



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

“EFECTO DE LAS MICROVESÍCULAS DE
CÉLULAS J774A.1 SOBRE LA INFECCIÓN
TUBERCULOSA”

TESIS

Que para obtener el grado de Doctorado en Ciencias en Inmunología

PRESENTA:

M. EN C. MARIANO GARCÍA MARTÍNEZ



DIRECTORES:
DRA. IRIS CITLALI ELVIRA ESTRADA GARCÍA
DR. SERGIO ANTONIO ESTRADA PARRA

CIUDAD DE MÉXICO , JUNIO 2018



OPEN ACCESS

Edited by:

Christopher Gregory,
University of Edinburgh, United
Kingdom

Reviewed by:

Maria Cecilia G. Marcondes,
San Diego Biomedical Research
Institute, United States
Bruce Milne Hall,
University of New South Wales,
Australia

***Correspondence:**

Rommel Chacón-Salinas
rommelchacons@yahoo.com.mx;
Iris Estrada-García
iestrada5@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance and
Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 03 November 2017

Accepted: 30 January 2018

Published: 19 February 2018

Citation:

Alvarez-Jiménez VD, Leyva-
Paredes K, García-Martínez M,
Vázquez-Flores L, García-
Paredes VG, Campillo-Navarro M,
Romo-Cruz I, Rosales-García VH,
Castañeda-Casimiro J, González-
Pozos S, Hernández JM, Wong-
Baeza C, García-Pérez BE,
Ortiz-Navarrete V, Estrada-Parra S,
Serafín-López J, Wong-Baeza I,
Chacón-Salinas R and Estrada-
García I (2018) Extracellular Vesicles
Released from *Mycobacterium
tuberculosis*-Infected Neutrophils
Promote Macrophage Autophagy
and Decrease Intracellular
Mycobacterial Survival.
Front. Immunol. 9:272.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00272

Extracellular Vesicles Released from *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Neutrophils Promote Macrophage Autophagy and Decrease Intracellular Mycobacterial Survival

Violeta D. Alvarez-Jiménez¹, Kahiry Leyva-Paredes¹, Mariano García-Martínez¹, Luis Vázquez-Flores¹, Víctor Gabriel García-Paredes¹, Marcia Campillo-Navarro^{1,2}, Israel Romo-Cruz³, Víctor Hugo Rosales-García^{4,5}, Jessica Castañeda-Casimiro¹, Sirenia González-Pozos⁵, José Manuel Hernández², Carlos Wong-Baeza⁶, Blanca Estela García-Pérez¹, Vianney Ortiz-Navarrete⁷, Sergio Estrada-Parra¹, Jeanet Serafin-López¹, Isabel Wong-Baeza¹, Rommel Chacón-Salinas^{1,8*} and Iris Estrada-García^{1*}

¹Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico City, Mexico, ²Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico, ³Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico, ⁴Laboratorio de Citometría de Flujo de Diagnóstico Molecular de Leucemias y Terapia Celular SA. De CV. (DILETEC), Mexico City, Mexico, ⁵Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LANSE), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico, ⁶Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico City, Mexico, ⁷Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico, ⁸Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico City, Mexico

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). In the lungs, macrophages and neutrophils are the first immune cells that have contact with the infecting mycobacteria. Neutrophils are phagocytic cells that kill microorganisms through several mechanisms, which include the lytic enzymes and antimicrobial peptides that are found in their lysosomes, and the production of reactive oxygen species. Neutrophils also release extracellular vesicles (EVs) (100–1,000 nm in diameter) to the extracellular milieu; these EVs consist of a lipid bilayer surrounding a hydrophilic core and participate in intercellular communication. We previously demonstrated that human neutrophils infected *in vitro* with Mtb H37Rv release EVs (EV-TB), but the effect of these EVs on other cells relevant for the control of Mtb infection, such as macrophages, has not been completely analyzed. In this study, we characterized the EVs produced by non-stimulated human neutrophils (EV-NS), and the EVs produced by neutrophils stimulated with an activator (PMA), a peptide derived from bacterial proteins (fMLF) or Mtb, and observed that the four EVs differed in their size. Ligands for toll-like receptor (TLR) 2/6 were detected in EV-TB, and these EVs favored a modest increase in the expression of the co-stimulatory molecules CD80, a

Resumen

La tuberculosis es la primera causa de muerte en el mundo por un agente infeccioso. Su tratamiento es prolongado y tóxico, por lo que los pacientes lo abandonan. Es necesario encontrar nuevos esquemas de tratamiento que ayuden reducir el tiempo de administración.

Todas las células liberan microvesículas espontáneamente, con características de las células que les den origen, que funcionan como mediadores en la comunicación celular. La composición de estas microvesículas cambia dependiendo del estímulo a que sean sometidas las células.

Se ha probado el uso de microvesículas para el tratamiento de enfermedades no infecciosas como *status epilepticus* y displasia broncopulmonar e infarto al miocardio. En modelos de estas enfermedades se ha visto que pueden reducir el daño al tejido y la inflamación. Se han modificado microvesículas para que puedan travesar la barrera hematoencefálica y transportar moléculas que ayuden al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En el caso de enfermedades infecciosas, se ha probado el uso de microvesículas como vacunas. Se ha probado con éxito en modelos murinos de malaria y tuberculosis.

Las microvesículas liberadas por macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* tienen efectos sobre células del sistema inmune, modificando la expresión de moléculas de superficie y la liberación de citocinas y quimiocinas en macrófagos, además de que pueden reclutar macrófagos y presentar antígeno a linfocitos T. Pero su potencial como adyuvantes en el tratamiento de la tuberculosis no ha sido probado.

En este trabajo propusimos el uso de las microvesículas liberadas por macrófagos J774A.1 para tratar la tuberculosis, encontrando resultados prometedores. Caracterizamos las microvesículas liberadas por células J774A.1 de manera espontánea (MV-Espont) y como respuesta a una infección con *M. tuberculosis* H37Rv (MV-H37Rv). Las MV-H37Rv contienen antígenos micobacterianos y una cantidad mayor de fosfatidilserina que las MV-Espont. *In vitro* las MV-Espont redujeron la carga bacteriana en macrófagos J774A.1 infectados con *M. tuberculosis* mediante un efecto dependiente de la fosfatidilserina en su superficie.

Encontramos que las microvesículas son efectivas como tratamiento para la tuberculosis en un modelo murino de la enfermedad, encontrando que tanto las MV-Espont como las MV-H37Rv ayudan a reducir la carga bacteriana al ser administrados por vía intraperitoneal tres veces por semana durante 60 días comenzando la administración 60 días después de la infección. Es necesario realizar experimentos combinando la administración de microvesículas con antifímicos para conseguir un esquema de tratamiento más corto.

Abstract

Tuberculosis is the first cause of death in the world due to an infectious agent. It's treatment is long and toxic, and because of that, it's abandoned by the patients. It's necessary to find new treatment schemes that help reduce the time of treatment.

Every cells spontaneously release microvesicles with characteristics of the cell releasing them, they can mediate cell communication. The composition of these microvesicles change depending on the stimulus given to the cells.

Microvesicles have been tested for treatment of non infectious diseases such as *status epilepticus* and bronchopulmonary dysplasia and myocardial infarction. They reduce the damage and inflammation in models of these diseases. Microvesicles have been modified so they can pass through the blood-brain barrier and transport molecules for treatment of Alzheimer's disease.

In infectious diseases, microvesicles have been tested successfully as vaccines in mice models of malaria and tuberculosis.

Microvesicles released by *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages have effect in cells of the immune system, modifying the expression of surface molecules and chemokines release in macrophages; also, they can recruit more macrophages and present antigen to T cells. But their effect as helpers in treatment of tuberculosis has not been tested.

In this work, we proposed the use of microvesicles released by the J774A.1 cell line macrophages, with promising results. First, we characterized the chemical composition of these microvesicles. Microvesicles released by J774A.1 macrophages after *M. tuberculosis* infection (MV-H37Rv) carry micobacterial antigens and have an increased amount of phosphatidylserine compared to the microvesicles released spontaneously by these cells (MV-Espont). *In vitro*, MV-Espont reduced the bacteria burden of *M. tuberculosis* infected J774A.1 macrophages with an effect dependent of surface phosphatidylserine.

We found that the microvesicles are effective as treatment for tuberculosis in a mouse model of the disease, finding that both microvesicles, MV-Espont and MV-H37Rv help to reduce the bacterial burden after being administered intraperitoneally three times a week for 60 days, beginning at day 60 of infection. Further experiments are needed combining the microvesicles with antituberculous drugs so a shorter administration time can be achieved.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular II del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García y el Dr. Sergio Antonio Estrada Parra. Se realizaron experimentos en el Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, dirigido por el Dr. Rogelio Hernández Pando.

El trabajo fue financiado por el proyecto CONACyT “Caracterización y función de micro vesículas en la tuberculosis” con N° de registro: 221002 y por los proyectos SIP “Caracterización del efecto de ectosomas derivados de neutrófilos humanos sobre macrófagos homólogos infectados con micobacterias”, con clave 20171013; “Caracterización de exosomas derivados de macrófagos J774A.1 infectados con micobacterias”, con clave 20161901.

El sustentante fue becario CONACyT con N° de registro 267841 y recibió apoyo del Proyecto Integral de Formación de Investigadores mientras realizó sus estudios de Doctorado en Ciencias en Inmunología con las claves 20141407, 20151277, 20161901 y 20171013,

Agradecimientos

- Directores
 - Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García
 - Dr. Sergio Antonio Estrada Parra
- Comité tutorial
 - Dr. Miguel Ángel Ibáñez Hernández
 - Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont
 - Dra. Luvia Enid Sánchez Torres
- Laboratorio de Inmunología molecular II
- Laboratorio de Patología Experimental del INCMNSZ
 - Dr. Rogelio Hernández Pando
 - Dr. Jorge Barrios Payán
 - Dra. Dulce Mata Espinosa
 - Dra. Brenda Marquina Castillo
- Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi madre, a mi hermana, a mi sobrino y a mis tías.

Y muy especialmente a mi padre, Mariano García Rodríguez, *in memoriam*. Te fuiste cuando se estaba poniendo interesante.

Índice

Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	v
Abreviaturas.....	vi
1. Antecedentes.....	1
1.1 Tuberculosis.....	1
1.2 Desarrollo de la infección y respuesta inmune.....	1
1.3 Vesículas membranales.....	5
1.3.1. Microvesículas y tuberculosis.....	7
1.3.3 Usos terapéuticos de las microvesículas.....	9
2. Planteamiento del problema.....	11
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivos.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos particulares.....	14
5. Materiales y métodos.....	15
5.1 Obtención de microvesículas de macrófagos infectados con micobacterias.....	15
5.2 Caracterización de las microvesículas.....	16
5.2.1 Selección de las fracciones a analizar.....	16
5.2.2 Citometría de flujo.....	17
5.2.3 Microscopía electrónica.....	19
5.2.4 Análisis de rastreo de nanopartículas.....	20
5.2.5 Extracción de lípidos y cromatografía en capa fina.....	20
5.2.6 Electroforesis de proteínas de exosomas y Western blot.....	21
5.3 Efecto biológico de las microvesículas en modelos de infección.....	23
5.3.1 Efecto <i>in vitro</i> de las microvesículas sobre una línea celular infectada con <i>M. tuberculosis</i>	23
5.3.3 Modelo experimental de tuberculosis pulmonar en ratón y tratamiento con exosomas.....	25

5.4 Análisis estadístico.	27
6.1 Determinación de las condiciones para la obtención de microvesículas.	28
6.2 Presencia de microvesículas en las fracciones con mayor absorbancia en la región de componentes de mayor tamaño	30
6.3 Características bioquímicas de las microvesículas	38
6.4 Efecto <i>in vitro</i> de las microvesículas sobre macrófagos J774A.1 infectados y participación de la fosfatidilserina.....	43
6.5 Efecto del tratamiento con exosomas en el modelo experimental de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c.....	44
7. Discusión.....	49
8. Conclusiones.....	58
9. Bibliografía.....	59

Índice de figuras

Figura 1. Patogénesis de la tuberculosis.....	3
Figura 2. Las microvesículas son de diferente origen subcelular.....	7
Figura 3. Región a partir de la cual se contaron los eventos para el análisis de citometría de flujo.....	17
Figura 4. Tipos de áreas delimitados para el análisis histológico.....	26
Figura 5. Determinación de las condiciones para obtención de microvesículas.....	28
Figura 6. Las microvesículas se pierden si son ultracentrifugadas por segunda vez.....	29
Figura 7. Existen poblaciones de microvesículas que se pueden distinguir por sus marcadores de superficie.....	31
Figura 8. Las microvesículas tienen tamaños distintos según el estímulo con el que fueron inducidas.....	32
Figura 9. La cromatografía por exclusión de tamaño permite obtener exosomas con menos proteínas contaminantes.....	33
Figura 10. La cromatografía por exclusión de tamaño mantiene la estructura característica de las microvesículas.....	34
Figura 11. Las microvesículas liberados por células infectadas con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv presentan una población de mayor tamaño.....	35
Figura 12. Las microvesículas de suero fetal bovino no pueden ser empleados como control pues se desconoce la proporción de estas en las preparaciones de microvesículas liberadas por macrófagos J774A.1.....	37
Figura 13. Las microvesículas liberadas por macrófagos J774A.1 contienen más fosfatidilserina.....	38
Figura 14. Composición proteica y antigénica de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv presentes en las microvesículas.....	39
Figura 15. La fosfatidilserina en la cara externa de las microvesículas liberados por células infectadas puede bloquearse con Anexina V.....	41
Figura 16. Las microvesículas liberadas espontáneamente aumentan la capacidad microbicida de los macrófagos J774A.1 en un efecto dependiente de fosfatidilserina.....	43
Figura 17. Las microvesículas reducen la carga bacteriana en un modelo <i>in vivo</i> de tuberculosis pero el efecto puede perderse por el almacenamiento de las microvesículas en el laboratorio.....	45

Figura 18. Las microvesículas no modifican la patología de la tuberculosis.....	47
Figura 19. Efecto probable de las microvesículas liberadas por células J774A.1 sobre macrófagos.....	51

Índice de tablas

Tabla 1. Formulación de geles de poliacrilamida al 12%.....	21
---	----

Abreviaturas

Ag85	Antígeno 85
APC	Alofococianina
APHL	<i>Association of Public Health Laboratories</i> . Asociación de laboratorios de salud pública
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> . Ligando 5 de las quimiocinas de motivo C-C
CD##	Clúster de diferenciación, ## indica el número de molécula
CPA	Célula presentadora de antígeno
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> . Medio Eagle modificado por Dulbecco
ESAT-6	<i>Early Secretory Antigenic Target of 6KDa</i> , Blanco antigénico de secreción temprana de 6kilodaltones
IFN- γ	Interferón gamma
IL-##	Interleucina, ## indica el número de interleucina
KDa	kilodalton
Lamp2b	<i>Lysosome associated membrane protein 2b</i> . Proteína de superficie asociada a lisosomas
LPS	Lipopolisacárido
MCP-5	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> . Proteína quimioatrayente de monocitos 5
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> . Complejo principal de histocompatibilidad
MV-Espont	Microvesículas liberadas espontáneamente
MV-H37Rv	Microvesículas liberadas después de la infección con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
OADC	Oleico, albúmina, dextrosa, catalasa
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> . Patrón molecular asociado a patógenos
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> . Receptor de reconocimiento de patrón
PS	Fosfatidilserina
PSR	<i>Phosphatidylserine receptor</i> . Receptor de fosfatidil serina.
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i> . Receptor de productos finales de glicación avanzada
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-Poliacrilamide gel electrophoresis</i> . Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i> . Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SS	Solución salina
TB	Tuberculosis
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	<i>T helper</i> . Linfocito T cooperador
TIM-#	<i>T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule</i> . Molécula de células T que contiene un dominio de inmunoglobulina y mucina, # indica el número.
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> . Cromatografía en capa fina.
TLR	<i>Toll-like receptor</i> . Receptor tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> . Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidad formadora de colonia
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WHO	<i>World Health Organization</i> . Organización Mundial de la Salud
xg	Gravedades

1. Antecedentes

1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por un grupo de bacterias filogenéticamente muy relacionadas conocidas en conjunto como el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), siendo *M. tuberculosis* y *M. africanum* los agentes etiológicos principales de la enfermedad en humanos (Comas, 2013). Es la novena causa de muerte en el mundo y la primera causa de muerte por un agente infeccioso (WHO, 2017).

En 2016, la cifra estimada de muertes por tuberculosis fue de 1.3 millones en personas no infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y 374,000 en personas infectadas con el VIH. La cifra estimada de personas que contrajeron la enfermedad fue de 10.4 millones. La estrategia "End TB" de la Organización Mundial de la Salud (WHO) plantea reducir el número de muertes en un 95% y la tasa de incidencia en un 90% entre 2015 y 2035 (WHO, 2017).

1.2 Desarrollo de la infección y respuesta inmune

En el esputo de los pacientes con TB pulmonar activa se encuentra presente la bacteria, siendo la expulsión de aerosoles la principal fuente de infección en la comunidad. La infección primaria con *M. tuberculosis* produce la enfermedad en aproximadamente el 10% de los pacientes (Comstock y cols, 1974). En los casos restantes, la respuesta inmune evita el crecimiento de la micobacteria, eliminándola eficazmente en aproximadamente el

10% de los casos (Stein y col. 2009). Los demás casos logran solamente contener la infección (Stein y col. 2009).

La infección con *M. tuberculosis* inicia con aspiración de la bacteria en microaerosoles (Figura 1) y la fagocitosis de la micobacteria por los macrófagos alveolares, mediada por el receptor de manosa (Schlesinger, 1993), el receptor 3 de complemento (Cywes, y col, 1996) y probablemente por CD14 (Peterson y col, 1995; Shams y col, 2003).

Posterior a su infección, los macrófagos alveolares liberan agentes quimiotácticos y citocinas como IL-1 β , IL-12 y TNF- α que reclutan monocitos y neutrófilos al sitio de infección, donde son incapaces de matar a la micobacteria porque ésta ha resistido los mecanismos microbicidas de la célula fagocítica al evitar la fusión del fagosoma con los lisosomas mediante el sistema de secreción tipo VII, en el que participan ESAT-6 y CFP-10, multiplicándose en el fagocito y produciendo la muerte celular por necrosis o apoptosis (Simeone, 2012). Las micobacterias liberadas repiten este ciclo al ser fagocitadas por otras células fagocíticas. También los macrófagos pueden producir IL-10 y TGF- β , citocinas antiinflamatorias que mantienen el equilibrio entre erradicación de la bacteria y daño al hospedero (Olobo y col, 2001).

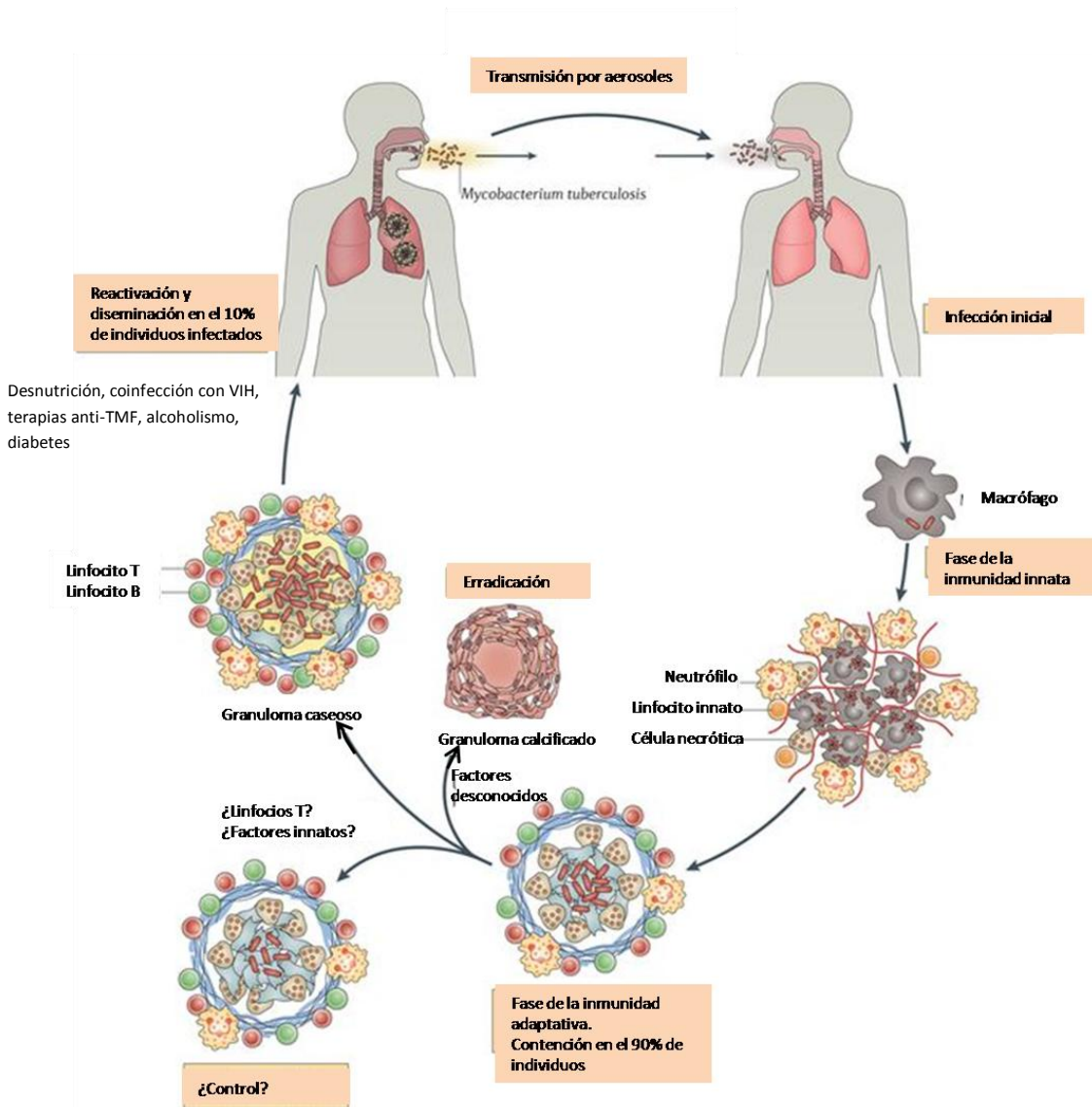


Figura 1. Patogénesis de la tuberculosis. Una persona con tuberculosis expelle las micobacterias en microaerosoles al toser. Estos microaerosoles son inhalados por una persona sana y la bacteria llega al pulmón. En la fase de la inmunidad innata, la micobacteria es fagocitada por macrófagos alveolares. La micobacteria se multiplicará en su interior y no podrá ser eliminada. Una célula dendrítica logrará presentar el antígeno e iniciar una expansión de clones de linfocitos T, dando lugar a la respuesta inmune adaptativa, formando una estructura de contención, el granuloma. El granuloma en un inicio será una estructura vascularizada donde los macrófagos muertos por la infección serán rodeados de macrófagos que se irán fusionando para hacer células gigantes o cambiarán su metabolismo para acumular lípidos, produciéndose macrófagos espumosos. Esta estructura se rodeará de linfocitos y fibroblastos, y dejará de ser vascularizada para reducir el aporte nutricional y la tensión de oxígeno en su interior, con lo que la bacteria no podrá multiplicarse, entrando en estado de latencia. El 10% de las personas que han formado granuloma logran eliminar a la bacteria calcificando el granuloma. Otro 10% perderá el equilibrio de citocinas por coinfección con VIH, desnutrición, diabetes o alcoholismo. Cuando la estructura se pierde, la micobacteria se multiplica de manera extracelular y se disemina por vía hematogena a otros órganos, además de que ya puede ser expulsada al toser. La respuesta inmune innata producirá daño en el pulmón. Tomado de: Nunes-Alves y col, 2014 y WHO, 2017

Las células reclutadas empiezan a formar el granuloma, una estructura amorfa caracterizada por neutrófilos, monocitos, células epitelioides (Turk y Narayanan, 1982) y macrófagos. Estos últimos se diferencian a macrófagos espumosos (Peyron y col. 2008), y gigantes multinucleados (Postlethwaite y col, 1982). Con el desarrollo de respuesta inmune adaptativa, el granuloma adquiere una estructura definida: el centro tiene condiciones de pH bajo y contiene bacterias y material necrótico, escasos nutrientes y reducida tensión de oxígeno, lo que evita la multiplicación micobacteriana, pero sin eliminarla, además está rodeado de capas de macrófagos, fibroblastos y linfocitos (Peyron y col. 2008).

La pérdida en el equilibrio de citocinas lleva a la pérdida de la estructura del granuloma y a la diseminación de la micobacteria. La coinfección con VIH lleva a la pérdida de los linfocitos T cooperadores (Th) para contener la enfermedad (Whalen y col, 1995). La terapia de bloqueo de TNF- α en enfermedades inflamatorias también se ha asociado con la pérdida de la estructura del granuloma y la reactivación de la tuberculosis (Mohan y col, 2004). Otros factores asociados a la pérdida de la estructura del granuloma son la desnutrición, la edad y el alcoholismo (WHO, 2017), permitiendo la dispersión de la bacteria y adquiriendo un nuevo perfil metabólico en el que puede multiplicarse extracelularmente. En este estado, la circulación del aire en los pulmones puede llevar a la bacteria a otras partes del pulmón y permitir su diseminación mediante la tos. Además, el daño producido a los pulmones y a los vasos sanguíneos que irrigan su tejido permite que la bacteria pueda diseminarse por vía hematológica a otros órganos, produciendo infecciones extrapulmonares (Tierney y Nardell, 2018).

El tratamiento actual para casos de tuberculosis sensible a antituberculosos es un régimen de 6 meses de cuatro drogas de primera línea: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. Con una tasa de éxito mayor a 85% (WHO, 2017). El tratamiento de tuberculosis resistente a isoniazida y rifampicina (tuberculosis multidrogo resistente) requiere esquemas de tratamiento de 20 meses, con medicamentos más tóxicos (WHO, 2010).

1.3 Vesículas membranales.

En 1963 se describieron cuerpos multivesiculares en el interior de células endoteliales y de músculo esquelético (Fuchs, 1963). En 1981 se descubrió que células en cultivo liberaban vesículas membranales de 500 a 1000 nm acompañadas a veces por vesículas de 40 nm, el conjunto total de microvesículas tenían actividad enzimática y se propuso el término “exosomas” (Trams y col, 1981).

Estas vesículas membranales se forman en el interior de las células en cuerpos multivesiculares. La fusión de la membrana del cuerpo multivesicular con la membrana celular produce la liberación de los exosomas (figura 2). Su tamaño se encuentra entre 30 y 120 nm (Ekeny col, 2010; Théry, 2011; Colombo y col, 2012).

En 1991, se describió la liberación de vesículas membranales a partir de la membrana celular de neutrófilos humanos como defensa al tratamiento con concentraciones subletales de complemento y propusieron el término *ectocitosis*, para diferenciarlo de la exocitosis (Stein y Luzio, 1991). Durante la ectocitosis, la fosfatidilserina (PS) que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana celular, se expone en la cara

externa, produciendo después una partícula gemante que mantendrá esta disposición exterior de este fosfolípido en su membrana (Sadallah y col, 2011a), mientras que en la exocitosis, las vesículas formadas se producen por la fusión de compartimentos en el interior de la célula, obteniendo de esa manera su membrana. El tamaño de los ectosomas oscila entre los 50 nm y 1000nm (Colombo y col, 2012). Sin embargo, este tipo de vesículas reciben varios nombres: ectosomas, micropartículas y microvesículas (Gasser y col, 2003; González Cano y col, 2010; Ramachandra y col, 2010; Sadallah y col, 2011b; Colombo y col 2012, Koliha y col, 2016). Además se distinguen unas de otras exclusivamente por su mecanismo de liberación, -ambas se producen tanto en células en reposo (Trams y col, 1981; Sadalla y col, 2011b) como en células estimuladas (Gasser y col, 2003; Liu y col, 2007; González Cano y col, 2010; Li y col, 2010). Debido a que en los trabajos consultados no se hace referencia al origen celular de las vesículas sino únicamente a su tamaño y a que no existen técnicas para separar unos de otros, los términos exosomas y microvesículas son empleados indistintamente (Ramachandra y col, 2010; Sadallah y col, 2011b).

Los eritrocitos y plaquetas guardados en refrigeración liberan espontáneamente ectosomas (Eken, 2010, Sadallah y col, 2011b); en monocitos algunos estímulos que favorecen la liberación de microvesículas son: el enriquecimiento con colesterol (Liu y col, 2007), la estimulación con lipopolisacárido (LPS) (Satta y col, 1994) y el extracto de humo de cigarro (Li y col, 2010); en neutrófilos, la estimulación con PMA, f-MLP ó ionomicina induce la liberación de ectosomas (Gasser y col 2003), también se liberan mediante la

infección con *M. tuberculosis*, *Escherichiacoli*, *Staphylococcus aureus* y *Leishmania mexicana*(González-Cano y col, 2010).

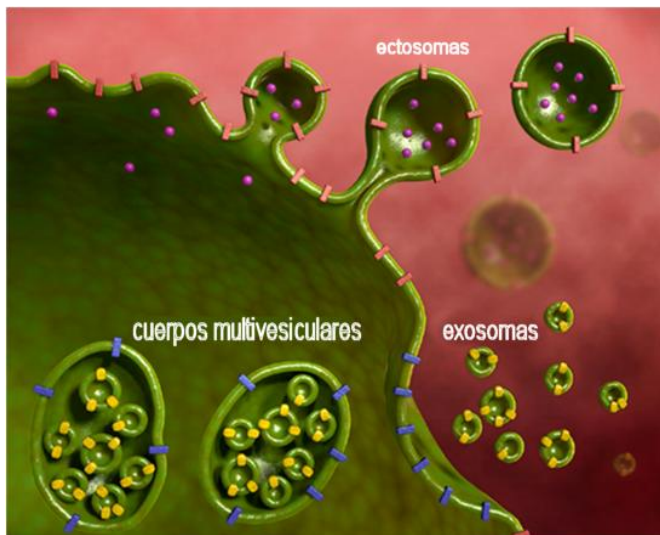


Figura 2. Las microvesículas son de diferente origen subcelular. Los ectosomas (arriba) se forman a partir de la membrana celular, contienen proteínas transmembranales, proteínas solubles y metabolitos presentes en el citoplasma, son grandes y de tamaño heterogéneo. Los exosomas(abajo) se producen en cuerpos multivesiculares que controlan su composición membranar y contenido., son pequeños y de tamaño homogéneo (tomado de Colombo y col, 2012)

1.3.1. Microvesículas y tuberculosis

Los macrófagos liberan constitutivamente microvesículas en un proceso dependiente de calcio. Al infectar macrófagos de médula ósea con *M. bovis* BCG, no se aumenta el número de microvesículas liberadas, pero sí se altera su composición química, ya que aparte de incluir antígenos micobacterianos, tienen mayor cantidad de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC clase II) (Beatty y col, 2000). Algunos linfocitos T sensibilizados a *M. bovis*BCG pueden ser activados por exosomas obtenidos por la infección con esta micobacteria, pero, en presencia de células presentadoras de antígeno (CPA's),el número de linfocitos activados es mayor, lo que indica que pueden presentar antígeno, pero que principalmente lo transportan para que otras células lo

presenten. Al administrar estos exosomas por vía intranasal en ratones *naïve* inducen respuestas de memoria de linfocitos T cooperadores (CD4) y citotóxicos (CD8) sin necesidad de adyuvante (Giri y Schorey, 2008; Giri y col, 2010). Los exosomas liberados por macrófagos infectados con *M. tuberculosis* expresan en su superficie moléculas de coestimulación como CD86 además de moléculas MHC clase II (Ramachandra y col 2010)

Se ha hecho el análisis proteómico de las microvesículas liberadas tras la infección de macrófagos con *M. tuberculosis* H37Rv y se ha observado que contienen proteínas que la micobacteria secreta, como: el complejo del antígeno 85 (Ag85), el blanco antigénico secretado tempranamente de 6 kDa (ESAT-6), la lipoproteína de 19KDa, la glutamina sintetasa A (GlnA) y la superóxido dismutasa A (SodA). Estos antígenos no parecen incorporarse a las microvesículas por medio de procesos de degradación de la micobacteria al ser fagocitada, sino que sólo se incorporan a las microvesículas si han sido secretados, por lo que los macrófagos infectados o expuestos al sobrenadante de un cultivo de micobacterias liberarán exosomas con antígenos micobacterianos, no así si la micobacteria está muerta. Estos exosomas con los antígenos micobacterianos pueden estimular la producción de TNF- α , CCL5, MCP-5, MIP-1 α , MIP-1 β y G-CSF e iNOS en macrófagos y de IL-12 en células dendríticas. La activación producida por las microvesículas depende de TLR2, TLR4 y MyD88 (Bhatnagar y col, 2007, Giri y col, 2008, Singh y col, 2012). Las microvesículas liberadas de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* pueden presentar antígeno a linfocitos T *in vivo*. Esta presentación de antígeno requiere que los antígenos micobacterianos como HspX sean incorporados al

exosoma mediante Rab27 en la célula hospedera aunque no todos los antígenos micobacterianos son incorporados al exosoma por esta vía (Smith, y col, 2017).

Las microvesículas también tienen efecto sobre la expresión de moléculas de superficie. Macrófagos derivados de médula ósea sobreexpresan CD64 (FcγRI) y moléculas de MHC de clase II cuando son estimulados con IFN-γ por 18 horas. Si estos macrófagos son estimulados únicamente con microvesículas liberadas por macrófagos de la línea celular RAW264.7 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, también sobreexpresan estas moléculas, pero en menor cantidad. Y si a los macrófagos de médula ósea estimulados con estas microvesículas se les estimula posteriormente con IFN- γ, la sobreexpresión de CD64 y MHC-II no alcanza los niveles de expresión que se lograban con el estímulo único de IFN-γ (Singh y col, 2011).

Macrófagos tratados *in vitro* con exosomas liberados de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* pueden reclutar células *in vivo* en el mismo número que lo harían tras una infección con *M. bovis* BCG (Singh y col, 2012).

1.3.3 Usos terapéuticos de las microvesículas.

Se ha estudiado el uso de microvesículas como tratamiento en enfermedades no infecciosas. Microvesículas liberadas por células tallo mesenquimales se ha probado que reducen la inflamación y neurogénesis anormal en el hipocampo de ratones en un modelo murino de *status epilepticus* si son administrados vía intranasal 2 veces (en dosis de 15 μg) en un intervalo de 24 horas después del ataque epiléptico. Esta vía de administración permite la llegada de las microvesículas al hipocampo 6 horas después de la administración (Long y col 2017). En un modelo murino de displasia broncopulmonar,

pueden recuperar la función pulmonar si son administrados vía intranasal (Willis y col, 2018). También se han podido modificar microvesículas con proteínas de fusión para dirigirlas a cerebro, un órgano al que muchos fármacos no pueden llegar porque no pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Microvesículas liberadas por células dendríticas que expresan una proteína de fusión Lamp2b-glicoproteína del Virus de la rabia pueden atravesar esta barrera y se han empleado para transportar siRNA y apagar la expresión del gen del precursor del beta-amiloide, la molécula principal que produce la enfermedad de Alzheimer (Alvarez-Erviti, y col., 2011).

No solo las células eucariontes liberan microvesículas, las especies de *Mycobacterium* también liberan microvesículas cuando se encuentran creciendo en escasez de nutrientes. Estas microvesículas contienen ligandos de TLR2 y se han probado como vacunas, pero su efecto depende de la vía de administración. En 2011, Prados-Rosales y colaboradores administraron 25 µg de microvesículas liberadas por *M. bovis* BCG por vía intranasal a ratones hembras C57BL/6, y retaron con *M. tuberculosis* H37Rv vía intranasal 15 días después. Estas microvesículas incrementaron el número de granulomas y la carga bacteriana. En 2014, el mismo grupo de investigación administró 2.5 µg de vesículas liberadas por *M. tuberculosis* por vía subcutánea a ratones hembra C57BL/6, dando un refuerzo tres semanas después y retando con *M. tuberculosis* tres semanas después de esta inmunización. Este esquema de inmunización redujo la carga bacteriana y el porcentaje de lesión en el pulmón. Este esquema también indujo la producción de anticuerpos de clase IgG contra lisado total de la micobacteria y contra lipoproteínas de la misma.

Para evaluar el potencial de las microvesículas liberadas por los macrófagos de la línea celular J774A.1, en este trabajo se empleó un modelo murino de tuberculosis que consiste en inocular 2.5×10^5 UFC de *M. tuberculosis* por vía intratraqueal a ratones BALB/c (Baay-Guzmán y col, 2018). Este modelo ya se ha empleado para el análisis de moléculas del hospedero durante la enfermedad, como el factor inducible por hipoxia 1α (Baay-Guzmán y col, 2018); el estudio de factores de la micobacteria en el desarrollo de la enfermedad, como los factores sigma SigE y SigB (Pisu y col, 2017) y el ensayo de nuevos agentes terapéuticos, como el 2-metoxiestradiol (Baay-Guzmán y col, 2018), la inmunoglobulina administrada por vía intravenosa (Olivares y col, 2017); así como candidatos a vacuna, como los proteliposomas obtenidos de *Mycobacterium smegmatis* usando alúmina como adyuvante (Tirado y col. 2016).

2. Planteamiento del problema

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa principalmente pulmonar. La micobacteria al llegar a los pulmones es fagocitada por los macrófagos, que pueden liberar microvesículas que contienen antígenos micobacterianos, moléculas MHC clase II, CD86, moléculas de adhesión como ICAM-1 y enzimas de señalización como GTPasas Rab, y se ha observado que pueden presentar antígenos aunque podrían tener otro papel en el curso de la enfermedad. Hasta el momento únicamente se ha evaluado el uso de microvesículas como vacunas contra tuberculosis, mostrando resultados alentadores cuando son administrados por vía sistémica. Aunque se han observado efectos de las microvesículas liberadas por macrófagos en la liberación de citocinas y por su capacidad de presentar

antígeno podrían desencadenar una respuesta inmune adaptativa favorable al hospedero, su potencial efecto como agente terapéutico en la infección con *M. tuberculosis* no se ha evaluado, lo cual se planteó en esta tesis.

3. Hipótesis

La inoculación de microvesículas derivadas de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv mejorará el curso de la enfermedad de ratones infectados experimentalmente con *M. tuberculosis* H37Rv.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la protección conferida por la inoculación de ratones BALB/c con microvesículas derivadas de la infección de células de la línea J774A.1 con *M. tuberculosis* H37Rv.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener y purificar microvesículas liberadas por macrófagos de la línea celular J774A.1 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.
- Caracterizar las microvesículas derivadas de macrófagos de la línea celular J774A.1 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv por tamaño y contenido de lípidos y proteínas.
- Evaluar la acción de las microvesículas derivadas de macrófagos de la línea celular J774A.1 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv en células J774A.1 infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv.
- Evaluar la respuesta terapéutica de las microvesículas derivadas de macrófagos de la línea celular J774A.1 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv en un modelo de infección con *M. tuberculosis* H37Rv en ratones BALB/c.

5. Materiales y métodos

5.1 Obtención de microvesículas de macrófagos infectados con micobacterias

Para reducir el número de exosomas presentes en el suero fetal bovino, para este trabajo se empleó medio de cultivo con suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, EUA) ultracentrifugado, que se prepara ultracentrifugando 12.5 mL a 160,000 xg en una ultracentrífuga Beckman Optima XL-90 (Beckman Coulter, Brea, EUA) con rotor SW40Ti (Beckman Coulter) durante tres horas y desechando 3 mL de sedimento.

Se empleó la línea celular J774A.1 (ATCC, Manassas, EUA) y se hizo crecer en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de SFB sin ultracentrifugar (Gibco) a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia cercana al 100%. Al alcanzar la confluencia se cambió el medio de cultivo a DMEM con 2.5% de SFB ultracentrifugado y para obtener las microvesículas liberadas tras infectar las células con *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC) se probó infectar las células con *M. tuberculosis* H37Rv empleando las MOI de 10:1 y 1:1, continuando la incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 4, 24 y 48 horas para la liberación de microvesículas.

Las microvesículas en el medio de cultivo se recuperaron mediante una serie de centrifugaciones. El medio de cultivo se centrifugó a 2,000 (xg). Se colectó el sobrenadante, se centrifugó a 10,000 xg durante 30 minutos y se colectó nuevamente el sobrenadante, que se centrifugó a 160,000 xg durante 90 minutos. Se colectaron 1,500 μ L del sedimento y se purificaron las microvesículas mediante cromatografía por exclusión de

tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) en una columna de 35mL de Sepharosa4B (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) montada en una jeringa de 60mL (BD Plastipak, Cuautitlán Izcali, México), eluyendo con solución salina (SS) inyectable (PISA, Guadalajara, México) y colectando fracciones de 1000 μ L. Como control se colectaron microvesículas de macrófagos J774A.1 sin infectar (MV-Espont). En los experimentos posteriores se utilizaron las siguientes condiciones de obtención de vesículas: A partir de 10^7 macrófagos J774A.1 en botellas de cultivo de 150cm²(Corning, Corning, EUA) con 12.5mL de DMEM adicionado con 333 μ L de SFB ultracentrifugado para alcanzar una concentración de 2.5%, MOI de 10 de *M. tuberculosis* H37Rv, 4 horas de infección y 5% de CO₂. Para los experimentos de composición proteica se obtuvieron microvesículas liberadas por macrófagos infectados con *Mycobacterium fortuitum* (MV-fort), conservando las mismas condiciones de cultivo. Para otros experimentos también se obtuvieron las microvesículas remanentes en SFB ultracentrifugado, ultracentrifugando y purificando por SEC la misma cantidad de SFB ultracentrifugado que se usó en los cultivos celulares.

5.2 Caracterización de las microvesículas

5.2.1 Selección de las fracciones a analizar.

Se determinó la concentración de proteína mediante la lectura de absorbancia a 230 nm (Goldfarb y col, 1951) en un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, EUA). Se eligieron para trabajar las fracciones con componentes de mayor tamaño. En otros experimentos se determinó la concentración de proteínas con la técnica del ácido bicinconínico (Thermo Scientific Pierce, Rockford, EUA), brevemente, se prepara el reactivo mezclando 25 partes del reactivo A (bicarbonato, carbonato y tartrato de

sodio), 24 partes del reactivo B (ácido bicinconínico al 4%) y una parte de reactivo C (sulfato de cobre pentahidratado al 4%), La determinación se llevó a cabo en placas de 96 pozos, adicionando 50 μ L de reactivo de ácido bicinconínico y 50 μ L de muestra. Se incubó la placa a 37 °C durante 3 horas, y leyendo la absorbancia de las muestras a 570 nm en un lector de ELISA Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA).

5.2.2 Citometría de flujo

Se caracterizaron las vesículas por citometría de flujo por la presencia de Rab 7 y de fosfatidilserina en su superficie. Para esto se tomaron las fracciones eluidas con mayor probabilidad de tener exosomas (las primeras fracciones con un cambio en la absorbancia a 230nm) y se ajustaron a una concentración de proteínas de 2.5 μ g/mL. Se tomaron alícuotas de 1mL y se añadieron 55 ng de anticuerpo de conejo anti-Rab7 (Abcam, Cambridge, EUA) y 7.5 μ g de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con FITC (Thermo, Rockford, EUA), se dejaron actuar toda la noche a 4°C. La fosfatidilserina se evidenció mediante su unión a Anexina V marcada con aloficocianina (APC) (Biolegend, San Diego, EUA), añadiéndose la Anexina V-APC a una concentración final de 0.04 ng/mL y 200 μ L de regulador de unión (Biolegend). A todas las alícuotas se les añadió el regulador de unión aunque no llevaran la Anexina V para que la única variable entre las determinaciones de citometría fuera la molécula marcada con el fluorocromo. El exceso de anticuerpo y de Anexina V se eliminó ultracentrifugando las muestras a 160,000 xg durante 90 minutos en una ultracentrífuga Optima TLX (Beckman Coulter) con rotor TLS55 (Beckman Coulter) La lectura se realizó a los 10 minutos de la reacción de la Anexina V. El análisis se hizo en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences, San José, EUA), que fue

lavado con 1 litro de hipoclorito de sodio al 0.5% filtrado con membrana de 0.45 μm y enjuagado con 5 litros de agua destilada filtrados con membrana de 0.45 μm , antes de su uso para reducir la cantidad de señal inespecífica. Las muestras se leyeron en escala logarítmica tanto en FSC, SSC y en el canal FL4. Se adquirieron 10,000 eventos de una región marcada en la figura 3. El análisis se realizó con el software Summit 4.3 (Dako Colorado, Inc, Fort Collins, EUA).

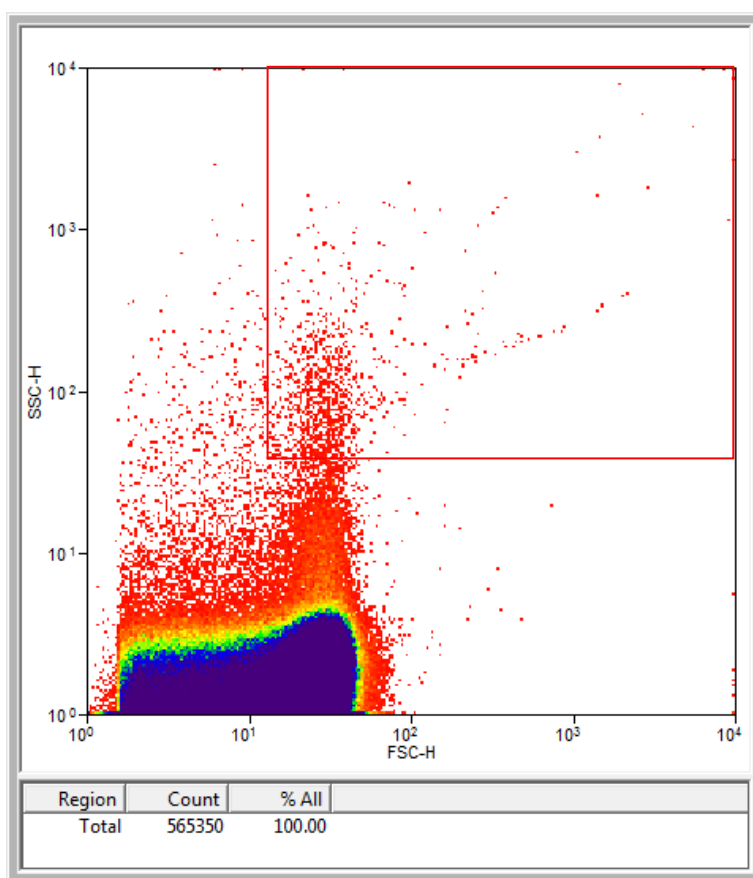


Figura 3. Región a partir de la cual se contaron los eventos para el análisis de citometría de flujo. En rojo se marca la región a partir de la cual se obtuvieron 10,000 eventos.

Se probó además bloquear la fosfatidilserina de las microvesículas con Anexina V. Para ello, a una alícuota de microvesículas colocadas en 200 μL de regulador de unión se le agregó Anexina V (BD Pharmingen, Franklin Lakes, EUA) a una concentración final de 0.04

$\mu\text{g}/\text{mL}$, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. A esta misma muestra se le añadió 1 μL de Anexina V marcada con APC 10 minutos después de hacer añadido el regulador de unión.

5.2.3 Microscopía electrónica

La morfología de las microvesículas se determinó mediante microscopía electrónica y criomicroscopía electrónica. Las microvesículas se mantuvieron en refrigeración 12 horas, tras las cuales se aplicaron 10 μL de muestra sobre mallas de cobre cubiertas de polivinil formal (Agar Scientific, Stansted, Reino Unido) y se dejaron reposar un minuto. Se eliminó el exceso de líquido con papel absorbente en el canto de la membrana y se añadieron 10 μL de ácido fosfotúngstico al 1% (Electron Microscopy Sciences, Hartfield, EUA) dejándolo actuar durante 30 segundos y retirando el exceso con papel absorbente. Se observaron las microvesículas en un microscopio de transmisión de electrones JEM-1010 (Jeol, Peabody, EUA) a 60 kV.

La criomicroscopía electrónica se llevó a cabo en el microscopio ambiental JEM-2100 (Jeol) del Centro de Nanociencias, Micro y Nano Tecnologías del IPN. Para ello se depositaron 10 μL de muestra se depositaron en una membrana de fibra de carbono y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido. Una vez congelada la muestra se procedió a la observación a 80 kV.

5.2.4 Análisis de rastreo de nanopartículas

Para determinar la distribución de tamaño y concentración de exosomas se empleó el Nanosigth NS300 (Malvern, Worcestershire, UK) utilizando el láser azul (488nm), tomando el promedio de tres lecturas de un minuto.

5.2.5 Extracción de lípidos y cromatografía en capa fina

Los lípidos de las microvesículas se extrajeron a partir de la fracción inferior del tubo tras la ultracentrifugación sin haber sido eluido en columnas de Sepharose 4B (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) mediante el método de Folch (Folch y col, 1957). Se añadieron 3mL de una mezcla 2:1 de metanol-cloroformo por cada 4.5mL de vesículas, se agitaron en el vórtex y se centrifugó la mezcla a 2000 *xg* durante 15 minutos para eliminar la fracción acuosa retirando lo más posible de esta fracción y colectando la fracción orgánica, que se dejó evaporar para concentrar los lípidos. Ya seca la muestra se analizó inmediatamente mediante cromatografía en capa fina (TLC). En algunos experimentos se guardaron las vesículas en congelación hasta su uso.

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas TLC Silica gel 60 F254 (Merk, Darmstadt, Alemania). Se añadieron 20 μ L de cloroformo a las muestras secas y se aplicaron cuidadosamente con un capilar sobre la capa de sílica en repetidas ocasiones, dejando evaporar todo el disolvente entre cada carga. Se usó como fase móvil una mezcla de cloroformo (Tecsiquim, Toluca, México)-metanol (Tecsiquim, D.F., México)-ácido acético (Merck, Naucalpan de Juárez, México)-agua (Pisa) 65:25:8:4, que se preparó al momento de usar y se dejó eluir hasta que el frente de corrimiento se encontró a un centímetro del borde de la placa. Se dejó secar la placa durante 2 horas para eliminar el

ácido acético. Los lípidos con grupos amino libres se evidenciaron rociando las placas con ninhidrina al 1% en etanol con un aspersor e incubando 10 minutos a 37 °C. Estas placas así reveladas se sumergieron un instante en ácido sulfúrico (J.T. Baker, Xalostoc, México) al 5% en etanol e inmediatamente se dejaron secar. Posteriormente se flameó la parte posterior de las placas para revelar toda la materia orgánica en la muestra.

Se tomaron fotografías de las placas de TLC después de ambos revelados y se analizaron con el programa ImageJ 1.50i (*National Institutes of Health, USA*) según instrucciones para el análisis de “dot blots” contando el número de pixeles de fosfatidilserina (revelado con ninhidrina) en las muestras en al menos 4 fotografías en cada repetición. Debido a la dificultad de adicionar una cantidad equivalente de lípidos para cada tipo de vesícula, se compararon los pixeles de materia orgánica (revelado con ácido sulfúrico) de cada uno de los tipos de vesícula, obteniéndose la relación de pixeles Espontáneas/H37Rv como control de carga de muestra y normalizando el número de pixeles de fosfatidilserina respecto a esta relación.

5.2.6 Electroforesis de proteínas de exosomas y Western blot

Se extrajeron los lípidos de las microvesículas mediante la técnica de Folch (Folch y col, 1957) tras ser eluidos en una columna de Sepharose 4B. En el proceso de obtención de lípidos se colectó la interfase con material precipitado y se hizo correr este precipitado en una electroforesis en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% de 1.5 mm de espesor según la formulación de la tabla 1.

Tabla 1: Formulación de geles de poliacrilamida al 12%

Gel de resolución (15 mL)		Concentración final
Agua destilada	5.9 mL	
Mezcla de acrilamida bis-acrilamida 30%:0.8% (Biorad, Hercules, EUA)	5 mL	10%
Tris 1.5M pH 6.8 (Biorad, EUA)	3.8 mL	380 mM
SDS 10% (Amersham biosciences, Uppsala, Suecia)	0.15 mL	0.1 %
APS 10%(USB Corporation, Cleveland, EUA)	0.15 mL	0.1%
TEMED(Research Organics, Cleveland, EUA)	0.006 mL	0.04%
Gel concentrador (4 mL)		Concentración final
Agua destilada	2.7 mL	
Mezcla de acrilamida bis-acrilamida 30%:0.8%	0.67 mL	5%
Tris 1.5M pH 8.8	0.5 mL	187 mM
SDS 10%	0.04 mL	0.1%
APS 10%	0.04 mL	0.1%
TEMED	0.004 mL	0.1%

El material precipitado se disolvió en 45µL de dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 10% ,5 µL de ditioneitol (DTT) 1M y se hirvió durante un minuto. Se empleó Tris (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA)-glicina (Sigma-Aldrich)-SDS (Amersham Biosciences) en una relación 3% - 14% - 1% como amortiguador de corrimiento y se hizo correr la electroforesis a 30mA durante hora y media. Las proteínas se revelaron con tinción con plata (GE Healthcare) como se describe a continuación:

Se fijaron los geles toda la noche en una solución que contiene 75 mL de etanol, 25 mL de ácido acético glacial y 250 mL de agua desionizada. Se decantó con cuidado esta solución y se añadió solución para sensibilizar, que contiene 75 mL de etanol, 10 mL de tiosulfato de sodio al 5% p/v, 17 g de acetato de sodio y 250 mL de agua. Inmediatamente después de añadir esta solución al gel, se añadieron 1.25 mL de glutaraldehído al 25% p/v y se dejó en agitación 2 horas. Se retiró esta solución y se lavó el gel 5 veces con agua desionizada

durante 15 minutos cada lavado, en agitación. Se añadió la solución de plata: 25 mL de nitrato de plata al 2.5% en 250 mL de agua desionizada. Se dejó en agitación 2 horas. Se decantó la solución y se hicieron 2 lavados de un minuto con agua desionizada. Se añadió la solución de revelado: 6.25 g de carbonato de sodio en 250 mL de agua. Inmediatamente antes de emplear esta solución se añadieron 200 μ L de formaldehído al 37% p/v y se esperó hasta la aparición de las bandas. Se desechó la solución y el revelado se detuvo con una solución de 3.65 g de EDTA disódico dihidratado en agua desionizada.

Se visualizaron proteínas de *M. tuberculosis* en las microvesículas por el método de *Western blot* mediante la transferencia de proteínas de los geles a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0.45 μ m (Amersham Biosciences) en un sistema sumergido a 0.8 mA/cm² durante 90 minutos e incubando la membrana con un suero inmune de conejo anti extracto soluble de *M. tuberculosis* H37Rv diluido 1:7,000 a 4 °C durante toda la noche. La membrana se reveló con anticuerpo de cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Life Biosciences, Carlsband, EUA) diluido 1:2,000 y usando peróxido de hidrógeno y diaminobencidina (Sigma-Aldrich) como revelador.

5.3 Efecto biológico de las microvesículas en modelos de infección.

5.3.1 Efecto *in vitro* de las microvesículas sobre una línea celular infectada con *M. tuberculosis*.

Se obtuvieron microvesículas de células J774A.1 en reposo o infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv como se ha descrito y se guardaron en refrigeración hasta su uso, en un tiempo no mayor a una semana de haber sido obtenidos.

Para evaluar el efecto de las microvesículas sobre los mecanismos bactericidas de la línea celular J774A.1 se hicieron crecer células de esta línea celular en placas de 24 pozos (Corning) hasta tener el pozo confluyente (aproximadamente 120,000 células/pozo). Al alcanzar la confluencia las células se lavaron tres veces con solución salina balanceada de Hanks y se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv una MOI de 10 en un volumen de 1mL de medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino, incubando a 37 °C y 5% de CO₂. Tras tres horas de infección, las células se lavaron tres veces con solución de Hanks (Gibco, Gaithersburg, EUA) y se adicionó DMEM con 10% de SFB y 10µg/mL de amikacina (Bruluart, Tultitlán, México). Se dejó actuar la amikacina durante una hora incubando a 37 °C y 5% de CO₂. Las células se volvieron a lavar tres veces con solución de Hanks y se adicionó medio DMEM adicionado con 7% de SFB ultracentrifugado al que se le adicionaron 2.5µg de algún tipo de las microvesículas obtenidas o solución salina hasta igualar el volumen de todos los pozos.

Además del tipo de vesícula en el medio de cultivo, se analizó como otra variable el bloqueo de la fosfatidilserina en la superficie de las microvesículas con Anexina V. Para esta variable, al medio de cultivo con microvesículas se le añadió 1 µL de Anexina V sin marca y 200 µL de regulador de unión de Anexina V por cada 2.5 µg de microvesículas que se fueran a emplear 30 minutos antes de añadirlas a las células. Se añadieron también 200 µL de regulador de unión de Anexina V a los pozos a los que no se les adicionó Anexina V. Este bloqueo ya se había demostrado por medio de citometría de flujo. Se emplearon 4 pozos por condición. Se dejó en incubación durante 24 o 48 horas y se lavaron los pozos nuevamente tres veces con solución de Hanks. Se lisaron las células con 500µL de Tritón X-

100 (Sigma-Aldrich) al 0.1%. Se dejó actuar durante siete minutos y se neutralizó con 500 μL de albúmina (Gibco) al 5%. Se hicieron diluciones decimales en un volumen de 1 mL hasta la dilución 10^{-3} y se sembraron 20 μL de estas diluciones en agar Middlebrook 7H10 (7H10) (Beckton Dickinson, Sparks, EUA) con suplemento OADC (Oleico, Albúmina, Dextrosa, Catalasa) (Becton Dickinson). Se incubaron las placas a 37°C y se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) a los 15 y 21 días.

5.3.3 Modelo experimental de tuberculosis pulmonar en ratón y tratamiento con exosomas.

Para evaluar la respuesta terapéutica de las microvesículas liberadas por macrófagos J774A.1, se empleó un modelo de tuberculosis murina (Silva-Sánchez y col, 2015). El modelo se desarrolló en el laboratorio de bioseguridad de nivel 3 del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. 8 ratones BALB/c (Jackson, Bar Harbor, EUA) machos por grupo, de 8 semanas de edad fueron infectados con 2.5×10^5 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv por vía intratraqueal. Al cabo de 60 días de infección se comenzó con la administración de 2.3 μg de microvesículas en 100 μL de SS inyectable por vía intraperitoneal tres veces por semana. Transcurridas 4 semanas de iniciado el tratamiento, se sacrificó a la mitad de los animales de cada grupo y la otra mitad se sacrificó a las ocho semanas. El pulmón izquierdo se perfundió y fijó en alcohol absoluto para hacer preparaciones histológicas y el pulmón derecho se introdujo en tubos para Fast-Prep (MP Biomedicals, Solon, EUA). Estos tubos se transportaron en nitrógeno líquido hasta el laboratorio en donde se almacenaron a -80 °C hasta la determinación de UFC..

Los tubos con los pulmones para la determinación de las UFC se descongelaron a 4 °C y a cada tubo se le añadió una perla cerámica de zirconia de 4mm de diámetro (MP Biomedicals) y un mL de PBS-Tween80 al 0.05% estéril. Los tubos se sometieron a 3 ciclos de 20 segundos de agitación a alta velocidad, dejando transcurrir 3 minutos y manteniendo los tubos en hielo entre cada ciclo. En una placa de 96 pozos se hicieron diluciones decimales hasta la dilución 10^{-4} (30 μ L de tejido macerado o de una dilución previa en 270 μ L de caldo 7H9) y se sembraron 10 μ L de cada una de las diluciones en agar Middlebrook 7H10 con suplemento OADC. Las UFC se determinaron a los 14 días y se buscaron colonias que no hubieran sido percibidas en este tiempo una semana después.

Los pulmones para la preparación histológica se liberaron de tejido disperso y se prepararon para montar en parafina Paraplast (McCormick Scientific, Saint Louis, EUA) mediante una serie de inmersiones en solventes orgánicos (3 inmersiones de 45 minutos en alcohol absoluto (J.T. Baker), 3 inmersiones de 45 minutos en xilol (J.T. Baker) y una inmersión de 12 horas en parafina). Se realizaron cortes de 4 μ m y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E). Los cortes se montaron en portaobjetos y se observaron a 10x en un microscopio equipado con una cámara Leica (Leica Microsystems, Heerbrug, Suiza), con el cual se obtuvieron imágenes a aumento 10x hasta abarcar la totalidad del pulmón, a partir de las cuales se formó una imagen completa de cada pulmón y sobre la que se hicieron anotaciones con el programa *Leica Application Suite 4.2* (Leica Microsystems). Se trazó una línea de contorno del pulmón, para obtener el área total. Se delimitaron también los espacios vacíos: vasos sanguíneos grandes y bronquiolos, los cuales se sustrajeron del área total del pulmón pues sobre estas áreas no se pueden

observar manifestaciones de patología. Para el análisis se consideraron las áreas neumónicas: regiones del pulmón en las que la estructura de los alveolos se hubiera perdido. No se consideraron para el análisis las regiones con alveolitis, ni con infiltrado perivascular. Las áreas con necrosis no se consideraron debido a que eran escasas y no se encontraban presentes en más de un ratón de cada grupo de tratamiento. En la figura 4 se ejemplifican los tipos de áreas.

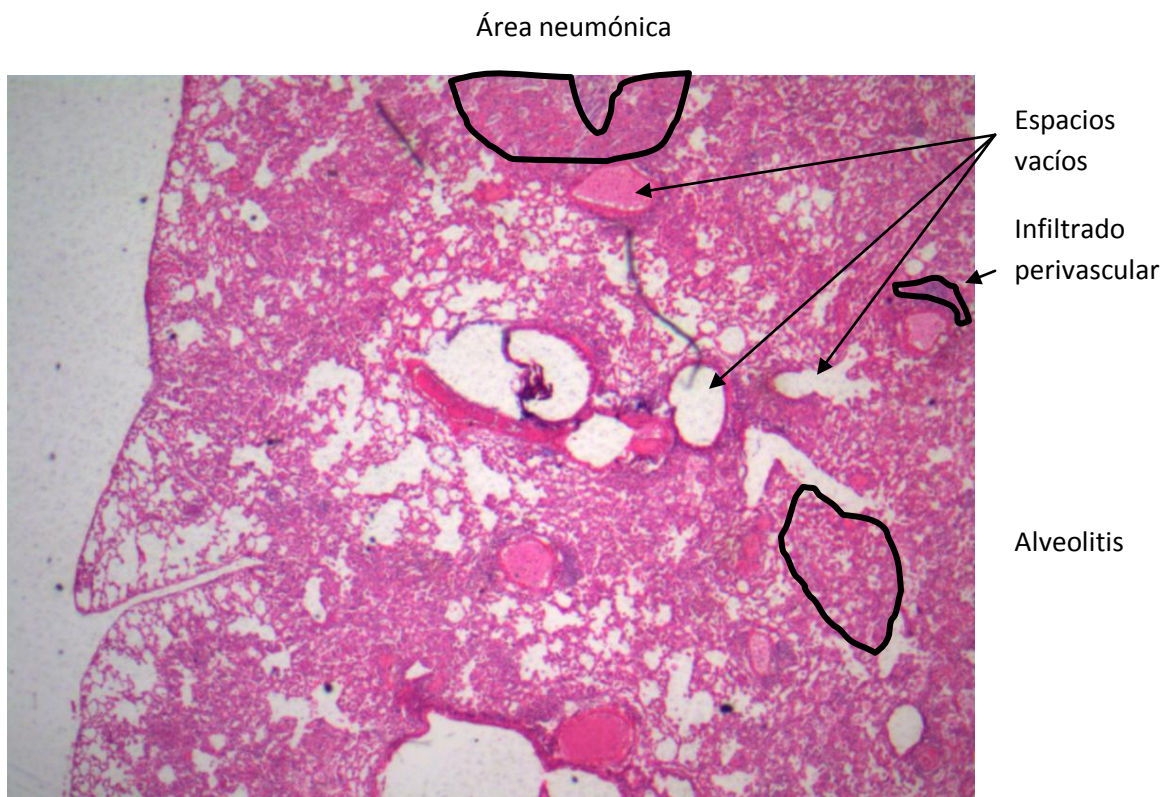


Figura 4. Tipos de áreas delimitados para el análisis histológico. Se tomaron fotografías de varios campos a un aumento de 10x para hacer una imagen total del pulmón. Se muestra una de estas imágenes y se indican los tipos de área analizadas.

5.4 Análisis estadístico.

Se hizo análisis de dos colas con una $\alpha = 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo con el programa SigmaPlot 12.2.0.45 (Sysat Software, Inc, San José, EUA)

6. Resultados

6.1 Determinación de las condiciones para la obtención de microvesículas.

Para determinar las condiciones para la obtención de microvesículas se hicieron crecer a confluencia macrófagos J774A.1 en pozos de una placa de 24 pozos. Se probaron las MOI 1:1 Y 10:1 a 4, 24 y 48 horas de incubación. Se utilizaron 3 pozos para cada condición y se colectaron 250µL de sedimento, que se hicieron pasar por una columna de 9mL de Sepharose 4B empleando solución salina como eluyente. Se colectaron fracciones de 260µL y se determinó la absorbancia a 230nm de cada fracción. Con este método se pudo observar un pico en la absorbancia entre las fracciones 21 y 25 (figura 5), que es más notorio cuando las microvesículas se obtienen a las 4 horas posteriores a una infección con MOI 10:1. En estas fracciones es donde con mayor probabilidad se encontrarían las microvesículas debido a que tendrían componentes de gran tamaño y con proteínas. A continuación del pico de microvesículas se observa un domo en el perfil, correspondiente a proteínas en las muestras y solutos más pequeños. En el caso de la MOI de 1 a las 48 horas se observa un pico pequeño en fracciones anteriores, que podría corresponder a vesículas aún más grandes, como cuerpos apoptóticos.

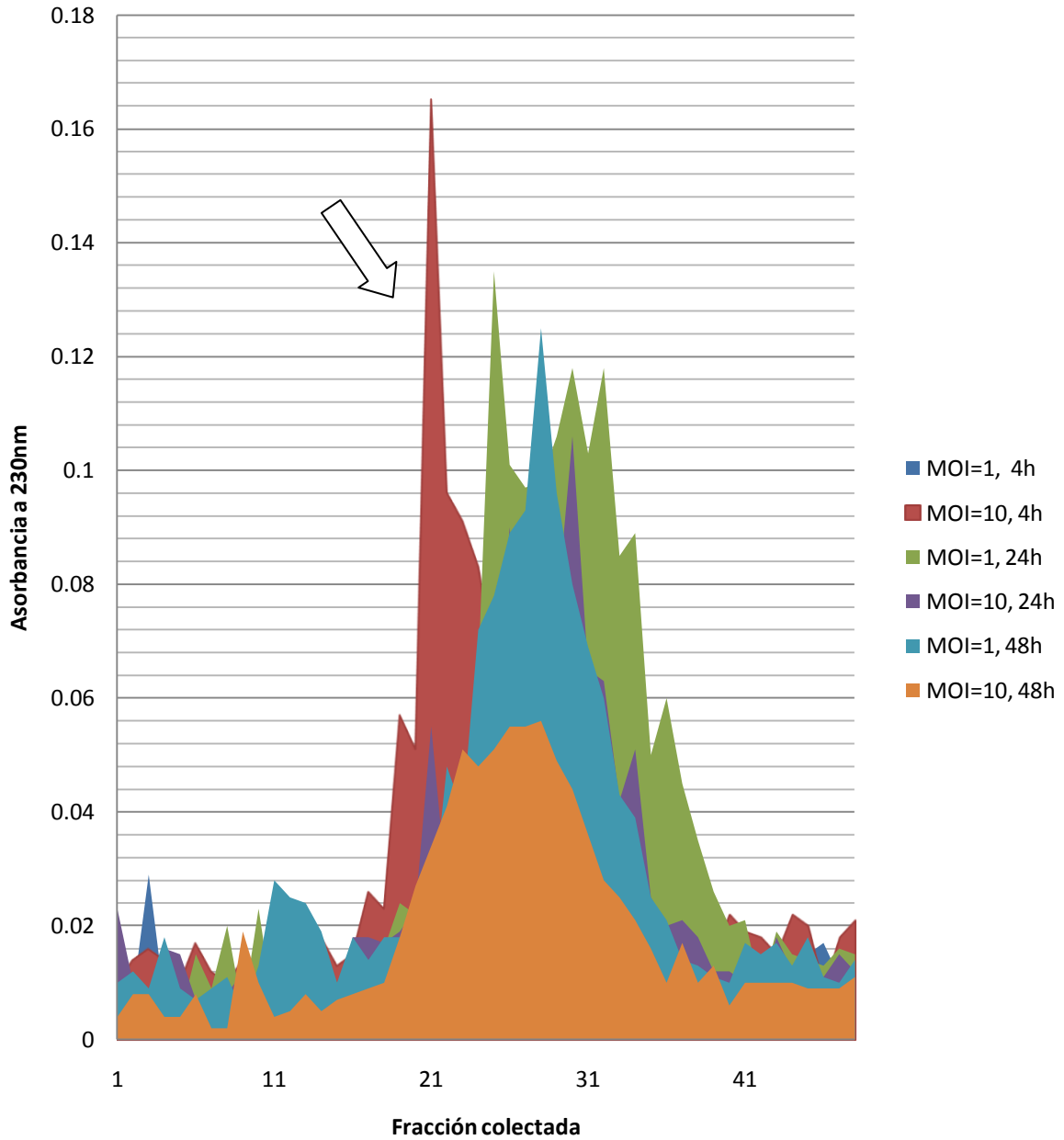


Figura 5. Determinación de las condiciones para obtención de microvesículas. En placas de 24 pozos se hicieron crecer macrófagos J774A.1 y se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv a las MOI y tiempo indicados. Se concentraron las microvesículas mediante ultracentrifugación, se colectaron 250µL de sedimento, se le hizo pasar a través de una columna de Sepharosa 4B de 9 mL y se colectaron fracciones de 260µL. Se determinó su absorbancia a 230nm. Flecha: fracciones con mayor probabilidad de tener microvesículas.

Se intentó reducir la cantidad de solutos en las muestras antes de separarlas mediante SEC ultracentrifugando una segunda vez a 100,000 xg , pero se perdían las microvesículas (figura 6).

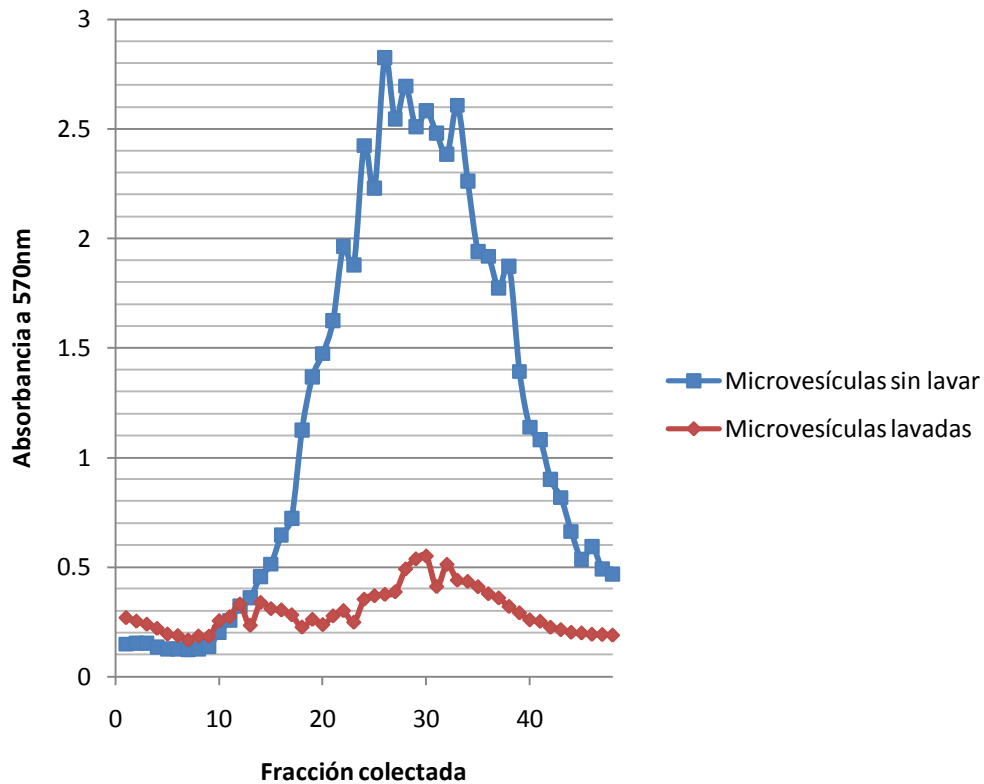


Figura 6. Las microvesículas se pierden si son ultracentrifugadas por segunda vez. Se obtuvieron microvesículas de macrófagos J774A.1 pero antes de ser separadas por SEC se dividió la muestra en dos alícuotas, una de las cuales se lavó mediante una segunda ultracentrifugación a 100,000 xg . Las proteínas presentes en cada fracción se evidenciaron con el método del ácido bicinónico, que se lee a 570nm.

6.2 Presencia de microvesículas en las fracciones con mayor absorbancia en la región de componentes de mayor tamaño

La presencia de microvesículas en las fracciones con mayor probabilidad de contenerlas se evidenció mediante citometría de flujo, microscopía electrónica de transmisión y criomicroscopía electrónica de transmisión. Por citometría de flujo se analizaron las

microvesículas exclusivamente por la presencia de sus marcadores Rab7 y fosfatidilserina por la imposibilidad de analizar por su tamaño y complejidad relativos ya que el ajuste en la detección de partículas tan pequeñas normalmente lleva a la detección simultánea de la divergencia del haz de láser, lo que se observa como ruido electrónico en los parámetros de tamaño y complejidad (FSC y SSC, respectivamente) aun únicamente del solvente. El uso de un control de SFB ultracentrifugado y teñido permitió distinguir regiones con probabilidad de ser exosomas. En la figura 7A se distinguieron al menos dos poblaciones distintas de exosomas en el análisis de tamaño y complejidad. Al analizar la presencia de fosfatidilserina y Rab7 en la superficie de estos exosomas se observan que estas poblaciones presentaron diferente expresión de estos marcadores. Una de las poblaciones en su mayoría tuvo únicamente fosfatidilserina en su superficie (figura 7B) y la otra población, tuvo ambos marcadores (figura 7C). No se esperaban vesículas con marca para Rab7 en las MV-SFB, lo que permitió establecer la región para buscar la marca en las MV-Espont y MV-H37Rv. Los eventos sin marcas no se pueden interpretar correctamente pues pueden formar parte del ruido electrónico. Esta observación se realizó dos veces, para confirmar las fracciones eluidas en las que se encontrarían las microvesículas, estas fracciones se comprobaron mediante microscopía electrónica.

Las microvesículas se observaron por microscopía electrónica de transmisión. Para conocer las estructuras que debían buscarse en las fracciones con mayor probabilidad de contener microvesículas, se observaron al microscopio electrónico muestras de vesículas antes de ser purificadas mediante la cromatografía por exclusión de tamaño. Se observó que las MV-Espont tienen formas y tamaños regulares, alrededor de 20 nm de diámetro.

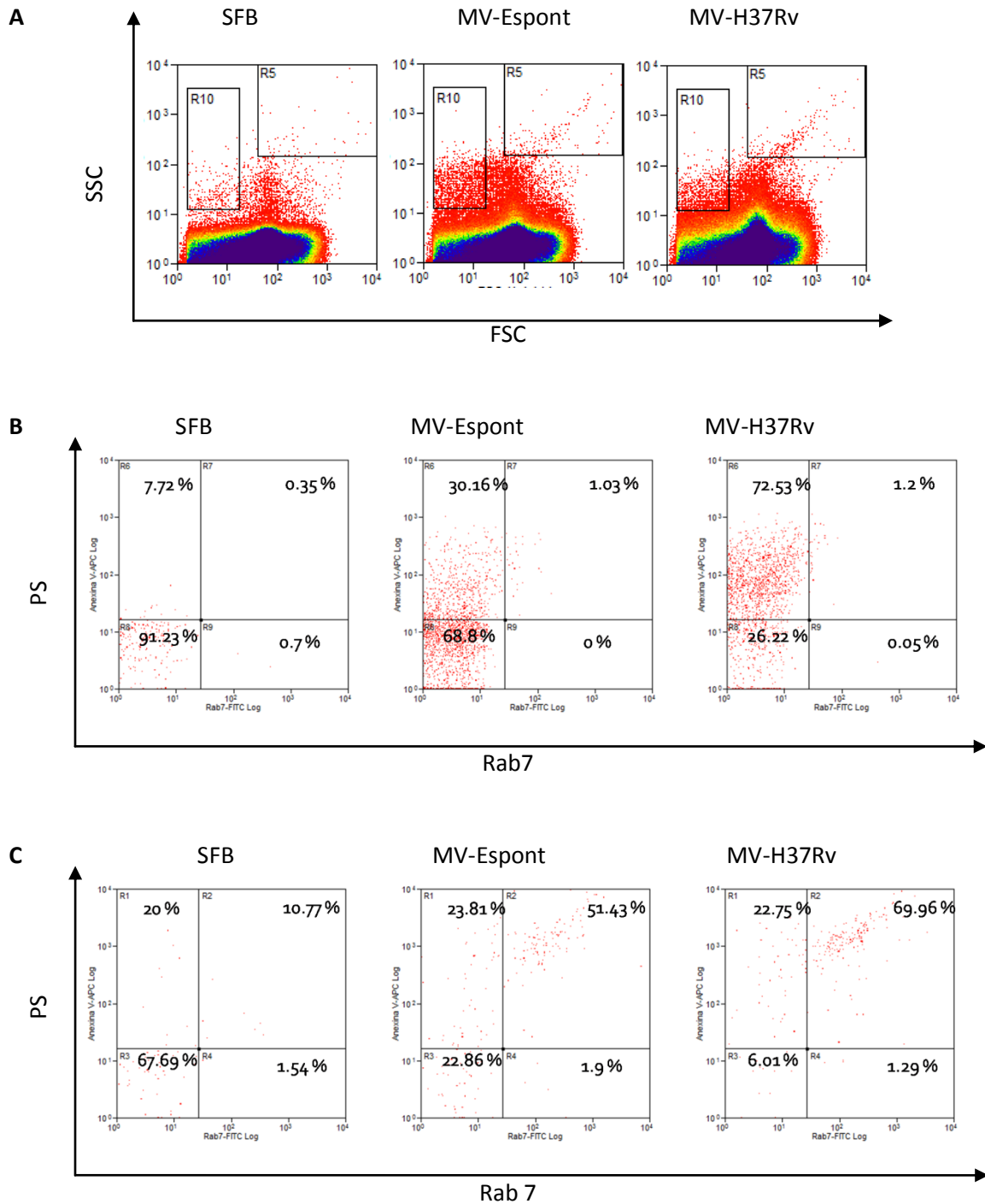


Figura 7. Existen poblaciones de microvesículas que se pueden distinguir por sus marcadores de superficie. Se analizaron exosomas purificados por SEC provenientes de (SFB) o liberados espontáneamente por los macrófagos J774A.1 (MV-Espont) o por una infección con H37Rv (MV-H37Rv). **A.** Análisis de tamaño y complejidad de las vesículas. Se buscaron los marcadores de superficie PS y Rab7 de las microvesículas en las regiones marcadas en A como R10 (**B**) y R5 (**C**).

Las MV-H37Rv tienen tamaños más irregulares pudiendo llegar hasta 100 nm de diámetro (figura 8).

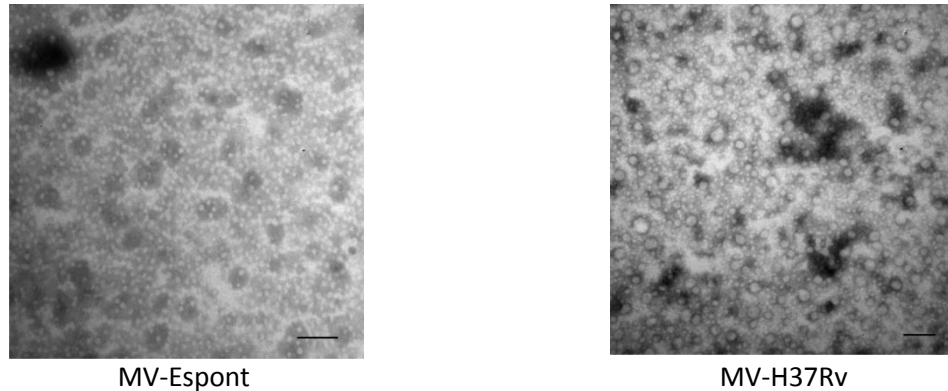


Figura 8. Las microvesículas tienen tamaños distintos según el estímulo con el que fueron inducidas. Se obtuvieron microvesículas liberadas espontáneamente por los macrófagos J774A.1 y liberadas después de la infección de los macrófagos con *M. tuberculosis* H37Rv y se observaron por microscopía electrónica antes de ser purificadas por cromatografía por exclusión de tamaño. Barra de tamaño: 100nm.

Para posteriores experimentos se purificaron las microvesículas mediante cromatografía por exclusión de tamaño. A partir del perfil de elución de las muestras de microvesículas, se observaron al microscopio electrónico: una fracción con mayor probabilidad de encontrar microvesículas, una fracción anterior, en donde no se tenía lectura de absorbancia a 230nm en la que no habría nada que observar y una fracción posterior con una lectura de absorbancia mayor, donde no deberían haber microvesículas sino únicamente componentes del medio de cultivo (figura 9). Para determinar el ancho de banda del perfil de elución en el que se encontraban las microvesículas se analizaron hasta 4 fracciones antes y 4 fracciones después del pico de la fracción de microvesículas, en las que todavía se observaba su presencia. Un análisis similar de la fracción de componentes de mediano tamaño no reveló la presencia de microvesículas. La SEC eliminó una gran proporción de proteínas en las muestras de microvesículas, evidenciadas por el área bajo

la curva en las fracciones posteriores a aquellas donde se observaron las microvesículas en el perfil de elución.

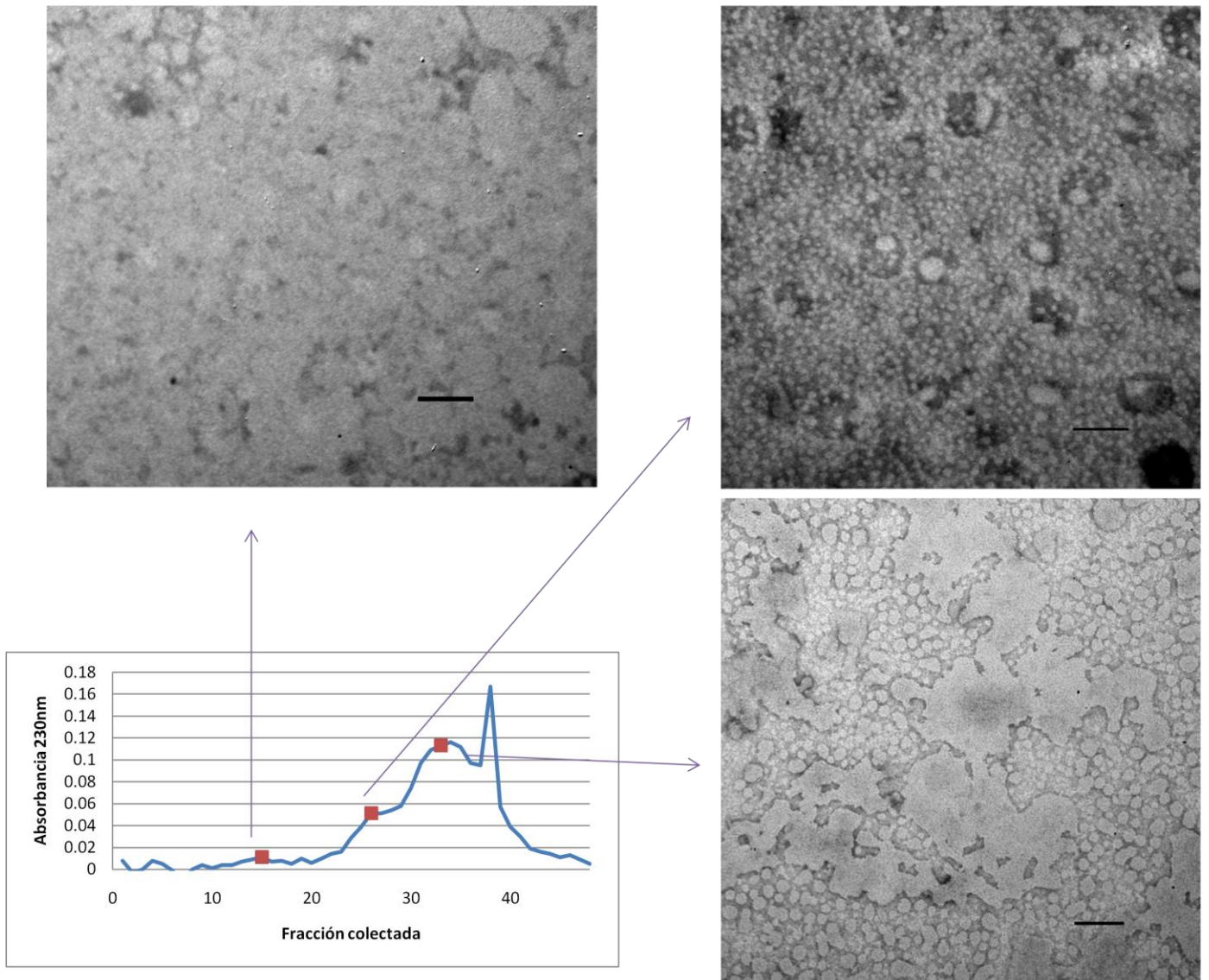


Figura 9. La cromatografía por exclusión de tamaño permite obtener exosomas con menos proteínas contaminantes. Se eluyeron 200 μ L del sedimento de la última ultracentrifugación por una columna de Sepharose 4B, se colectaron fracciones de 260 μ L y se determinó su absorbancia a 230nm. Se eligieron 3 fracciones y se observaron en microscopía electrónica de transmisión para buscar las estructuras vistas en la figura 8. Barras = 100 nm.

Una mejor imagen de la doble membrana, la forma esférica y el diámetro de las microvesículas se pudo obtener mediante crío-microscopía electrónica de transmisión, a partir de las fracciones donde ya se había demostrado la presencia de microvesículas. Se pudieron observar microvesículas agrupadas (figura 10).

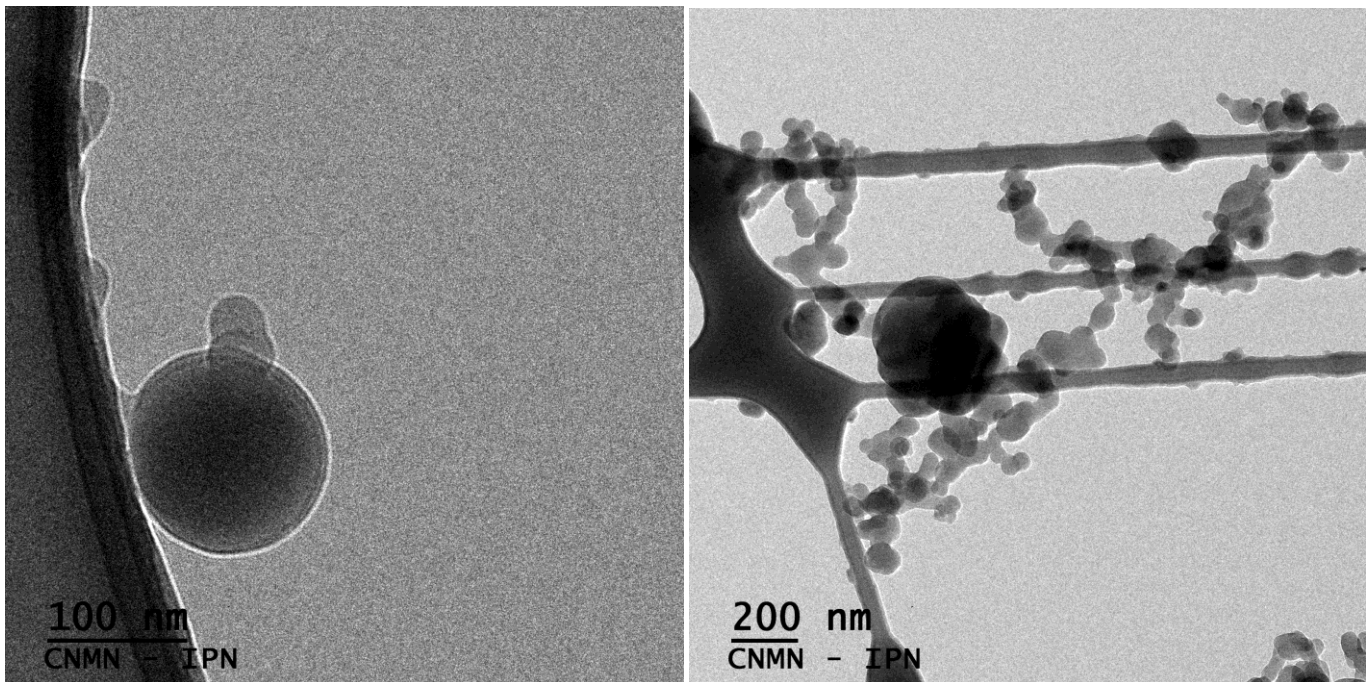


Figura 10. La cromatografía por exclusión de tamaño mantiene la estructura característica de las microvesículas. Se obtuvieron vesículas de células J774A.1 infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv y se purificaron en una columna de Sepharose 4B. Se montaron en la membrana de fibra de carbono y se congelaron en nitrógeno líquido para su observación. **A.** Observación de la doble membrana de un exosoma de aproximadamente 100 nm de diámetro. **B.** Observación de acúmulos de exosomas sobre la malla de fibra de carbono.

Una vez confirmada la presencia de microvesículas en las fracciones predichas, se evaluó la distribución de tamaños mediante rastreo de nanopartículas empleando el Nanosight. Aunque la mayoría de las microvesículas liberadas tanto por células infectadas como no infectadas oscilan alrededor de los 100nm, hay una población de vesículas de mayor tamaño (350 a 400 nm) en las microvesículas liberadas por células infectadas (figura 11).

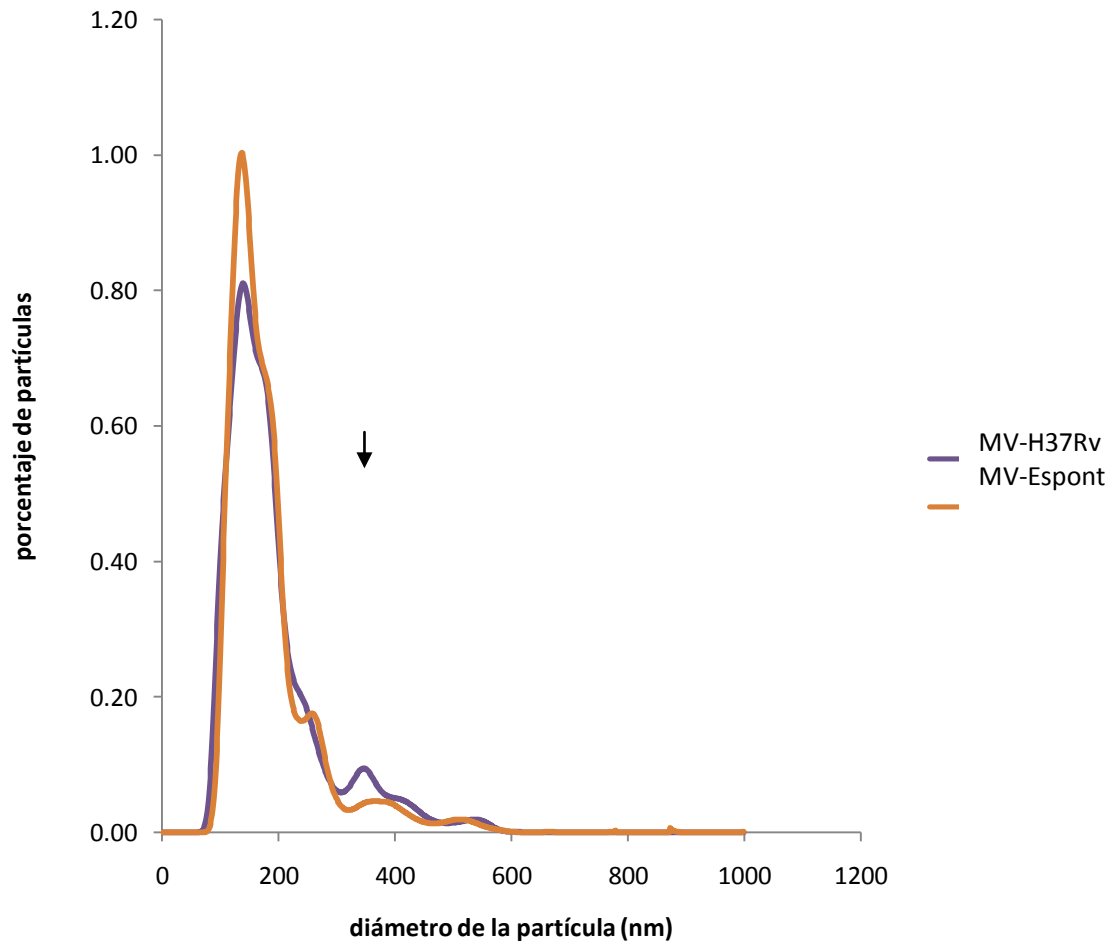


Figura 11. Las microvesículas liberadas por células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv presentan una población de mayor tamaño. Las microvesículas liberadas por células infectadas 4 horas y sin infectarse se analizaron mediante análisis de rastreo de nanopartículas para obtener la distribución de tamaños. La flecha indica una población de microvesículas de mayor tamaño, liberados por células infectadas. Se muestran los datos de un experimento representativo de 3 experimentos distintos e independientes.

Ya determinadas las condiciones óptimas para la obtención de microvesículas se procedió a escalar el proceso para obtener una mayor cantidad de vesículas y determinar la proporción de proteínas que estas representarían en el sedimento del que se obtienen. Para ello se obtuvieron microvesículas a partir de botellas de 150cm² y durante la serie de centrifugaciones también se centrifugaron en paralelo 12.5mL de medio de cultivo con 2.5

% de SFB ultracentrifugado. Los sedimentos con las microvesículas o en el medio con SFB ultracentrifugado se hicieron pasar por una columna de 35 mL de Sepharose 4B con solución salina como eluyente y se colectaron fracciones de 1500 μ L. Se obtuvo un perfil de elución con fracciones de 1mL, similar al perfil obtenido en el experimento anterior. El perfil de elución se repitió siempre que se utilizó una nueva columna.

Para los siguientes experimentos se intentó emplear microvesículas provenientes del SFB ultracentrifugado como control, pues aún se observaban algunas en el SFB ultracentrifugado y su presencia podría modificar los resultados. La hipótesis era que aunque en las muestras de microvesículas liberadas por las células, ya purificadas, hubiera microvesículas del SFB, la cantidad de microvesículas obtenidas del medio de cultivo de las células sería mayor por tener las microvesículas liberadas por las células además de las microvesículas presentes en el SFB ultracentrifugado. Sin embargo, Al determinar la concentración de proteínas de todas las preparaciones de microvesículas se observó que la concentración de microvesículas en el suero no era estadísticamente diferente a la concentración de MV-Espont y MV-H37Rv (figura 12). Esto podría deberse a que las microvesículas del SFB estarían siendo consumidas a la misma velocidad a la que las células estarían liberando sus propias microvesículas. Este control, tal como fue diseñado, no tomó en cuenta la cantidad de microvesículas del SFB que quedaría al final de la incubación, por lo que fue descartado.

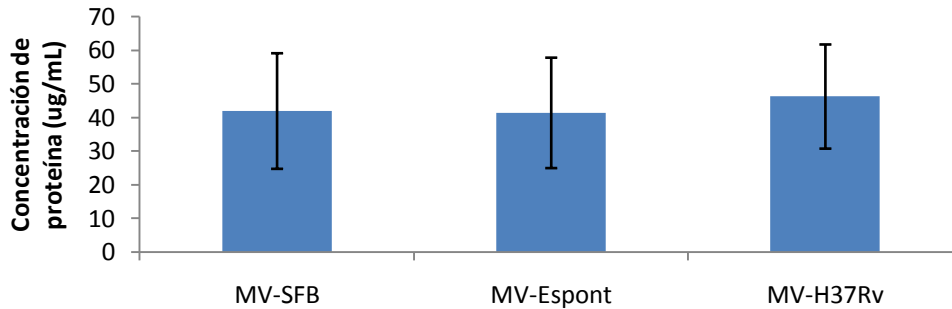


Figura 12. Las microvesículas de suero fetal bovino no pueden ser empleados como control pues se desconoce la proporción de estas en las preparaciones de microvesículas liberadas por macrófagos J774A.1. Se comparó la concentración de proteína de las microvesículas liberadas espontáneamente por macrófagos J774A.1 (MV-Espont), o después de ser infectados con H37Rv (MV-H37Rv) contra las microvesículas presentes en la cantidad de suero fetal bovino (MV-SFB) que se les adiciona a las células durante el proceso de liberación de de microvesículas. Datos de 12 experimentos. Analizado con ANOVA

6.3 Características bioquímicas de las microvesículas

Se comparó la composición de lípidos en las microvesículas derivados de células sin infectar e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. Para ello se hizo la extracción de sus lípidos por el método de Folch (Folch y col, 1957) y se realizó una cromatografía en capa fina. Los lípidos con grupos amino libres (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina) se revelaron con la aspersion de ninhidrina, donde se observa una mayor cantidad de lípidos con amino libres con movilidad baja (fosfatidilserina) en las MV-H37Rv (figura 13A y 13C). Pese a que la cantidad de materia orgánica parece comparable a las MV-Espont (revelado con ácido sulfúrico) tienen mayor cantidad de lípidos de alta movilidad cromatográfica como el colesterol (figura 13B). Este análisis no se puede realizar en microvesículas refrigeradas más de una semana, pues no se observan lípidos al revelar con ninhidrina. Esto podría significar que los lípidos se estarían degradando, probablemente por oxidación, manteniendo algunas proteínas, que aún se encontraban en la interfase al purificar los lípidos.

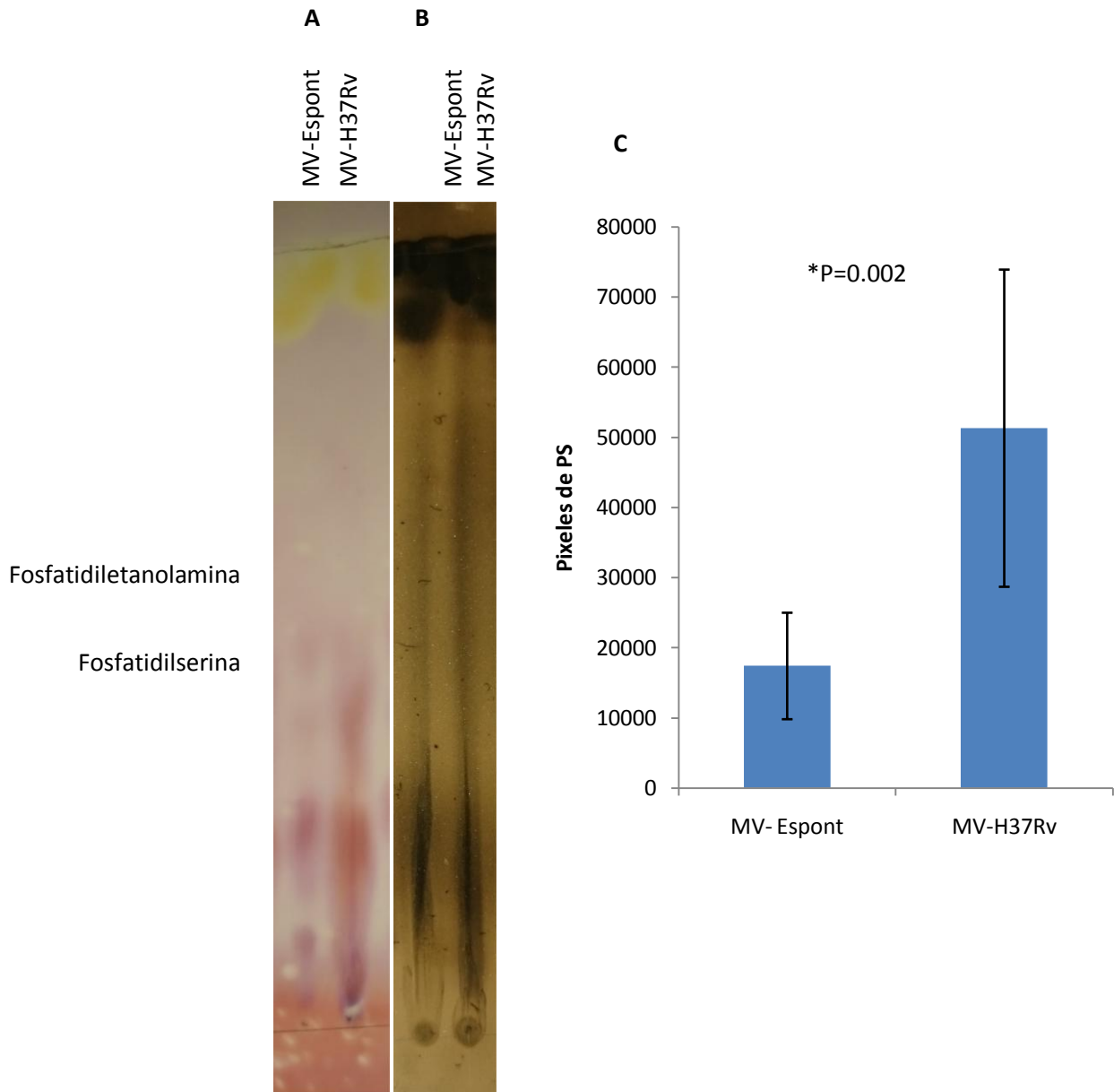


Figura 13. Las MV-H37Rv contienen más fosfatidilserina que las MV-Espont. Cromatografía en capa fina de los lípidos de las vesículas, que se reveló con ninhidrina para la detección de grupos amino libres (A) o con ácido sulfúrico para detectar materia orgánica total (B). Representativo de tres experimentos. C. Pixelles de fosfatidilserina en ambos tipos de vesícula. Análisis de 3 experimentos independientes mediante U de Mann-Whitney

Se comparó la composición proteica de las microvesículas liberadas por los macrófagos J774A.1 MV. Espont y MV-H37Rv con las MV-SFB mediante SDS-PAGE. Encontrándose que las MV-SFB y las MV-Espont tienen composiciones proteicas similares pero que las MV-

H37Rv tienen al menos dos componentes exclusivos. Se comparó también la composición proteica de microvesículas liberadas por macrófagos J774A.1 infectados con *M. fortuitum* (MV-fort), para determinar si los antígenos de *M. tuberculosis* en los MV-H37Rv serían comunes a la pared de las micobacterias, pues la 2,3-diacil trehalosa de ambas especies de *Mycobacterium* tiene cruce antigénico (Tórtola y col. 1996). Los MV-fort tienen una composición distinta al resto de las microvesículas, pues además de no tener los dos antígenos exclusivos de las MV-H37Rv, carecen de una proteína común al resto de microvesículas (figura 14A). En las MV-H37Rv se encontraron componentes de la bacteria mediante Western blot, pero no son antígenos comunes a las micobacterias, pues no se observaron estos antígenos en las MV-fort (figura 14B). Por estas diferencias se decidió no utilizar las MV-fort en los siguientes experimentos.

La presencia de fosfatidilserina en la superficie de cuerpos apoptóticos es una señal que permite la remoción de células que han muerto por este proceso sin que se desate una respuesta pro inflamatoria, es una señal que favorece la fagocitosis, esta señal se le llama en inglés “eat me” (Witting y col, 2000; Birge y col, 2016). Debido a que la diferente cantidad de fosfatidilserina en las microvesículas podría ser importante para algún efecto biológico, se probó bloquearla con Anexina V sin marca, demostrando el bloqueo mediante citometría de flujo (figura 15).

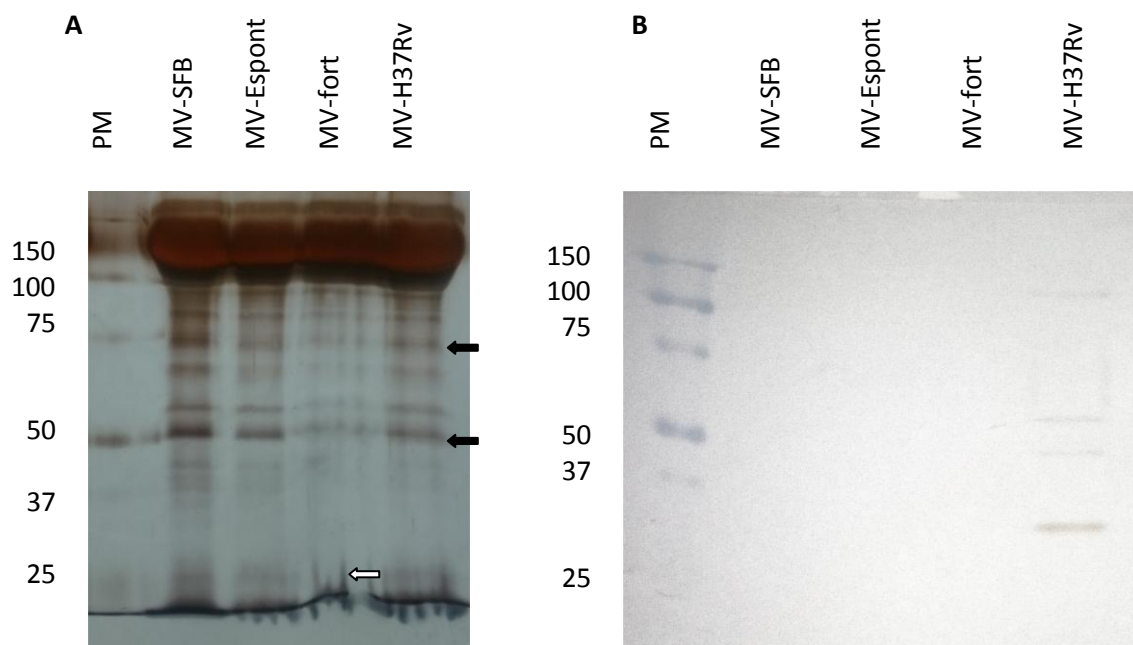


Figura 14. Composición proteica y antígenos de *M. tuberculosis* H37Rv presentes en las microvesículas. La fracción proteica de las microvesículas se analizó mediante SDS-PAGE en geles al 12% de poliacrilamida. **A.** Tinción con nitrato de plata. La flecha blanca indica el componente ausente de las MV-fort en comparación con el resto de microvesículas. Las flechas negras indican componentes presentes solo en las MV-H37Rv **B.** *Western blot* revelado con suero de conejo anti extracto soluble de *M. tuberculosis* H37Rv.

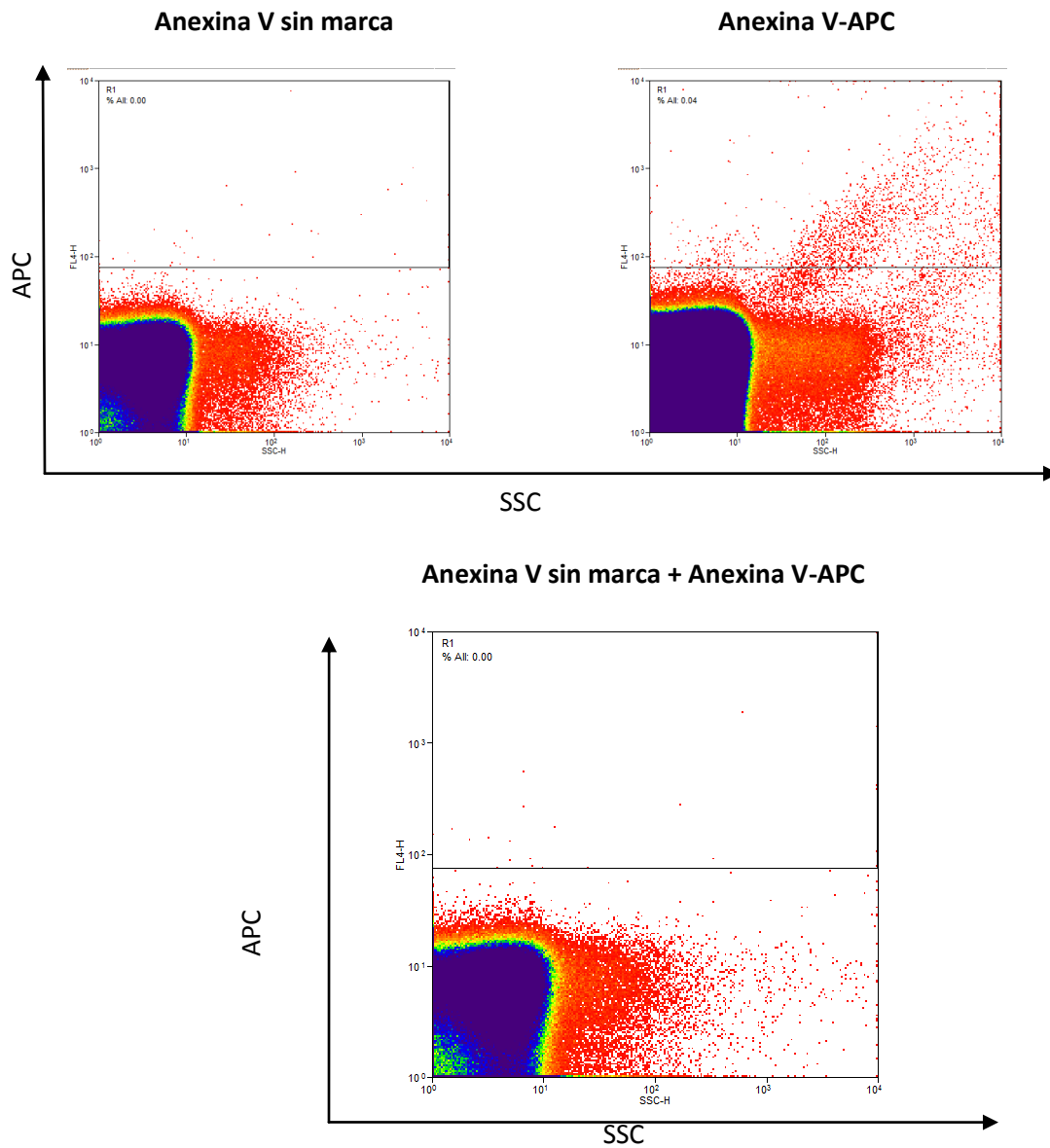


Figura 15. La fosfatidilserina en la cara externa de las MV-H37Rv puede bloquearse con Anexina V. Se obtuvieron alícuotas de MV-H37Rv y se hicieron reaccionar con dos tipos de Anexina V, sin marca y marcada con APC. Una tercera alícuota se hizo reaccionar con Anexina V sin marca, 10 minutos después se adicionó Anexina V marcada con APC y se leyó en el citómetro una hora después.

6.4 Efecto *in vitro* de las microvesículas sobre macrófagos J774A.1 infectados y participación de la fosfatidilserina.

Las microvesículas tienen efecto sobre la expresión de moléculas de superficie y sobre la producción de citocinas en macrófagos (Singh y cols, 2011 y 2012), pero no se ha evaluado su efecto sobre la fagocitosis. Para evaluar un efecto sobre la capacidad microbicida de los macrófagos J774A.1, se añadieron exosomas al medio después de haber sido eliminada la micobacteria no fagocitada con amikacina. Las microvesículas liberadas espontáneamente de las células reducen la carga bacteriana 48 horas después de la infección (figura 16). Debido a la diferente cantidad de fosfatidilserina en su composición, este lípido podría ser de importancia para este efecto, lo que demostramos añadiendo Anexina V al medio con exosomas 30 minutos antes de adicionarlas a las células, observando que el efecto microbicida se pierde (figura 16). Aunque las MV-H37Rv no reducen la carga bacteriana, la adición de Anexina V no modifica la carga bacteriana posiblemente debido a que aunque estos exosomas tienen una mayor cantidad de fosfatidilserina (figura 13), los componentes derivados de la micobacteria presentes en los mismos podrían interferir en la actividad bactericida.

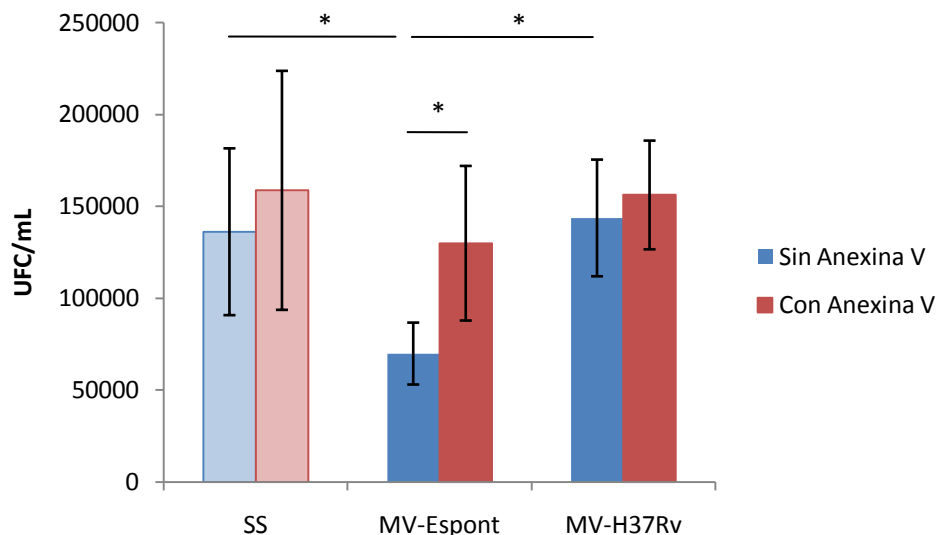


Figura 16. Las microvesículas liberadas espontáneamente aumentan la capacidad microbicida de los macrófagos J774A.1 en un efecto dependiente de fosfatidilserina. Se infectaron células J774A.1 con *M. tuberculosis* a una MOI de 10 durante 3 horas y se eliminaron las bacterias no fagocitadas con amikacina, dejando actuar durante una hora. Se añadieron microvesículas al medio después de haber lavado el exceso de amikacina y se dejaron actuar 48 horas después del comienzo de la infección. Resultados representativos de dos experimentos independientes. (* P < 0.05, ANOVA de dos vías)

6.5 Efecto del tratamiento con exosomas en el modelo experimental de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c.

Se ha reportado que las microvesículas derivadas de macrófagos de líneas celulares infectados con *M. tuberculosis* H37Rv tienen efectos *in vitro* en la infección tuberculosa, induciendo la sobreproducción de TNF- α , GCSF, MIP-2, RANTES, sICAM1 e IL-1ra en macrófagos de médula ósea, pero que también interfieren en la señalización del IFN- γ sobre estos mismos macrófagos, lo que les impide sobreexpresar en su superficie CD64 y MHC-II (Singh y cols, 2012). *In vivo* se ha observado que las microvesículas por sí solas pueden reclutar macrófagos al inocularlos en orejas de ratón (Bhatnagar y cols, 2007) pero no se ha probado el efecto de estas vesículas sobre la infección tuberculosa.

Se infectaron ratones BALB/c con 1.75×10^5 UFC de *M. tuberculosis* por vía intratraqueal y se empezó la administración de microvesículas por vía intraperitoneal tres veces por semana desde los 60 días después de la infección. Se emplearon microvesículas obtenidas en un plazo no mayor a dos semanas antes de su administración, pero ya que se ha descrito que las microvesículas pueden ser almacenadas para análisis posteriores (Liu y col, 2007; Sadallah y col, 2011b) se analizó el tratamiento con microvesículas mantenidas en refrigeración a 8 °C durante 30 días. A los 30 días de iniciado el tratamiento se determinó la carga bacteriana y se observó la morfología microscópica del pulmón de la mitad de los ratones, a los ratones restantes se les hicieron las mismas determinaciones a los 60 días de iniciado el tratamiento.

El tratamiento con microvesículas modificó el curso de la enfermedad en el modelo de ratón. Las microvesículas redujeron la carga bacteriana a los 30 días de iniciado el tratamiento (figura 17A) y la reducción se mantuvo al día 60 (figura 17B). Aunque se ha reportado que las microvesículas se pueden almacenar después de haber sido obtenidas, el almacenamiento de las microvesículas es una variable cuyos efectos no se pueden controlar, observándose que en alguno de los tiempos analizados, las microvesículas tenían efecto y en otro no. La estabilidad de estas microvesículas probablemente es distinta, por lo que la refrigeración modificaría sus actividades en diferentes puntos del tiempo, lo que explicaría el efecto observado (figura 17). Es por ello que los futuros ensayos se deberán hacer con vesículas obtenidas en un plazo no mayor a una semana de su obtención.

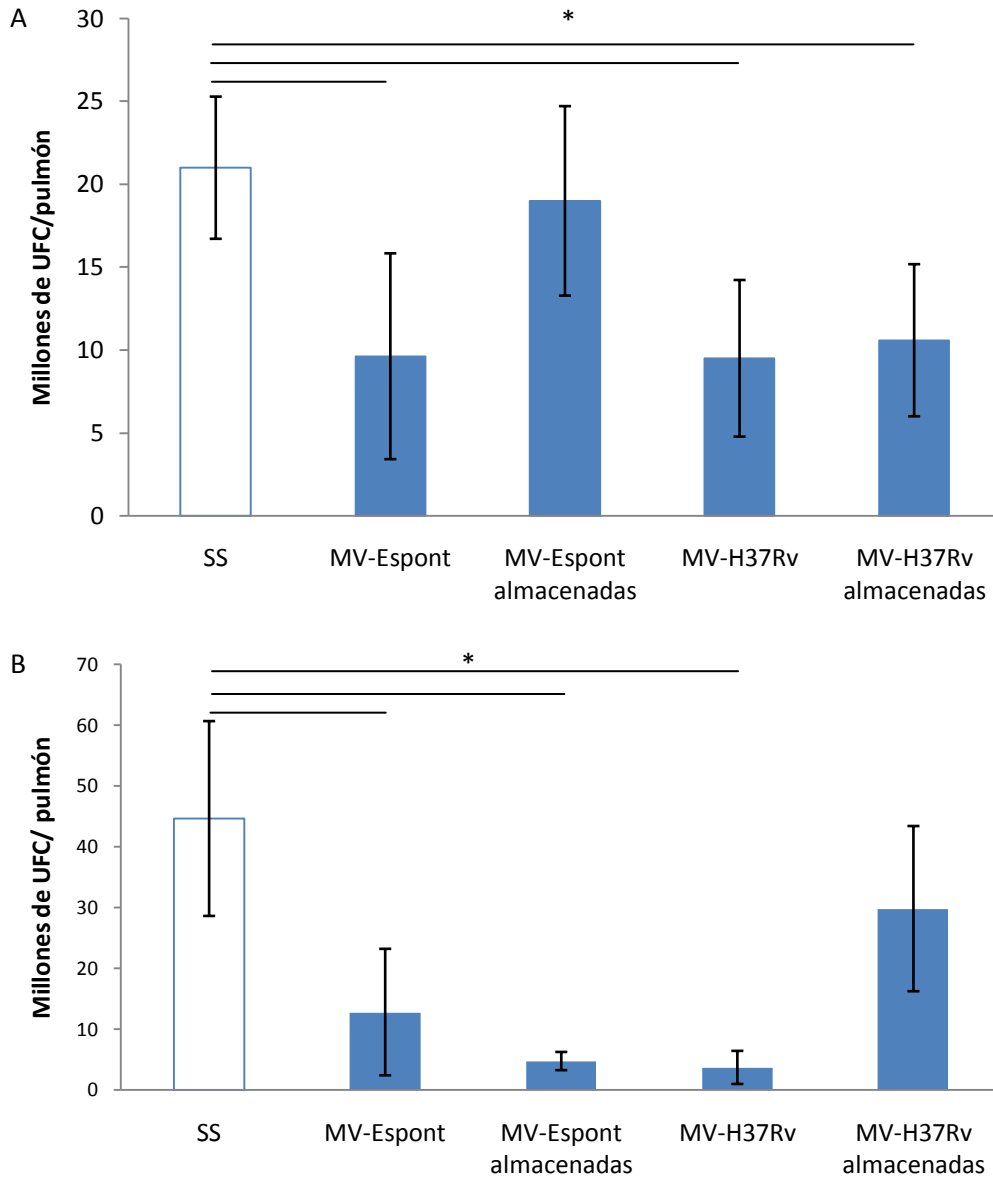


Figura 17. Las microvesículas reducen la carga bacteriana en un modelo *in vivo* de tuberculosis pero el efecto puede perderse por el almacenamiento de las microvesículas en el laboratorio. Ratones BALB/c fueron infectados con H37Rv via intratraqueal y se administraron microvesículas vía intraperitoneal a los 60 días post-infección. Se determinó la carga bacteriana en el pulmón derecho a los 30 (A) y 60 (B) días de tratamiento (* $p < 0.05$, ANOVA).

Aunque modifican la carga bacteriana, las microvesículas liberadas por las células J774A.1 (figura 17) no modifican el daño en el pulmón, evaluado como porcentaje de área

neumónica (figura 18). Es necesario probar la combinación de microvesículas y antifímicos, para conseguir un esquema de tratamiento más corto, que evite la extensión del daño en el pulmón, ya que las microvesículas de macrófagos J774A.1 podrían estar interfiriendo con las microvesículas liberadas por el parénquima pulmonar para reparar el daño.

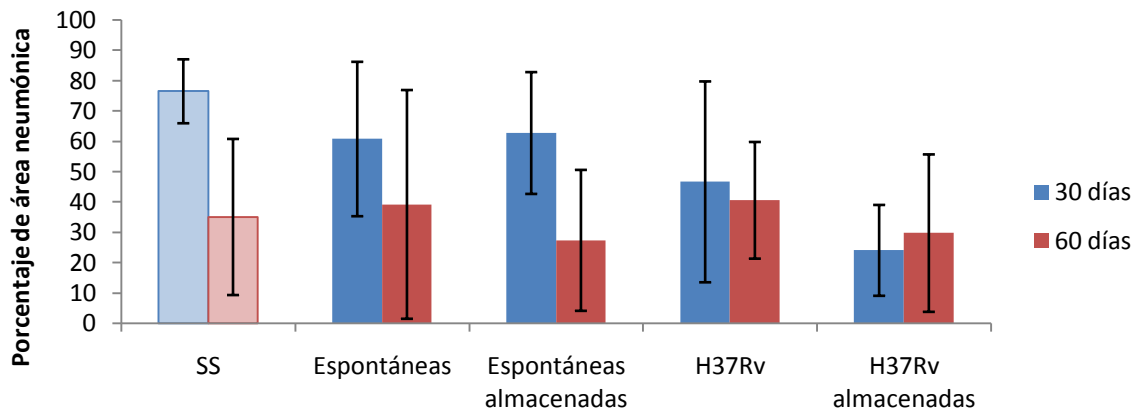
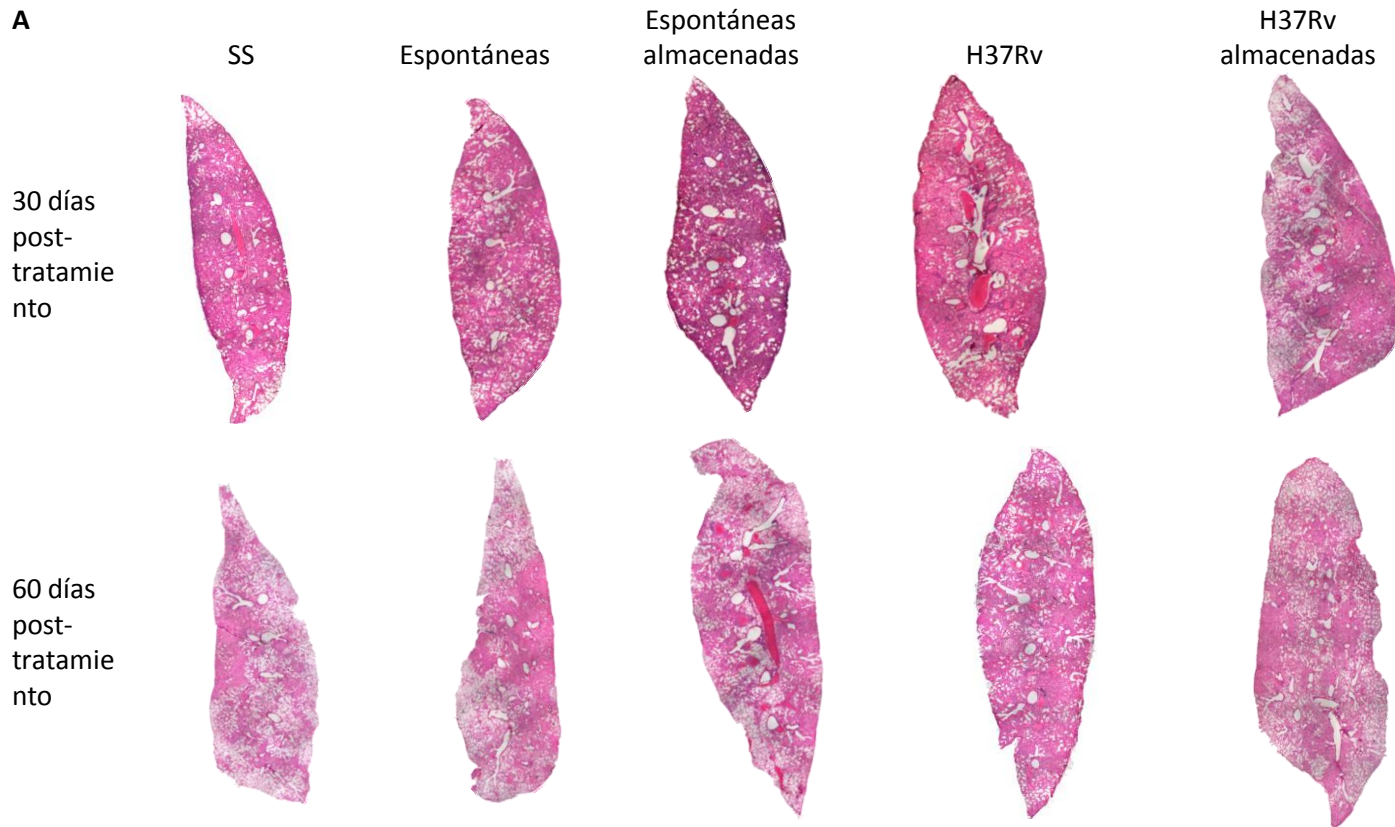


Figura 18. Las microvesículas no modifican la patología de la tuberculosis. **A.** Cortes histológicos representativos de los pulmones izquierdos de los ratones de la figura 17. Aumento original, 10x. **B.** Análisis estadístico de las áreas neumónicas en las imágenes de histología. Análisis por Kruskal-Wallis

7. Discusión

Las células liberan microvesículas de manera espontánea, pero al ser infectadas las células, liberan otro tipo de microvesículas, de tamaño y composición química distintas. Se establecieron las condiciones de infección a una MOI=10 y 4 horas de infección, porque es la condición en la que se liberaba la mayor cantidad de MV-H37Rv (figura 5). A tiempos más prolongados no solo se observó una menor cantidad de microvesículas sino que se corría el riesgo de obtener cuerpos apoptóticos, que son vesículas membranales liberadas por la muerte celular por apoptosis (Théry y col, 2009), que podría ocurrir en estas condiciones de cultivo. Estos cuerpos apoptóticos son de mayor tamaño y que en la figura 5 se podrían encontrar en las fracciones anteriores a aquellas en las que se encontraron las microvesículas pues los componentes de mayor tamaño eluyen antes que los de menor tamaño. En las condiciones de cultivo de MOI=1 y 48 horas de infección se pudo observar un pico entre las fracciones 11 y 15 donde probablemente se encuentren cuerpos apoptóticos. Una vez establecido el tiempo de infección, se utilizó este mismo tiempo para la liberación de MV-Espont y que el tiempo de cultivo no fuera otra variable en los experimentos posteriores.

Durante el proceso de liberación de microvesículas se liberan al medio macromoléculas. Es por ello que para analizar su efecto fue necesario purificar las microvesículas. En el trabajo con células es procedimiento rutinario el lavarlas con una solución isotónica y centrifugarlas para recuperarlas en el sedimento con la menor cantidad de macromoléculas solubles. La fuerza relativa proporcionada por la centrifugación no es suficiente para que sedimenten las vesículas, por lo que se recurre a la

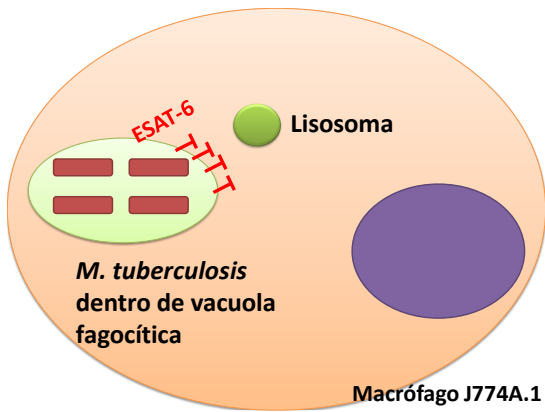
ultracentrifugación, pero intentar lavar las vesículas mediante ultracentrifugaciones implica perder las vesículas (figura 4). Fue por ello que durante el desarrollo de esta tesis se prefirió purificar las microvesículas exclusivamente mediante cromatografía por exclusión de tamaño y determinar la concentración de proteínas mediante la lectura de absorbancia a 230nm (Goldfarb, y col, 1951), ya que la composición química de cada fracción colectada es distinta e interfiere con los análisis colorimétricos para determinación de proteínas. Al obtener el perfil de elución de las microvesículas se hipotetizó la presencia de las microvesículas en las fracciones de mayor tamaño, comprobándose por citometría de flujo (figura 7) y microscopía electrónica (figuras 9 y 10). Se observaron las microvesículas por microscopía electrónica de transmisión antes de ser eluidas en la SEC (figura 8) para conocer sus estructuras y buscarlas en caso de que la elución redujera considerablemente el número de microvesículas, pero esto no ocurrió.

Las microvesículas no tienen una composición uniforme, ya que se pueden observar poblaciones de vesículas con uno o dos marcadores (figura 7). Asimismo, dependiendo de las condiciones de cultivo las vesículas pueden tener tamaños distintos, siendo más grandes cuando las células están infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv (figuras 9 y 11).

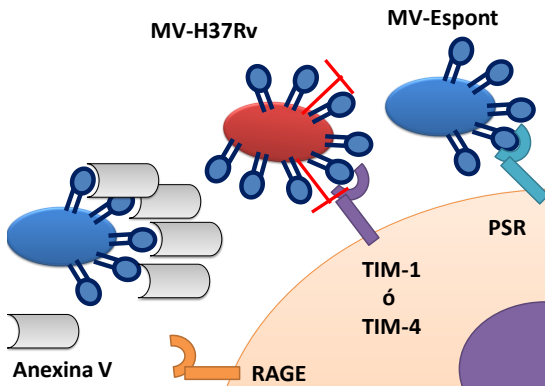
Las diferencias en la composición química de las microvesículas debidas a los estímulos se observan en la composición química de lípidos (figura 13), en la composición de proteínas (figura 14) y en la proporción de las poblaciones de microvesículas (figura 7). En la actualidad no se cuenta con una técnica que pueda separar las poblaciones de microvesículas para su estudio individual, pero se están desarrollando técnicas de citometría de flujo para el análisis de marcadores de superficie de vesículas individuales

(Koliha y cols, 2016), pero aún no son suficientemente sensibles para separar las poblaciones de vesículas derivadas de una sola célula aunque se pueden identificar vesículas mezcladas en una muestra y distinguir las poblaciones celulares que les dieron origen.

Las microvesículas liberadas por macrófagos de líneas celulares infectados con micobacterias tienen efectos sobre otros macrófagos *in vitro* como la sobreexpresión de MHC de clase II y de CD64 en su superficie (Singh y cols, 2011). También se ha observado que pueden inducir la liberación de mediadores químicos como GCSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES, MCP-5 y TNF- α en macrófagos de médula ósea (Singh y cols, 2012). Pero no se ha observado su efecto para ayudar a reducir la carga bacteriana, efecto que observamos con las MV-Espont (figura 16). Este efecto se anula cuando se bloquea la fosfatidilserina de su superficie (figuras 15, 16 y 19). Sin embargo, estas mismas microvesículas son las que presentan una menor cantidad de fosfatidilserina en su composición total (figura 13). Aunque no se observó el mecanismo de entrada de las microvesículas a los macrófagos, es probable que sean fagocitadas mediante la interacción de la fosfatidilserina con su receptor (PSR) (Li y col, 2003), las moléculas de células T que contienen un dominio de inmunoglobulina y mucina 1 y 4 (TM-1 y TIM-4) (Kobayashi y col, 2007) o el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) (He y col, 2011) y luego degradados por acción lisosomal (figura 19). Esta fagocitosis de las vesículas aumentaría el volumen fagocitado, reduciendo la concentración de ESAT-6, una molécula que impide la fusión fagolisosomal (Simeone y col 2012), en las vacuolas fagocíticas y permitiendo de nuevo la fusión fagolisosomal. Este proceso no se modificaría.

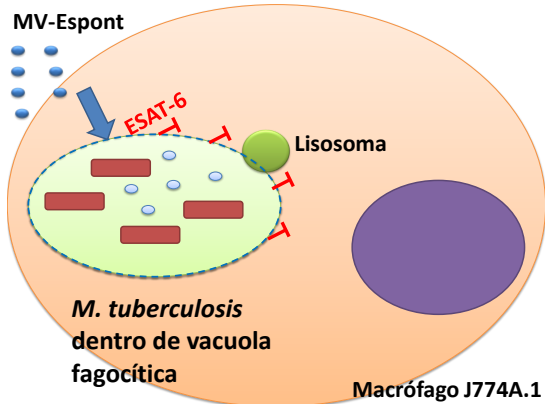


La micobacteria al ser fagocitada libera moléculas como ESAT-6, que evitan la fusión de la vacuola fagocítica con el lisosoma, evitando su eliminación.

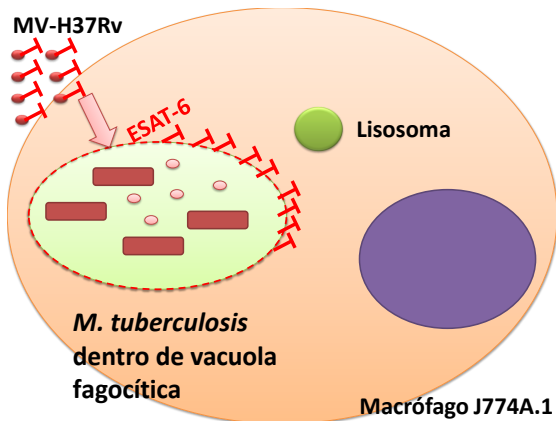


Ambos tipos de vesícula: MV-Espont y MV-H37Rv pueden entrar al macrófago mediante la interacción de la fosfatidilserina de su superficie con sus receptores en el macrófago: PSR, TIM-1, TIM-4 o RAGE.

Esta entrada puede ser bloqueada con Anexina V



Las MV-Espont aumentan el volumen de material fagocitado, reduciendo la concentración de ESAT-6, y permitiendo la fusión fagolisosomal.



Las MV-H37Rv también aumentan el volumen de material fagocitado, pero como también tienen ESAT-6, se mantiene la concentración de ESAT-6 necesaria para evitar la fusión fagolisosomal.

Figura 19. Efecto probable de las microvesículas liberadas por células J774A.1 sobre macrófagos. MV-Espont, microvesículas liberadas espontáneamente por macrófagos J774A.1. MV-H37Rv, microvesículas liberadas por macrófagos J774A.1 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv

por las MV-H37Rv, pues también contienen antígenos micobacterianos, y como se ha observado en otros estudios, presentan el antígeno ESAT-6 (Giri y col, 2010), por lo que estas microvesículas también evitarían la fusión del fagosoma con los lisosomas (figura 19).

Se ha probado el uso de vesículas liberadas por la micobacteria como candidato a vacuna (Prados-Rosales y cols, 2014). Estas vesículas inducen una protección similar a la conferida por la vacunación con BCG, con la ventaja adicional de que las vesículas no se pueden multiplicar, pudiéndose evitar los casos de BCGosis (Shrot y col, 2016). En este trabajo evaluamos el uso de microvesículas liberadas por macrófagos como agentes terapéuticos contra la tuberculosis debido a los efectos que se han observado que producen y a que también contienen componentes de la micobacteria. Se ha observado que las vesículas derivadas de micobacterias tienen efecto protector cuando la vía de administración es sistémica (Prados-Rosales y cols, 2014), a diferencia de la administración por vía intratraqueal, que induce una inflamación exacerbada, deletérea para los animales cuando son infectados (Prados-Rosales y cols, 2011). Se decidió la administración por vía intraperitoneal de vesículas equivalentes a 2.5 µg de proteína porque para reducir la probabilidad de una respuesta desfavorable al administrar de manera local.

En el modelo experimental de tuberculosis en ratones BALB/c, las microvesículas liberadas por los macrófagos J774A.1 reducen la carga bacteriana, pero este efecto se desvanece si las vesículas no se emplean dentro de una semana después de haber sido obtenidas (figura 17) pues se pierde su integridad podría estar comprometida por la oxidación de los lípidos, que no se observan en el TLC de microvesículas mantenidas en refrigeración más de

2 semanas, por lo que se recomienda emplear las microvesículas en el menor tiempo posible.

Es muy probable que otros mecanismos sean modificados por las microvesículas, ya que *in vitro* sólo se observó una reducción en la carga bacteriana por las vesículas liberadas espontáneamente, pero *in vivo* también las vesículas liberadas por células infectadas redujeron la carga bacteriana. Uno de estos efectos puede ser por la capacidad de las microvesículas de presentar antígeno, como se ha manifestado antes (Smith, 2017).

Las microvesículas funcionan como mecanismo de comunicación entre células (Théry, 2011), por lo que la adición de microvesículas podría estar disminuyendo la concentración de microvesículas que señalicen para reparar el tejido, lo que explicaría que pese a que las microvesículas ayudan a reducir la carga bacteriana (figura 17) no tengan efecto sobre el daño pulmonar (figura 18). No deberían estar afectados los mecanismos de comunicación celular debidos a quimiocinas pues su pequeño tamaño permitiría una difusión más rápida que las microvesículas pero podrían estar compitiendo con ellos si el mecanismo de eliminación de la bacteria es por una respuesta proinflamatoria, pero esta acción es poco probable, ya que la fosfatidilserina soluble induce respuestas antiinflamatorias como inhibir la producción de mediadores pro inflamatorios como IL-6, IL-8 y prostaglandina E₂ (Teom y col, 2013) y se han observado efectos antiinflamatorios de otro tipo de microvesículas como las liberadas por células tallo mesenquimales de médula ósea (Long y col, 2017 y Willis y col, 2018).

En conclusión, la infección de macrófagos J774A.1 con *M. tuberculosis* H37Rv induce la liberación de microvesículas (MV-H37Rv) que son diferentes en la composición de proteínas y lípidos así como de sus efectos a las microvesículas liberadas espontáneamente (MV-Espont). Las MV-H37Rv tienen antígenos de la micobacteria y una mayor cantidad de fosfatidilserina. No promueven el control de la infección en macrófagos J774A.1, efecto que sí tienen las MV-Espont. Las MV-Espont serían nuestro mejor candidato para combinar con antifímicos, en espera de lograr un esquema de tratamiento más corto, y por ello menos tóxico y con menor probabilidad de ser abandonado.

In *vivo*, las MV-Espont, como ya se había observado *in vitro*, y las MV-H37Rv, al contrario de lo que se había observado *in vitro*, reducen la carga bacteriana. Efecto que se pierde al almacenar las microvesículas, lo que indica que es importante su estabilidad, tanto por sus componentes químicos como por su estructura. Aunque ayudan a reducir la carga bacteriana, no modifican el proceso de daño tisular en el pulmón, probablemente porque contrarrestan la señalización para reparar el daño mediada por otro tipo de microvesículas. Para probar esto, *in vitro* se podría comparar la liberación de citocinas por las células J774A.1 cuando a su medio de cultivo se les adicionan MV-H37Rv o MV-Espont y una tercera condición, que sería la liberación de citocinas en presencia de ambos tipos de microvesículas y que las microvesículas liberadas por células RAW264.7 inducen un perfil diferente de quimiocinas y citocinas dependiendo de las condiciones de cultivo que se empleen para la liberación de microvesículas, ya que las vesículas liberadas por células infectadas inducen la liberación de TNF- α , CCL5, MCP-5, MIP-1 α , MIP-1 β y G-CSF, no así

las microvesículas liberadas espontáneamente (Bhatnagar y col, 2007, Giri y col, 2008, Singh y col, 2012).

En este trabajo se ha observado la eficacia de las microvesículas liberadas por macrófagos J774A.1 en el control de la tuberculosis. Futuros experimentos en combinación con antifímicos podrían dar lugar a tratamientos más cortos o con mayor tasa de efectividad, ya que la actual es poco mayor a 85% (WHO, 2017). Podría también probarse el tratamiento de primera línea, etambutol, rifampicina, pirazinamida e isoniazida en combinación con microvesículas contra cepas de *M. tuberculosis* multidrogoresistentes con el objetivo de encontrar tratamiento más corto y menos tóxico.

No se esperaba que las MV-Espont ayudaran a reducir la carga bacteriana, ya que microvesículas liberadas por macrófagos de la línea celular RAW264.7 no inducen la producción de TNF- α , CCL5, MCP-5, MIP-1 α , MIP-1 β y G-CSF e iNOS en macrófagos de médula ósea como lo hacen las microvesículas liberadas por esta línea celular cuando son infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv, sin embargo este resultado podría llevar al estudio exclusivo de estas microvesículas ya que su obtención implica menos riesgo, pues no se estaría trabajando con un agente patógeno de nivel de bioseguridad 3 como lo es *M. tuberculosis* (APHL, 2015).

Se descubrió que las MV-Espont ayudan a reducir la carga bacteriana de macrófagos infectados mediante un mecanismo dependiente de fosfatidilserina, pero no es el único mecanismo por el que las microvesículas tendrían efecto, al observarse que *in vitro* las MV-H37Rv no tienen efecto, pero que en el modelo de infección reducen la carga

bacteriana. Se podrían buscar los otros mecanismos por los que las microvesículas ejercen su efecto y después sustituir las microvesículas por liposomas con fosfatidilserina y las proteínas de las que en el futuro se descubra su efecto para tener un agente terapéutico de composición constante. Se podría comenzar con la administración de liposomas con fosfatidilserina, para los que primero se debería establecer una dosis expresada como cantidad de fosfatidilserina administrada. No sería necesario probar distintos tamaños de liposomas, pues según nuestras observaciones, las microvesículas administradas tenían un tamaño de alrededor de 100 μm (figura 11) pero se podría probar con diferentes cantidades de fosfatidilserina en su composición.

Si el mecanismo dependiente de fosfatidil-serina fuera el principal mecanismo por el que se reduce la carga bacteriana in vivo, se podría incluso emplear microvesículas derivadas de plantas, y la administración oral de estas, pues ya se ha observado que microvesículas liberadas por toronja y jengibre pueden ser estables tanto en el pH estomacal como en el pH intestinal. Las microvesículas liberadas por el jengibre incluso inducen a macrófagos de la línea celular RAW264.7 a liberar IL-6 e IL-10 (Mu y col, 2014). Además la fosfatidilserina de plantas también tiene efectos antiinflamatorios, como se ha observado al administrar fosfatidilserina de soya en forma soluble para el tratamiento en un modelo en rata de artritis inducida por carragenina, reduciendo los niveles de IL-1 β (Yeom y col. 2013).

8. Conclusiones

Se purificaron y caracterizaron las microvesículas liberadas. Además se comprobó su eficacia para la reducción de la carga bacteriana en ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv., ampliando el campo de estudio de las microvesículas como agentes terapéuticos.

9. Bibliografía

1. Alvarez-Erviti, L; Seow, Y; Yin, H; Betts, C; Lakhai, S; Wood M.J. 2011. **Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes.** Nat Biotechnol. 29(4):341-345.
2. Association of Public Health Laboratories. 2015 **National TB Laboratory Services Survey Report: Biosafety.**
3. Baay-Guzman, G.J; Duran-Padilla, M.A; Rangel-Santiago, J; Tirado-Rodriguez, B; Antonio-Andres, G; Barrios-Payan, J; Mata-Espinosa, D; Klunder-Klunder, M; Vega M.I; Hernandez-Pando, R; Huerta-Yepez, S. 2018. **Dual role of hypoxia-inducible factor 1 α in experimental pulmonary tuberculosis: its implication as a new therapeutic target.** Future Microbiol. fmb-2017-0168.
4. Beatty, WL; Ullrich, H-J; Russell, DG. 2000. **Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event.** Eur J Cell Biol. 80:31-40
5. Bhatnagar, S; Shinagawa, K; Castellino, FJ; Schorey, JS. 2007. **Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo.** Blood. 110(9):3234-3244.
6. Birge, R.B; Boelts, S; Kumar, S; Carlson, J; Wanderley, J; Calianese, D; Barcinski, M; Brekken, R.A; Huang, X; Hutchins, J. T; Freimark, B; Empig, C; Mercer, J; Schroit, A.J; Schett, G; Herrmann, M. 2016. **Phosphatidylserine is a global immunosuppressive**

- signal in efferocytosis, infectious disease and cancer.** Cell Death Differ. 23(6):962-978.
7. Colombo, E; Borgiani, B; Verderio, C; y Furlan, R. 2012. **Microvesicles: novel biomarkers for neurological disorders.** F Phys 3:63
 8. Comas, I; Coscolla, M; Luo, T; Borrell, S; Holt, KE; Kato-Maeda, M; Parkhill, J; Malla, B; Berg, S; Thwaites, G; Yaobah-Manu, D; Bothamley, G; Meij, J; Wei, L; Bentley, S; Harris, SR; Niemann, S; Diel, R; Aseffa, A; Gao, Q; Young, D & Gagneux, S. 2013. **Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans.** Nat Genet. 45(10):1176-1182.
 9. Comstock, G.W; Livesay, V.T; Woolpert, S.F. 1974. **The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence.** Am J Epidemiol. 99(2):131-138
 10. Cywes. C; Godenir, N.L; Hoppe, H.C; Scholle, R.R; Steyn, L.M; Kirsch, R.E; Ehlers, M.R. 1996. **Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells.** Infect Immun. 64(12):5373-5383.
 11. Eken, C. 2010. **Immunomodulation by Ectosomes.** Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel. Basilea, Suiza. Pp. 3-115.
 12. Flynn, J.L; Chan, J. and Lin, P.L. 2011. **Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis.** Mucosal Immunol 4(3):271-278
 13. Folch, J; Lees, M & Sloane-Stanley, GH. 1957. **A Simple Method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** J Biol Chem. 226:497-509

14. Fuchs, U. 1963. **Electron microscope observation on multivesicular bodies in endothelial and skeletal muscle cells.** Z MikroskAnatForsch. 70:391-396.
15. Gasser, O; Hess, C; Miot, S; Deon C; Sanchez J-C; Schifferli J.A. 2003. **Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils.** Exp. Cell. Res. 285:243-257
16. Giri, PK; Kruh, NA; Dobos, KM, Schorey, JS. 2010. **Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from M. tuberculosis-infected and culture filtrate protein-treated macrophages.** Proteomics. 10:3190-3202.
17. Giri, PK; Schorey, JS. 2008. **Exosomes Derived from M. bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells In Vitro and In Vivo.** PLoS ONE 3(6):e2461.
18. Goldfarb, A-R; Saidel, L.J; Mosovich, E. 1951. **The ultraviolet absorption spectra of proteins.** J Biol Chem. 193(1):397-404.
19. González-Cano, P. Mondragón-Flores, R; Sánchez-Torres, L.E; González-Pozos, S; Silva-Miranda, M; Monroy-Ostria, A; Estrada-Parra, S. and Estrada-García, I. 2010. **Mycobacterium tuberculosis H37Rv induces ectosome release in human polymorphonuclear neutrophils.** Tuberculosis. 90(2):125-134.
20. He, M; Kubo, H; Morimoto, K; Fujino, N; Suzuki, T; Takahasi, T; Yamada, M; Yamaya, M; Maekawa, T; Yamamoto, Y; Yamamoto, H. 2011. **Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells.** EMBO Rep 12(4):358-364.

21. Kobayashi, N; Karisola, P; Peña-Cruz, V; Dorfman, D.M; Jinushi, M; Umetsu, S.E; Butte, M.J; Nagumo, H; Chernova, I; Zhu, B; Sharpe, A.H; Ito, S; Dranoff, G; Kaplan, G.G; Casasnovas, J.M; Umetsu, D.T; Dekruyff, R.H; Freeman, G.J. 2007. **TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells.** *Immunity* 27(6):927-940.
22. Koliha, N, Weincek, Y; Heider, U; Jüngst, C; Kladt, N; Krauthäuser, S; Johnston, ICD; Bosio, A; Schauss, A; & Wild, S. 2016. **A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles.** *J Extracell Vesicles.* 5: 10.3402/jev.v5.29975.
23. Leon, C; Nandan, D; Lopez, M; Moeenrezakhanlou, A; Reiner, N.E. 2006. **Annexin V associates with the IFN-gamma receptor and regulates IFN-gamma signaling.** *J Immunol* 176(10):5934-5942.
24. Li, M; Yu D; Williams K.J. and Liu M-L. 2010. **Tobacco Smoke Induces the Generation of Procoagulant Microvesicles from Human Monocyte/Macrophages.** *ArteriosclerThrombVascBiol.* 30(9):1818-1824.
25. Li M,O; Sarkisian, M.R; Mehal, W.Z; Rakic, P; Flavell, R.A. 2003. **Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells.** *Science.* 302(5650):1560-1563
26. Liu, M-L; Reilly, M.P; Casasanto, P; McKenzie S.E; Williams K.J. 2007. **Cholesterol Enrichment of Human Monocyte/Macrophages Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and the Release of Biologically-Active Tissue Factor-Positive Microvesicles.** *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 27:430-435.

27. Long, Q; Upadhyya, D; Hattiangady, B; Kim, D.K; An, S.Y; Shuai, B; Prockop, D.J; Shetty, A.K. 2017. **Intranasal MSC-derived A1-exosomes ease inflammation, and prevent abnormal neurogenesis and memory dysfunction after status epilepticus.** Proc Natl Acad Sci U S A. 114(17):E3536-E3545.
28. Martin-Jaular, L; Nakayasu, E.S; Ferrer, M; Almeida, I.C; Del Portillo H.A. 2011. **Exosomes from Plasmodium yoelii-infected reticulocytes protect mice from lethal infections.** PLoS One 6(10):e26588
29. Mohan, A.K; Coté, T.R; Block, J.A; Manadan, A.M; Siegel, J.N; Braun, M.M. 2004. **Tuberculosis following the use of etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor.** Clin Infect Dis. 39(3):295-299
30. Mu, J; Zhuang, X; Wang, Q; Jiang, H; Deng, Z.B; Wang, B; Zhang, L; Kakar, S; Jun, Y; Miller, D; Zhang, H.G. 2014. **Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles.** Mol Nutr Food Res. 58(7):1561-1573
31. Nunes-Alves, C; Booty, M.G; Carpenter, S.M; Jayaraman, P; Rothchild, A.C; Behar, S.M. 2014. **In search of a new paradigm for protective immunity to TB.** Nat Rev Microbiol. 12(4):289-299
32. Olivares, N; Rodriguez, Y; Zatarain-Barron, Z.L; Marquina, B.; Mata-Espinosa, D; Barrios-Payán, J; Parada, C; Moguel, B; Espitia-Pinzón, C; Estrada, I; Hernandez-Pando, R. 2017. **A significant therapeutic effect of immunoglobulins administered alone, or in combination with conventional chemotherapy, in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains.** Pathog

- Dis. ftx118Olobo J.O; Geletu, M; Demissie, A; Eguale, T; Hiwot, K; Aderaye, G; Britton, S. 2001. **Circulating TNF-alpha, TGF-beta, and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts.** Scand J Immunol. 53(1):85-91.
33. Peterson, P.K; Gekker, G; Hu, S; Sheng, W.S; Anderson, W.R; Ulevitch, R.J; Tobias, P.S; Gustafson, K.V; Molitor, T.W; Chao, C.C. 1995. **CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia.** Infect Immun. 63(4):1598-602.
34. Peyron, P; Vaubourgeix, J; Poquet, Y; Levillain, F; Botanch, C; Bardou, F; Daffé, M; Emile, J.F; Marchou, B; Cardona, P.J; de Chastellier, C; Altare, F. 2008. **Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence.** PLoS Pathog. 4(11):e1000204.
35. Pisu, D; Provvedi, R; Espinosa, D.M; Payan, J.B; Boldrin, F; Palù, G; Hernandez-Pando, R; Manganelli, R. 2017. **The Alternative Sigma Factors SigE and SigB Are Involved in Tolerance and Persistence to Antitubercular Drugs.** Antimicrob Agents Chemother. 61(12):e01596-1
36. Postlethwaite, A.E; Jackson, B.K; Beachey, E.H; Kang, A.H. 1982. **Formation of multinucleated giant cells from human monocyte precursors. Mediation by a soluble protein from antigen-and mitogen-stimulated lymphocytes.** J Exp Med. 155(1):168-78.
37. Prados-Rosales, R; Baena, A; Martínez, LR; Luque-García, J; Kalscheuer, R; Veeraraghavan, U; Carara, C; Nosanchuk, JD; Besra, GS; Chen, B; Jimenez, J; Glatman-Freedman, A; Jacobs Jr, WR; Porcelli, SA; Casadevall, A. 2011.

- Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice.** J Clin Invest. 121(4);1471-1483.
38. Prados-Rosales, R; Carreño, LJ; Batista-González, A; Baena, A; Venkataswamy, MM; Xy, J; Yu, X; Wallstrom, G; Magee, DM; LaBaer, J; Achkar, JM; JACobs Jr, WR; Chan, J; Porcelli, SA; Casadevall, A. 2014. **Mycobacterial Membrane Vesicles Administered Systemically in Mice Induce a Protective Immune Response to Surface Compartments of *Mycobacterium tuberculosis*.** mBio5(5):e01921-14.
39. Ramachandra, M; Qu, Y; Wang, Y; Lewis, CJ; Cobb, BA; Takatsu, K; Boom, WH; Dubyak, GR; Harding, CV. 2010. ***Mycobacterium tuberculosis* Synergizes with ATP To Induce Release of Microvesicles and Exosomes Containing Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Capable of Antigen Presentation.** Infect Immun. 78(12)5116-5125.
40. Sadallah, S; Eken, C. and Schifferli, J.A. 2011a. **Ectosomes as immunomodulators.** Springer Semin Immun. 33:487-495.
41. Sadallah, S; Eken, C; Martin, P.J. and Schifferli, J.A. 2011b. **Microparticles (Ectosomes) Shed by Stored Human Platelets Downregulate Macrophages and Modify the Development of Dendritic Cells.** J Immunol. 186:6543-6552.
42. Satta, N; Toti, F; Feugeas, O; Bohbot, A; Dachary-Prigent, J; Eschwège, V; Hedman, H. and Freyssinet, J-M. 1994. **Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide.** J Immunol. 153(7):3245-3255.

43. Saunders, BM; Britton, WJ. 2007. **Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis.** Immunol Cell Biol 85(2):103-111.
44. Shams, H; Wizel, B; Lakey, D.L; Samten, B; Vankayalapati, R; Valdivia, R.H; Kitchens, R.L; Griffith, D.E; Barnes, P.F. 2003. **The CD14 receptor does not mediate entry of Mycobacterium tuberculosis into human mononuclear phagocytes.** FEMS Immunol Med Microbiol. 36(1-2):63-69.
45. Schlesinger L.S. 1993. **Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors.** J Immunol. 150(7):2920-2930.
46. Shrot, S; Barkai, G; Ben-Shlush, A; Soudack, M. 2016. **BCGitis and BCGosis in children with primary immunodeficiency - imaging characteristics.** Pediatr Radiol. 46(2):237-245
47. Silva-Sánchez, A; Meza-Pérez, S; Flores-Langarica, A; Donis-Maturano, L; Estrada-García, I; Calderón-Amador, J; Hernández-Pando, R; Idoyaga, J; Steinman, R. and Flores-Romo, L. 2015. **ESAT-6 Targeting to DEC205+ Antigen Presenting Cells Induces Specific-T Cell Responses against ESAT-6 and Reduces Pulmonary Infection with Virulent Mycobacterium tuberculosis.** 10(7):e0133200.
48. Simeone, R; Bobard, A; Lippman, J; Bitter, W; Majlessi, L; Brosch, R; Enninga, J. 2012. **Phagosomal Rupture by Mycobacterium tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death.** PLoS Pathog. 8(2):e1002507.

49. Singh, PP; LeMaire, C; Tan, JC; Zeng, E; Schorey, JC. 2011. **Exosomes Released from *M.tuberculosis* Infected Cells Can Suppress IFN- γ Mediated Activation of Naïve Macrophages.** PLoS ONE 6(4):e18564.
50. Singh, PP; Smith, VL; Karakousis, PC; Schorey, JS. 2012. **Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*.** J Immunol. 189(2):777-785
51. Smith, VL; Cheng, Y; Bryant, BR; Schorey JS. 2017. **Exosomes function in antigen presentation during an *in vivo* Mycobacterium tuberculosis infection.** Sci Rep. 7:43578
52. Stein, C.M; Zalwango, S; Malone, L.L; Won, S; Mayanja-Kizza, H; Mugerwa, R.D; Leontiev, D.V; Thompson C.L; Cartier, K.C; Elston, R.C; Iyengar, S.K; Boom, W.H; Whalen, C.C. 2008. **Genome scan of *M. tuberculosis* infection and disease in Ugandans.** PLoS One. 3(12):e4094
53. Stein, J.M; Luzio, J.P. 1991. **Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human Neutrophils.** Biochem J. 274(2):381-386.
54. Théry, C. 2011. **Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications.** F1000 Biol Rep. 3:15
55. Tierney, D; Nardell, E.A; 2018. **Extrapulmonary Tuberculosis (TB).** MSD Manual Professional Edition.
56. Tirado, Y; Puig, A; Alvarez, N; Borrero, R; Aguilar, A; Camacho, F; Reyes, F; Fernandez, S; Perez, J.L; Acevedo, R; Mata-Espinoza, D; Payan, J.A; Garcia, M.L; Kadir, R; Sarmiento, M.E; Hernandez-Pando, R; Norazmi, M.N; Acosta, A. 2016.

- Mycobacterium smegmatis proteoliposome induce protection in a murine progressive pulmonary tuberculosis model.** Tuberculosis. 101:44-48
57. Tórtola, M.T; Lanéelle, M.A; Martín-Casabona, N. 1996. **Comparison of two 2,3-diacyl trehalose antigens from Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium fortuitum for serology in tuberculosis patients.** Clin Diagn Lab Immunol. 3(5):563-6.
58. Trams, EG; Lauter, CJ; Salem, N. Jr; Heine, U.1981. **Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles.** Biochim Biophys Acta. 1981. 645(1):63-70.
59. Turk, J.L; Narayanan, R.B. 1982. **The origin, morphology, and function of epithelioid cells.** Immunobiology. 161(3-4):274-282.
60. Whalen, C; Horsburgh, C.R; Hom, D; Lahart, C; Simberkoff, M; Ellner, J. 1995. **Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med. 151(1):129-135.
61. Willis, G.R; Fernandez-Gonzalez, A; Anastas, J; Vitali S.H; Liu, X; Ericsson, M; Kwong, A; Mitsialis S.A; Kourembanas, S. 2018. **Mesenchymal Stromal Cell Exosomes Ameliorate Experimental Bronchopulmonary Dysplasia and Restore Lung Function through Macrophage Immunomodulation.** Am J Respir Crit Care Med. 197(1):104-116.
62. Witting, A; Müller, P; Herrmann, A; Kettenmann, H; Nolte, C. 2000. **Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition.** J Neurochem. 75(3):1060-1070.

63. World Health Organization. 2010. **Treatment of tuberculosis guidelines**. WHO Press. Geneva, Suiza.
64. World Health Organization. 2017. **Global tuberculosis report 2017**. WHO Press. Geneva, Suiza.
65. Yeom, M; Hahm, D.H; Sur, B.J; Han, J.J; Lee, H.J; Yang, H.I; Kim, K.S. 2013. **Phosphatidylserine inhibits inflammatory responses in interleukin-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and alleviates carrageenan-induced arthritis in rat**. Nutr Res. 33(3):242-250.