Shanker, A. (2014). Fus1/Tusc2 Is a Novel Regulator of Mitochondrial Calcium Handling, Ca<sup>2+</sup>-Coupled Mitochondrial Processes, and Ca<sup>2+</sup>-Dependent NFAT and NF- $\kappa$ B Pathways in CD4<sup>+</sup> T Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Wang, H., Chen, S., & Gu, Y. (2015). Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin. *Arthritis and Rheumatology* .
- Warren, E., Teskey, G., & Venketaraman, V. (2017). Effector Mechanisms of Neutrophils within the Innate Immune System in Response to Mycobacterium tuberculosis Infection. *journal of clinical medicine*.
- Yeruva, V., Kulkarni, A., Khandelwal, R., & Sharma, Y. (2016). The PE\_PGRS Proteins of Mycobacterium tuberculosis Are Ca<sup>2+</sup> Binding Mediators of Host–Pathogen Interaction. *Biochemistry*.
- Zawrotniak, M., Kozik, A., & Rapala-Kozik, M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps in Infectious Human Diseases.

## Anexos

### Reactivos

Alsever. Solución anticoagulante, de composición salina compuesto de 2.05% de dextrosa 0.8% de citrato de sodio, 0.055% de ácido cítrico y 0.42 de cloruro de sodio. Utilizada como coagulante y para separar eritrocitos de leucocitos, conservada en refrigerador común.

Agua estéril. Agua bidestilada y esterilizada para el uso en la lisis fuerte de eritrocitos por la acción que genera un choque osmótico en estos

KCl. Solución de cloruro de sodio al 0.6% esterilizado utilizado en la lisis fuerte de eritrocitos

PBS. Buffer de fosfatos, utilizada en el manejo y conservación de células in vitro, contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Mientras que los grupos fosfato mantienen el pH estable, la osmolaridad coincide con la del cuerpo humano (isotónico). Se trata de una solución isotónica, es decir, la concentración de soluto es igual dentro y fuera de la célula; no es tóxica para las células de los mamíferos, y su pH es de 7.4.

Ficoll. Es una solución de un polímero ramificado de sacarosa no iónico, muy hidrofílico y soluble en agua, se utiliza para separación de gradiente de densidad

DAPI. El 4',6-diamino-2-phenylindole es un fluorocromo que se une específicamente a DNA tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 358 nm (ultravioleta) y su máximo de emisión es en 461 nm (azul). Por lo tanto, para la microscopía de fluorescencia DAPI es excitado con ultravioleta de la luz y se detecta a través de un azul/cian filtro. El pico de emisión es bastante amplio DAPI también se unen al ARN, a pesar de que no es tan fuertemente fluorescente. Su emisión se desplaza a alrededor de 500 nm cuando se une al ARN.

MitoTracker™ Red CMXRos. Es un fluorocromo rojo fluorescente que tiñe las mitocondrias de las células vivas. Su acumulación depende del potencial de la membrana. El colorante se conserva bien después de la fijación mediante aldehído.

Rhod-2. Es un marcador fluorescente que se une a calcio, de color rojo, utilizado comúnmente para la localización de este en diversos experimentos, utilizado en la movilización de calcio.

Ionomicina. es un ionóforo producido por la bacteria *Streptomyces conglobatus* se utiliza en la investigación para aumentar el nivel intracelular de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y como una herramienta de investigación para comprender el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de membranas biológicas.

## Crusters de diferenciación

CD4: glicoproteína-T de superficie celular. Es una proteína de superficie de membrana importante para una respuesta inmune contra patógenos externos funciona como correceptor de MHC de clase II

CD11: integrina alfa, conformada por las subunidades: M L y X, siendo estas caracterizadas como CD11b, CD11a y CD11c respectivamente.

- ) CD11b: La integrina ITGAM/ITGB2, se encuentra implicado en diversas interacciones de adhesión con macrófagos, monocitos y granulocitos, así como la mediación de adhesión de partículas del complemento.
- ) CD11a: La integrina alfa-L/beta-2 es un receptor de ICAM1, ICAM2, ICAM3 y ICAM4. También receptor para F11R
- ) CD11c: La integrina alfa-X/beta-2 es un receptor de fibrinógeno. Reconoce la secuencia de G-P-R en el fibrinógeno. Interviene en la interacción célula-célula durante la respuesta inflamatoria.

CD16: receptor Fc de inmunoglobulina gamma para la región de baja afinidad tipo III-a y III-b.

- ) CD16a: Se une a un complejo o inmunocomplejos de IgG y también IgG monomérica. La media de anticuerpos citotoxicidad celular dependiente (ADCC) y otro anticuerpo-dependiente de respuestas, tales como la fagocitosis
- ) CD16b: Se une a un complejo o agregados de IgG y también IgG monomérica. Contrario a III-A, no es capaz de mediar anticuerpo-dependiente de la citotoxicidad y la fagocitosis. Puede servir como una trampa para los complejos inmunes en la circulación periférica que no activa de neutrófilos.

CD32: receptor Fc de inmunoglobulina gamma para la región de baja afinidad tipo II. Receptor involucrado en células efectoras y sus mecanismos como la fagocitosis de complejos inmunes y modulación de producción de anticuerpos en linfocitos B. La unión a este receptor produce la modulación del estado previo a la activación de las células a través de los receptores de antígenos de las células B (BCR), las células T (TCR) o a través de otro receptor Fc

CD62L: L-selectina o SELL. De la familia de selectinas calcio dependiente que intervienen en la adhesión celular mediante la unión de glicoproteínas en células vecinas, así como la adhesión de linfocitos en células epiteliales en vénulas de endotelio alto de ganglios linfáticos periféricos.

CD103: integrina alfa-E: La integrina alfa-E/beta-7 es un receptor de E-cadherina. Interviene en la adhesión de la intra-epiteliales de los linfocitos T a las monocapas de células epiteliales.

CD177: se asocia con la el heterodimero beta- 2 de la integrina ITGAM/CD11b y ITGB2/CD18, mediando la activación de TNF-alfa, incluyendo la desgranulación y producción de superóxido en neutrófilos. Además la fracción beta-2 de la integrina permite la internalización y el control de la producción de quimiocinas favoreciendo la migración y su adherencia celular.

CDw198: C-C de receptores de quimiocinas de tipo 8. Receptor de la quimiocina CCL1/SCYA1/I-309. Puede regular la quimiotaxis de monocitos y apoptosis de células de la línea tímica y una alternativa de receptor CD4 en infección con HVI

CDw199: C-C de receptores de quimiocinas de tipo 9. Los receptores de quimiocinas SCYA25/TECK. Posteriormente se transduce una señal mediante el aumento de la acumulación intracelular de iones de calcio.

CD322: unión de molécula de adhesión B o JAM2. Puede jugar un papel en los procesos de señalización de linfocitos a los órganos linfoides secundarios.

CD328: unión de ácido sialico a Ig tipo lectina 7. Sustituto de molécula de adhesión de ácidos sialicos dependiente de la unión a células, se une preferentemente al ligando alfa-2,3 - y alfa-2,6 al ácido sialico.