



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estudio de la respuesta glial de corteza de rata a las  
proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de la  
bacteria *Mycobacterium tuberculosis***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A  
P R E S E N T A:**

**KAREN STEPHANY CRUZ HERNÁNDEZ**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**



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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1.- DATOS DEL ALUMNO

Cruz  
Hernández  
Karen Stephany  
55 65 22 40 30  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
312127279

### 2.- DATOS DEL TUTOR

Dra. Mónica Adriana  
Torres  
Ramos

### 3.- DATOS DEL SINODAL 1

Dra. Hilda  
Martínez  
Coria

### 4.- DATOS DEL SINODAL 2

Dr. Citlaltepeltl  
Salinas  
Lara

### 5.- DATOS DEL SINODAL 3

Dr. Octavio César  
García  
González

### 6.- DATOS SINODAL 4

Dr. José Eduardo  
Rodríguez  
Bustamante

Este trabajo fue realizado en la Unidad Periférica de Neurociencias del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” bajo el proyecto titulado “Neuroinflamación crónica durante el envejecimiento como factor de riesgo de enfermedades neurológicas: Participación del receptor de hidrocarburos de arilo en astrogliosis y neurodegeneración” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (CONACYT-FOSISS 262295) con número de registro INNN-156/16.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Mónica Torres, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por su confianza, su tiempo y el interés que tuvo en todo momento hacia mi formación, por guiarme en mi vida académica y personal.

Al Dr. Aurelio Campos por abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia, sus consejos y apoyo.

A la Dra. Marisol Orozco por su apoyo incondicional para la realización de este proyecto, por brindarme su tiempo, confianza, consejos y gran parte de los aprendizajes adquiridos en el proceso. A la Dra. Norma Serrano, por compartir sus conocimientos conmigo y auxiliarme cuando lo necesitaba. Muchas gracias.

A la Dra. Clara Espitia, por brindarme las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 fundamentales para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Pablo, Iván, Aleida, Marycruz, Gaby, Miguel, Joselyn y Brian quienes lograron que todo este proceso fuera más ameno y llevadero, por su compañerismo y sobre todo por la amistad que logramos consolidar. A mi amigo de toda la vida, Felipe, gracias porque a pesar de la distancia haces presencia en los momentos en los que más te necesito.

A todo el personal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, particularmente al bioterio, por proporcionarme los animales para la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado; Dra. Hilda Martínez, Dr. Citlaltepeltl Salinas, Dr. Octavio César García y Dr. José Eduardo Rodríguez, por su tiempo, disposición y retroalimentación a este proyecto.

## DEDICATORIA

A mi mamá, Maricela Cruz Hernández, por darme el mejor de los ejemplos para continuar con mi vida académica, por confiar en mí, por tu cariño, comprensión y apoyo. Siempre serás mi más grande inspiración.

A mi familia porque sin duda alguna siempre han sido un pilar importante en mi formación académica, por cobijarme y apoyarme en todos mis proyectos.

A Javier, por impulsarme siempre a crecer. Por creer en mí, incluso más que yo, por estar conmigo en cada paso que doy.

*El éxito es aprender a ir de fracaso en fracaso sin desesperar. Winston Churchill*

## INDICE

1. ABREVIATURAS.....	9
2. RESUMEN.....	10
3. ABSTRACT.....	12
4. INTRODUCCIÓN.....	14
4.1 Sistema Nervioso.....	14
4.2 Células del Sistema Nervioso Central.....	14
4.3 Neuronas.....	15
4.4 Células gliales.....	16
4.5 Astrocitos.....	16
4.5.1 Participación de los astrocitos en el sistema nervioso central.....	18
4.5.2 Astroglisis.....	19
4.6 Microglía.....	21
4.6.1 Funciones.....	21
4.6.2 Activación de la microglía.....	22
4.6.3 Microglisis.....	23
4.7 Tuberculosis.....	24
4.8 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	25
4.8.1 Patogenicidad de <i>M. tb</i> .....	27
4.8.2 Proteína ESAT-6.....	28
4.8.3 Proteína PE_PGRS33.....	29
5. ANTECEDENTES.....	30
6. JUSTIFICACIÓN.....	33
7. HIPÓTESIS.....	34
8. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos particulares.....	35
9 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
10 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
10.1 Animales.....	37
10.2 Cultivo primario de astrocitos corticales.....	37

10.3	Subcultivo de astrocitos.....	39
10.4	Cultivo primario de microglía.....	39
10.5	Subcultivo de microglía.....	40
10.6	Proteínas recombinantes PE_PGRS33 y ESAT-6.....	40
10.7	Inmunofluorescencia.....	41
10.8	Viabilidad celular, técnica calceína.....	42
10.9	Generación de medios condicionados de microglía (MCM).....	43
10.10	Ensayos de ELISA.....	43
10.11	Análisis estadístico.....	44
11	<b>RESULTADOS</b>	
11.1	Estandarización del cultivo primario de microglía.....	45
11.2	Purificación del cultivo primario de microglía.....	46
11.3	Purificación del cultivo primario de astrocitos.....	47
11.4	Efecto de la proteína PE_PGRS33 en astrocitos corticales de rata después de 48 horas de exposición.....	48
11.5	Efecto de la proteína ESAT-6 en astrocitos corticales de rata después de 48 horas de exposición.....	49
11.6	Expresión de factores pro-inflamatorios en medios condicionados de astrocitos (MCA) después de 48 h de exposición a la proteína PE_PGRS33.....	50
11.7	Expresión de factores pro-inflamatorios en medios condicionados de astrocitos (MCA) después de 48 h de exposición a la proteína ESAT-6.....	51
11.8	Expresión de factores pro-inflamatorios en medios condicionados de microglía (MCM) después de 24 hrs de exposición a las proteínas PE_PGRS3 y ESAT-6.....	52
11.9	Exposición de astrocitos a medios condicionados de microglía tratada con la proteína PE_PGRS33.....	54
11.10	Exposición de astrocitos a medios condicionados de microglía tratada con la proteína ESAT-6 .....	55



11.11	Perfil inflamatorio en medios condicionados de astrocitos y microglía después del tratamiento con las proteínas PE_PGRS33 y ESAT-6.....	56
12	DISCUSIÓN.....	58
13	CONCLUSIONES.....	62
14	PERSPECTIVAS.....	63
15	BIBLIOGRAFÍA.....	64

## 1. ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero bovina
ESAT-6	<i>6 Early Secretor Antigenic Target</i>
PE_PGRS33	<i>Polymorphic GC Rich Repetitive Sequence</i>
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dubelcco
FBS	Suero Fetal Bovino
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
MCM	Medio Condicionado de Microglia
MCA	Medio Condicionado de Astroцитos
MCAM	Medio Condicionado de Astroцитos y Microglia
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
TB	Tuberculosis
<i>M. tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
SNC-TB	Tuberculosis en el sistema nervioso central
TBM	Meningitis tuberculosa
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral Alpha
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
LPS	Lipopolisacárido

## 2. RESUMEN

### Introducción

La tuberculosis es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, su manifestación más severa ocurre en el sistema nervioso, las infecciones en el sistema nervioso son orquestadas por microglía y astrocitos principalmente, las primeras son las principales efectoras inmunológicas con propiedades fagocíticas en el cerebro, y responden en primera instancia al daño adaptando rápidamente su fenotipo para producir una respuesta oportuna; mientras que los astrocitos detectan el daño al tejido, ayudan a mitigarlo y reparar la lesión. Cuando el estímulo es crónico se producen alteraciones en las funciones fisiológicas de microglía y astrocitos que pueden contribuir a la pérdida de sus funciones, afectando directamente a las neuronas que contribuye al desarrollo de ciertas patologías del SNC; algunos de los agentes con alto grado de virulencia de esta micobacteria, son las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 y han sido poco estudiados en células de gliales.

### Objetivo

Determinar la respuesta tóxica e inflamatoria de la microglía y de los astrocitos posterior a la exposición de las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*.

### Materiales y Métodos

Se realizaron cultivos primarios de microglía y astrocitos corticales de ratas neonata de la cepa Wistar, la pureza de los cultivos se determinó mediante la técnica de inmunocitoquímicas para las proteínas Iba-1 y GFAP respectivamente. Los astrocitos fueron tratados durante 48h con PE\_PGRS33 y ESAT-6 en las concentraciones de 0, 2.5, 5, 25 y 50 µg /mL, del mismo modo las células de la microglía fueron tratadas con las concentraciones citadas a 24h, los medios condicionados fueron recuperados para tratar nuevamente a los astrocitos por 48h y también se recuperaron los medios condicionados de microglía con astrocitos. Se evaluó la viabilidad celular después de cada uno de los tratamientos mencionados

con la técnica de calceína y se midió la cantidad de citocinas IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y TNF $\alpha$  en todos los medios condicionados, mediante la técnica de ELISA.

## **Resultados**

Las proteínas PE\_PGRS33, ESAT-6 y el MCM tratada con las mismas, en las concentraciones evaluadas produjeron hipertrofia celular y cambios morfológicos que indican reactividad de los astrocitos, no obstante, no se registraron datos de muerte celular. En los medios condicionados de microglía se detectó un mayor aumento en el nivel de IL-1 $\beta$ /IL-1F2 estimulada con ESAT-6; en el tratamiento con PE\_PGRS33 a 50  $\mu$ g /ml registró la mayor liberación de citocinas aumentando 68 veces más IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y 1000 veces más de TNF $\alpha$  respecto al control. Por otra parte, en los medios condicionados de astrocitos, se observó un ligero aumentos de ambas citocinas después de los tratamientos, sin ser significativo. Finalmente, la expresión de TNF $\alpha$  aumentó en medios condicionados de astrocitos y microglía (MCA-M) posterior a la exposición a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6.

## **Conclusión**

Los resultados sugieren que la comunicación entre microglía y astrocitos en respuesta a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 está involucrada en el proceso infeccioso de la bacteria generando un ambiente proinflamatorio, que, si bien no fue tóxico para estas células, significan una amenaza importante para células más sensibles como neuronas y oligodendrocitos.

### **3. ABSTRACT**

#### **Introduction**

Tuberculosis is caused by *Mycobacterium tuberculosis*, its most severe manifestation occurs in the nervous system, infections in the nervous system are orchestrated by microglia and astrocytes; which are the main immunological effectors with phagocytic properties in the brain and are the first to respond damage by rapidly adapting their phenotype. The astrocytes detect tissue damage, help mitigate it and repair the injury. When the stimulus is chronic, alterations occur in the physiological functions of microglia and astrocytes can contribute to the loss of their functions, directly affecting neurons that contribute to the development of certain CNS pathologies; Some of the agents with a high degree of virulence of this mycobacterium, are the proteins PE\_PGRS33 and ESAT-6 and have been little studied in glial cells.

#### **Objective**

To determine microglia and astrocytes' toxic and inflammatory response after exposure to proteins PE\_PGRS33 and ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*.

#### **Materials and Methods**

Primary cultures of microglia and cortical astrocytes of neonatal rats of the Wistar strain were made, the purity of the cultures was determined by the immunocytochemical technique for the Iba-1 and GFAP proteins, respectively. Astrocytes were treated for 48H with PE\_PGRS33 and ESAT-6 at concentrations of 0, 2.5, 5, 25 and 50 µg/ml, in the same way microglia cells were treated with the mentioned concentrations at 24H, the conditioned media were recovered to treat astrocytes again for 48H and microglia conditioned media with astrocytes were also recovered. Cell viability was evaluated after each of the mentioned treatments with the calcein technique and the quantity of cytokines IL-1β/IL-1F2 and TNFα was measured in all the conditioned media, using the ELISA technique.

## **Results**

The proteins PE\_PGRS33, ESAT-6 and the MCM treated with them, at the concentrations evaluated, produced cell hypertrophy and morphological changes that indicate astrocytes reactivity; however, cell death data were not recorded. A greater increase in the level of IL-1 $\beta$ /IL-1F2 stimulated with ESAT-6 was detected in microglia conditioned media; in the treatment with PE\_PGRS33 at 50  $\mu$ g/ml, it registered the highest release of cytokines, increasing 68 times more IL-1 $\beta$ /IL-1F2 and 1000 times more TNF $\alpha$  compared to the control. On the other hand, in the conditioned media of astrocytes, a slight increase of both cytokines was observed after the treatments, without being significant. Finally, the expression of TNF $\alpha$  increased in conditioned media of astrocytes and microglia (MCA-M) after exposure to PE\_PGRS33 and ESAT-6 proteins.

## **Conclusion**

The results suggest that the communication between microglia and astrocytes in response to PE\_PGRS33 and ESAT-6 proteins is involved in the bacterial infection process, generating a proinflammatory environment, which, although not toxic to these cells, represents a significant threat for more sensitive cells such as neurons and oligodendrocytes.

## 4. INTRODUCCIÓN

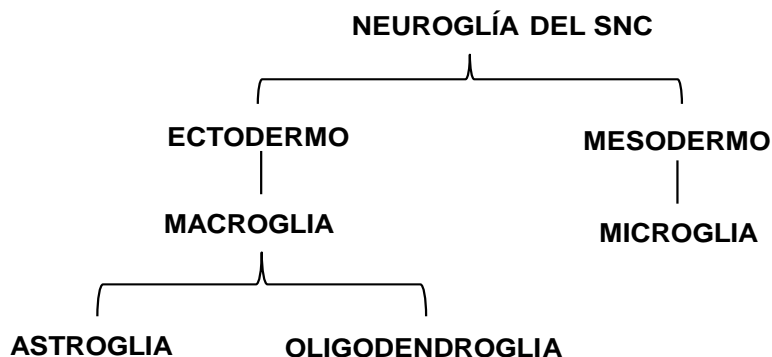
### 4.1 Sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) es una red compleja de estructuras especializadas que se encargan de controlar y regular múltiples órganos y sistemas, su buen funcionamiento es vital para el cuerpo humano; puede detectar cambios tanto en el interior como en el exterior del organismo (Romero, 2015; Martínez, 2014).

El SN recibe información del ambiente, la cual es procesada para emitir una respuesta apropiada, algunas de ellas se realizan en milisegundos como un reflejo que es una respuesta automática y otras necesitan de un tiempo mayor, como el aprendizaje, que requiere de una cooperación y comunicación de diversas regiones del cerebro (Martínez, 2014).

### 4.2 Células del Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central (SNC) vertebrado en desarrollo deriva de la capa de células germinales del ectodermo. El SNC está constituido por diversos linajes celulares, todos y cada uno de ellos desempeñan una función vital, entre estas células se encuentran las neuronas y células gliales, su clasificación se puede realizar de acuerdo con su origen embrionario (Figura 1).

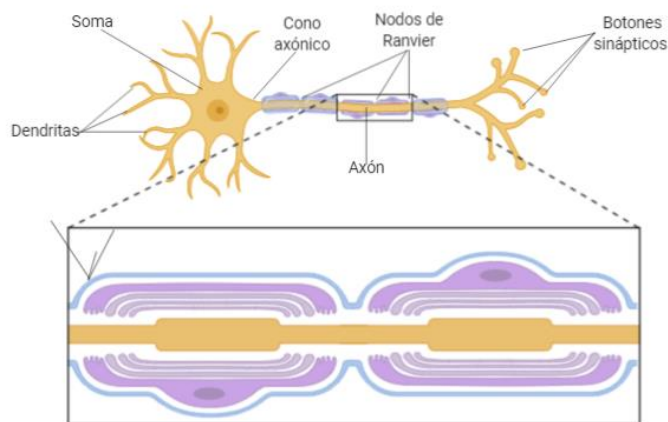


**Figura 1.** Clasificación de los linajes celulares de la neuroglía presentes en el sistema nervioso central de acuerdo a su origen embrionario

Las neuronas, los oligodendrocitos y los astrocitos comparten un origen neuroepitelial común y nacen a lo largo de la embriogénesis de una manera definida temporalmente (Engelhardt & Liebner, 2014), mientras que la microglía es el único linaje proveniente del mesodermo.

### 4.3 Neuronas

El SNC está compuesto de un gran número de células nerviosas excitables denominadas neuronas, que mantienen una relación morfofuncional con un tejido especializado denominado glia (Snell, 2010). El encéfalo humano contiene alrededor de 100,000 millones de neuronas. Aunque pueden tener distintas formas, tamaños, distribución espacial y función, todas las neuronas tienen una estructura básica, constan de: cuerpo neuronal o soma, dendritas, axón, cono axónico, botones sinápticos y nodos de Ranvier (Tortora & Derrickson, 2013), (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura básica de una neurona. Cruz-Hernández

Las neuronas están especializadas en la recepción y procesamiento de la información, esto se lo logran mediante mecanismos de comunicación químicos y eléctricos que están asociados fundamentalmente a la membrana plasmática.



Las neuronas pueden establecer diversos circuitos de comunicación con otras neuronas mediante sinapsis, las cuales son aproximaciones celulares donde se intercambia información entre dos neuronas (Megías, et al., 2017).

#### **4.4 Células gliales**

Como sugiere el nombre griego, glía significa “pegamento”, Virchow concibió la neuroglia como una especie de tejido conectivo y descubrió que este tejido también contenía elementos celulares. (Prinz, et al., 2019). Las células gliales se conocen comúnmente como el pegamento del sistema nervioso ya que rodean a las neuronas y las mantienen en su lugar; en los últimos años, numerosos estudios han demostrado que la glía tiene otras funciones importantes que favorecen la estabilidad de las neuronas, incluyendo el control de la homeostasis iónica, el suministro de nutrientes, oxígeno, la destrucción de patógenos, la eliminación de células muertas, recaptura de neurotransmisores, modelación sináptica y el aislamiento entre ellas, por lo que es muy importante que todas estas células mantengan una buena regulación y comunicación entre ellas, de este modo se mantendrá un ambiente saludable en el sistema nervioso, de lo contrario existirá un daño sistémico que repercutirá negativamente en el tejido, incluso llegando a producir diversas disfunciones cerebrales. Entre las células que podemos destacar son los astrocitos y microglía.

#### **4.5 Astrocitos**

Los astrocitos son un linaje de células gliales presentes tanto en vertebrados como en invertebrados, fueron observados por primera vez por Camillo Golgi en 1871 (Cotrina & Nedergaard, 2002).

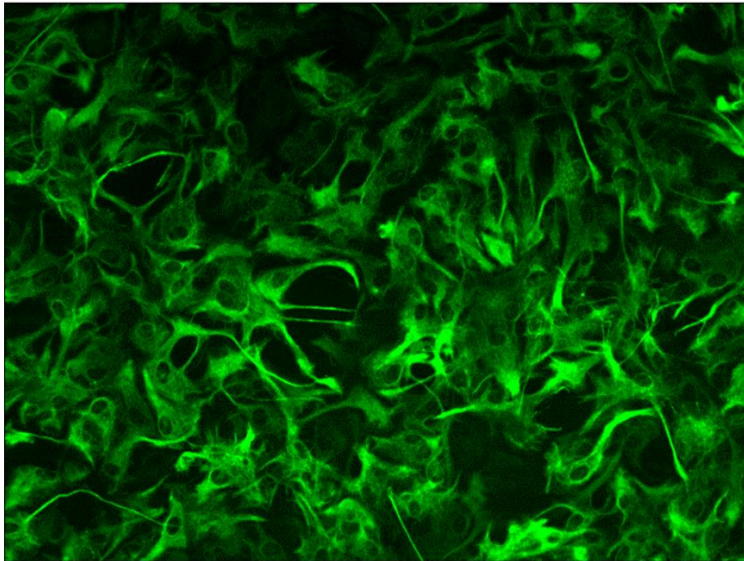
En los últimos 25 años, ha quedado claro que los astrocitos participan en una gran cantidad de procesos fisiológicos esenciales en un cerebro sano (Dossi, et al., 2018), ejercen una serie de respuestas complejas, además de ser el tipo celular

más grande y frecuente en el SNC representando aproximadamente el 20% ~ 40% del número total de células cerebrales (Sofroniew, et al., 2010), superando en más de cinco veces el número de neuronas, tienen un cuerpo celular central, de aproximadamente 15 a 17  $\mu\text{m}$  de diámetro, y procesos largos que se extienden en todas las direcciones (Liu, et al., 2011; Zhou, et al., 2019).

La generación, diferenciación y maduración de estas células es diferente en las regiones cerebrales, aunque este suele ocurrir después de que se completan los principales periodos de neurogénesis y migración neuronal en el cerebro de mamíferos (Allen & Eroglu, 2017).

El nombre de astrocito deriva de palabras griegas y latinas “*astron*” y “*astrum*” se traducen como “estrella” o “cuerpo celeste” (Lu, et al., 2018), aunque adquieren mayoritariamente esta morfología, suele ser muy variable, dependiendo de la actividad que tengan o, incluso de la región en la que se encuentren. Se denominan protoplasmáticos si se localizan en la sustancia gris o fibrosos si se encuentran en la sustancia blanca.

A pesar de tener esta versatilidad en su morfología todos los astrocitos expresan una proteína específica en su citoesqueleto denominada proteína glial fibrilar ácida (GFAP), la cual se puede considerar un marcador sensible y confiable que marca a los astrocitos (Figura 3), esto nos permite identificarlos con facilidad del resto de la glía (Sofroniew, et al., 2010). Se han utilizado otros marcadores para la identificación de astrocitos como glutamina sintetasa y S100 $\beta$ , sin embargo, estas proteínas no son exclusivas de este tipo celular.



**Figura 3.** Astrocitos corticales de rata neonata de cultivo primario, teñidos mediante la técnica de inmunofluorescencia que expresa la proteína GFAP (verde) específica de astrocitos, aumentado 100 veces. Foto: Cruz-Hernández K.

#### **4.5.1 Participación de los astrocitos en el sistema nervioso central**

Los astrocitos desempeñan un papel crítico en el metabolismo energético, el reciclaje de neurotransmisores, contribuyen en la microarquitectura cerebral al controlar la formación y eliminación de sinapsis, muestran plasticidad estructural en respuesta a la actividad y el comportamiento sináptico (Sloan & Barres, 2014). La evidencia de que los astrocitos juegan un papel crítico en la sinaptogénesis deriva de experimentos que se realizaron hace más de 20 años, en los cuales se demostró que las neuronas cultivadas *in vitro* aisladas formaban pocas sinapsis y estas aumentaban tanto en el número como en la fuerza cuando se realizaban co-cultivos con astrocitos (Allen & Eroglu, 2017), del mismo modo se ha visto que los astrocitos regulan la eliminación de sinapsis mediante la secreción del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que regula a la alza el C1q complejo proteico involucrado en el sistema del complemento en las neuronas, lo que lleva al “etiquetado” para la eliminación por fagocitosis por la microglía (Allen., & Eroglu, 2017).

Recientemente se ha demostrado que los astrocitos proporcionan a las neuronas soporte mecánico, auxilian en el sostén de la barreraa hematoencefálica, liberan

sustratos nutricionales y energéticos como glucosa y lactato para las neuronas, desempeñan un papel importante en la vasomodulación y la reparación tisular (Olwen, R. 2016).

#### 4.5.2 Astrogliosis

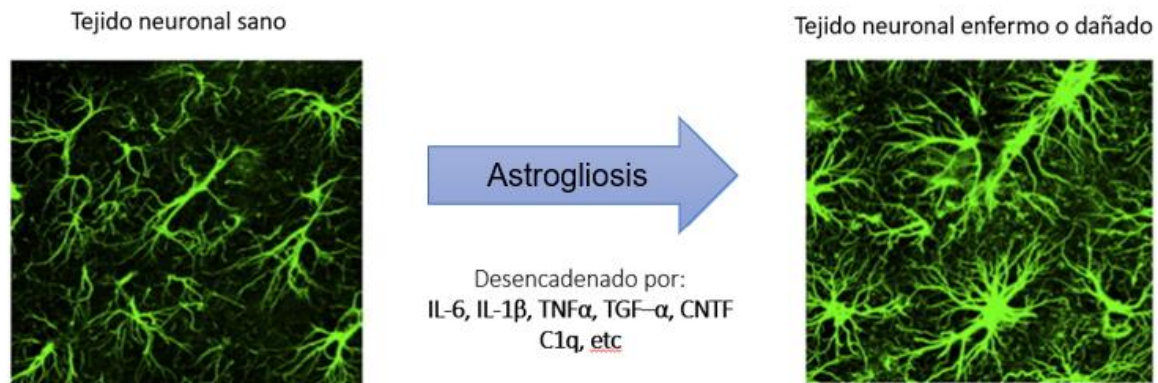
Los astrocitos desempeñan múltiples funciones fisiológicas, reaccionan a prácticamente todos los tipos de alteraciones patológicas en la homeostasis cerebral mediante cambios morfológicos y moleculares significativos (Escartin, et al., 2019). Cuando los astrocitos detectan algún tipo de daño al tejido su respuesta inmediata será mitigar el daño y tratar de reparar la lesión. Sin embargo, cuando el estímulo es crónico se producen una serie de alteraciones en las funciones fisiológicas de los astrocitos que pueden contribuir a la pérdida de estas e influir directamente en el desarrollo de ciertas patologías que atacan al SNC (Zhou, et al., 2019).



**Figura 4.** Esquema representativo del cambio morfológico de astrocitos en estado normal a astrocito reactivo después de la estimulación dada por un daño o una lesión.

La astrogliosis consiste en cambios moleculares y funcionales graduales en respuesta a lesiones y alteraciones en el SNC, es una reacción defensiva que tiene como objetivo restaurar la homeostasis tisular y restringir el daño, estas alteraciones pueden variar de acuerdo con el grado de lesión, (Figura 4). En estímulos moderados, la astrogliosis puede llegar a una etapa resolutive si la agresión se elimina. Sin embargo, cuando se llega a astrogliosis reactiva severa, se produce

una mayor proliferación astrocítica en el sitio de la lesión, impulsando la generación de una cicatriz glial en los bordes del daño, de la necrosis o tumores (Dossi, et al., 2018). Algunos rasgos que se han descrito como distintivos de la astrogliosis es la regulación al alza de GFAP (proteína ácida fibrilar glial) (Figura 5), hipertrofia celular y un aumento en el número de procesos (Ceyzériat, et al., 2018), se ha demostrado que varias citocinas, incluido el factor de crecimiento transformante ( $TGF-\alpha$ ), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la interleucina-6 (IL-6), entre otros, activan a los astrocitos y, una activación excesiva puede ocasionar una desregulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) o hasta su ruptura (Pekny & Pekna, 2016).



**Figura 5.** Astrogliosis. Fotografías de fluorescencia de astrocytes que muestran la expresión de la proteína GFAP (verde) en tejido neuronal sano y dañado, en este último observando una mayor expresión de esta proteína, desencadenado por algunos factores propios del astrocyte o células adyacentes. Modificado de: Pekny & Pekna, 2016.

Existe una creciente evidencia que apoya la idea de que la pérdida de funciones normales de los astrocytes por la astrogliosis, contribuye a la patogénesis de varios trastornos neurológicos y psiquiátricos y se considera una característica común y distintiva de la etapa tardía de la neurodegeneración, por lo tanto, la integridad morfológica y funcional de los astrocytes puede representar un importante objetivo terapéutico (Sofroniew, et al, 2010; Zhou, et al., 2019). Recientemente se ha dado una clasificación binaria de los astrocytes como neurotóxicos o reparadores A1 y A2, respectivamente, haciendo una similitud con la clasificación de macrófagos

(Liddelow, et al., 2017), actualmente se discute la evaluación de múltiples parámetros moleculares y funcionales que pudieran abrir el panorama a una clasificación más extensa de estas células (Escartin, et al., 2021)

## **4.6 Microglía**

Las células de la microglía son fagocitos residentes del SNC (Madore, et al., 2020), fue descrita por primera vez por Pío del Río Ortega en 1920 (López, 2012), observando algunos procesos que provenían desde el cuerpo celular de forma ameboide y que lograban tener largas proyecciones, sus análisis histológicos sentaron las bases para la comprensión actual de la biología de estas células.

### **4.6.1 Funciones**

Las células de la microglía son las principales efectoras inmunológicas con propiedades fagocíticas en el cerebro (Lai, et al., 2018; Malm, 2012), constituyen entre el 10 y 15% de todas las células gliales (Nayak, et al., 2014), son las primeras en responder al daño adaptando rápidamente su fenotipo para producir una respuesta oportuna (Madore, et al., 2020). Se sabe que estas células son indispensables para el buen desarrollo y funcionamiento del SNC; sus tareas son multifacéticas ya que participan en la maduración, regulación y homeostasis cerebral (Tang & Le 2016; Holtman, et al., 2017).

Realizan el refinamiento de redes sinápticas, promueven la muerte neuronal a través de factores intrínsecos o extrínsecos, es decir, si las neuronas reciben una señal intracelular que les indique muerte por apoptosis, la microglía participa de manera activa en la eliminación de restos celulares por fagocitosis, además tiene la capacidad de “etiquetar” e inducir la muerte de aquellas neuronas que presenten alguna disfunción. También se sabe que estas células estimulan la supervivencia neuronal mediante la secreción de factores de crecimiento, así como la regulación de la plasticidad sináptica y el aprendizaje (Ransohoff., 2016), participan activamente

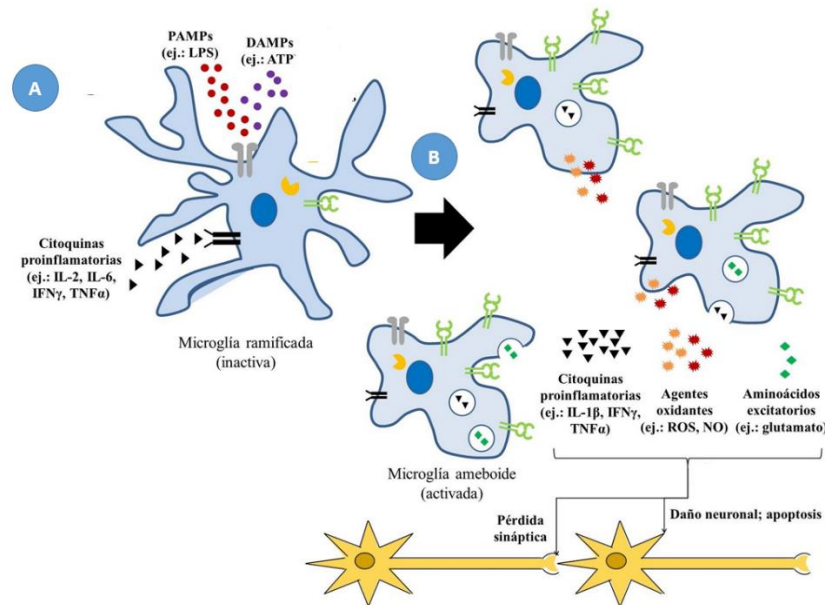
en la remodelación de la arquitectura sináptica, es decir, se dedica a pulir los circuitos del cerebro para mantener sólo las conexiones neuronales óptimas, las mejores. Cuando la microglía se encuentra con procesos neuronales redundantes o excesivos que podrían obstaculizar o entorpecer la transmisión del impulso nervioso los elimina mediante poda sináptica (Labzin, et al., 2017).

#### **4.6.2 Activación de la microglía**

Las células de la microglía están dotadas de todos los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), por lo que pueden responder rápidamente a cualquier estímulo dado por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño (DAMPs); en condiciones normales, la respuesta inmune se regula en el proceso de iniciación o resolución a fin de mantener la homeostasis del tejido (Mikita, et al., 2011; Kreutzberg, 1996). Sin embargo, si se presenta un estímulo persistente que mantenga a la microglía activada puede conducir a daño tisular y neurodegeneración debido a la producción exacerbada de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) (Timmerman., et al., 2018).

Al igual que los macrófagos, podemos distinguir al menos a dos subpoblaciones de microglía. Las respuestas M1 y M2 describen las actividades opuestas de matar y reparar, respectivamente. Las M1 “clásicamente activadas” se consideran células efectoras de la respuesta inmune innata, la cual incluye una alta producción de citocinas proinflamatorias IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-6 y TNF- $\alpha$ , así como alta producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno. De manera opuesta, la respuesta M2 “activadas alternativamente” se caracteriza por una baja producción de citocinas proinflamatorias, una alta producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y tienen funciones inmunorreguladoras; de manera general es una respuesta reparadora (Refai, et al., 2018). Se ha visto que estos fenotipos pueden ser estados reversibles tanto *in vivo* como *in vitro* de acuerdo con el estímulo que reciban,

también se observa un cambio entre los perfiles de citocinas pro y antiinflamatorias durante esta reversibilidad fenotípica (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema representativo de la activación de la microglía la cual se encuentra en un estado inactivo con múltiples procesos (A), una vez que detecta algún PAMPs o DAMPs en el medio, cambia su fenotipo a una forma activada la cual se caracteriza por adquirir forma ameboide con procesos más pequeños (B), y la posterior liberación de diversas citocinas inflamatorias y agentes oxidantes, el mantenimiento crónico de éste ambiente proinflamatorio puede conducir a la pérdida sináptica o muerte neuronal, entre otras cosas. Imagen modificada de Quesada, et al., 2016.

### 4.6.3 Microgliosis

La gliosis es un cambio reactivo inespecífico de las células gliales en respuesta a lesiones y agresiones, comúnmente este estímulo conduce a la proliferación o hipertrofia de las células gliales. En particular, la microgliosis se presenta como cambios morfológicos, donde las células pasan de formas ramificadas a ameboides con cuerpos celulares agrandados y ramificaciones más cortas (Chen, et al., 2018), a menudo se regula incrementando la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) (Duffy, et al., 2018), además de la migración hacia el sitio de la lesión por quimiotaxis (Quesada, et al., 2016).



La liberación prolongada de mediadores proinflamatorios por parte de la microglía podría contribuir en el desarrollo de procesos neurodegenerativos, se ha descrito que la microglía desempeña un papel clave en la neurotoxicidad al iniciar la respuesta inflamatoria en la neurodegeneración (Lu, et al., 2019), por lo que la atenuación de la inflamación mediada por microglía se ha convertido en un punto importante para mejorar el proceso neurodegenerativo (Ginhoux, et al., 2015), ya que se ha reportado que existe una respuesta excesiva por parte de estas células en diversas patologías como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington, los cuales se caracterizan por la pérdida neuronal lenta y progresiva en ciertas áreas del cerebro (Quesada, et al., 2016).

#### **4.7 Tuberculosis**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) o bacilo de Koch (Pimienta, et al., 2012; Lu, et al., 2018; Leem, et al., 2018), se considera la novena causa de muerte en todo el mundo que pone en grave peligro la salud humana (Miggiano & Ferraris 2020). En 2018, las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de la carga mundial de tuberculosis fueron 10 millones de casos y 1,45 millones de muertes (Iacobino & Giannoni, 2020).

La tuberculosis pulmonar ocurre comúnmente después de la infección de *M. tb*, no obstante, también suele afectar órganos y tejidos fuera del parénquima pulmonar, representando del 20 a 25% de los casos de esta enfermedad (Golden & Vikram, 2005; Ford, et al., 2013). Entre la tuberculosis extrapulmonar, aproximadamente del 1 a 5% se atribuye a la tuberculosis en el sistema nervioso central (TB-SNC) (Fanlo & Tiberio 2007; Ramirez, et al., 2015).

La TB-SNC puede presentarse de distintas formas dependiendo del área afectada como: meningoencefalitis, abscesos tuberculosos, granulomas los cuales son agregados de células inmunes como macrófagos, linfocitos y otras células inmunes

del huésped, y se forma en respuesta a estímulos persistentes (Smith, 2003; Cadena & Flynn, 2017; Jaimes, 2017) y meningitis tuberculosa (TBM). Esta última es la complicación extrapulmonar más grave, ocupa aproximadamente el 1% de todos los casos de TB (Chen, et al., 2018), con una mortalidad elevada; el 25% de los pacientes pueden quedar con algún tipo de secuela y entre el 15 al 40% llegan a fallecer a pesar del inicio del tratamiento (Ramirez, et al., 2015).

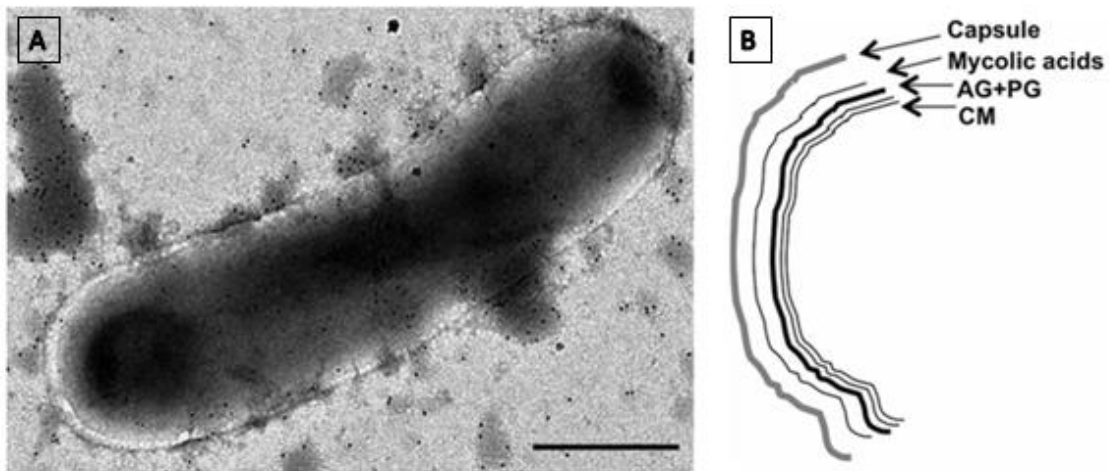
Es importante destacar que las funciones de las células inmunes hospederas son cruciales para el desarrollo de esta enfermedad, la cual se desencadena por la interacción de PAMPs o DAMPs con PRR (Sreejit, et al., 2014; Rivera & Camargo., 2015; Gupta & Agrawal, 2018). El SN puede estar comprometido por múltiples agentes (como bacterias, virus, hongos y parásitos) y cada uno evidencia sus particularidades clínicas (Sgarbi, 2015), las interacciones entre las neuronas y las células inmunes son multifactoriales y multidimensionales, desempeñan un papel importante en la homeostasis del SNC y estados fisiopatológicos, incluida la autoinmunidad, neurodegeneración, infección y lesiones traumáticas (Chavan, et al., 2017). Poco se sabe de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de *M. tb*, pero la microglia puede ser activada por el bacilo sin necesidad de que esta se encuentre infectada a través de diferentes componentes que se encuentran en su superficie (Jaimes, 2017).

#### **4.8 *Mycobacterium tuberculosis***

El agente etiológico de la tuberculosis es la *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) (Figura 7A), su primer registro como patógeno fue en África hace unos 70,000 años y luego se extendió fuera del continente como consecuencia de las migraciones humanas (Delogu & Fadda, 2013), actualmente es extremadamente exitoso (Sia., & Rengarajan, 2019), se ha adaptado a diversos sitios anatómicos del cuerpo gracias a muchos años de coevolución con su huésped (Brites & Gagneux, 2015; Chai & Liu., 2018), es un patógeno intracelular facultativo con la capacidad de infectar y persistir en humanos (Kalscheuer, et al., 2019).

Es una micobacteria de crecimiento lento con un tiempo de duplicación de 15-24 h en condiciones óptimas, tardando de una a tres semanas en aparecer colonias visibles en medios de cultivo sólidos (Ramírez, et al., 2002; Pérez del Molino, et al., 2002), su genoma está constituido por  $\cong 4$  Mbp. Un rasgo distintivo de la *M. tb* es que la estructura de su pared celular está formada por ácidos grasos largos en el interior y componentes cerosos en la capa exterior, proporcionando una barrera impermeable que la protege de compuestos nocivos y fármacos, esta característica juega un papel fundamental en su virulencia (Delogu & Fadda, 2013).

La envoltura del bacilo está constituida por cuatro capas: (I) la membrana plasmática o membrana interna, (II) el complejo peptidoglicano-arabinogalactano (AG+PG), (III) una membrana externa asimétrica que está unida covalentemente al complejo AG+PG mediante ácidos micólicos, y (IV) la cápsula externa (Kalscheuer, et al., 2019). (Figura 7B).



**Figura 7. A.** Micrografía electrónica de una célula de *Mycobacterium tuberculosis* Barra de escala 500 nm. **B.** Esquema representativo de las capas de su envoltura celular. Modificada de Kalscheuer, et al., 2019.

Puede ser considerada como una bacteria patógena condicional debido a que, en cierto sentido, solo puede causar TB en hospedadores inmunodeprimidos, cerca del

90% de las personas infectadas por *M. tb* controlan inmediatamente la infección (Chai & Liu., 2018). Existe solo un 10% de probabilidad de desarrollar tuberculosis activa y que la bacteria pueda invadir múltiples órganos (Zhai, et al., 2019), aunque emplea una gran variedad de proteínas efectoras que facilitan la invasión en el tejido.

#### **4.8.1 Patogenicidad de *M. tb***

La facilidad del patógeno para sobrevivir dentro del organismo hospedero requiere de la expresión de una serie de características genéticas involucradas en la interacción patógeno-hospedero, estas peculiaridades le permiten resistir el estrés ambiental que le genere el mismo medio fisiológico del hospedero (Maulén, 2011).

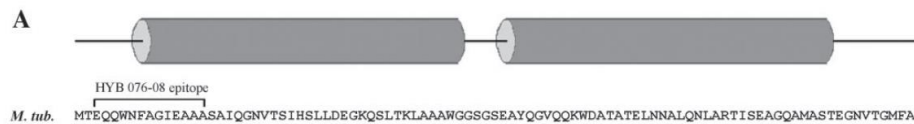
La patogenicidad de esta micobacteria se basa principalmente en; (I) la formación de granulomas en los que el bacilo sobrevive en un estado de equilibrio con la defensa del huésped, (II) el control del metabolismo bacteriano y (III) la replicación que se caracteriza por el estado latente de *M. tb* el cual es resistente a las defensas del huésped (Miggiano & Ferraris 2020).

La *M. tb* es considerada una de las bacterias más exitosas por los diferentes factores de virulencia que posee, en estudios recientes de proteómica de alto rendimiento realizados en extractos de cápsulas de diferentes micobacterias como *M. tb*, destacan las proteínas asociadas al sistema de secreción 1 (ESX-1), el cual es esencial para la patogénesis de *M. tb* y parece estar dedicado al suministro de proteínas muy activas cuya función principal es alterar algunos pasos críticos de la respuesta inmune innata en las células del hospedero (Kalscheuer, et al., 2019).

Entre otros de los componentes virulentos del bacilo, podemos destacar a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT6, las cuales podrían participar en el proceso infeccioso de las células de la microglía.

### 4.8.2 Proteína ESAT-6

La diana antigénica de secreción temprana 6 (ESAT-6), por sus siglas 6 Early Secretor Antigenic Target, es un péptido de *M. tb* que le confiere características virulentas, con un peso molecular de 6 kDa (Poulakis, et al., 2016; Kinhikar, et al., 2010). La ganancia o pérdida de virulencia micobacteriana en cierto sentido está estrechamente relacionada con la capacidad de secretar ESAT-6 ya que muchas de las funciones virulentas cruciales de *M. tb* se atribuyen a esta proteína, (Figura 8), incluida la actividad lítica de la membrana que causa daño a las células epiteliales alveolares (Refai, et al., 2018).



**Figura 8.** Estructura de la proteína ESAT-6. Imagen modificada de Brodin, et al., 2005

Se sabe que esta proteína es esencial para evitar la unión fagosoma-lisosoma y la apoptosis, y permite finalmente la entrada del bacilo en el citoplasma, de esta manera el bacilo aprovecha al máximo su capacidad de multiplicación y diseminación, proporcionando así las herramientas necesarias para escapar de los compartimentos fagosómicos para interactuar con las proteínas celulares del huésped y modular sus funciones (Cardona, 2018).

ESAT-6 es responsable de la permeabilización fagosómica y una posterior secreción predeterminada de IFN tipo I durante la infección por micobacterias. Además, se le ha atribuido una actividad membranolítica al funcionar como una proteína formadora de poros (Lienard, et al., 2020). Se encontró que ESAT-6 induce el 94% de apoptosis en macrófagos activando la expresión de caspasas, a una concentración de 5 µg/ml (Derrick, & Morris 2007; Sreejit, et al., 2014), adicionalmente se ha visto que la delección del gen que codifica para esta proteína disminuye significativamente la capacidad de virulencia de este bacilo (Scherrer, et al., 2018). Adicionalmente en estudios recientes han demostrado que encontrar a

esta proteína intracelularmente en el hospedero, es un marcador prometedor para determinar la infección por *M. tb* (Poulakis, et al., 2016).

#### 4.8.3 Proteína PE\_PGRS33

Por otra parte la proteína PE\_PGRS33 pertenece a una de las dos familias de proteínas que constituyen aproximadamente el 10% del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*; las PPE y las PE son proteínas micobacterianas peculiares de especies patógenas, estas últimas se caracterizan por un dominio N-terminal altamente conservado de ~100 aminoácidos con la presencia de un motivo prolina-ácido glutámico (PE) en la posición 8-9 (Talarico, et al., 2005; Cascioferro, et al., 2011; Palucci, et al., 2016).

Estudios filogenéticos han llevado a subdividir la familia PE, en dos subfamilias, la de PE de 34 miembros y la más numerosa de 65 miembros PGRS (*Polymorphic GC Rich Repetitive Sequence*), cuyo contenido en glicina supera el 50% y se distribuye en forma de repeticiones en tándem del motivo Gly-Gly-Ala o de Gly-Gly-Asn en el extremo carboxilo terminal, mientras que el dominio amino terminal es conservado (Rivera & Camargo, 2015). Entre las proteínas PE\_PGRS, la PE\_PGRS33, (Figura 9), es una de las mejor estudiadas por su interacción con el sistema inmunológico, está constituida por 498 residuos de aminoácidos con un peso de 41.8 kDa y se ha considerado un modelo para este grupo de proteínas (Kramarska, et al., 2021).



**Figura 9.** Estructura de la proteína PE\_PGRS33. Tomada y modificada de Cascioferro, et al., 2011

Su localización superficial en la envoltura bacteriana le permite una amplia interacción con los componentes del huésped, aún no se han descrito detalladamente las funciones de esta proteína, pero se ha demostrado en trabajos previos que PE\_PGRS33 juega un papel crucial durante la infección por *M. tb* (Palucci, et al., 2016; Kramarska, et al., 2021).

## 5. ANTECEDENTES

La microglía y los astrocitos juegan un papel fundamental en el SNC, su activación está estrechamente relacionada con el desarrollo y la gravedad de las enfermedades. Curiosamente se ha visto que la respuesta al daño es temporalmente distinta, en primera instancia se produce la activación de la microglía adquiriendo un fenotipo proinflamatorio que conduce a la activación de la astrogliá (Liu, et al., 2011).

En diversos estudios se ha comprobado esta diferencia temporal en la activación proponiendo que existe una comunicación estrecha en todas las células del SNC, en un trabajo realizado por Kirkley y colaboradores (2017), se demostró que el tratamiento con manganeso en microglía murina dio como resultado un aumento dependiente de la dosis en la expresión proinflamatoria y una morfología desramificada, posteriormente la exposición de astrocitos a los medios condicionados microglía fue suficiente para generar la activación de los astrocitos e incrementaron drásticamente la expresión de ARNm para *Tnf*, *Il-1 $\beta$* , *Il-6*.

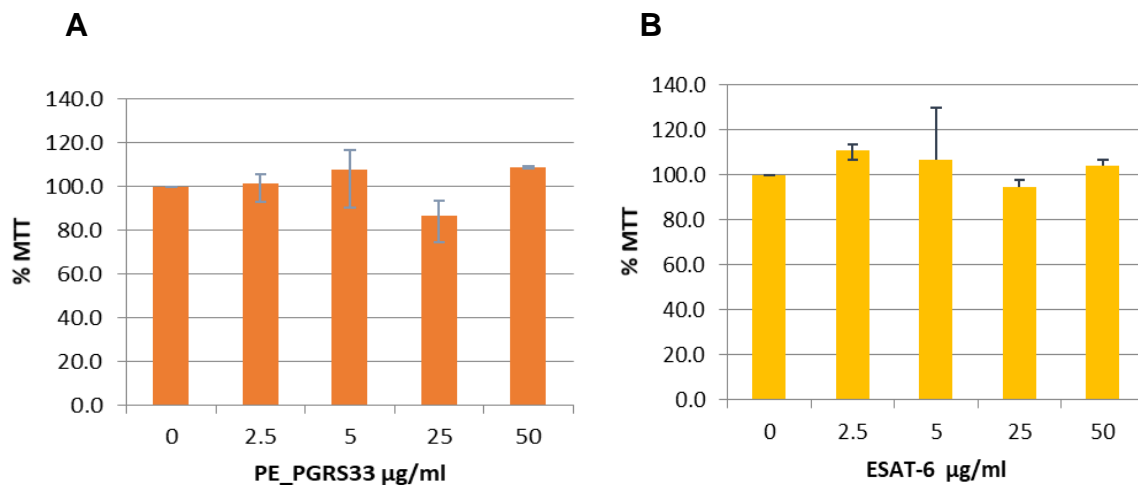
Del mismo modo Liddelow y colaboradores (2017), observaron que los astrocitos reactivos denominados A1 (haciendo referencia a los fenotipos M1 y M2 de las células de la microglía), son inducidos rápidamente por microglía activada utilizando lipopolisacárido (LPS) como estímulo, en este trabajo se describieron los componentes humorales fundamentales para producir astrogliosis, entre los que se destacan a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y C1q. Además, se confirmó que estos astrocitos pierden la mayoría de las funciones normales y están presentes en muchas enfermedades neurodegenerativas con propiedades neurotóxicas, destruyendo rápidamente oligodendrocitos maduros diferenciados y neuronas de la retina; enfatizando así que existe una comunicación continua que no solo involucra a microglía y astrocitos sino a todas las células del tejido nervioso, incluidas las neuronas.

Tanto ESAT-6 como PE\_PGRS33 han sido estudiadas previamente por su alta capacidad virulenta, sin embargo, aún no se conoce a detalle el papel que juegan en el proceso infeccioso. En un estudio realizado por Refai y colaboradores (2018) se observó que ESAT-6 promovió la diferenciación de monocitos humanos M0 y M2 hacia el fenotipo M1, presentando una elevada secreción de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$  y la inducción de una firma transcripcional M1 típica.

Por otra parte, se sabe que la entrada mediada por PE\_PGRS33 en los macrófagos es dependiente de los receptores 2 tipo Toll (TLR2) y esta interacción ocurre a través del dominio PGRS, involucrando específicamente los primeros 260 aminoácidos de PE\_PGRS33. La deficiencia de ésta proteína en una cepa mutante de *M. tb* se asoció con un deterioro de la capacidad para infectar, se demostró previamente que desencadena la muerte de las células de macrófagos al inducir la secreción de citocinas proinflamatorias y la activación de señales pro-apoptóticas o pro-necróticas (Palucci, et al., 2016), además se ha reportado que la sobreexpresión de PE\_PGRS33 sobre la superficie bacteriana de *M. tb* mejora la supervivencia de la misma y causa importantes cambios estructurales en la célula huésped (Delgu, et al., 2004).

Estudios previos en nuestro equipo de trabajo realizados por Jaimes (2017) concluyen que ninguna de las dos proteínas antes mencionadas induce muerte celular en cultivos primarios de microglía cortical de rata neonata a ninguna de las concentraciones evaluada (0, 2.5, 5, 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) después de 24 h de exposición ya que no se encontraron datos de muerte celular en ensayos de MTT (Figura 10).





**Figura 10.** Ensayo de MTT en células de microglía expuestas por 24 horas a la proteína (A) PE\_PGRS33 y (B) ESAT-6 indicando que ninguna de las dos resulta ser citotóxica de forma significativa para la microglía, conservándose viables, incluso en altas concentraciones. Jaimes, (2017)

Estudiando un poco más el efecto de estas proteínas en células de la microglía también se observó después de 24 horas de tratamiento con la proteína PE\_PGRS33 que no hay expresión nuclear del factor NF $\kappa$ Bp65, ya que sólo se observa en citoplasma en las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$ , pero sí se detecta un aumento en la expresión de OX42 e Iba-1 en las concentraciones de 2.5 y 5  $\mu\text{g/ml}$ , evidenciando la activación de la microglía en la respuesta inducida por PE\_PGRS33 lo que sugiere su efecto proinflamatorio en las condiciones usadas pero probablemente no está mediada por la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, además que parece depender de la concentración.

Por otro lado, se encontró que la proteína ESAT-6 activa y permite la translocación del factor NF $\kappa$ Bp65; esta respuesta se observó en las concentraciones de 2.5 y 5  $\mu\text{g/ml}$  mientras que en las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  regresa al citoplasma, del mismo modo, tanto iNOS como TNF- $\alpha$ R1 mostraron una mayor expresión en las concentraciones 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$ . Comprender la comunicación entre las células de la glía estimuladas con las proteínas ESAT-6 y PE\_PGRS33 y el ambiente proinflamatorio que se está generando en el sistema nervioso central, ayudará entender la respuesta del hospedero tras una infección con *M. tb* en el SNC.

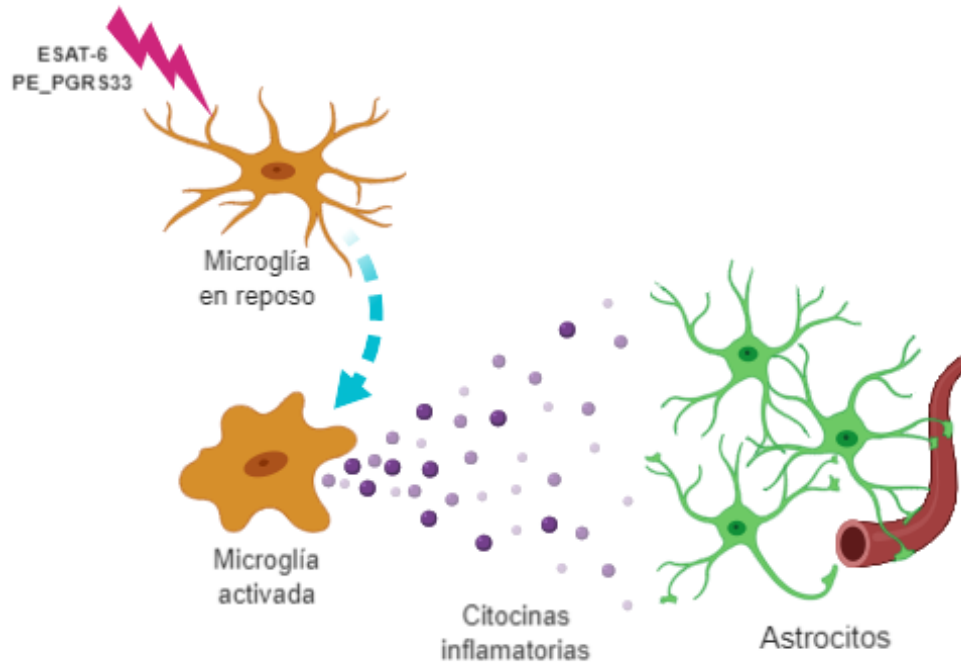
## 6. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es un problema de salud mundial, causado por *M. tb*, la afección más común ocurre en tejido pulmonar, no obstante, esta micobacteria es capaz de infectar otros tejidos como el SNC, su presentación como meningitis tuberculosa es la más grave, ocasionando una gran cantidad de muertes y discapacidades.

Se sabe que en este tejido las células de la microglía y astrogía son las principales efectoras inmunológicas desarrollando diversos mecanismos de defensa que tienen como objetivo principal mitigar y reparar el daño. El mecanismo por el cual esta enfermedad se propaga en el sistema nervioso central, así como el protocolo de defensa que siguen estas células no ha sido descrito detalladamente, es por ello que resulta relevante el estudio de la biología celular del proceso infeccioso en el sistema nervioso central posterior a la infección por *M. tb* para futuros esfuerzos en el conocimiento completo de esta patología.

## 7. HIPÓTESIS

Si las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de *M. tuberculosis* inducen un fenotipo M1 en células de la microglía, entonces se generará un microambiente potencialmente neurotóxico que tendrá un efecto directo sobre la astrogliá (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema general de hipótesis.

## **8. OBJETIVOS**

### **8.1 Objetivo general**

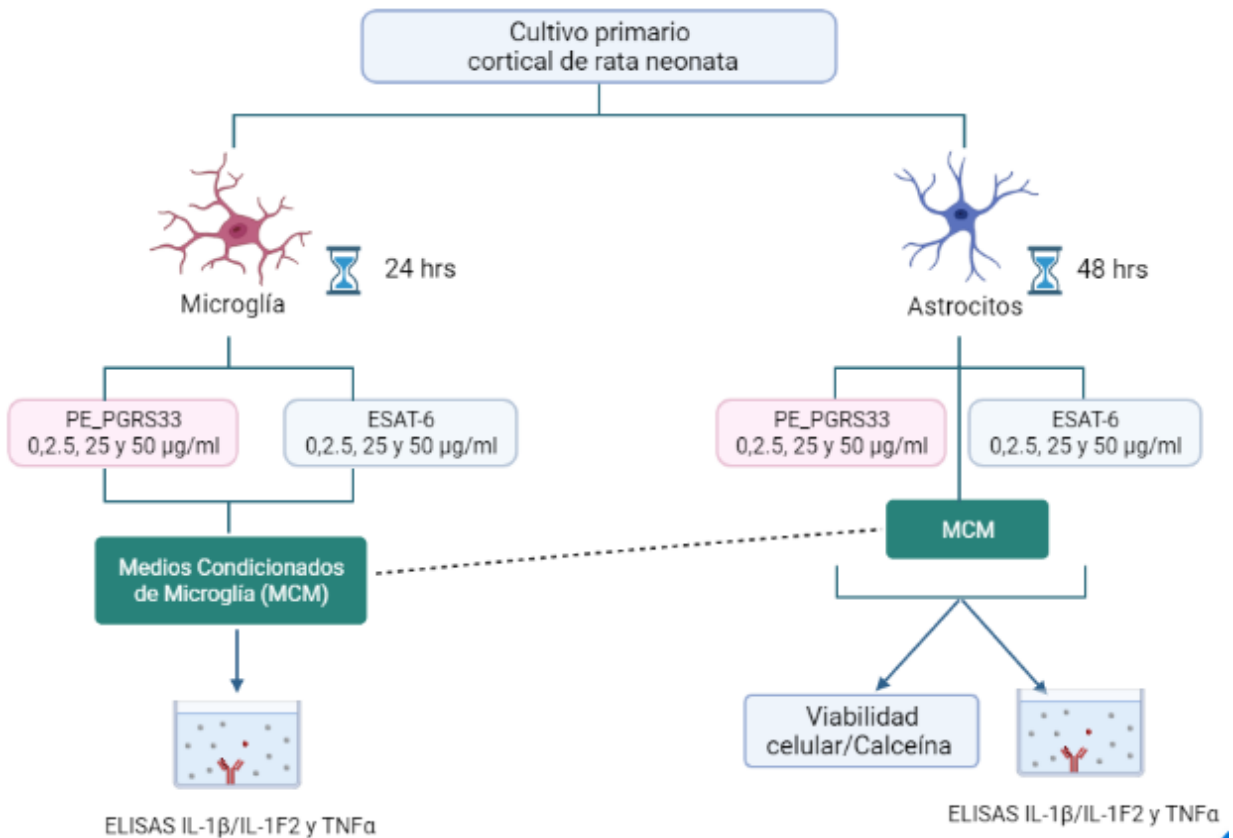
Determinar la respuesta de las células de la microglía y astrogía posterior a la exposición de las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*

### **8.2 Objetivos particulares**

- 8.2.1 Estandarizar el cultivo primario de microglía cortical de rata neonata.
- 8.2.2 Determinar la viabilidad celular de astrocitos corticales de rata posterior a la exposición a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6.
- 8.2.3 Determinar la viabilidad celular en astrocitos corticales expuestos a componentes humorales de células de la microglía.
- 8.2.4 Evaluar los niveles de expresión de las citocinas IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y TNF $\alpha$  en células de la microglía y astrocitos.

## 9. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron cultivos primarios corticales de rata neonata para astrocitos y microglía, una vez purificados ambos tipos celulares; la microglía fue tratada durante 24 horas con las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 se recuperaron los medios condicionados de microglía (MCM) y se realizaron ensayos de ELISAS para determinar la cantidad de proteínas IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y TNF $\alpha$  disueltas en los mismos. Por otra parte, los astrocitos fueron tratados a 48 horas con las proteínas directas a las mismas concentraciones para determinar si estas por sí solas generaban algún tipo de daño celular, del mismo modo se expusieron a los MCM, en ambos casos se realizaron pruebas de viabilidad celular por calceína y se recuperaron los medios condicionados de astrocitos (MCA) y (MCA-M) a los cuales se le realizaron ensayos de ELISAS para determinar la cantidad de proteínas IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y TNF $\alpha$  disueltas en los mismos, (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema del diseño experimental. Imagen creada en Biorender.com

## **10. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **10.1 Animales**

Para los cultivos primarios se utilizaron ratas neonatas de la cepa Wistar proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, bajo el proyecto titulado, "Neuroinflamación crónica durante el envejecimiento como factor de riesgo de enfermedades neurológicas" 2017-111/3-4601. Se realizaron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento animal; su manejo se realizó siguiendo las recomendaciones de cuidado animal y procedimientos aprobados internacionalmente por el NIH Publicación No.8023, (revisado en 1978), del mismo modo, se cumplió con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### **10.2 Cultivo primario de astrocitos corticales**

Rápidamente las ratas fueron anestesiadas por hipotermia poniendo un poco de hielo a nivel del cuello para posteriormente realizar eutanasia por decapitación, el cuerpo se desechó y se continuó trabajando con la cabeza, se retiró la piel exponiendo el cráneo, con ayuda de pinzas ultrafinas para microdissección se extrajeron las cortezas cerebrales, las cuales fueron colocadas en una caja Petri con solución Hank's (Tabla 1), con apoyo de un microscopio estereoscópico se retiraron estructuras no corticales, meninges y coágulos.

Dentro de una campana de flujo laminar el tejido se colocó en un tubo cónico de 15 ml, con 2 ml de solución Hank's estéril por cada encéfalo, se realizó una disociación mecánica con jeringas de diferentes calibres, primero con una de 21G aspirando suavemente para evitar la formación de burbujas y enseguida con una de 27G hasta observar una completa disociación del tejido (de 4 a 5 veces con cada jeringa), inmediatamente la suspensión se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> permitiendo el intercambio gaseoso para inducir la activación de proteasas endógenas y de este

modo llevar a cabo una disociación enzimática durante 15 minutos. Concluido el tiempo la suspensión se centrifugó a 1000 G durante 5 minutos.

Posteriormente se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 2 ml de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibiótico/antimicótico al 1% (Tabla 2). Las células fueron sembradas en un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Santa Cruz), los cuales tuvieron un pretratamiento con Poli-D-lisina (SIGMA p0899; 1:50). Se vertió la suspensión en el frasco de cultivo y se llevó a un volumen final de 10 ml de medio DMEM suplementado, y finalmente fueron incubados a 37°C con humedad controlada y 5% de dióxido de carbono. El medio se cambió después de 24 horas y posteriormente cada tres días. Los cultivos se mantuvieron durante 11 a 13 días in vitro tiempo en el cuál observó una confluencia del 90%.

**Tabla 1** Solución Hank's

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración mM</b>
Cloruro de sodio	138
Cloruro de potasio	5.4
Fosfato de sodio monobásico	0.044
Fosfato de sodio dibásico	0.34
Glucosa	5.56
Bicarbonato de sodio	4.2
pH	7.4

**Tabla 2.** Suplementos del medio DMEM para cultivo de Astrocitos

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
DMEM, (Gibco)	13.5 g/l
Bicarbonato de sodio	3.7 g/l
SFB	10 %
Antibiótico/antimicótico	1 %

### **10.3 Subcultivo de Astrocitos**

Entre los días 11 y 13, cuando los cultivos tuvieron una confluencia del 90-95% se agitaron durante 24 horas a 180 rpm y a 37° C para remover células de la microglía, transcurrido el tiempo, se retiró el exceso de medio de cultivo y se lavaron las células con 10 ml de solución salina 0.9% (PiSA farmacéutica).

Para facilitar el desprendimiento de los astrocitos se trataron con 4 ml de tripsina (T4799, Sigma Aldrich) al 0.5% y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 5 min hasta que las células se desprendieron completamente de la base del frasco, este proceso fue monitoreado con un microscopio invertido. Una vez desprendidas todas las células, se adicionaron 4 ml de medio de cultivo DMEM suplementado para abatir la actividad enzimática de la tripsina; la solución resultante se vertió en un tubo cónico de centrifuga de 15 ml estéril (Santa Cruz Biotechnology) y se centrifugó a 1000 G durante 5 minutos.

Se retiró el sobrenadante y el *pellet* fue disuelto en medio de cultivo, enseguida se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer y las células fueron sembradas en placas de 24 pozos (30,000 células/pozo), para los experimentos posteriores. En el caso de las pruebas de inmunocitoquímica las células se colocaron sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 12 mm de diámetro y 0.13-0.17 mm de grosor, tratados con poli-D-lisina, para los ensayos de viabilidad celular las células fueron sembradas directamente en las placas.

### **10.4 Cultivo primario de microglía cortical**

El cultivo primario de microglía se realizó del mismo modo que el cultivo de astrocitos con ligeras modificaciones, en este caso, luego de 24 horas se cambió por medio DMEM de la marca Sigma Aldrich suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 15 % y antibiótico/antimicótico al 1% (Tabla 3). Los cambios de medio se realizaron cada 5 días hasta el día 17-20 donde se observó una gran mayor confluencia de células de la microglía suspendidas en el medio de cultivo.



**Tabla 3.** Suplementos del medio DMEM para cultivo de microglía

Reactivo	Concentración
DMEM, Sigma Aldrich	13.5 g/l
Bicarbonato de sodio	3.7 g/l
SFB	15 %
Antibiótico/antimicótico	1 %
pH	7.4

**Nota:** Es muy importante que en el cultivo de microglía se utilice el medio DMEM de la marca Sigma Aldrich, ya que se observaron importantes diferencias en la caracterización de cultivo cuando este se realizó con medio DMEM de la marca Gibco.

### **10.5 Subcultivo de microglía**

Una vez que en el cultivo se observó con una confluencia del 80% de células de la microglía, entre los días 17-20 aproximadamente las células se agitaron durante 24 horas a 180 rpm, posteriormente se depositó el medio de cultivo (que contenía la microglía removida), en un tubo cónico de centrifuga de 15 ml, el cual se centrifugó a 1000 G durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en medio de cultivo DMEM suplementado al 10% de SBF y 1% de antibiótico/antimicótico, posteriormente se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer. Para los ensayos de inmunofluorescencia y generación de medios condicionados de microglía se sembraron 50,000 células en placas de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio 13 mm de diámetro.

### **10.6 Proteínas recombinantes PE\_PGRS33 y ESAT-6**

Las proteínas recombinantes PE\_PGRES33 y ESAT-6 fueron donadas generosamente por la Dra. Espitia, brevemente las regiones codificantes para PE\_PGRS33 y ESAT-6 se amplificaron por PCR, los productos se ligaron y se amplificaron en una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*), luego se subclonaron en un vector que se utilizó para la transformación de cepas de *E. coli*. La expresión de las

proteínas se indujo en cultivos bacterianos, las proteínas recombinantes se purificaron, se realizó la determinación de proteínas y se almacenaron a -70°C hasta su uso (Aguilar., et al, 2019).

### **10.7 Inmunofluorescencia**

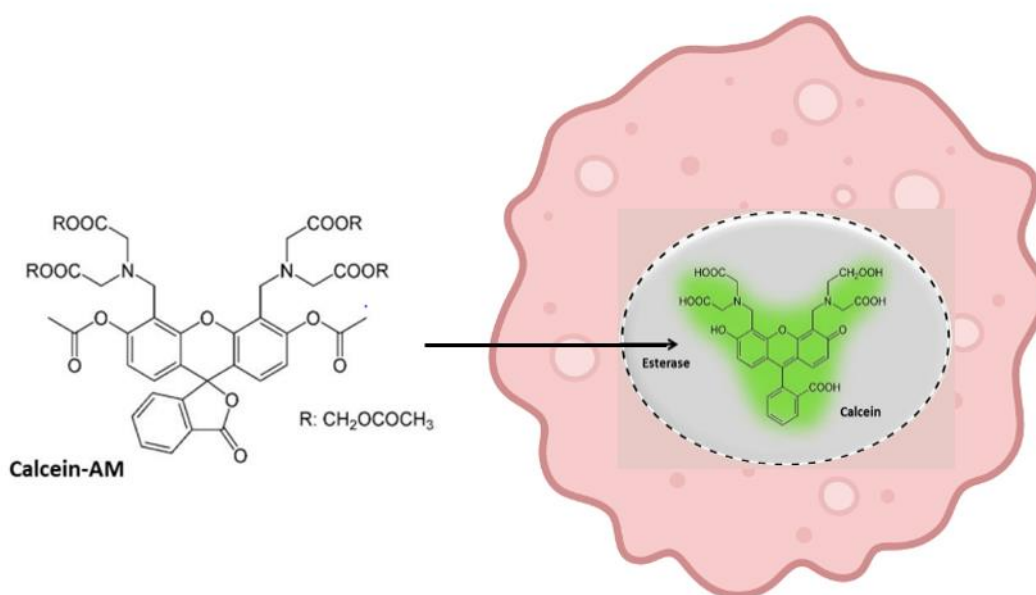
Para identificar las células de la microglía y astrogliá se utilizó la técnica de inmunofluorescencia, la cual permite la identificación y localización celular de proteínas específicas al promover una interacción antígeno-anticuerpo. Brevemente, las células fueron sembradas en cajas de 24 pozos 30,000 y 50,000 para astrocitos y microglía respectivamente, las cuales contenían un cubreobjetos de vidrio 13 mm de diámetro en cada pozo, posterior a los tratamientos las células se fijaron a -4°C con paraformaldehído al 4% durante 20 min y se permeabilizaron a 4°C con metanol durante 10 min, posteriormente se bloquearon con suero de cabra (Equitech-Bio Inc. SG30-0100), al 4% disuelto en PBS durante una hora a temperatura ambiente, trascurrido el tiempo se adicionó el anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo, Iba-1 sc-ab178847; Abcam para microglía y GFAP-PAN sc-Z033401-2; DAKO para astrocitos a una concentración 1:200, estos se incubaron por una noche en cámara húmeda a 4°C.

Trascurrido el tiempo se retiró el anticuerpo primario y se colocó el anticuerpo secundario disuelto en PBS (Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG Ref: A11055 Life technologies), en una concentración 1:200, se incubó durante una hora a temperatura ambiente en completa oscuridad.

Para finalizar los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando la solución de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories Inc. H-1200 Lot. ZA0620), las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia NIKON KCC-REMN-CY-E200LEDMV modelo Eclipse E200LED MV R y se tomaron fotografías con una cámara Evolution VF Cooled Color/ MediaCybernetics modelo F-CLR-12-C para análisis posteriores.

### 10.8 Viabilidad celular, técnica de calceína

La calceína-AM es un compuesto permeable para las células, cuando éste penetra la membrana por acción de las esterasas presentes en el citoplasma de las células vivas el acetoximetil (AM) se separa y la calceína emite una fuerte fluorescencia (Figura 13), la cual tiene una excitación máxima a los 495-515 nm. Debido a esta reacción enzimática, solo se tiñe el citoplasma de aquellas células que permanezcan viables.



**Figura 13.** Esquema simplificado del cambio de calceína-AM a calceína fluorescente por reacción enzimática de las esterasas. Modificado de de Syntec, 2020

Los astrocitos fueron sembrados en placas de 24 pozos a una densidad de 30,000 células, hasta el día 2 se les aplicó el tratamiento con la intención de permitir una completa adhesión a la placa. Para la aplicación de tratamientos las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 se incubaron durante 48 horas a diferentes concentraciones (2.5, 5, 25 y 50 µg/ml).

Brevemente, se retiró el tratamiento de los astrocitos y las células fueron lavadas 3 veces con solución Tyrode (Tabla 4), en completa oscuridad se añadieron 250 µl de la solución de trabajo: calceína 4µM (Molecular probes, C3100MP), la placa se

envolvió en papel aluminio para evitar la exposición a la luz y se incubó durante 30 minutos a 37°, transcurrido el tiempo las células se volvieron a lavar con Tyrode y se realizó la lectura en el lector de placas (Sinergy HT, Biotek, Winooski,VT,EUA) a 495 nm.

**Tabla 4.** Solución de Tyrode

Reactivo	Concentración mM
Cloruro de sodio	119
Cloruro de potasio	5
HEPES	25
Glucosa	27

### **10.9 Generación de medios condicionados de microglía (MCM)**

Una vez purificado el cultivo de microglía las células fueron sembradas en cajas de 24 pozos a una densidad de 50,000 células por pozo, se aplicaron los tratamientos para ambas proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 a las concentraciones (2.5, 5, 25 y 50 µg/ml) durante 24 horas para generar una respuesta celular y con ello la liberación de posibles citocinas al medio. Concluido el tratamiento los medios condicionados de microglía fueron recolectados en tubos de 600 µl y almacenados a -80°C para experimentos posteriores.

### **10.10 Ensayos de ELISA**

Se realizaron ensayos de inmunodetección mediante la técnica de ELISA para las proteínas: TNF-α (Immunoassay. R&D Systems Biotechne Brand; RTA00) e IL-1β/IL-1F2 (R&D Systems Biotechne Brand; RLB00) en las muestras de MCM (Medios Condicionados de Microglía) tratados con las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de *M. tb* a las concentraciones 0, 2.5, 5, 25 y 50 µg/ml durante 24 horas, del mismo modo se analizaron MCA (Medios condicionados de Astrocitos) tratados con las mismas condiciones a 48 horas y finalmente se analizaron los MCA-M

(Medios Condicionados de Astroцитos posteriores a la exposición de MCM por 48 horas). Este procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial como se indicó en las fichas técnicas de cada kit.

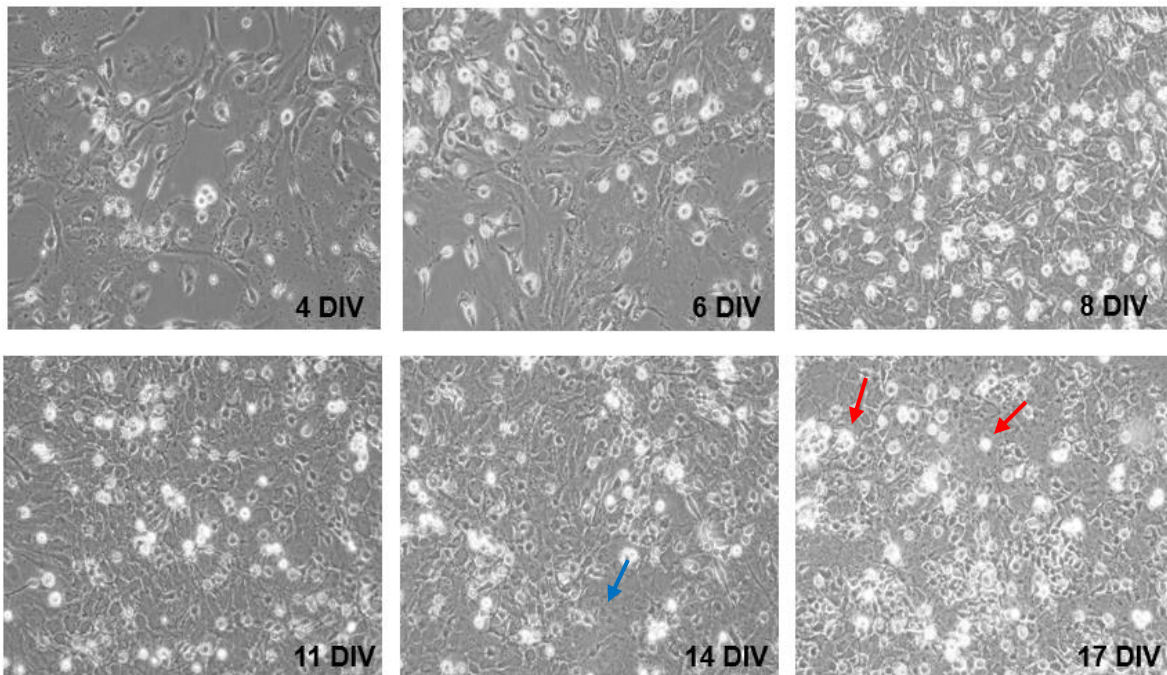
### **10.11 *Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA seguido de la prueba Dunnet, se consideraron diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media. Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa GraphPad Prism 8.0.1

## 11. RESULTADOS

### 11.1 Estandarización del cultivo primario de microglía

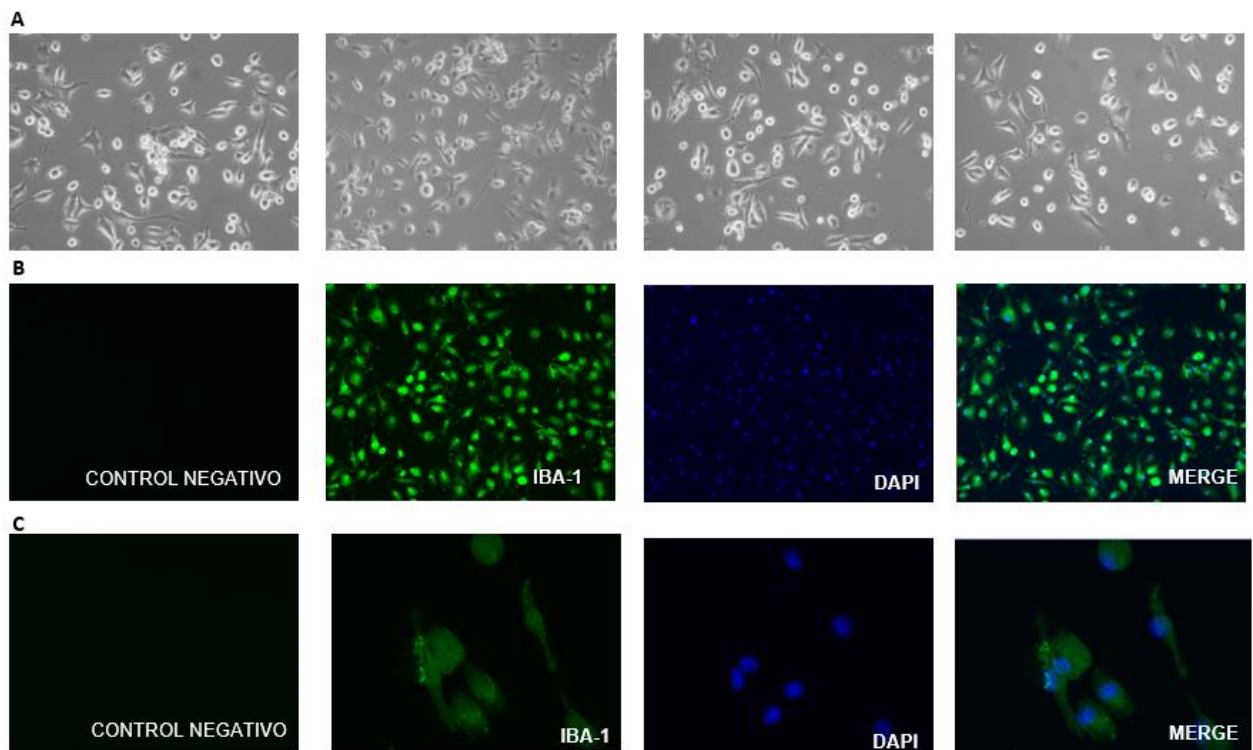
Se realizó la estandarización y caracterización del cultivo primario de microglía, como se puede apreciar en las fotografías de campo claro (Figura 14), en la parte inferior y adheridas a la base del frasco de cultivo la presencia de astrocitos formando un tapete los cuales van proliferando conforme transcurren los días de cultivo (flecha azul). Por el contrario, en la fase líquida del cultivo se encuentran las células de la microglía (flechas rojas) las cuales presentan una mayor confluencia hasta el día 17, mismo en el cual se realizó su purificación para experimentos posteriores.



**Figura 14.** Fotografías de campo claro con un aumento de 100 veces que muestran la caracterización del cultivo primario mixto de microglía y astrocitos corticales de los 4 a 17 días *in vitro* (DIV).

### 11.2 Purificación del cultivo primario de microglía

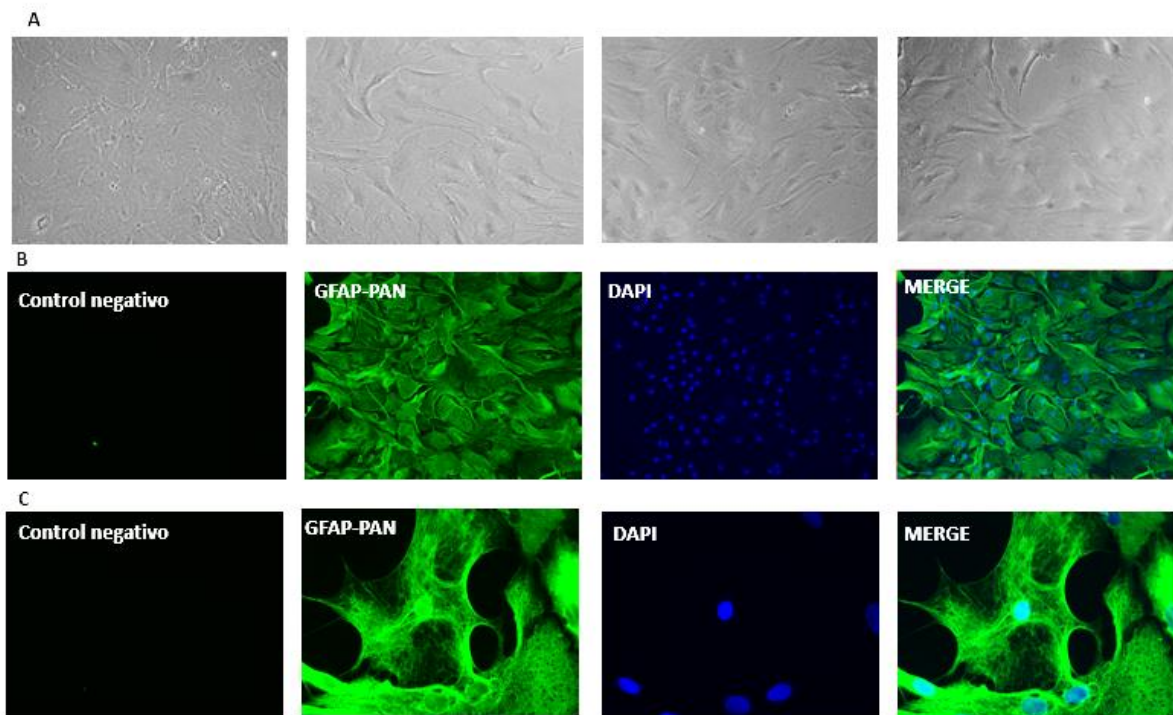
Para corroborar que las células aisladas del cultivo mixto como se describió previamente eran microgliales se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para la proteína Iba-1 la cual es específica para microglía/macrófagos, (Figura 15 A), se muestran fotografías de campo claro que muestran las células de la microglía purificadas a un aumento de 10x, en el cultivo se puede observar que algunas células presentan proyecciones citoplasmáticas, esta morfología es característica de microglía en reposo M2, (Figura 15 B y C) fotografías de inmunofluorescencias para Iba-1 y DAPI en un aumento de 100 y 400 veces, en las cuales se puede apreciar que todas las células eran microgliales, de este modo se determinó la pureza del cultivo para la realización de experimentos posteriores.



**Figura 15.** Purificación del cultivo primario de microglía. **A)** Fotografías de campo claro de, cultivo primario de microglía, aumento de 100 veces y **C)** Inmunofluorescencia contra anticuerpo Iba-1 específico para microglía y DAPI para la tinción de núcleos en un aumento de 100 y 400 veces, respectivamente.

### 11.3 Purificación del cultivo primario de astrocitos

Los astrocitos fueron purificados del cultivo mixto como se describió previamente, (Figura 16 A), en las fotografías de campo claro de los astrocitos, se observa una forma estrellada. Para asegurar que se trataban de astrocitos se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, (Figura 16 B y C), para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) la cual se expresa en el citoesqueleto y es un marcador específico para este tipo celular, con estos experimentos se garantizó la pureza del cultivo.

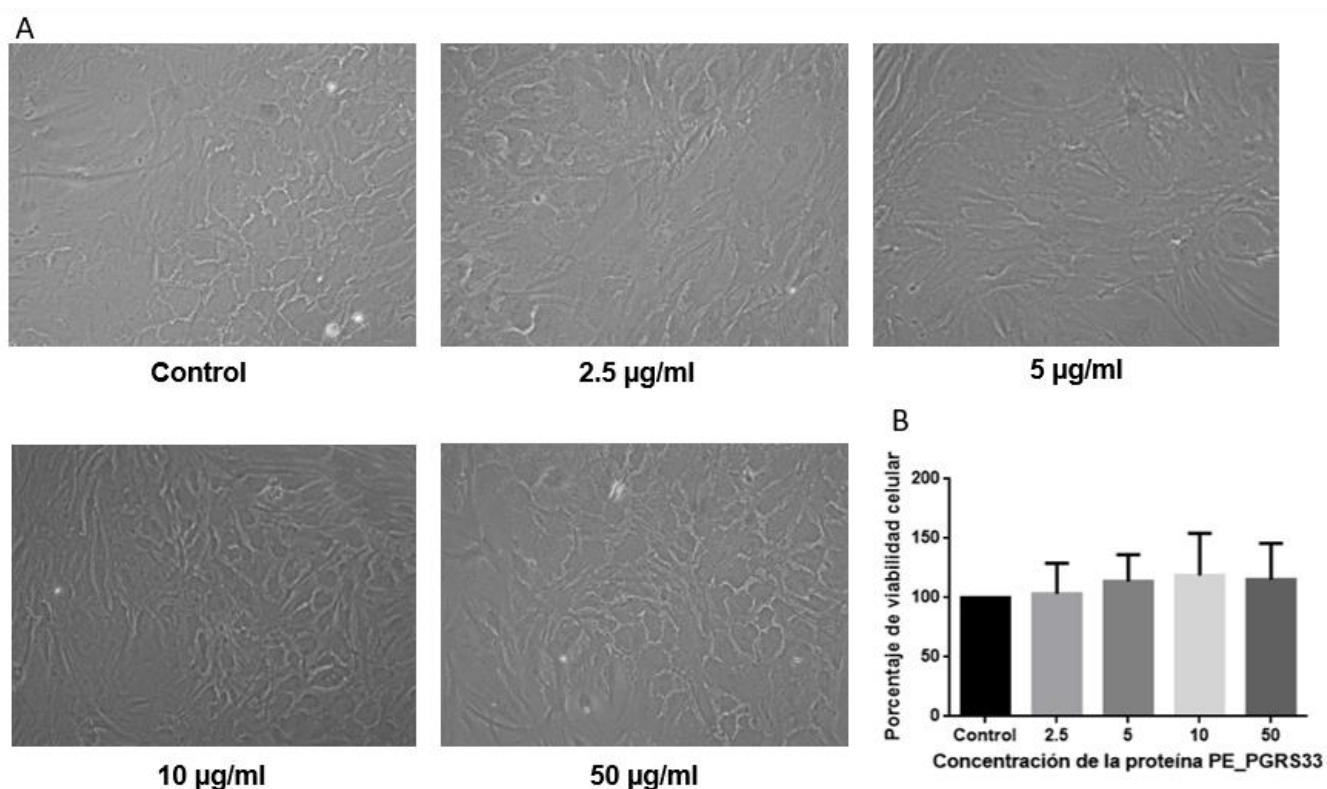


**Figura 17.** Purificación del cultivo primario de astrocitos. **A)** Fotografías de campo claro con un aumento de 100 veces de cultivo primario de astrocitos, **B y C)** Inmunofluorescencia contra anticuerpo GFAP-PAN específico para astrogía y DAPI para la tinción de núcleos en un aumento de 100 y 400 veces, respectivamente.



#### 11.4 Efecto de la proteína PE\_PGRS33 en astrocitos corticales de rata después de 48 horas de exposición.

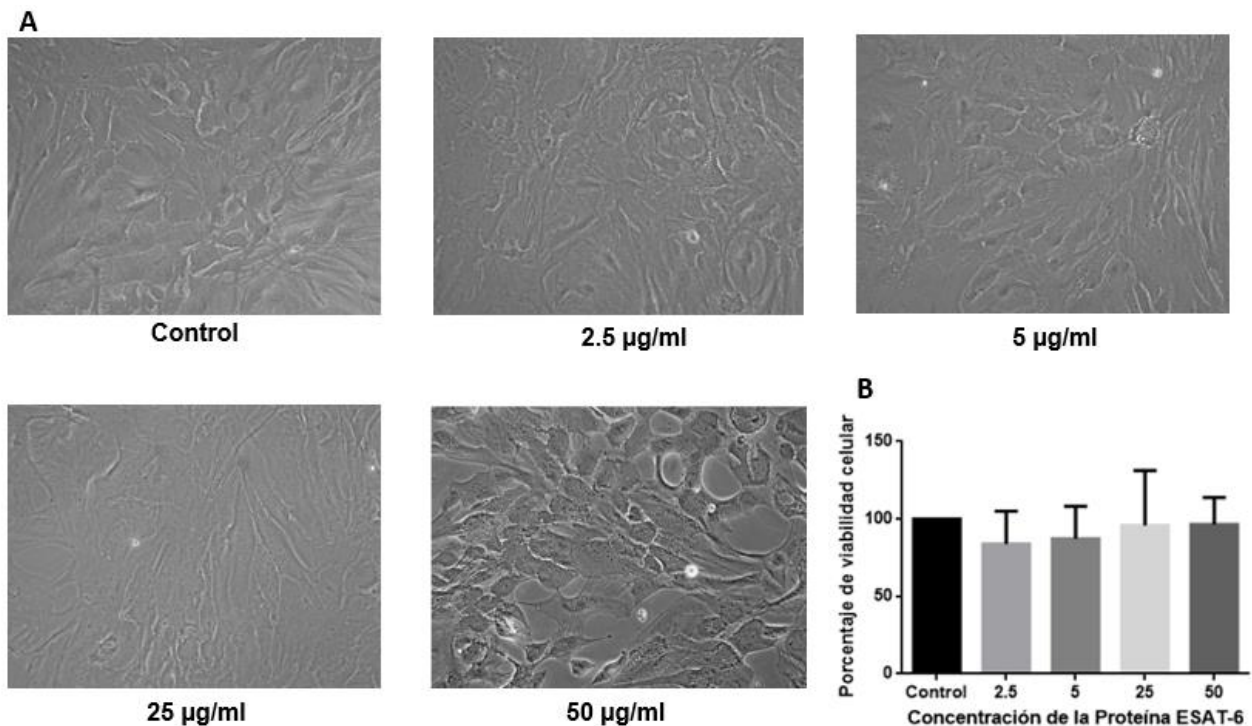
La exposición de astrocitos corticales a la proteína PE\_PGRS33 durante 48 horas no genera muerte celular en ninguna concentración, ya que no se observa ningún rasgo de daño en las fotografías de campo claro, (Figura 17 A), incluso son muy similares a los controles, del mismo modo al realizar el ensayo de viabilidad celular por calceína, (Figura 17 B), no se encontraron diferencias significativas a ninguna concentración empleado con respecto al control, lo que sugiere que esta proteína no es citotóxica en las condiciones experimentales empleadas.



**Figura 17.** La exposición a la proteína PE\_PGRS33 por 48 horas no modificó la viabilidad celular ni la morfología en astrocitos corticales de rata neonata **A)** Fotografías de campo claro que muestran astrocitos después de 48 horas de exposición a PE\_PGRS33, aumento de 100 veces, **B)** Gráfica que muestra la cuantificación de calceína de estos experimentos. Los datos mostrados se obtuvieron de tres experimentos independientes por duplicado, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA seguido de una prueba Dunnett, considerando diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media.

### 11.5 Efecto de la proteína ESAT-6 en astrocitos corticales de rata después de 48 horas de exposición.

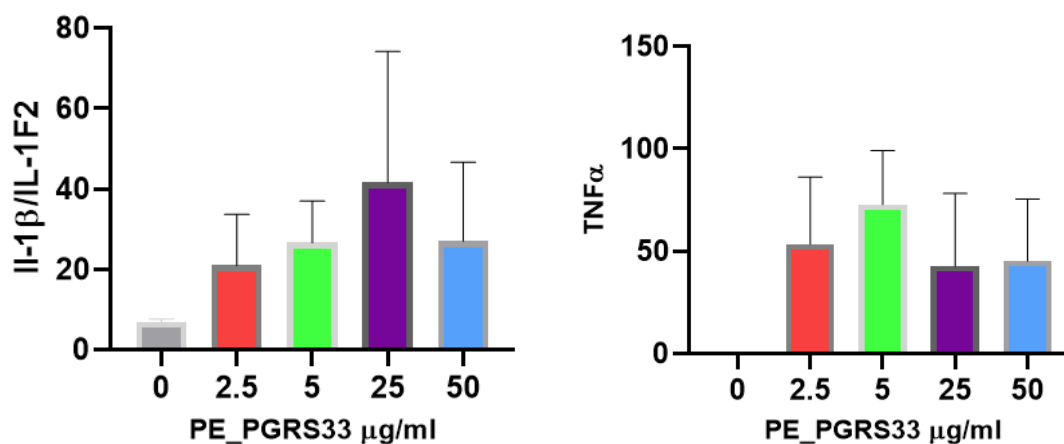
La exposición de astrocitos corticales a la proteína ESAT-6 durante 48 horas modificó la morfología celular, (Figura 18 A), éste cambio fue más evidente a la concentración de 50µg/ml, en donde se puede apreciar que las células adquieren una morfología hipertrófica como señal de daño, no obstante al realizar los ensayos de viabilidad celular por la técnica de calceína bajo estas mismas condiciones, no se encontraron diferencias significativas con respecto al control, (Figura 18 B), indicándonos que las células no están muriendo.



**Figura 18.** La exposición a la proteína ESAT-6 durante 48 horas, modificó la morfología celular, pero no la viabilidad en astrocitos corticales de rata neonata. **A)** Fotografías de campo claro que muestran astrocitos después de 48 horas de exposición a ESAT-6, aumento de 100 veces, **B)** Gráfica que muestra la cuantificación de calceína de estos experimentos. Los datos mostrados se obtuvieron de tres experimentos independientes por duplicado, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA seguido de una prueba Dunnett, considerando diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media.

### 11.6 Expresión de factores pro-inflamatorios en medios condicionados de astrocitos (MCA) después de 48 h de exposición a la proteína PE\_PGRS33

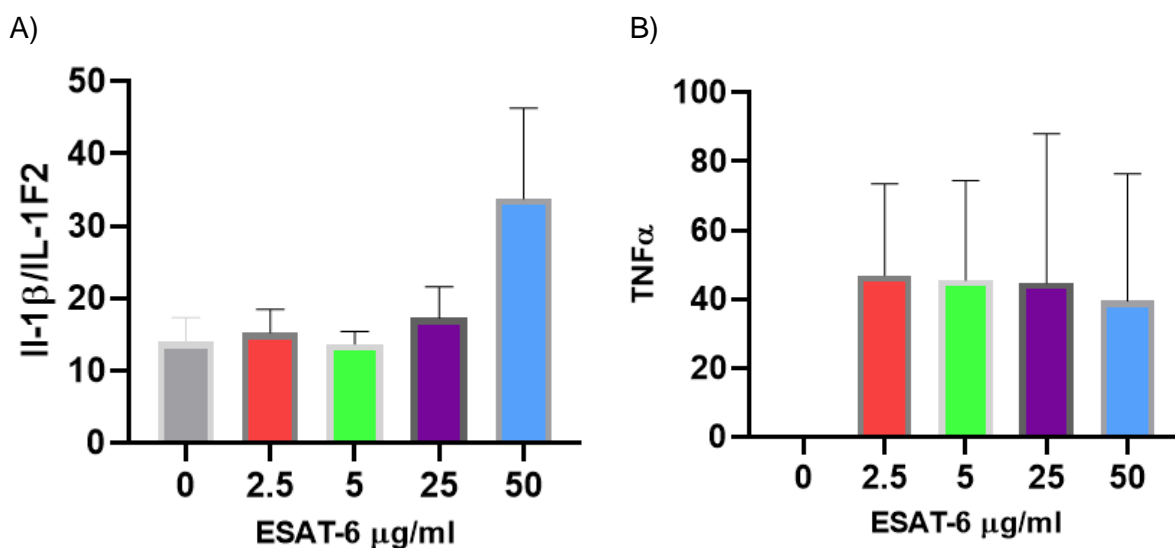
Una vez que se corroboró que ninguna de las proteínas provocaba muerte celular en los astrocitos corticales de rata neonata, pero sí inducían un aparente cambio morfológico decidimos evaluar el perfil inflamatorio bajo las mismas condiciones. Las células fueron tratadas con las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 por 48 horas, se recuperaron los medios y se realizaron ensayos tipo ELISA para la detección de las citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ /IL-F2, las cuales se secretan en condiciones pro-inflamatorias. Los resultados obtenidos muestran que existe un aumento en la expresión tanto de TNF $\alpha$  como IL-1 $\beta$ /IL-F2 respecto al control posterior a la exposición a las proteínas, (Figuras 19 y 20), sin embargo, ninguno de estos aumentos fue considerado significativo después de realizar el análisis estadístico, indicándonos que el perfil inflamatorio al menos en astrocitos corticales inducido por estas proteínas es bajo.



**Figura 19.** Expresión de citocinas proinflamatorias en astrocitos estimulados con PE\_PGRS33. **A)** IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y **B)** TNF $\alpha$  (pg/ml) en astrocitos corticales posterior a la exposición por 48 horas a la proteína PE\_PGRS33. Los datos mostrados se obtuvieron de tres experimentos independientes por duplicado, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA seguido de una prueba Dunnett, considerando diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media.

### 11.7 Expresión de factores pro-inflamatorios en medios condicionados de astrocitos (MCA) después de 48 h de exposición a la proteína ESAT-6

Al evaluar el estado inflamatorio de los astrocitos posterior a la exposición de la proteína ESAT-6 por 48h pudimos observar un patrón similar al de la proteína PE\_PGRS33, los niveles de las citocinas IL-1 $\beta$ /IL-F2 y TNF $\alpha$  aumentaron, (Figura 20 A, B), sin embargo, este aumento no fue significativo respecto al control: indicando un perfil inflamatorio bajo.

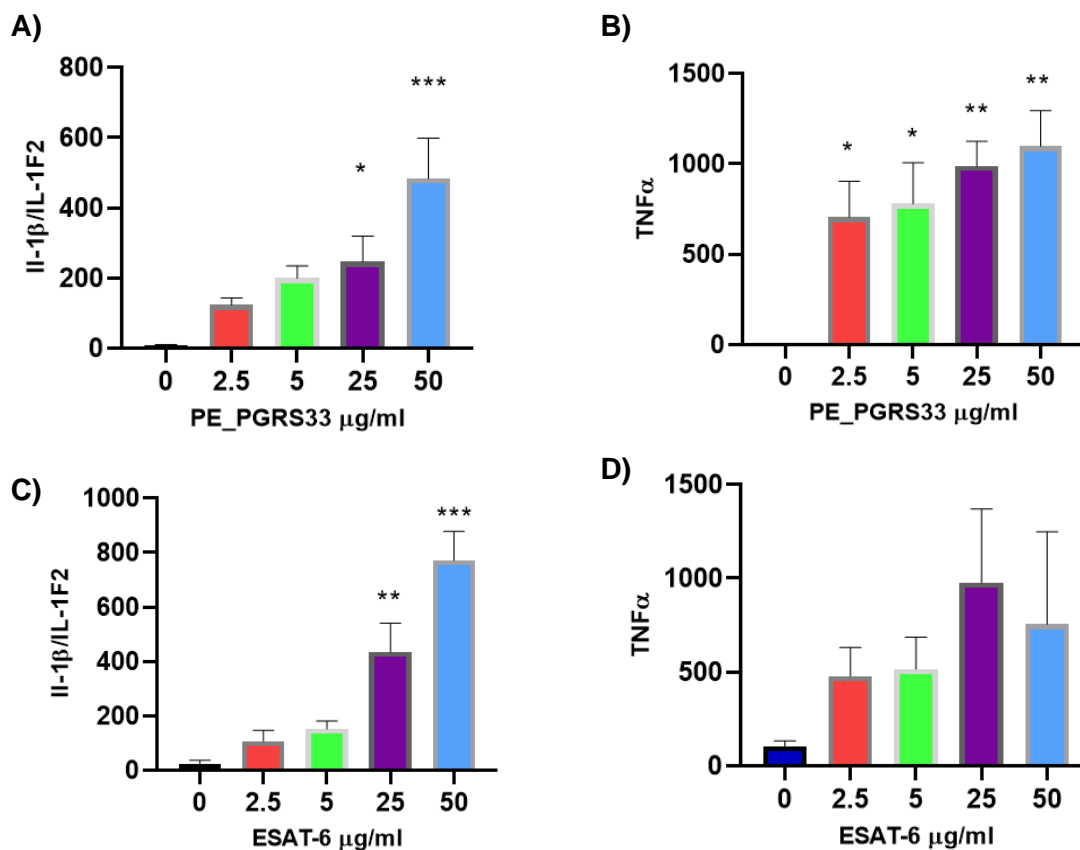


**Figura 20.** Expresión de citocinas proinflamatorias en astrocitos estimulados con ESAT-6. **A)** IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y **B)** TNF $\alpha$  (pg/ml) en astrocitos corticales posterior a la exposición por 48 horas a la proteína ESAT-6. Los datos mostrados se obtuvieron de tres experimentos independientes por duplicado, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA seguido de una prueba Dunnett, considerando diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media.

En estudios realizados previamente por nuestro equipo de trabajo (Jaimes, 2017), se observó que estas proteínas no inducen muerte en cultivos primarios de microglía cortical, por ello se decidió evaluar la secreción de citocinas inflamatorias como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ /IL-F2.

### 11.8 Expresión de factores pro-inflamatorios en medios condicionados de microglía (MCM) después de 24 hrs de exposición a las proteínas PE\_PGRS3 y ESAT-6

Como lo esperábamos, el perfil inflamatorio fue más severo en las células de la microglía, los resultados indican que existe un aumento significativo en la secreción de IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y TNF $\alpha$ , (Figura 21 A y B) desde la concentración 25 y 2.5  $\mu$ g/ml respectivamente posterior a la exposición por 24 horas a la proteína PE\_PGRS33. Una respuesta similar se observó con la proteína ESAT-6, la cual mostró un aumento significativo en la secreción de IL-1 $\beta$ /IL-1F2, (Figura 21 C) a partir de la concentración 25  $\mu$ g/ml, por el contrario, no se observó una diferencia significativa en la expresión de TNF $\alpha$  bajo estas mismas condiciones, (Figura 21 D).



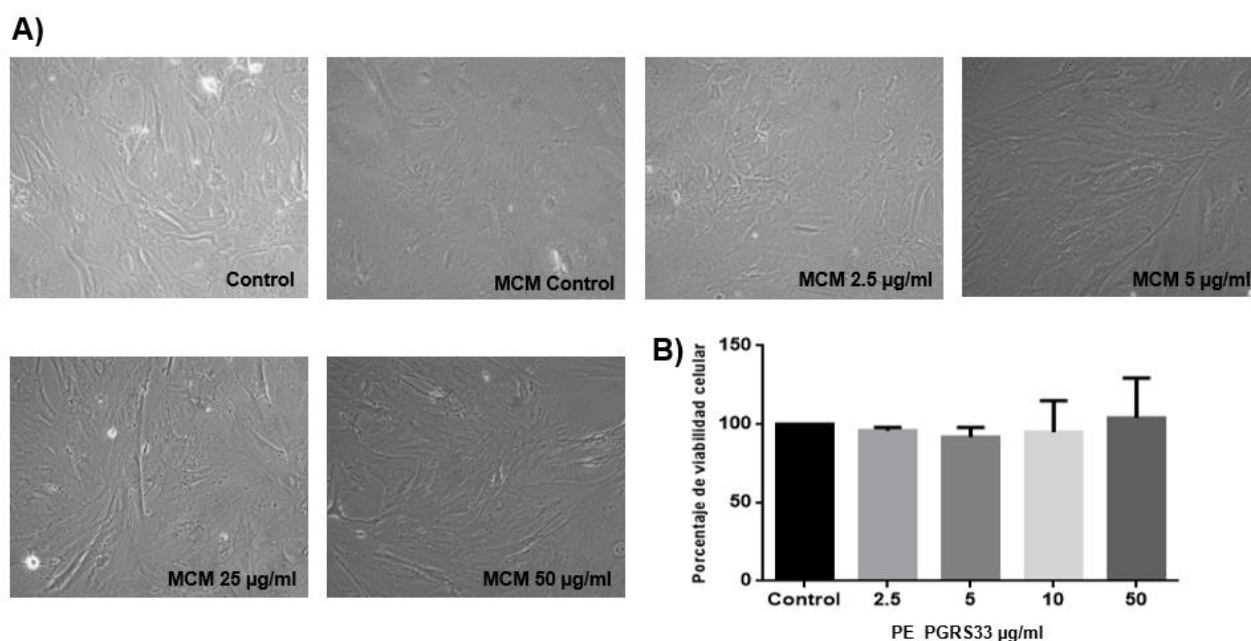
**Figura 21.** Expresión de las citocinas proinflamatorias en microglía estimulada con PE\_PGRS33 y ESAT-6. **A, C)** IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y **B, D)** TNF $\alpha$  (pg/ml) en microglía posterior a la exposición por 24 horas a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 respectivamente. Los datos mostrados se obtuvieron de tres experimentos independientes por duplicado, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA

seguido de una prueba Dunnett, considerando diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media.

Una vez se había corroborada la respuesta proinflamatoria de las células de la microglía, se decidió exponer a los astrocitos a los medios condicionados de microglía tratada con las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 ya que de manera fisiológica tanto la microglía como los astrocitos están mutuamente expuestos a los elementos humorales de cada tipo celular, existiendo así una comunicación bidireccional.

### 11.9 Exposición de astrocitos a medios condicionados de microglía tratada con la proteína PE\_PGRS33.

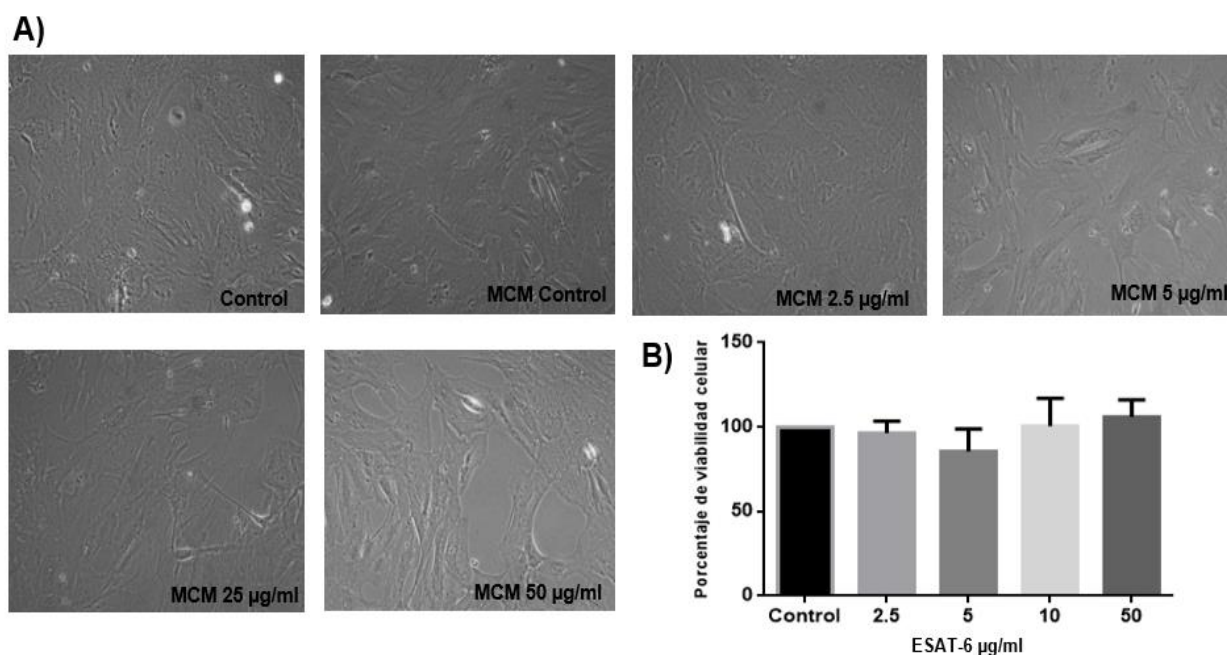
Los resultados de la exposición de astrocitos a los medios condicionados de microglía (MCM) tratada con la proteína PE\_PGRS33 sugieren que no existe muerte celular, esto se corroboró por fotografía de campo claro, (Figura 22 A), en donde se aprecia un ligero cambio morfológico a partir de la concentración de 25µg/ml, en las concentraciones de 2.5 y 5 25µg/ml aparentemente no se observan cambios morfológicos, del mismo modo los ensayos de viabilidad celular por la técnica de calceína, (Figura 22 B), indicaron que no hubo ninguna afectación en la viabilidad celular tras estos tratamientos.



**Figura 22.** La exposición de astrocitos a los medios condicionados de microglía tratada con la proteína PE\_PGRS33 no induce muerte celular **A)** Fotografías de campo claro de astrocitos corticales expuestos a diferentes concentraciones de la microglía tratada con proteína PE\_PGRS33, aumento 100 veces **B)** Gráfica que muestra la cuantificación de calceína de estos experimentos. Los datos mostrados se obtuvieron de tres experimentos independientes por duplicado, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA seguido de una prueba Dunnett, considerando diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media.

### 11.10 Exposición de astrocitos a medios condicionados de microglía tratada con la proteína ESAT-6

La exposición de los astrocitos a los MCM tratada con la proteína ESAT-6, se comportó de manera similar a los ensayos en los que se colocaba la proteína directa, no indujeron muerte celular, pero si un cambio morfológico como se puede observar en las fotografías de campo claro (Figura 23 A), a partir de la concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  las células expresan una forma más alargada e hipertrófica, sin embargo, el ensayo de calceína sugiere que no se produce muerte celular, (Figura 23 B).



**Figura 23.** La exposición de astrocitos a los medios condicionados de microglía tratada con la proteína ESAT-6 no induce muerte celular, pero sí cambios morfológicos a las concentraciones más altas. **A)** Fotografías de campo claro de astrocitos corticales expuestos a diferentes concentraciones de la microglía tratada con proteína ESAT-6, aumento 100 veces. **B)** Gráfica que muestra la cuantificación de calceína de estos experimentos. Los datos mostrados se obtuvieron de tres experimentos independientes por duplicado, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA seguido de una prueba Dunnett, considerando diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media.

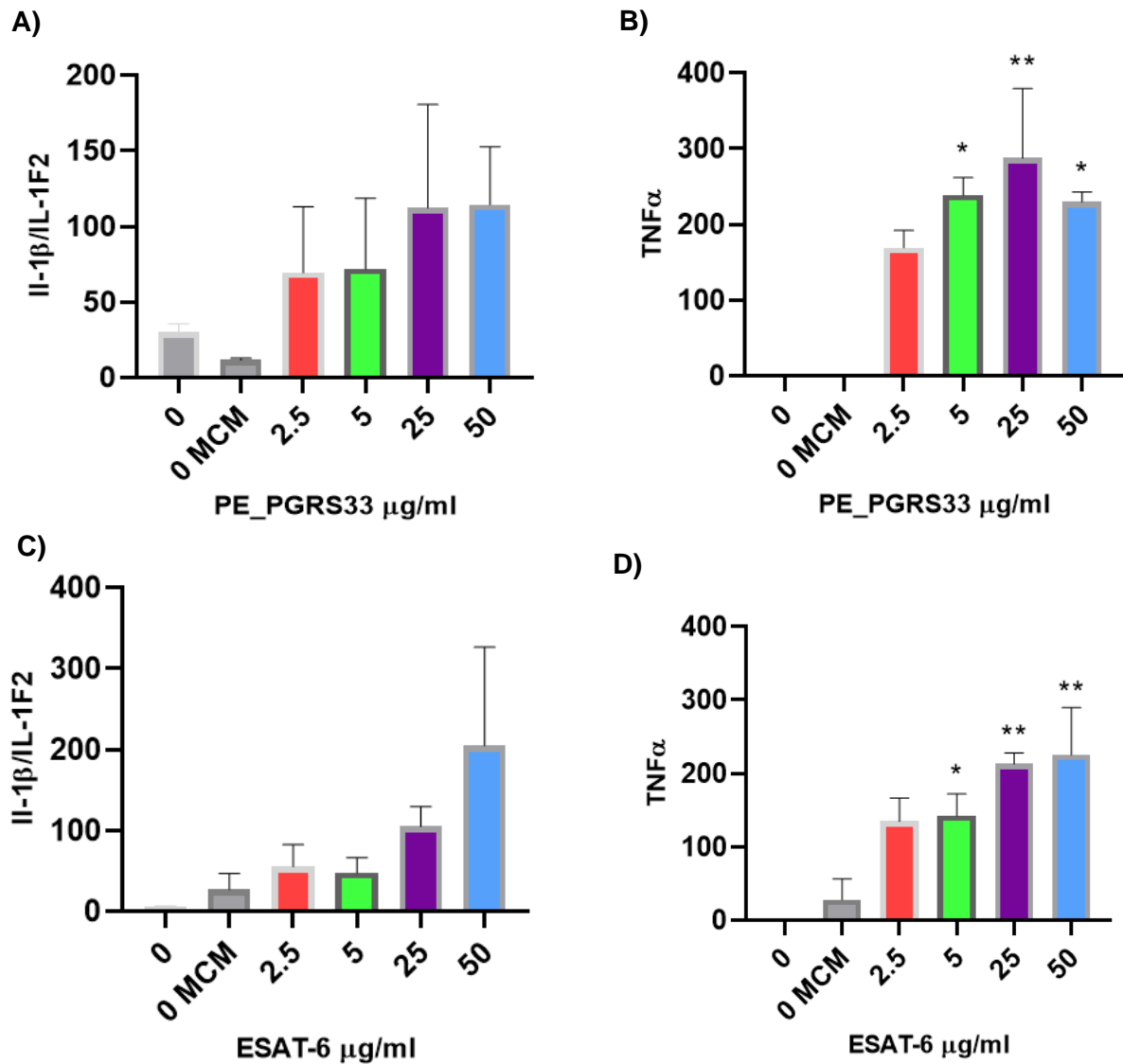


### **11.11 Perfil inflamatorio en medios condicionados de astrocitos y microglía después del tratamiento con las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6**

Finalmente se obtuvieron algunos resultados preliminares en los cuales se determinó el perfil inflamatorio de los medios condicionados de astrocitos, que habían sido tratados con medios condicionados de microglía (MCA-M) previamente expuestas a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 a diferentes concentraciones para determinar si existía una amplificación del proceso inflamatorio al sumar la respuesta de ambos tipos celulares.

Los resultados obtenidos al realiza la prueba de ELISA sugieren que existe una liberación importante de ambas citocinas, particularmente de TNF $\alpha$  la cual tuvo un aumento significativo a partir de la concentración de 5  $\mu$ g/ml tanto para PE\_PGRS33 y ESAT-6, (Figura 24 B y D), aunque los niveles de IL-1 $\beta$ /IL-1F2 mostraron un aumento dependiente de la concentración después del tratamiento con los medios condicionados de microglía expuestos a ambas proteínas (Figura 24 A y C), éste no fue estadísticamente significativo a ninguna de las concentraciones evaluadas.

Como parte de los últimos experimentos se realizaron un par ensayos de inmunocitoquímica para determinar expresión de la proteína GFAP (datos no mostrados), ya que en diversos estudios esta es utilizada también como un marcador de astrogliosis, no obstante, no se encontraron diferencias en la expresión de la proteína bajo nuestras condiciones experimentales.



**Figura 24.** La expresión de TNF $\alpha$  aumentó en medios condicionados de astrocitos y microglía (MCA-M) posterior a la exposición a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6. **A, C)** IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y **B, D)** TNF $\alpha$  (pg/ml) en astrocitos corticales posterior a la exposición por 48 horas a los medios condicionados de microglía tratada con las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 respectivamente. Los datos mostrados se obtuvieron de dos experimentos independientes por duplicado para la proteínas PE\_PGRS33 y tres experimentos independientes por duplicado para ESAT-6, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA seguido de una prueba Dunnett, considerando diferencias significativas a los valores iguales o menores a  $p < 0.05$ . Todos los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar de la media.

## 12. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo son diversos y nos proporcionan algunos de los primeros hallazgos en el campo de la interacción que existe entre las células hospedadas y *Mycobacterium tuberculosis* en el proceso infeccioso del sistema nervioso central. Por un lado encontramos que la proteína PE\_PGRS33 aparentemente no es dañina para los astrocitos, pues no se presentaron rasgos de muerte celular ni cambios morfológicos tras la exposición por 48 horas a ninguna de las concentraciones evaluadas, (0, 2.5, 25 y 50 µg/ml), en cambio la proteína ESAT-6 a pesar de no inducir muerte sí tuvo la capacidad de generar cambios morfológicos en estas células bajo las mismas condiciones; indicándonos que posiblemente se trataba de un proceso de activación diferencial, sin llegar a muerte celular.

En estudios previos de nuestro equipo de trabajo realizados por Jaimes (2017) tampoco se observó muerte celular a las mismas concentraciones en cultivos primarios de microglía cortical contrastando con el trabajo realizado por Derrick, & Morris (2007) en donde se demostró que la proteína ESAT-6 induce el 94% de apoptosis en macrófagos periféricos activando la expresión de caspasas a una concentración de 5 µg/ml, destacando que existe una respuesta diferencial importante a esta proteína entre macrófagos periféricos, microglía y astrocitos, pese a que estos últimos también son considerados macrófagos.

A pesar de que los astrocitos son considerados una población muy homogénea en el SNC, estudios recientes de perfiles fisiológicos y de expresión genética revelaron que los astrocitos son una población celular mucho más diversa de lo que se pensaba, tienen propiedades distintas en diferentes regiones del cerebro y en diferentes períodos de desarrollo (Allen & Eroglu, 2017). Del mismo modo, al caracterizar el perfil inflamatorio se observó que no existían diferencias significativas, como se esperaba, TNF $\alpha$  basal no se detectó en ninguno de los experimentos, en cambio IL-1 $\beta$ /IL-1F2 sí tuvo una expresión reducida en los controles, indicándonos que se encuentra presente en condiciones basales, esto

pudo suceder por el estrés que se genera en las células por el simple hecho de estar en un sistema de cultivo de dos dimensiones.

Al caracterizar el perfil inflamatorio de las células de la microglía expuestas a estas proteínas, encontramos que existe un proceso de activación temprana, esto corrobora los resultados obtenidos anteriormente en nuestro equipo de trabajo, en los cuales se observa que las proteínas no inducen muerte celular, pero sí un proceso de activación. Generalmente, la activación se refiere a una capacidad mejorada de una célula para poder realizar una función que no podría realizar en su estado basal, tanto para la microglía como para los astrocitos este proceso es crucial, su activación es multidimensional, se sabe que proliferan, fagocitan y liberan citocinas o factores de crecimiento (Liu, et al., 2011), la activación de microglía y astrocitos se produce con un patrón espacial y temporalmente distinto, las células de la microglía son las principales efectoras inmunológicas residentes del SNC responden rápidamente mediante el reconocimiento directo de patrones moleculares asociados a patógenos conservados (PAMP) como lipoproteínas, glicolípidos, carbohidratos en la superficie celular de *M. tuberculosis* (Jasenosky, et al., 2015) y en nuestro modelo, a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6.

Diversos estudios se han dedicado a evaluar la comunicación que existe entre las células gliales, algunos de ellos examinan los factores liberados por las células de la microglía implicados en la modulación de las respuestas de los astrocitos han identificado consistentemente las citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y C1q como críticas para la inflamación, porque la inhibición o eliminación de estos factores reduce en gran medida la astrogliosis (Kirkley, et al., 2017; Liddelow, et al, 2017; Liddelow., et al, 2020). En un trabajo realizado por Liddelow y colaboradores (2017), se demuestra que los astrocitos pierden la mayoría de las funciones descritas y son capaces de propiciar un ambiente potencialmente neurotóxico, ya que destruyen rápidamente neuronas y oligodendrocitos maduros diferenciados, del mismo modo demostraron que los astrocitos reactivos se forman rápidamente *in vivo* después de una lesión en el SNC y se encuentra presente en muchas enfermedades

neurodegenerativas, concluyendo que se requiere de la actividad de células de la microglía reactivas para producir astrocitos reactivos *in vivo*. Adicionalmente, un estudio realizado por Guttenplan y colaboradores (2020), demuestran que al inhibir o anular la IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  y C1q secretados por la microglía que inducen astrocitos reactivos neurotóxicos, se puede prevenir en gran medida la muerte de células ganglionares de retina (RGC) inducidas tras el daño en el nervio óptico, este mismo equipo de trabajo demostró que la esclerosis lateral amiotrófica, una enfermedad neurodegenerativa causada por la pérdida progresiva de neuronas, que conduce a la debilidad muscular, parálisis y progresivamente a la muerte, se puede ralentizar al eliminar factores activadores de astrocitos reactivos como IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  y C1q en un modelo de ratón.

Para resumir, nuestros hallazgos confirman los resultados obtenidos en estudios mencionados anteriormente, puesto que pudimos observar que las células de la microglía posterior al tratamientos de las proteínas por 24 horas, mostró una mayor liberación de citocinas proinflamatorias, esto se pudo apreciar más claro con el tratamiento de PE\_PGRS33 a 50  $\mu$ g /ml, donde aumentó 68 veces más IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y 1000 veces más de TNF $\alpha$  respecto al control y esto fue suficiente para activar a los astrocitos corticales. Por otro lado, en los medios condicionados de astrocitos expuestos durante 48 horas a las mismas proteínas, se pudo observar un ligero aumentos de ambas citocinas después de los tratamientos, sin embargo, ninguno fue significativo, esto posiblemente se deba a que la respuesta es más lenta y necesitaba un mayor tiempo de exposición, con estos hallazgos se confirma que existe una diferencia importante en la temporalidad de la activación como lo reportó previamente (Liddelow, et al., 2020).

Finalmente, en los medios condicionados de microglía y astrocitos se percibió un aumento en TNF $\alpha$  en respuesta a ambas proteínas después de 48 horas de tratamiento, en este caso podría tratarse de una respuesta sinérgica entre microglía y astrocitos, mediada en un principio por la microglía seguida por los astrocitos al responder a los estímulos liberados previamente por células de la microglía, es decir que la comunicación entre ambos tipos celulares es importante para poder orquestar

una mejor respuesta inflamatoria, coincidiendo con el trabajo de Liddelow y colaboradores (2017).

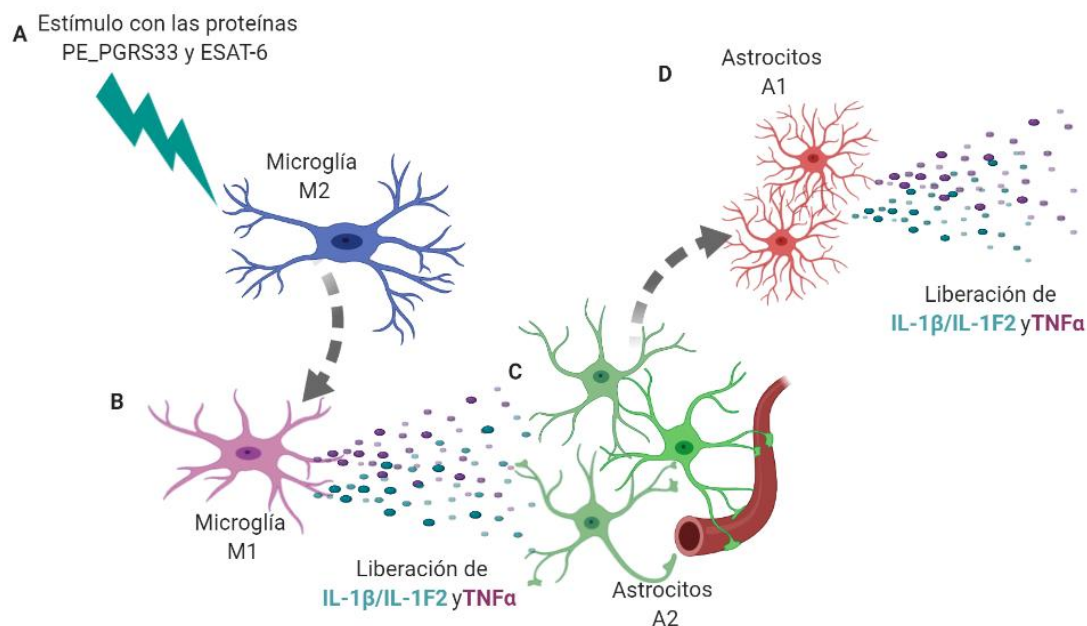
Este trabajo proporciona un buen acercamiento para entender un poco el proceso que se lleva a cabo durante la infección por *M. tb* en el sistema nervioso, sin embargo, aún quedan muchas preguntas por resolver, una de ellas es evaluar la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica de las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6, ya que este fenómeno pudiera ser un paso crucial e incluso representar un obstáculo que limite la entrada de estas proteínas al tejido nervioso, se sabe que esta puede ser atravesada por proteínas menores a los 500 kDa liposolubles o que usen un transportador presente en la membrana (Pachter, et al., 2003).

En el caso de estas proteínas no se conoce ningún transportador, particularmente ESAT-6, es una proteína pequeña (6kDa) y forma parte del sistema de secreción de la micobacteria, después de analizar su secuencia de aminoácidos, podemos observar que tiene un alto índice de hidropatía, por lo que se puede sugerir que tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica dado su pequeño peso molecular y alta hidropatía. Por otra parte, PE\_PGRS33 está constituida por 498 residuos de aminoácidos con un peso de 41.8 kDa, el cual es considerablemente elevado respecto a ESAT-6, por lo que esta proteína podría estar modulando la respuesta inflamatoria en una etapa más tardía, es decir, ya que la micobacteria haya penetrado el tejido nervioso. Una posible estrategia de virulencia dada por esta bacteria sería que por un lado libera una proteína ESAT-6 (Refai, et al., 2018), la cual podría facilitar el debilitamiento de las células hospederas, ya que en un trabajo realizado por Lienard, et al., 2020 se demostró que esta tiene una alta capacidad membranolítica y formadora de poros.

De tal forma que una vez que la micobacteria penetra sigue dañando bajo otros mecanismos aún no descritos con la proteína PE\_PGRS33, la cual se localiza en la membrana, permitiendo un estrecho contacto con células hospederas (Palucci, et al., 2016; Kramarska, et al., 2021), es por ello por lo que sería interesante planear experimentos dirigidos a evaluar la respuesta inflamatoria con ambas proteínas, para determinar si en conjunto estas muestran un mayor efecto.

### 13. CONCLUSIONES

- Las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de *M. tb* y los medios condicionados de microglía tratadas con las mismas inducen un cambio morfológico en astrocitos corticales de rata neonata.
- Las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de *M. tb* y los medios condicionados de microglía tratadas con las mismas no resultaron citotóxicas a ninguna de las concentraciones evaluadas en astrocitos corticales de rata neonata.
- Las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de *M. tb* inducen un ambiente inflamatorio en el SNC orquestado principalmente por las células de la microglía, quienes secretaron tempranamente las citocinas IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y TNF $\alpha$ . (Figura 25).



**Figura 25.** Esquema representativo de conclusiones. **A)** El tratamiento con las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 en células de la microglía conduce al cambio fenotípico de M2 a M1, **B)** promoviendo una mayor secreción de IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y TNF $\alpha$ , **C)** la exposición de los astrocitos a los medios condicionados de microglía tratada bajo esas mismas condiciones **D)** conduce un cambio morfológico de los astrocitos, aparentemente reactivos y la liberación en menor medida respecto a la microglía de IL-1 $\beta$ /IL-1F2 y TNF $\alpha$ .

## 14. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de las proteínas y los medios condicionados de microglía y astrocitos en otros tipos celulares como neuronas y oligodendrocitos.
- Determinar la presencia de otras citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias para tener un contexto completo del perfil inflamatorio que se desencadena tras la exposición de las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 en células gliales.
- Determinar si estas proteínas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.
- Evaluar el efecto que tienen estas proteínas de manera combinada, para saber si juntas pudieran tener un efecto de cooperatividad en la infección causada por *M. tb*.



## 15. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-López, B. A., Correa, F., Moreno-Altamirano, M. M. B., Espitia, C., Hernández-Longoria, R., Oliva-Ramírez, J., ... & Sánchez-García, F. J. (2019). LprG and PE \_ PGRS33 *Mycobacterium tuberculosis* virulence factors induce differential mitochondrial dynamics in macrophages. *Scandinavian journal of immunology*, 89(1), e12728.
- Allen, N. J., & Eroglu, C. (2017). Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron*, 96(3), 697-708.
- Brites, D., & Gagneux, S. (2015). Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunological reviews*, 264(1), 6-24.
- Brodin, P., de Jonge, M. I., Majlessi, L., Leclerc, C., Nilges, M., Cole, S. T., & Brosch, R. (2005). Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33953-33959.
- Cadena, A. M., Fortune, S. M., & Flynn, J. L. (2017). Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 17(11), 691-702.
- Cardona, P. J. (2018). Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 36(1), 38-46.
- Cascioferro, A., Daleke, MH, Ventura, M., Donà, V., Delogu, G., Palù, G., y Manganeli, R. (2011). Disección funcional del dominio PE responsable de la translocación de PE\_PGRS 33 a través de la pared celular micobacteriana. *PloS uno*, 6 (11), e27713.
- Ceyzériat, K., Haim, L. B., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., & Escartin, C. (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 6(1), 1-23.

- Chai, Q., Zhang, Y., & Liu, C. H. (2018). Mycobacterium tuberculosis: an adaptable pathogen associated with multiple human diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 158.
- Chavan, S. S., Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2017). Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. *Immunity*, 46(6), 927-942.
- Chen, G., Zhang, Y. Q., Qadri, Y. J., Serhan, C. N., & Ji, R. R. (2018). Microglia in pain: detrimental and protective roles in pathogenesis and resolution of pain. *Neuron*, 100(6), 1292-1311.
- Chen, Z., Shao, X. Y., Wang, C., Hua, M. H., Wang, C. N., Wang, X., & Qin, Y. W. (2018). Mycobacterium marinum Infection in Zebrafish and Microglia Imitates the Early Stage of Tuberculous Meningitis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 64(2), 321-330.
- Cotrina, M. L., & Nedergaard, M. (2002). Astrocytes in the aging brain. *Journal of neuroscience research*, 67(1), 1-10.
- Delogu, G., Pusceddu, C., Bua, A., Fadda, G., Brennan, M. J., & Zanetti, S. (2004). Rv1818c-encoded PE\_PGRS protein of Mycobacterium tuberculosis is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Molecular microbiology*, 52(3), 725-733.
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 5(1).
- Dossi, E., Vasile, F., & Rouach, N. (2018). Human astrocytes in the diseased brain. *Brain research bulletin*, 136, 139-156.
- Duffy, M. F., Collier, T. J., Patterson, J. R., Kemp, C. J., Luk, K. C., Tansey, M. G., & Sortwell, C. E. (2018). Lewy body-like alpha-synuclein inclusions trigger reactive microgliosis prior to nigral degeneration. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 1-18.
- Engelhardt, B., & Liebner, S. (2014). Novel insights into the development and maintenance of the blood–brain barrier. *Cell and tissue research*, 355(3), 687-699.

- Escartin, C., Guillemaud, O., & Carrillo-de Sauvage, M. A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*, 67(12), 2221-2247.
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., ... & Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature neuroscience*, 24(3), 312-325.
- Fanlo, P., & Tiberio, G. (2007). Tuberculosis extrapulmonar. In *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 30, pp. 143-162). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Ford, C. B., Shah, R. R., Maeda, M. K., Gagneux, S., Murray, M. B., Cohen, T., & Fortune, S. M. (2013). Mycobacterium tuberculosis mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nature genetics*, 45(7), 784-790.
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8), a020537.
- Golden, M. P., & Vikram, H. R. (2005). Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American family physician*, 72(9), 1761-1768.
- Gupta, N., Kumar, R., & Agrawal, B. (2018). New players in immunity to tuberculosis: the host microbiome, lung epithelium, and innate immune cells. *Frontiers in immunology*, 9, 709.
- Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., Adler, D. I., Couthouis, J., Liddelow, S. A., Gitler, A. D., & Barres, B. A. (2020). Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nature communications*, 11(1), 3753.
- Guttenplan, K. A., Stafford, B. K., El-Danaf, R. N., Adler, D. I., Münch, A. E., Weigel, M. K., ... & Liddelow, S. A. (2020). Neurotoxic reactive astrocytes drive neuronal death after retinal injury. *Cell reports*, 31(12), 107776
- Holtman, I. R., Skola, D., & Glass, C. K. (2017). Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 127(9), 3220-3229.
- Iacobino, A., Fattorini, L., & Giannoni, F. (2020). Drug-resistant tuberculosis 2020: where we stand. *Applied Sciences*, 10(6), 2153.

- Jasenosky, L. D., Scriba, T. J., Hanekom, W. A., & Goldfeld, A. E. (2015). T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunological reviews*, 264(1), 74-87.
- Jaimes Nateras, 2017. "Patrón inmunológico de la Microglia ante la exposición a las proteínas PE\_PGRS33 y ESAT-6 de la membrana de *Mycobacterium tuberculosis*."
- Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs Jr, W. R., & Prados-Rosales, R. (2019). The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*, 476(14), 1995-2016.
- Kinhikar AG, Verma I, Chandra D, Singh KK, Weldingh K, et al. (2010) Posible papel de ESAT6 en la diseminación de *Mycobacterium tuberculosis* a través de células epiteliales de pulmón humano. *Mol Microbiol* 75: 92-106.
- Kirkley, K. S., Popichak, K. A., Afzali, M. F., Legare, M. E., & Tjalkens, R. B. (2017). Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 1-18.
- Kramarska, E., Squeglia, F., De Maio, F., Delogu, G. y Berisio, R. (2021). PE\_PGRS33, un importante factor de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* y potencial objetivo de la respuesta inmune humoral del huésped. *Celdas*, 10 (1), 161.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*, 19(8), 312-318.
- Labzin, L. I., Heneka, M. T., & Latz, E. (2017). Innate Immunity and Neurodegeneration. *Annual review of medicine*, (0).
- Lai, S. W., Chen, J. H., Lin, H. Y., Liu, Y. S., Tsai, C. F., Chang, P. C., ... & Lin, C. (2018). Regulatory effects of neuroinflammatory responses through brain-derived neurotrophic factor signaling in microglial cells. *Molecular neurobiology*, 1-13.
- Leem, A. Y., Song, J. H., Lee, E. H., Lee, H., Sim, B., Kim, S. Y., ... & Kim, Y. S. (2018). Changes in cytokine responses to TB antigens ESAT-6, CFP-10

- and TB 7.7 and inflammatory markers in peripheral blood during therapy. *Scientific reports*, 8(1), 1159.
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L.,... & Wilton, D. K. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481.
- Liddelow, S. A., Marsh, S. E., & Stevens, B. (2020). Microglia and astrocytes in disease: dynamic duo or partners in crime?. *Trends in Immunology*.
- Lienard, J., Nobs, E., Lovins, V., Mover, E., Valfridsson, C., & Carlsson, F. (2020). The Mycobacterium marinum ESX-1 system mediates phagosomal permeabilization and type I interferon production via separable mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(2), 1160-1166.
- Liu, W., Tang, Y., & Feng, J. (2011). Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life sciences*, 89(5-6), 141-146.
- López Sánchez, J. M. (2012). One School, two Laboratories: Neurosciences in the Junta para Ampliación de Estudios *Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría*, 32(116), 805-825.
- Lu, Y., Kang, J., Ning, H., Wang, L., Xu, Y., Xue, Y.,... & Bai, Y. (2018). Immunological characteristics of Mycobacterium tuberculosis subunit vaccines immunized through different routes. *Microbial pathogenesis*, 125, 84-92.
- Madore, C., Yin, Z., Leibowitz, J., & Butovsky, O. (2020). Microglia, lifestyle stress, and neurodegeneration. *Immunity*, 52(2), 222-240.
- Malm, T., Magga, J., & Koistinaho, J. (2012). Animal Models of Alzheimer's Disease: Utilization of Transgenic Alzheimer's Disease Models in Studies of Amyloid Beta Clearance. *Current Translational Geriatrics and Experimental Gerontology Reports*, 1(1), 11–20.
- Martínez-Gómez, A. 2014. Comunicación entre células gliales y neuronas I. Astrocitos, células de Schwann que no forman mielina y células de Schwann perisinápticas.

- Maulén, N. P. (2011). Virulence factors of Mycobacterium tuberculosis. *Revista médica de Chile*, 139(12), 1605-1610.
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2017). Atlas de histología animal y vegetal. *Tejidos vegetales: Conducción. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo*. 14pp.
- Miggiano, R., Rizzi, M., & Ferraris, D. M. (2020). Mycobacterium tuberculosis pathogenesis, infection prevention and treatment.
- Mikita, J., Dubourdieu-Cassagno, N., Deloire, M. S., Vekris, A., Biran, M., Raffard, G.,... & Petry, K. G. (2011). Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Multiple Sclerosis Journal*, 17(1), 2-15.
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual review of immunology*, 32, 367.
- Olwen, R. Astrocytes: ¿What Are They and What Do They Do? *TiempoBioscience*. 2016
- Pachter, J. S., de Vries, H. E., & Fabry, Z. (2003). The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(6), 593-604.
- Palucci, I., Camassa, S., Cascioferro, A., Sali, M., Anosheh, S., Zumbo, A.,... & Delogu, G. (2016). PE\_PGRS33 contributes to Mycobacterium tuberculosis entry in macrophages through interaction with TLR2. *PLoS One*, 11(3), e0150800.
- Pekny, M., & Pekna, M. (2016). Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 483-491.
- Pérez del Molino, M. L., Tuñez Bastida, V., García Ramos, M. R., & Lado Lado, F. (2002). Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. *Med Integral*, 39(5), 171-239.
- Pimienta-Rodríguez, E. T., Rodríguez-Valdés, C., Sarzo-Gómez, M., & Vallín-Plou, C. (2012). Producción de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 de Mycobacterium

- tuberculosis y evaluación de sus potencialidades en el serodiagnóstico de la tuberculosis activa en una población cubana. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 43(2), 1-8.
- Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 179(2), 292-311.
- Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2021). Microglia and central nervous system-associated macrophages—from origin to disease modulation. *Annual review of immunology*, 39, 251-277.
- Poulakis, N., Gritzapis, A. D., Ploussi, M., Leventopoulos, M., Papageorgiou, C. V., Anastasopoulos, A.,... & Tsilivakos, V. (2016). Intracellular ESAT-6: A new biomarker for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 90(3), 312-314.
- Quesada Yamasaki, D., Arce Soto, E., Ramírez Chan, K. G., Fornaguera Trías, J., & Mora Gallegos, A. (2016). The role of microglia in neuroinflammatory signaling and the neuroimmune response.
- Ramirez-Lapausa, M., Menendez-Saldana, A., & Noguero-Asensio, A. (2015). Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Rev Esp Sanid Penit*, 17(1), 3-11.
- Ramírez RNA, Cocotle RBE, Méndez PA, et al. *Mycobacterium tuberculosis*: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Rev Med UV*. 2002;2(2):39-43.
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?. *Nature neuroscience*, 19(8), 987.
- Refai, A., Gritli, S., Barbouche, M. R., & Essafi, M. (2018). *Mycobacterium tuberculosis* virulent factor ESAT-6 drives macrophage differentiation toward the pro-inflammatory M1 phenotype and subsequently switches it to the anti-inflammatory M2 phenotype. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 327.
- Rivera, D. F., & Camargo, D. G. (2015). Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Revista Médicas UIS*, 28(1), 39-51.

- Romero, L. V. (2015). *Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso*. XinXii.
- Scherrer, S., Landolt, P., Friedel, U., & Stephan, R. (2019). Distribution and expression of *esat-6* and *cfp-10* in non-tuberculous mycobacteria isolated from lymph nodes of slaughtered cattle in Switzerland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(2), 217-221.
- Sgarbi, N. (2015). Infecciones del sistema nervioso: nuevas herramientas diagnósticas. *Revista argentina de radiología*, 79(1), 12-31.
- Sia, J. K., & Rengarajan, J. (2019). Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiology spectrum*, 7(4), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018.
- Synentec, 2020. Testing the Toxicity of Calcein-AM under Fluorescence Activated Single Cell Cloning (FASCC) Conditions. Consultado el 19 de octubre del 2020. Disponible en: [https://synentec.com/media/calceintoxstudy\\_anb128-xvii-07.pdf](https://synentec.com/media/calceintoxstudy_anb128-xvii-07.pdf).
- Smith I. (2003). Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 463–496. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.463-496.2003>
- Sreejit, G., Ahmed, A., Parveen, N., Jha, V., Valluri, V. L., Ghosh, S., & Mukhopadhyay, S. (2014). The ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis interacts with beta-2-microglobulin ( $\beta$ 2M) affecting antigen presentation function of macrophage. *PLoS pathogens*, 10(10), e1004446
- Sloan, S. A., & Barres, B. A. (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current opinion in neurobiology*, 27, 75-81.
- Snell, R. (2010). Neuroanatomía clínica. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7-35.
- Talarico, S., Cave, M. D., Marrs, C. F., Foxman, B., Zhang, L., & Yang, Z. (2005). Variation of the Mycobacterium tuberculosis PE\_PGRS33 gene among clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(10), 4954-4960.



- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology*, 53(2), 1181-1194.
- Timmerman, R., Burm, S. M., & Bajramovic, J. J. (2018). An overview of in vitro methods to study microglia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 242.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana.
- Zhai, W., Wu, F., Zhang, Y., Fu, Y., & Liu, Z. (2019). The immune escape mechanisms of Mycobacterium tuberculosis. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 340.
- Zhou, B., Zuo, Y. X., & Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(6), 665-673.