



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



**“ACTIVIDAD DE LA METALOPROTEASA DE MATRIZ
EXTRACELULAR-9 EN RELACIÓN A LA CARGA BACTERIANA EN
MUESTRAS DE ESPUTO DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS”**

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Q.C ELAYNE IRENE BECERRA BAEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO ZENTENO CUEVAS

COMITÉ TUTORIAL:

DR. JUAN D. SANTIAGO GARCÍA

DRA. CLARA LUZ SAMPIERI RAMÍREZ

DR. ENRIQUE JUÁREZ AGUILAR

Xalapa de Enríquez, Ver

Noviembre de 2017

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de tesis fue financiado a través del donativo No. 213712 de CONACYT-Programa de atención a problemas nacionales otorgado Al Dr. Roberto Zenteno Cuevas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Roberto Zenteno Cuevas, por el apoyo, la confianza y dedicación otorgada durante todos estos años y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

De igual manera, a la Dra. Clara Luz Sampieri Ramírez, por cada uno de los consejos compartidos, por la paciencia y el tiempo otorgado durante la realización de éste y otros proyectos. A los miembros del comité tutorial, Dr. Enrique Juárez Aguilar y Dr. Juan Santiago García, por sus aportaciones para enriquecer y mejorar éste trabajo.

Del mismo modo, a las Jurisdicciones V de Xalapa, VIII de Veracruz y el Laboratorio Estatal de Salud Pública por la donación de las muestras de esputo.

También, al recurso del programa de becas para estudios de posgrado otorgado por el CONACYT No. de Becario 666637.

Al programa de la maestría en Ciencias de la salud, así como al personal, maestros e investigadores del Instituto, por el apoyo y las enseñanzas para mi formación profesional.

A mis amigos de laboratorio, Daniela, Esdras, Carlos y Elizabeth, por soportarme en los momentos de estrés y por estar siempre presente cuando más los necesité; a mis compañeros de la maestría y doctorado en Ciencias de la Salud.

De manera especial, quiero agradecer a mis compañeras de generación de la maestría, Pao, Rebeca, Caro y Wendy, porque sin su compañerismo y amistad, esta etapa de mi vida no hubiese sido la misma, saben que las aprecio mucho.

Agradezco a mis padres por ser mi soporte y por apoyarme incondicionalmente en cada uno de mis objetivos, deseo ser siempre un orgullo para ustedes.

A mis hermanos, Aimeé y Julio por confiar en mí y apoyarme en este proyecto, espero ser siempre un ejemplo a seguir para ustedes.

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y que afecta principalmente al pulmón. La inmunopatología de la tuberculosis involucra la formación de estructuras celulares denominadas granulomas. En este sentido, se ha observado que el bacilo estimula la secreción de metaloproteasa de matriz extracelular-9 (MMP-9) del hospedero a través de la proteína micobacteriana ESAT6, por lo que se sugiere que la MMP-9 podría estar involucrada en la formación del granuloma.

Sin embargo, en la literatura no se han reportado estudios que demuestren la relación entre los niveles de MMP-9 y la carga bacteriana. El utilizar muestras de esputo con diferentes niveles de concentración bacteriana, permitió evaluar la actividad de MMP-9 con el grado de evolución de la enfermedad y desde el sitio directo de la infección. Por lo que el objetivo de este proyecto fue determinar la relación de la actividad de MMP-9 y la carga bacteriana en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis.

Se recolectaron 39 muestras de esputo de pacientes sin tuberculosis y 48 muestras con tuberculosis. El resultado de la técnica de baciloscopía permitió conformar el grupo sin infección (control negativo) con 39 muestras y el grupo de individuos con tuberculosis, formando dos sub-grupos: 1) De Baja carga bacteriana (BCB) con 12 muestras y el de Alta Carga Bacteriana (ACB) con 36 muestras.

La actividad de la MMP-9 y sus formas se determinó por la técnica de zimografía y los geles se analizaron por densitometría. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SigmaPlot y la diferencia entre grupos se determinó por medio de la prueba de U Mann Whitney.

Los resultados demostraron que existe una diferencia entre la actividad de MMP-9 activa del grupo control negativo contra el de BCB ($p=0.024$), también se apreció una diferencia significativa entre el grupo control negativo contra el grupo de ACB ($p<0.001$). Sin embargo, el análisis de la actividad del grupo de BCB contra el grupo de ACB no mostró diferencias significativas ($p=0.559$) a pesar de que se observó una tendencia de mayor actividad de MMP-9 activa en el grupo de ACB.

Esta diferencia en el comportamiento de la actividad de MMP-9 activa en las muestras de esputo podría explicarse debido a que en el pez cebra infectado con *Mtb* se ha observado que el bacilo estimula la secreción de MMP-9 por parte del huésped, y mientras mayor sea la carga bacteriana, mayor la actividad de MMP-9. Además, este aumento de la actividad podría tener una explicación fisiológica y funcional debido a que en el lugar de la infección por tuberculosis existe un proceso inflamatorio que daña al tejido pulmonar, y son precisamente las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), las enzimas principalmente encargadas en la reparación del tejido dañado, es por ello que se requiere una mayor cantidad de ellas conforme aumenta la infección.

En conclusión podemos decir que fue posible establecer una relación entre la actividad de MMP-9 activa y la carga bacteriana, lo cual sugiere que su expresión podría estar directamente relacionada con el agravamiento de la infección causada por esta infección, por lo que se propone un mayor análisis de la MMP-9 para que sea propuesto como un marcador predictivo de eficacia para el tratamiento contra tuberculosis.

Palabras clave: Tuberculosis, Metaloproteasas de matriz extracelular, granuloma, carga bacteriana, esputo.

LISTA DE ABREVIATURAS

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

OSM: Oncostatina M

SDS: Dodecil sulfato de sodio

TAES: Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado

LAM: Lipoarabinomanano

BAAR: Bacilo Alcohol Ácido Resistente

CMH: Complejo de mayor histocompatibilidad

IL-1: Interleucina 1

IL-12: Interleucina 12

MMP: Metaloproteasas de matriz extracelular

MMP-2: Metaloproteasa de matriz extracelular-2

MMP-9: Metaloproteasa de matriz extracelular-9

MEC: Matriz extracelular

TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteasas

LESP: Laboratorio Estatal de Salud Pública

ESX-1: Sistema de secreción ESX

RD1: Locus genómico llamado "región de diferencia 1"

ESAT-6: Proteína secretada por *Mycobacterium tuberculosis* de función desconocida

NGAL: Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES	13
Generalidades de la tuberculosis	13
Patología de la tuberculosis	13
Estructura del granuloma	15
Generalidades de las metaloproteasas de matriz extracelular	16
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> estimula la producción de MMP-9	18
JUSTIFICACIÓN	23
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
HIPOTESIS	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
METODOLOGÍA.....	24
Diseño de la investigación.....	24
Universo de estudio.....	24
Criterios de inclusión de muestras de pacientes con tuberculosis	26
Criterios de inclusión de muestras de pacientes sin tuberculosis.....	26
Criterios de eliminación	27
Definición de variables.....	28
ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS	29
Estandarización de la técnica de baciloscopía.....	29
Estandarización de la técnica de zimografía	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
RESULTADOS.....	35
Baciloscopía y conformación de grupos de estudio	35
Análisis de la actividad de MMP-9	35
Análisis por densitometría	37
Análisis estadístico de la actividad enzimática de MMP-9 y sus formas	38

CONCLUSIONES.....	48
PERSPECTIVAS.....	48
CONSIDERACIONES ÉTICAS	49
CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO I Protocolo de técnicas, soluciones y reactivos.....	55
ANEXO II. Zimogramas	68

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), el cual afecta principalmente al pulmón. En el 2015 se consideró como la primera causa mundial de mortalidad originada por un agente infeccioso (1.4 millones de personas)(1) y en el mismo año 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis, además se estima que un tercio de la población está infectada por el bacilo por lo que representa un serio problema de salud a nivel mundial(2).

En el 2015 se diagnosticaron 22,294 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas en México, el estado con mayor incidencia fue Baja California (57.1 por 100,000 habitantes), mientras que Veracruz presentó una incidencia de 25.8 por 100,000 habitantes, muy por arriba de la media nacional (17 por 100,000 habitantes)(3).

Dentro de la patología de la tuberculosis, la formación de granulomas es un evento característico que ocurre por la presencia de agentes patógenos de vida intracelular; los granulomas son estructuras que comprenden el agrupamiento de células fagocíticas como macrófagos(4,5). Se trata de un nódulo de células que se encuentra bien definido, además, en el centro del granuloma se encuentran delimitados los bacilos de *Mtb*(6).

La formación y el mantenimiento de los granulomas son esenciales para el control de las infecciones por micobacterias, pero paradójicamente, también son responsables de la inmunopatología típica causada por tuberculosis pulmonar, es decir, la propensión a daños en los tejidos y facilitar la propagación de bacilos(7).

Poco se sabe de los factores involucrados en la formación del granuloma, sin embargo se ha propuesto la participación de la MMP-9 debido a su capacidad de reclutar células, en este sentido se ha demostrado que el bacilo y algunas células epiteliales y macrófagos que forman parte del granuloma estimulan y secretan MMP-9(8–11).

Diversos estudios han descrito que en modelos animales, de cultivo celular y en muestras clínicas de individuos infectados con tuberculosis aumenta la producción de MMPs en la infección por tuberculosis(11–22) y que la MMP-9 es la primer

enzima extracelular secretada que participa en la fusión de macrófagos y modulación de estos durante el proceso inflamatorio causado por *Mtb*(23).

En un modelo animal se observó que ratones infectados con *Mtb* y tratados con un inhibidor de metaloproteasas desarrollaron un retraso en la formación de granulomas o formaron granulomas pequeños, sugiriendo que las MMPs podrían regular la migración celular y formación del granuloma(12).

También, se ha observado que el bacilo por sí mismo estimula la secreción de MMP-9 en el hospedero a través de la proteína ESAT6, una proteína de la micobacteria secretada por el sistema de secreción ESX-1 codificada por RD1(8), amplificando así la producción de MMP-9 en la infección por tuberculosis.

Sin embargo, no se han descrito reportes en los que se utilice la muestra de esputo, la cual proviene del pulmón; la importancia de utilizar este tipo de muestras radica en que permitiría evaluar la actividad de MMP-9 directamente desde el sitio donde se está llevando a cabo la infección por tuberculosis. Este aspecto es importante, debido a que existen estudios que demuestran que la respuesta inmune en tuberculosis difiere entre el análisis de muestras de sangre periférica en comparación del análisis de fluidos provenientes desde el sitio donde se lleva a cabo la infección. Por ejemplo, se ha observado que el perfil de secreción de citocinas así como la activación de células, como macrófagos, en la respuesta inmune sistémica es diferente de la respuesta inmune local (24,25), lo cual sugiere que los niveles de secreción de metaloproteasas podrían diferir de acuerdo al tipo de muestra que se analiza, por lo que no se reflejarían adecuadamente los niveles de metaloproteasa presentes en la enfermedad.

De igual manera, no se han encontrado investigaciones que relacionen el incremento de la actividad de MMP-9 con el incremento de la carga bacteriana en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis o que evalúen el posible uso de la actividad de MMP-9 como posible indicador del grado de avance de tuberculosis tomando en cuenta la importancia que tiene el bacilo en estimular la secreción de MMP-9 surge la siguiente pregunta de trabajo, ¿Existe relación entre la actividad de la metaloproteasa de matriz extracelular-9 y la carga bacteriana en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis?

Para tal fin, se realizó zimografía en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina para identificar la actividad de MMP-9 y las formas en las que se presenta en muestras de esputo de pacientes con diferente carga bacteriana. Es conveniente mencionar que el término carga bacteriana se define como el número de bacilos *Mtb* que se observan al microscopio en una muestra de esputo teñida y cuya cantidad se cuantifica mediante cruces (una cruz, dos cruces, tres cruces) (26); las cuales se utilizan para evaluar el nivel de infección en un individuo.

Aunado a lo anterior, determinar el número de bacilos es esencial para evaluar la infectividad y la eficacia del tratamiento contra tuberculosis; sin embargo, la baciloscopia posee una sensibilidad y especificidad bajas y variaciones importantes de acuerdo a los laboratorios que la realizan(27). Es por lo anterior que el determinar la relación entre MMP-9 y la concentración de bacterias podría abrir el camino para desarrollar futuras investigaciones enfocadas a proponer el empleo de esta proteína como un marcador predictivo de eficacia para el tratamiento contra tuberculosis.

ANTECEDENTES

Generalidades de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mb*, que afecta principalmente al pulmón y se transmite de persona a persona a través el aire.

Mtb es un bacilo delgado, aerobio estricto, sin motilidad y no formador de esporas. Posee una pared celular de estructura poco común, contiene peptidoglucano, ácidos micólicos y lipoarabinomano (LAM), estos elementos le confieren a la micobacteria una pared celular con un contenido elevado de lípidos (más del 60% de la masa total de la pared celular)(28)(Figura 1).

Debido a las características de la pared celular del bacilo es difícil teñirlo con los colorantes básicos, pero este microorganismo puede resistir la decoloración con alcohol ácido tras la exposición prolongada a un colorante de fucsina básico y con el calentamiento posterior al agregado del colorante, por esta propiedad se le denomina Bacilo Alcohol Ácido Resistente (BAAR)(29).

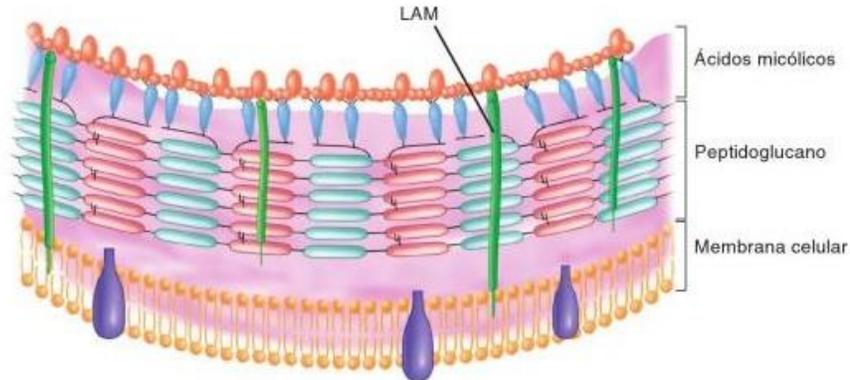


Figura 1. Estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. Tomada de Kenneth R(28).

Patología de la tuberculosis

El proceso de infección comienza cuando una persona sin tuberculosis inhala los bacilos expectorados por un sujeto con tuberculosis activa. Los bacilos inhalados se depositan en los pulmones(30); el sistema inmunológico comienza una respuesta inmune que tendrá como objetivo eliminar los bacilos, esta respuesta

involucra la acción de células con capacidad fagocítica, principalmente de macrófagos, los cuales fagocitan al bacilo pero como *Mtb* tiene la capacidad de sobrevivir dentro de las células fagocíticas y de evadir la respuesta inmune, el bacilo no es eliminado, por el contrario, este comienza a proliferar dentro del macrófago, asimismo se secretan citocinas y quimionas que atraen a otras células fagocíticas como neutrófilos y monocitos, que eventualmente formarán una estructura denominada granuloma(6).

Algunos bacilos se diseminan a los ganglios linfáticos donde los linfocitos T son activados por el complejo de mayor histocompatibilidad (CMH), ocasionando que más células T sean reclutadas al pulmón(6).

En tuberculosis el sistema inmune presenta poca capacidad de eliminar la infección, y como no existe un control del crecimiento bacteriano, el granuloma puede lesionarse y liberar bacilos a vías respiratorias o hematógena, además se ocasiona daño como destrucción del tejido pulmonar que no puede repararse adecuadamente, provocando la destrucción progresiva del pulmón(6)(Figura 2).

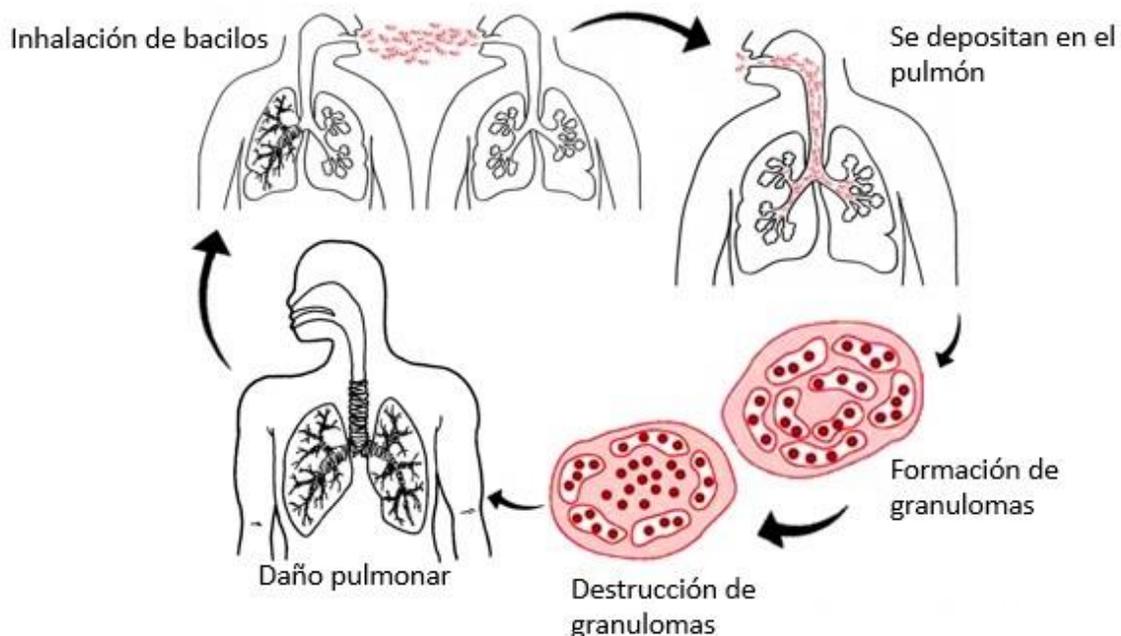


Figura 2. Patología de la tuberculosis. Elaboración propia.

Estructura del granuloma

La patología de la tuberculosis involucra la formación de granulomas, que son un nódulo o masa de células bien definida que se localiza en el pulmón(4,5,23).

El granuloma se produce como resultado de la respuesta inmune, que provoca la atracción de células fagocíticas, principalmente macrófagos, las cuales se agrupan en forma compacta(5), en la periferia del granuloma se distribuyen linfocitos y fibroblastos, mientras que en el centro se encuentra *Mtb* proliferando(5,8,22)(Figura 3).

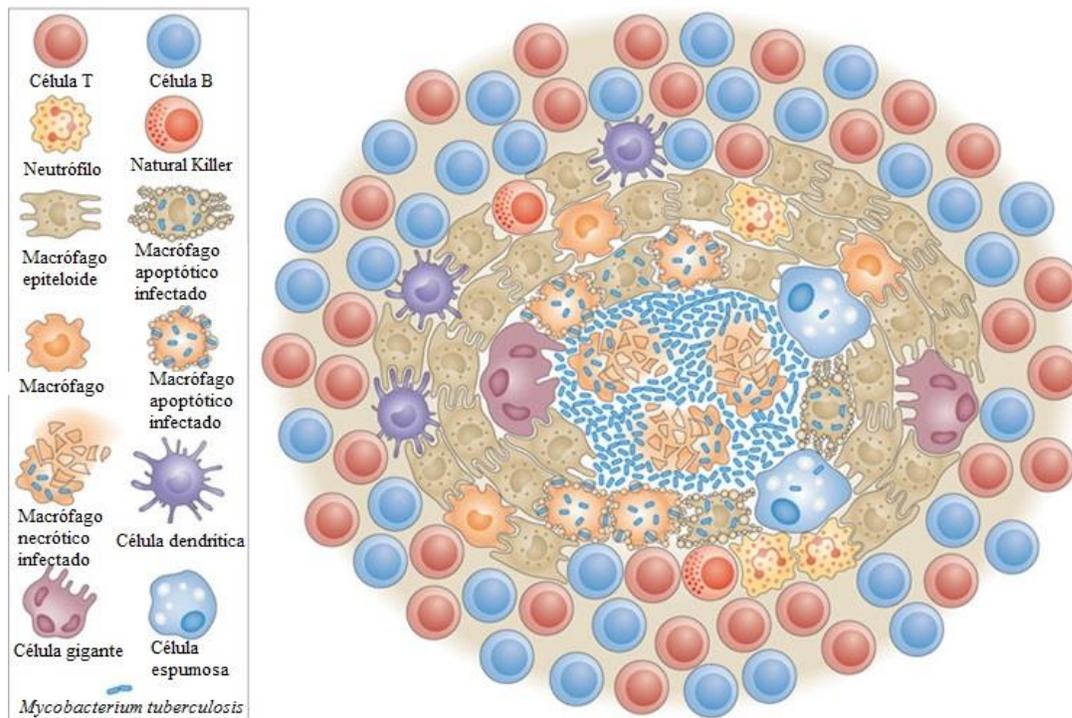


Figura 3. Estructura del granuloma tuberculoso. Tomada de Lalita Ramakrishnan(8).

Durante el proceso de infección, los macrófagos infectados con *Mtb* liberan citocinas como IL-1 (Interleucina 1) e IL-12 (Interleucina-12) que promueven la atracción de células al sitio de la infección, sin embargo poco se sabe de los factores involucrados en la formación de esta estructura, pero se ha tomado en cuenta la participación de las MMPs principalmente de MMP-9(14,22).

Generalidades de las metaloproteasas de matriz extracelular

Las metaloproteasas de matriz extracelular son enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular (MEC)(31–33). Se han descrito 24 metaloproteasas, todas contienen zinc; precisan de un cofactor como el calcio; actúan a pH neutro; se sintetizan como zimógenos por diversos tipos de células como osteoblastos, endoteliales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos, y para llevar a cabo su acción proteolítica requieren de su activación previa(34–36).

Dentro de sus funciones principales se encuentra su participación en el mantenimiento y remodelación de tejidos, por esos los niveles de metaloproteasas son bajos, los cuales se elevan cuando hay necesidad de reparar o remodelar el tejido dañado (32).

La actividad de las metaloproteasas es regulado por cuatro niveles: El primer nivel involucra la expresión del gen con una regulación transcripcional y postranscripcional, el segundo nivel comprende la localización y el ambiente extracelular de la metaloproteasa, el tercer nivel la activación de la enzima por eliminación del pro-dominio y el cuarto nivel comprende la inhibición de la metaloproteasa por inhibidores específicos denominados Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs)(34,36,37)(Figura 4).

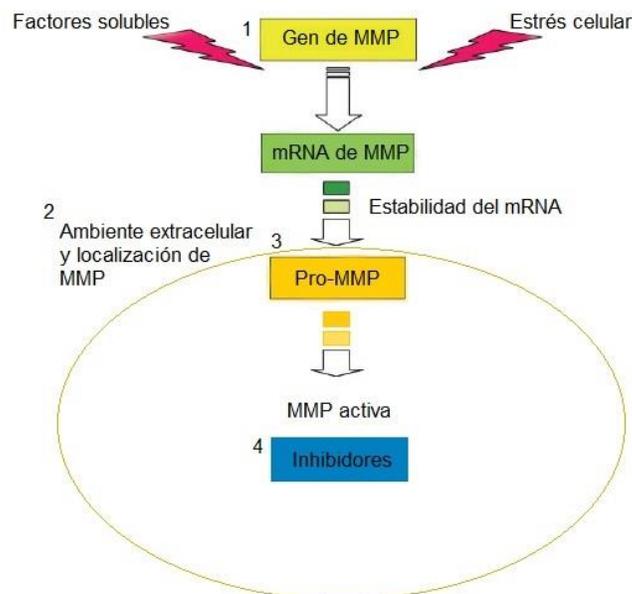


Figura 4. Niveles de regulación de la actividad de las metaloproteasas. Tomada de Löffek(37).

Cada una de la metaloproteasas tienen la capacidad de degradar un componente de la MEC, sin embargo cada componente no es susceptible a la proteólisis de diferentes metaloproteasas, y no todos los componentes pueden ser degradados por cada metaloproteasa(37,38).

Tomando en cuenta el sustrato específico de la metaloproteasa se pueden dividir en seis grupos(20).

- 1) Colagenasas: MMP-1, MMP-8 y MMP-13 y MMP-18
- 2) Gelatinasas: MMP-2 y MMP-9
- 3) Estromelinas: MMP-3, MMP-10 y MMP-11
- 4) Matrilisinas: MMP-7 y MMP-26
- 5) MMPs-tipo membrana: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17 y MMP-25
- 6) Otras metaloproteasas: MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 y MMP-28

Para identificar la actividad de metaloproteasas se utiliza la técnica de zimografía, la cual consiste en una corrida electroforética que permite separar proteínas por su peso molecular. La separación ocurre en geles de acrilamida copolimerizados con un sustrato específico, por ejemplo, para observar la actividad de gelatinasas, se utiliza el sustrato gelatina, el cual puede ser degradado por las enzimas de este grupo (MMP-2 y 9). Después de la electroforesis, el gel es lavado e incubado durante un tiempo definido, durante el periodo de incubación las metaloproteasas en el gel digieren el sustrato, por último, los geles se tiñen con Azul de Coomassie, y en las zonas de actividad enzimática se observarán como bandas claras contra el fondo azul(39).

La técnica de zimografía permite identificar diferentes bandas que representan las formas de la enzima, recordemos que MMP-9 es sintetizada en forma de zimógeno, la cual no presenta actividad enzimática por lo que se denomina forma latente, en el gel se detecta una banda con un peso molecular de 92 kDa; para la activación del zimógeno se requiere un corte proteolítico del pro-dominio de la enzima, lo que da lugar a la forma activa de MMP-9 y en el gel se puede observar

la banda con un peso molecular de 82 kDa(37). También se puede detectar una banda de 220 kDa que corresponde a la homodimerización de MMP-9, la diferencias entre el monómero de MMP-9 y el homodímero consisten en propiedades bioquímicas; el monómero es rápidamente activado por MMP-3 y tiene mayor actividad en comparación con el homodímero(40).

Otra forma de la enzima que se observa en el gel es una banda de 125 kDa, que corresponde a la unión de MMP-9 con lipocalina 2 o lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la cual forma parte de una familia de pequeñas proteínas extracelulares capaces de unirse a moléculas hidrofóbicas y que tienen como principal función transportar sustancias lipofílicas, participar en procesos de inmunes y síntesis de prostaglandinas(40,41).; NGAL es identificada como una glicoproteína en complejo con la MMP-9 secretada por neutrófilos y células epiteliales, son altamente inducidas en enfermedades inflamatorias(42), además el complejo MMP-9/NGAL protege a MMP-9 de la degradación proteolítica aumentando la actividad de MMP-9(43).

***Mycobacterium tuberculosis* estimula la producción de MMP-9**

Se ha observado que *Mtb* muestra la capacidad de estimular la producción de MMP-9 a través de células epiteliales, la producción de esta metaloproteasa está mediada por la proteína micobacteriana ESAT6, la cual es secretada por el sistema de secreción ESX-1 codificado por el locus RD1(8)(Figura 5).

La secreción de MMP-9 causa la activación de quimiocinas, que promueven el reclutamiento de nuevos macrófagos al lugar donde se está llevando a cabo la infección provocando la acumulación de células nuevas e infectadas. Aunado a lo anterior, los macrófagos expresan MMP-9 en condiciones inflamatorias causando así un medio de amplificación de la secreción de MMP-9 con el fin de acelerar la formación del granuloma(8)(figura 5).

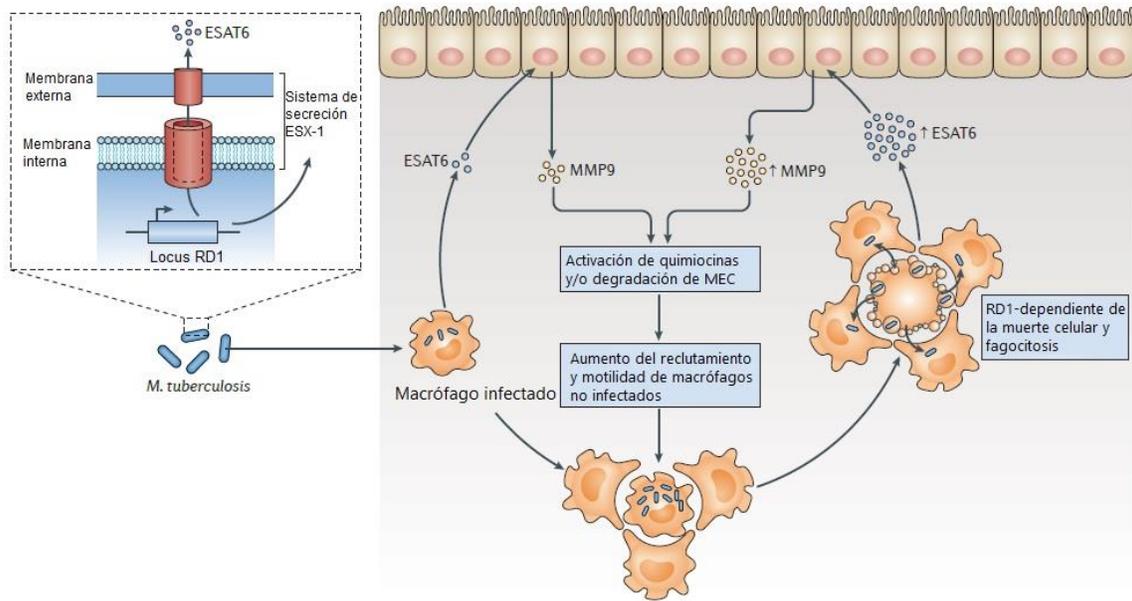


Figura 5. Mecanismo de reclutamiento celular a través de la inducción de MMP9 en células epiteliales. Tomada de Lalita Ramakrishnan(8)

Además, monocitos infectados con el bacilo *Mtb* inducen la sobre expresión génica y secreción de MMP-9, y esta producción se ve aumentada también por la interacción de monocitos infectados con *Mtb* con células epiteliales(17), por ello, en la literatura se ha descrito una representación de los eventos que regulan la secreción de MMP-9 en la infección por tuberculosis(30,44)(Figura 6).

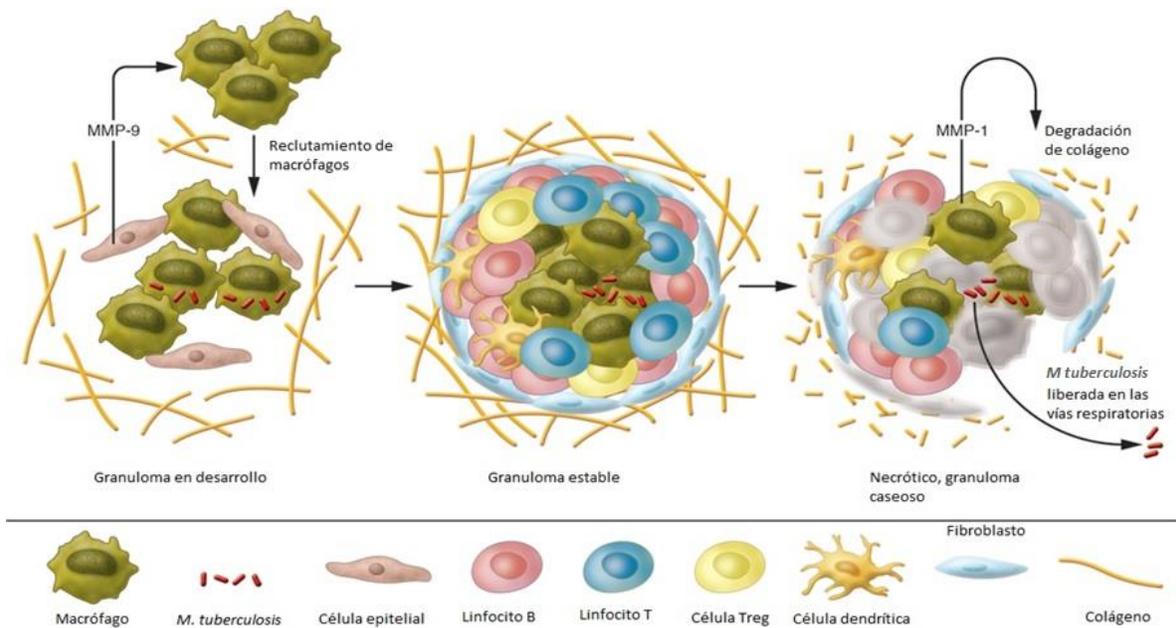


Figura 7. El papel de metaloproteasas de matriz extracelular en la progresión y destrucción del granuloma tuberculoso. Tomada de Salgame P(12).

Debido a que el bacilo tiene capacidad para promover el reclutamiento de células a través de MMP-9 y por la importancia que tienen las metaloproteasa en la función pulmonar, así como en la destrucción del tejido pulmonar asociado a enfermedades pulmonares inflamatorias(12,45), se han realizado estudios en modelo animal y en cultivo celular, enfocados en evaluar la actividad de MMP-9 en la infección por tuberculosis(13,16,17,22), también se ha analizado la actividad de MMP-9 en muestras clínicas de pacientes con tuberculosis(11,18–20).

En dichos estudios se ha observado que en ratones infectados con *Mtb* la actividad de MMP-9 es mayor a la segunda y tercera semana después de la infección, en comparación con el día 0 de la infección(13–15,22). Por otra parte, en estudios en cultivo celular, se han descrito resultados similares, en estos casos, las células infectadas con *Mtb* inducen una mayor actividad de MMP-9, en comparación de células estimuladas con *Mycobacterium bovis* o con células no estimuladas(16–18).

Aunado a las investigaciones anteriores, diversos autores han reportado que en muestras clínicas de pacientes con tuberculosis se aprecia un aumento elevado de

la actividad de MMP-9 en muestras de fluido pleural(11,20), en muestras de fluido cerebroespinal(18), en muestras de esputo inducido(21) y en muestras de suero sanguíneo(19).

JUSTIFICACIÓN

Se han descrito diversos reportes enfocados en evaluar la actividad de MMP-9 en la infección por tuberculosis. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones utilizan modelos animales, cultivo celular o muestras clínicas como sangre periférica o fluido pleural(11,13,16,17,19,22). Tanto los modelos animales como los tipos de muestra que se han analizado poseen como desventaja principal que no aportan información de la actividad de MMP-9 a nivel local, es decir, en el pulmón, lo que genera un vacío de conocimiento sobre la actividad de esta proteína en dicho órgano.

Este estudio utilizó muestras de esputo para analizar la actividad de las diferentes formas de MMP-9 a nivel local, tomando en cuenta que el esputo proviene de forma espontánea del pulmón después de expectorar. Utilizar este tipo de muestra permitió evaluar la actividad de las formas de MMP-9, desde el sitio donde se está llevando a cabo la infección por tuberculosis pulmonar, recordando que es en el pulmón donde comienza la formación y destrucción del granuloma, así como la secreción de MMP-9 por macrófagos y otros tipos celulares:

El analizar muestras de esputo permitió además conocer el grado de carga bacteriana presente en el individuo, y de esa manera relacionarla con la actividad de las formas de MMP-9, ya que se ha observado que el bacilo por sí mismo estimulan la secreción de MMP-9(8), sin embargo, no existen reportes en donde se describa la existencia de una relación entre el incremento de la actividad de las formas en que se presenta MMP-9 y el aumento de la carga bacteriana.

Encontrar una relación entre la carga bacteriana y la actividad de MMP-9 servirá de base para proponer el desarrollo de posteriores investigaciones que evalúen con mayor detalle la factibilidad de emplear a MMP-9 como un potencial marcador predictivo de eficacia para el tratamiento contra tuberculosis. Lo anterior permitirá evaluar con mayor detalle el control en el tratamiento y/o el seguimiento de la evolución de la infección en los pacientes con tuberculosis.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la relación entre la carga bacteriana y la actividad de MMP-9 en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis?

HIPOTESIS

Existe un incremento en la actividad de MMP-9 de acuerdo con el nivel de carga bacteriana en las muestras de esputo de pacientes con tuberculosis.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación de la actividad de MMP-9 y la carga bacteriana en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la carga bacteriana por la técnica de baciloscopia de las muestras de esputo de pacientes con tuberculosis
2. Determinar, a partir de muestras de esputo de pacientes con diferentes niveles de carga bacteriana, la actividad enzimática de MMP-9 y sus formas mediante zimografía
3. Establecer la relación entre la actividad enzimática de MMP-9 y sus formas y la carga bacteriana

METODOLOGÍA

Diseño de la investigación

Se realizó un estudio transversal, comparativo y analítico. Esta investigación se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Ecología y Salud del Instituto de Salud Pública perteneciente a la Universidad Veracruzana.

Universo de estudio

El muestreo fue por conveniencia, se analizaron 48 muestras de esputo de pacientes con tuberculosis y 39 muestras de esputo de pacientes sin tuberculosis.

Estas muestras fueron donadas por la jurisdicción V de Xalapa, VIII de Veracruz y el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) del Estado de Veracruz.

Población de estudio

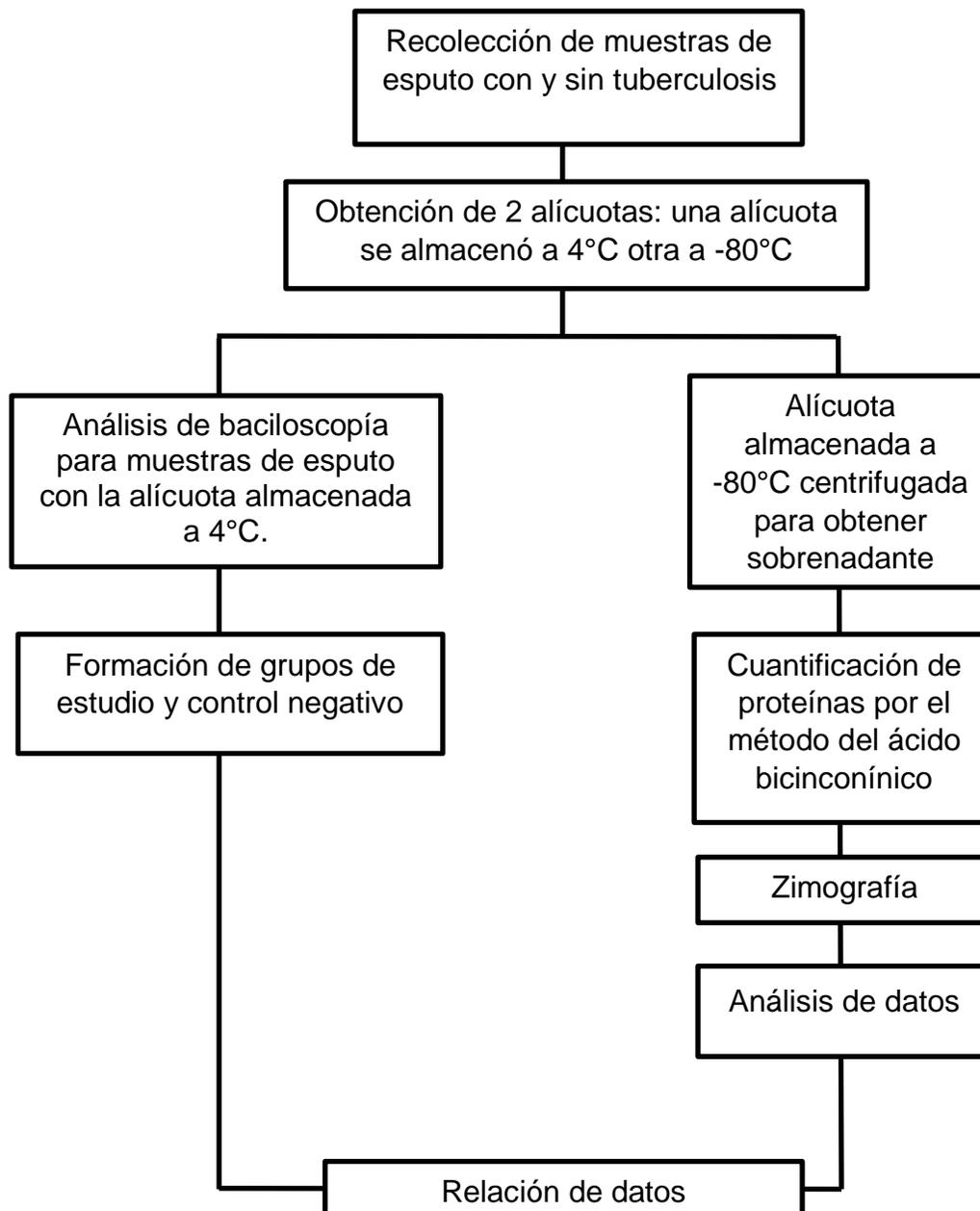
Las jurisdicciones sanitarias y el LESP, realizaron las pruebas diagnósticas confirmatorias de tuberculosis de acuerdo a lo establecido en la normatividad nacional.

Las muestras de esputo provenientes de pacientes sin tuberculosis (controles sanos), fueron de individuos que se presentaron al servicio médico con un cuadro de sospecha de infección por tuberculosis (tos por más de 15 días, fiebre y baja de peso). Sin embargo, fueron descartados posteriormente mediante baciloscopía negativa y seguimiento médico por parte de la jurisdicción sanitaria.

Así mismo, se proporcionó información como edad y sexo de cada paciente que se incluyó en este estudio, dicha información se obtuvo a partir de la solicitud del examen bacteriológico que manejan las jurisdicciones y el LESP.

Para una mayor comprensión del diseño experimental y de manera esquemática se incluye un diagrama que describe el proceso que se llevó a cabo para cada una de las muestras de esputo en este proyecto.

Los protocolos de las técnicas, soluciones y reactivos se describen a detalle en el anexo I.



Criterios de inclusión de muestras de pacientes con tuberculosis

- Muestras de pacientes diagnosticadas con tuberculosis mayores de 18 años y de sexo indistinto

Criterios de inclusión de muestras de pacientes sin tuberculosis

- Muestras de pacientes sin tuberculosis mayores de 18 años y de sexo indistinto

Criterios de eliminación

- Pacientes que presenten muestra de esputo insuficiente

Definición de variables

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable/ Escala de medición	Instrumento de medición
Actividad enzimática de metaloproteasas de matriz extracelular-9	Actividad proteolítica mediante la cual las metaloproteasas degradan la matriz extracelular localizada entre las células, la cual es regulada por los inhibidores tisulares de las metaloproteasas de la matriz extracelular.	Cantidad de sustrato (gelatina) degradado en geles copolimerizados con gelatina, durante 1 hora de incubación	Cuantitativa/ De razón	Resultado del análisis por densitometría
Carga bacteriana	Número de bacilos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en una muestra de esputo.	Número de Bacilos Alcohol Ácido Resistentes observados en la tinción de Ziehl-Neelsen.	Cuantitativa Discreta/ De intervalo: • Positivo (+): Se observa entre 10 a 99 BAAR en 100 campos observados • Positivo (++) : Se observan de 1 a 10 BAAR en 50 campos observados • Positivo (+++) : Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Resultado de la técnica de baciloscopia.
Edad	Es el tiempo transcurrido entre el día, mes y año de nacimiento y el día, mes y año en que ocurrió y/o se registró el hecho vital(46).	Número de años cumplidos hasta el momento de aplicación del cuestionario.	Cuantitativa Discreta/ De razón: Número de años	Solicitud del examen bacteriológico. Promedio
Sexo	Diferencias y características biológicas, anatómicas, fisiológicas y cromosómicas de los seres humanos que los definen como hombres o mujeres(47).	Categoría biológica en la que se clasifican los seres humanos.	Cualitativa Nominal/ Nominal: Hombre, Mujer	Solicitud del examen bacteriológico. Frecuencia absoluta

ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS

Estandarización de la técnica de baciloscopía

Con la finalidad de confirmar el diagnóstico generado por la baciloscopía y de poder así ubicar el grupo al que pertenecía cada muestra de esputo, se estandarizó y realizó la técnica de baciloscopía, en virtud de que esta información fue primordial para el desarrollo de este proyecto.

Para comprobar la estabilidad de los reactivos y soluciones se realizaron dos frotis utilizando colonias de una cepa de *Mtb* cultivada en medio de cultivo Löwenstein-Jensen. Estas tinciones aseguran la presencia de BAAR. La figura 8 muestra la presencia de BAAR coloreados por el reactivo carbol-fucsina, además dichos BAAR se observan de acuerdo a como describen el manual de la Secretaria de Salud y OPS, es decir, en forma de bastón delgado, ligeramente curvos, rojo fucsia(48,49).

Dichos resultados muestran la preparación adecuada de los reactivos y soluciones utilizados en la tinción, y por ende, confirma la estabilidad de estos para poder utilizarlas (Figura 8 A y B).

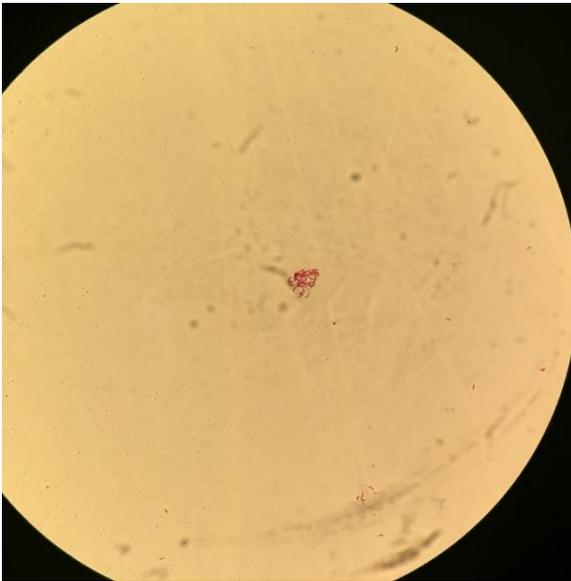


Figura 8. A) Microfotografía del frotis número 1(100x).

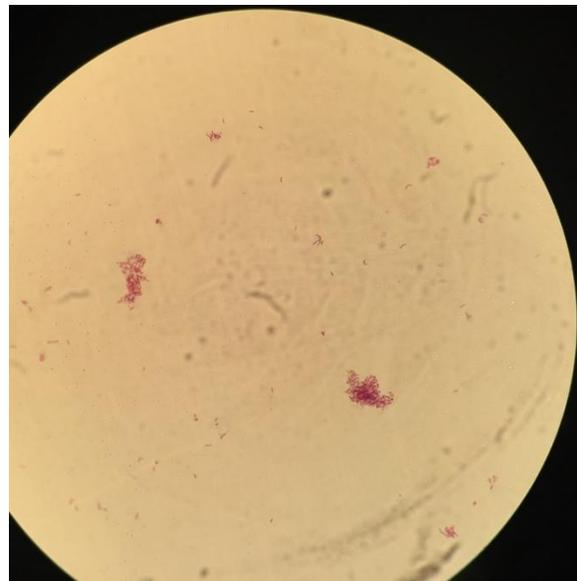


Figura 8. B) Microfotografía del número 2 (100x).

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica adoptada, se realizaron tres frotis utilizando muestras de esputo de pacientes con tuberculosis previamente confirmada. Los resultados de las tinciones (Figura 9 A, B y C) permitieron comprobar que la técnica que se implementó es reproducible en muestras de esputo positivas a BAAR, si bien, en ocasiones pueden observarse los bacilos aislados, apareados o agrupados es una característica normal en este tipo de tinciones(49).



Figura 9.A) Microfotografía del frotis número 1 de la muestra de esputo (100x).



Figura 9. B) Microfotografía del frotis número 2 de la muestra de esputo (100x).



Figura 9. C) Microfotografía del frotis número 3 de la muestra de esputo (100x).

Los resultados de las lecturas de las tinciones realizadas en las tres muestras de esputo fueron las siguientes:

Número de frotis	Informe de resultados de la jurisdicción o LESP	Informe de resultados de la baciloscopía estandarizada
1	Positivo (++)	Positivo (++)
2	Positivo (+++)	Positivo (+++)
3	Positivo (+)	Positivo (+)

Estandarización de la técnica de zimografía

Para identificar la actividad de MMP-9 se realizó la técnica de zimografía, se utilizaron geles de acrilamida como control de carga de proteínas totales y para observar integridad de la proteína, y un gel de acrilamida copolimerizado con gelatina para observar la actividad enzimática de gelatinasas (MMP-2 y -9). Es importante mencionar que fue necesario estandarizar el tiempo de incubación de los geles copolimerizados con gelatina.

Es por ello, que se evaluaron diferentes tiempos de incubación de 4, 8, 12, 18 y 24 horas en geles copolimerizados con gelatina, utilizando el sobrenadante de la muestra 3 del grupo de ACB, cargando 2.5 µg en cada pozo del gel. Los resultados de este experimento mostraron que los tiempos de incubación de 8, 12, 18 y 24 horas no son los adecuados para poder obtener bandas bien definidas, sin embargo, se puede observar una mejor separación de las bandas en el gel con un tiempo de incubación de 4 horas (figura 10). Por lo tanto, se procedió a planificar otro ensayo tomando en cuenta un menor tiempo de incubación. Los resultados de este último ensayo se muestran en la figura 10.

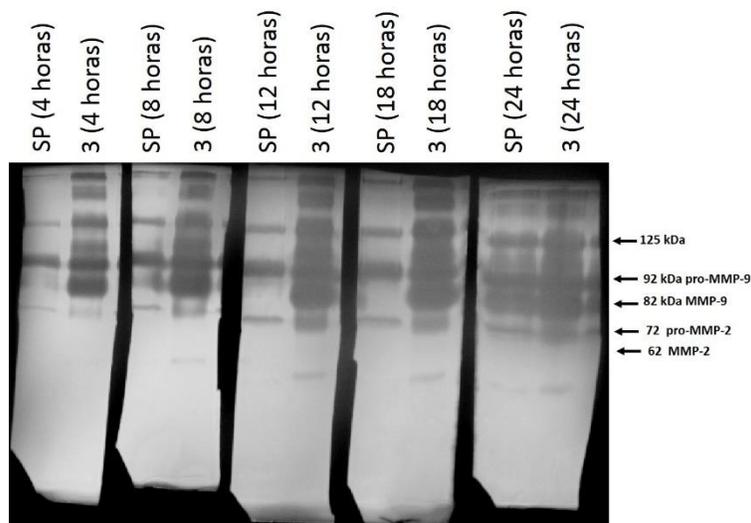


Figura 10. Detección de actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 en muestras de esputo con tuberculosis en geles copolimerizados con gelatina al 8.5%. Abreviaturas: SP: Sangre periférica (9 μ l). Carril 1, 3, 5, 7 y 9: SP (9 μ l). Carril 2: Sobrenadante muestra 3 con 4 horas de incubación. Carril 4: Sobrenadante muestra 3 con 8 horas de incubación. Carril 6: Sobrenadante muestra 3 con 12 horas de incubación. Carril 8: Sobrenadante muestra 3 con 18 horas de incubación. Carril 10: Sobrenadante muestra 3 con 24 horas de incubación. La concentración de proteínas fue ajustada a 2.5 μ g por pozo.

El siguiente experimento que se realizó contempló los tiempos de incubación de 1, 2, 3, 4 y 24 horas, se consideró repetir los tiempos de incubación de 4 y 24 horas para poder demostrar que este nuevo ensayo presentó las mismas condiciones que el primer experimento, por lo tanto se utilizó el sobrenadante de la misma muestra (número 3, perteneciente al grupo de ACB).

Al incubar el gel por 1, 2, 3 y 4 horas permite observar actividad enzimática de gelatinasas y obtener bandas definidas para llevar a cabo su análisis (figura 11). Sin embargo, se decidió seleccionar el tiempo de incubación de 1 hora porque se consideró que representa el tiempo adecuado para observar la actividad enzimática de MMP-9 y permite identificar diversas bandas con mayor definición. Por otra parte, seleccionar un tiempo de incubación mayor a 4 horas podría no ser

conveniente para realizar el análisis porque se observan bandas no definidas (Figura 11).

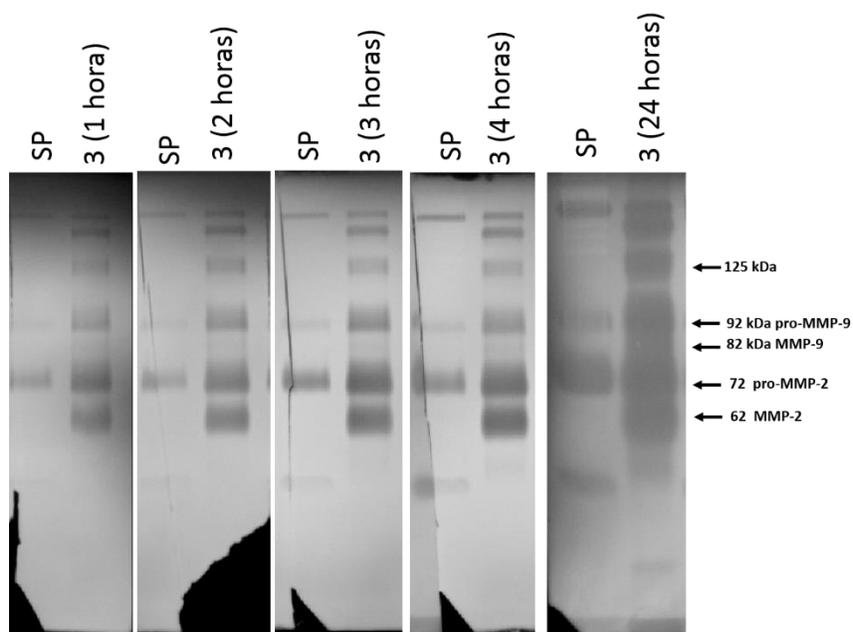


Figura 11. Detección de actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 en muestras de esputo con tuberculosis en gel copolimerizado con gelatina al 8.5%. Abreviaturas: SP: Sangre periférica (9 μ l). Carril 1, 3, 5, 7 y 9: SP (9 μ l). Carril 2: Sobrenadante muestra 3 con 24 horas de incubación. Carril 4: Sobrenadante muestra 3 con 4 horas de incubación. Carril 6: Sobrenadante muestra 3 con 3 horas de incubación. Carril 8: Sobrenadante muestra 3 con 2 horas de incubación. Carril 10: Sobrenadante muestra 3 con 1 hora de incubación. La concentración de proteínas fue ajustada a 2.5 μ g por pozo

A partir de los resultados obtenidos, los ensayos de zimografía se realizaron con geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina y se incubaron por 1 hora a 37°C.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información se procesó mediante el programa estadístico SigmaPlot. Los datos no paramétricos son representados como medianas del grupo control negativo y

de los grupos de BCB y ACB. Se realizó un análisis de diferencia entre grupos mediante la prueba de U Mann Whitney para muestras no paramétricas. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Se recolectaron 87 muestras de esputo durante el periodo de Junio 2016-Julio 2017, 6% (n=5) provenientes de la jurisdicción VIII de Veracruz, 47 % (n=41) de la jurisdicción V de Xalapa y 47 % (n=41) del LESP.

De las 87 muestras incluidas en el estudio, 48 muestras son de pacientes con tuberculosis, de estas, el 69% (n=33) corresponden a muestras de pacientes masculinos y el 31% (n=15) a femeninos, mientras que la edad promedio en años de pacientes con tuberculosis fue de 44 ± 14 .

Baciloscopía y conformación de grupos de estudio

Con respecto a la conformación de los grupos de trabajo, los resultados de la técnica de baciloscopía, permitieron conformar los grupos de trabajo; se formó el grupo control negativo compuesto por 39 muestras de esputo con resultado negativo a tuberculosis, es decir, no se observaron bacilos en 100 campos; el grupo de BCB conformado por 12 muestras con un resultado positivo de una cruz, es decir, con 10 a 99 bacilos en 100 campos observados; el grupo de ACB constituido por 36 muestras con un resultado positivo de dos y tres cruces, es decir, muestras en donde se observaron de 1 a 10 bacilos por campo en 50 campos observados, y más de 10 bacilos por campo en 20 campos respectivamente.

De esta manera se cumple con el objetivo específico número uno, debido a que el resultado de la baciloscopía permitió determinar la carga bacteriana en las muestras de esputo de pacientes con tuberculosis.

Análisis de la actividad de MMP-9

Para cumplir con el objetivo específico número dos, se realizó la técnica de zimografía a las 87 muestras recolectadas, como se mencionó en el apartado de metodología, se llevó a cabo el corrimiento electroforético de geles de acrilamida, como control de carga de proteínas totales y para observar integridad de la proteína, y acrilamida copolimerizados con gelatina para detectar la actividad enzimática de MMP-9 y sus formas. Es así, que se logró identificar las formas que

presenta MMP-9, es decir, una banda de 220 kDa que representa la forma homodimérica de MMP-9, otra banda de 125 kDa que corresponde a MMP-9 asociada a lipocalina, una banda de 92 kDa que pertenece a la forma latente y otra banda a 82 kDa para la forma activa de MMP-9. En paralelo, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida y se tiñeron con Azul de Coomassie.

Posteriormente, la presencia de las bandas permitió cuantificar de manera específica cada una de las formas de la enzima, para después llevar a cabo el análisis más específico y no solo de la actividad total de MMP-9 en la infección por tuberculosis. Esto último se consideró importante porque en nuestro conocimiento no se han encontrado en la literatura estudios que determinen la cantidad de enzima presente en la infección por tuberculosis tomando en cuenta cada una de las formas de MMP-9 y relacionar dicha cantidad de enzima con la función que cumple cada una de estas, lo que permitió comprender su relación con la infección por tuberculosis.

Con el objetivo de poder apreciar los resultados de la técnica de zimografía de las muestras de esputo, se presenta un gel representativo por grupo de trabajo formado (Figura 12) y se adjuntan como anexo las imágenes restantes de los geles (zimogramas) (Anexo II).

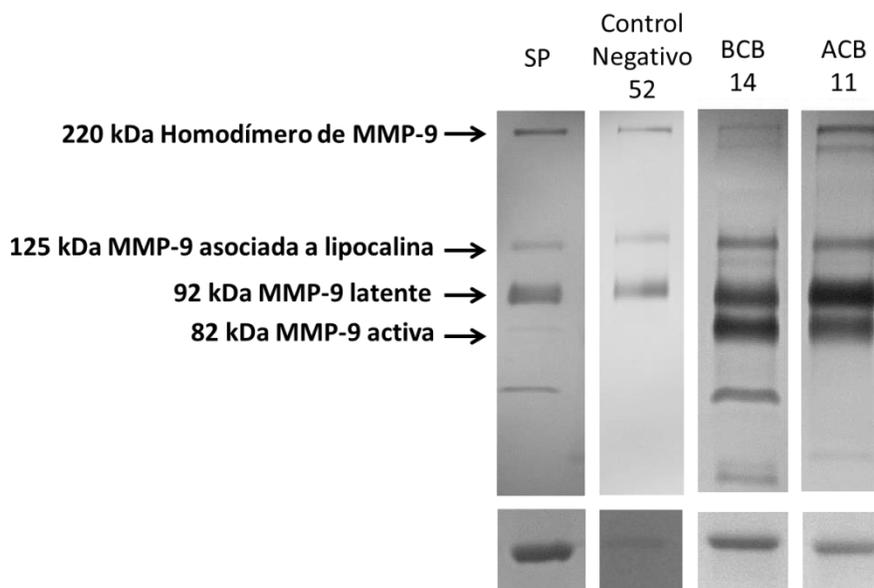


Figura 12. Detección de actividad enzimática de MMP-9 y sus formas en muestras de esputo con tuberculosis en gel copolimerizado con gelatina al 8.5%. Abreviaturas: SP: Sangre periférica (9 μ l). Carril 1: SP con Buffer de carga. Carril 2: Sobrenadante muestra 52 (control negativo). Carril 3: Sobrenadante muestra 14 (Grupo BCB). Carril 4: Sobrenadante muestra 11 (Grupo ACB). La concentración de proteínas fue ajustada a 2.5 μ g por pozo

Análisis por densitometría

Se utilizó el programa ImageJ, versión 1.48, para cuantificar por densitometría, el área de las bandas detectadas por zimografía en los geles de acrilamida copolimerizados con gelatina. Es importante mencionar que se cuantificó por triplicado cada una de las bandas detectadas en el gel de gelatina para las distintas formas de MMP-9 (activa, latente, dimérica, y asociada a lipocalina) en cada una de las muestras que conformaron los diversos grupos formados. De esta manera se evitaron sesgos de medición al momento de delimitar la banda.

Posteriormente se creó una base de datos mediante el programa Excel para determinar el promedio de las tres mediciones; dicho promedio es la cantidad de enzima con la que se trabajó para realizar el análisis estadístico.

Los resultados de las medianas y percentiles 25% y 75% por grupo se pueden apreciar en la tabla 1, en donde se observa que la actividad de MMP-9 es mayor

en muestras con tuberculosis con baja y alta carga bacteriana, en comparación con el grupo control negativo. Por otro lado, al comparar los grupos BCB y ACB se puede apreciar que la forma dimérica, asociada a lipocalina y latente son mayores en el grupo de BCB, sin embargo, la forma activa se apreció con mayor intensidad en el grupo de ACB.

Forma de la enzima	Grupo Control negativo n=39			Grupo BCB n=12			Grupo ACB n=36		
	Mediana	Percentiles		Mediana	Percentiles		Mediana	Percentiles	
		25%	75%		25%	75%		25%	75%
Homodímero	360	156	954	774	264	3465	690	220	2174
MMP-9 asociada a lipocalina	0	0	1664	1923	0	3932	1530	229	2937
MMP-9 latente	2145	0	7998	5107	2567	10334	4907	2163	6571
MMP-9 activa	0	0	1139	2375	0	7388	4219	1270	5096

Tabla 1. Medianas de la actividad de MMP-9 cuantificada por densitometría (en pixeles) las bandas de los geles de acrilamida copolimerizados con gelatina.

Análisis estadístico de la actividad enzimática de MMP-9 y sus formas

Para atender el objetivo específico número tres relacionado con establecer la relación entre la actividad enzimática de MMP-9 y la carga bacteriana se empleó el análisis estadístico de U- Mann Whitney.

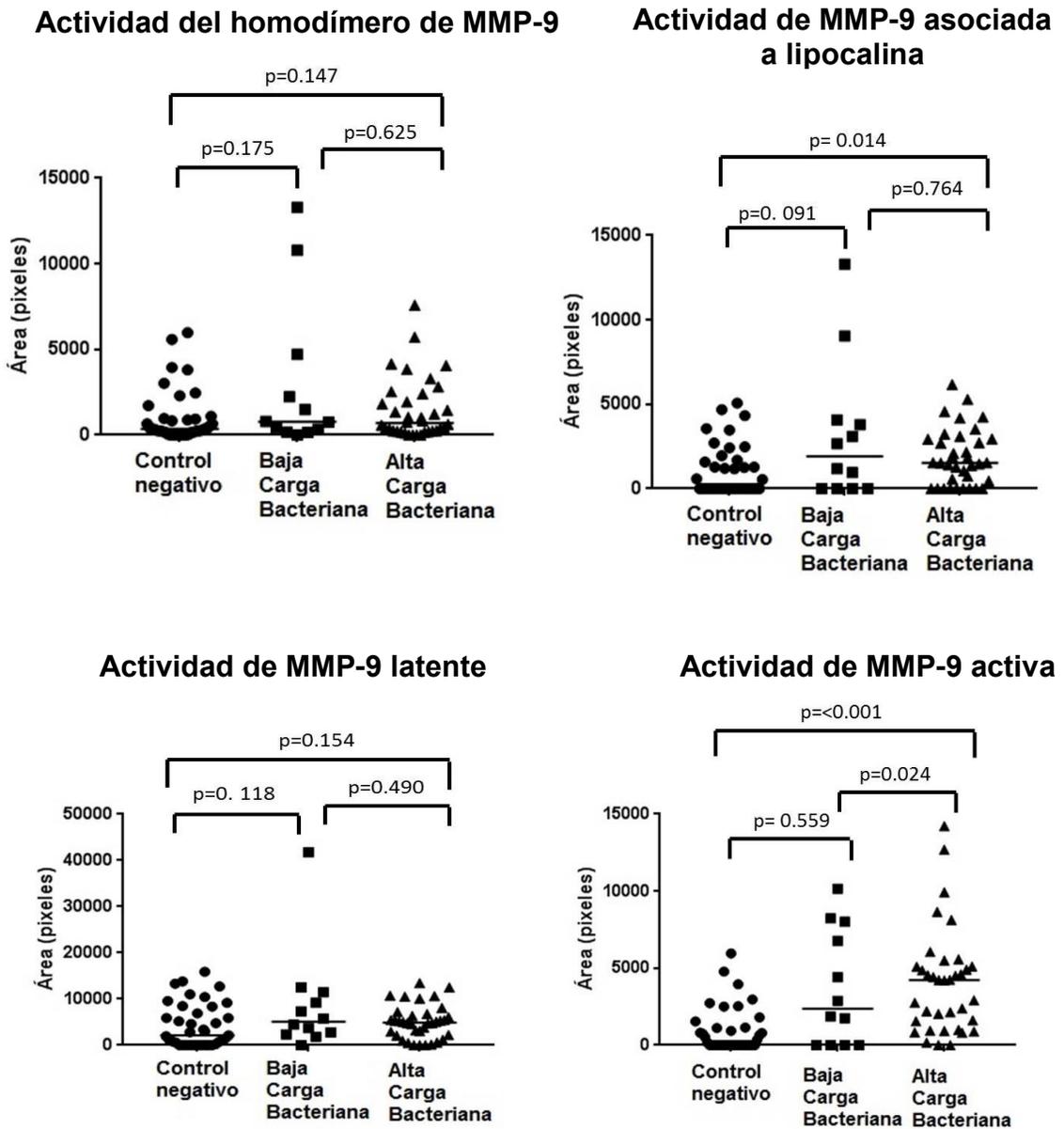
El análisis de la forma dimérica de MMP-9 no mostró diferencias significativas entre los grupos BCB ($p=0.175$) y ACB ($p=0.147$) contra el grupo control negativo, ni entre el grupo de BCB y ACB ($p=0.625$) (gráfica 1A), sin embargo, en la gráfica se observó una tendencia mayor en el grupo de BCB y ACB.

Con respecto al análisis de MMP-9 asociada a lipocalina el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control negativo y BCB ($p=0.091$), entre el grupo BCB y ACB ($p=0.764$), pero si entre el grupo control negativo y ACB ($p=0.014$), pero en la gráfica 1B se observó una tendencia mayor

de la actividad de la enzima en los grupos de BCB y ACB en comparación con el grupo control negativo.

Con respecto a la actividad enzimática de la forma latente de MMP-9, el análisis no mostró diferencias significativas entre el grupo de BCB ($p=0.118$) y ACB ($p=0.154$) contra el grupo control negativo, ni entre los grupos de BCB y ACB ($p=0.490$) (gráfica 1C).

Finalmente al comparar los resultados de MMP-9 en su forma activa en los tres grupos (Figura 1D), fue posible observar que dicha actividad está disminuida en el grupo control negativo, en comparación con los grupos BCB y ACB, con una tendencia al incremento de dicha actividad conforme aumenta la carga bacteriana. Estas diferencias mostraron significancia estadística, de manera que la actividad del grupo de BCB es mayor que en el grupo control negativo ($p=0.024$) y la actividad del grupo de ACB fue mayor en comparación con el grupo control negativo ($p<0.001$). Pero en el análisis de la actividad del grupo de BCB contra el grupo de ACB no se observó diferencia estadística significativa ($p=0.559$), a pesar de que en la gráfica 1D se observó una tendencia mayor de la actividad de MMP-9 en el grupo de ACB en comparación con el grupo de BCB.



Gráfica 1. Actividad de MMP-9 determinada por densitometría en pixeles en muestras de esputo de pacientes con y sin tuberculosis. Cada punto representa la mediana de cada muestra. Se utilizó la prueba de U-Mann Whitney para detectar diferencias entre el grupo control y los grupos de BCB y ACB.

DISCUSIÓN

Se recolectaron 87 muestras de esputo, el 55 % (n=48) sin tuberculosis y el 45 % (n=39) con tuberculosis, de estas últimas la mayoría de pacientes del sexo masculino, 69% (n=33). Este resultado concuerda con lo que se ha reportado a nivel nacional y mundial sobre la predominancia del sexo masculino en esta enfermedad (3,50). Con respecto al promedio de edad en años de pacientes con tuberculosis fue de 44 ± 14 , la cual se encuentra dentro del grupo de edad que se ve más afectado por esta enfermedad (20 años a 65 y más), según lo reportado por la Secretaria de Salud (3,50).

Como se pudo observar en la tabla 1 y grafica 1A, existe un promedio mayor de la actividad del homodímero de MMP-9 en el grupo de BCB y ACB en comparación con el grupo control negativo, sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencia estadística significativa.

Sin embargo, es importante comprender porque se observó mayor actividad de homodímero en muestras con mayor carga bacteriana en comparación con muestras sin tuberculosis, por lo que es conveniente recordar que el homodímero corresponde a la unión de MMP-9 con otra MMP-9(40); cuando MMP-9 se presenta en exceso en relación con su inhibidor endógeno TIMP, esta puede formar dímeros. Asimismo, se ha identificado el homodímero de MMP-9 en células secretoras de MMP-9 como células epiteliales y neutrófilos, además de ser un componente normal del plasma(51). Sin embargo, ensayos bioquímicos demuestran que la forma homodimérica de MMP-9 es más estable y es activada con una eficiencia menor que el monómero de MMP-9. La diferencia de activación entre el monómero y el homodímero sugiere un nivel adicional del control de la actividad catalítica de MMP-9 durante la degradación de la MEC(52,53). Tomando en cuenta lo anterior, nuestros resultados podrían sugerirnos que en la infección por tuberculosis se necesita controlar la activación de MMP-9, porque a mayor activación mayor actividad catalítica, lo que reflejaría en una mayor degradación de la MEC, esto significaría daño al tejido pulmonar. Es por ello, que la formación del homodímero podría ser un mecanismo regulador de la activación de MMP-9.

Con respecto a la forma de MMP-9 asociada a lipocalina, la actividad de este complejo fue mayor en muestras del grupo de BCB y ACB en comparación con el grupo control negativo, sin embargo solo se obtuvo una diferencia estadística significativa entre el grupo control negativo contra el grupo de ACB ($p= 0.014$). El hecho de que exista mayor actividad de esta forma de la enzima en el grupo de ACB podría explicarse porque se sabe que la formación de este complejo está relacionado con proteger la degradación de MMP-9 provocando que exista una mayor actividad de MMP-9(40,42,43,55).

En la literatura se ha encontrado que existe un aumento en la formación de MMP-9 asociado a lipocalina en procesos inflamatorios e invasión celular; además en modelos animales y en humanos se ha observado que la formación de dicho complejo es necesario para el desarrollo de enfermedades malignas y benignas, de igual manera, su expresión está relacionada con la progresión de la enfermedad como en cáncer y tumores(41).

Los procesos mencionados anteriormente no son específicos de una enfermedad, es decir, dentro de la patología de tuberculosis, el proceso de filtración celular es necesario para llevar a cabo la respuesta inmune, la cual involucra la atracción de células fagocíticas para combatir la infección; también la formación del granuloma y la destrucción de ésta estructura se relaciona con la progresión de la enfermedad, debido a que su ruptura provoca la liberación de los bacilos que se encontraban en el centro del granuloma, provocando la diseminación de la infección a otras áreas del organismo, empeorando así la condición del paciente.

Tomando en cuenta lo anterior, podría sugerirse que obtener mayor actividad de MMP-9 asociada a lipocalina en el grupo de mayor carga bacteriana podría deberse a que el organismo necesita de la función de este complejo para atraer células al lugar de la infección para dar lugar a la respuesta inmune, el cual involucra la formación del granuloma; sin embargo, el bacilo aprovecha este evento para sobrevivir y proliferar dentro del granuloma, y como este complejo (MMP-9/lipocalina) también previene la degradación de MMP-9 existe un aumento en la actividad de esta enzima, lo que causaría una progresión de la enfermedad

que consiste en la destrucción del granuloma así como del tejido pulmonar provocando la diseminación de la enfermedad(43).

Con respecto a la forma latente de la enzima, a pesar de que se observó una mediana mayor en el grupo de BCB en comparación con el grupo control negativo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos; sin embargo, al observar la gráfica se puede observar que las medianas de la actividad de MMP-9 latente disminuye del grupo de BCB al grupo de ACB. Esto podría sugerir que en la infección por tuberculosis la secreción de MMP-9 aumenta desde que se presenta la infección; sin embargo conforme avanza el grado de infección la forma latente es activada, por lo que sugiere que la concentración de MMP-9 latente será menor en comparación con su forma activa, cuando existe un aumento de la gravedad de la enfermedad.

Con los resultados se puede sugerir que el organismo necesita que MMP-9 estimule la atracción de células del sistema inmune al sitio donde se está llevando a cabo la infección(6,8); sin embargo, también existe la posibilidad de que los resultados estén relacionados con los hallazgos de Ramos y colaboradores (2015), en ratones infectados con *Mtb*, quienes observaron que la expresión del mRNA de MMP-9 aumenta al día 21 después de la infección pero esta expresión disminuyó conforme avanzaba la infección(56).

Estos resultados podrían explicar porque en el presente proyecto la actividad de la forma latente disminuyó conforme aumento la carga bacteriana, y se podría sugerir que esta disminución de la actividad de la forma latente de MMP-9 puede ser porque el organismo regula la expresión de MMP-9 para poder controlar el aumento de la actividad de la enzima y de esta manera no causar más daño al tejido pulmonar(14).

Por otra parte, el análisis de U-Mann Whitney también demostró que la actividad de MMP-9 en su forma activa es diferente y estadísticamente significativa en el grupo control negativo en comparación con los grupos de BCB y ACB, es decir, se observó mayor actividad de MMP-9 en muestras de pacientes con tuberculosis que en muestras sin tuberculosis. En el mismo sentido, la actividad aumenta

considerablemente desde el grupo de BCB al grupo de ACB, la razón por la que existe más actividad de MMP-9 en el grupo de ACB podría estar relacionado con el hecho de que el bacilo estimula la secreción de MMP-9 a través de una interacción con la proteína micobacteriana ESAT-6, secretada por el sistema de secreción ESX-1, el cual es codificado por el locus RD1 de *Mtb*(8).

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demuestra que la actividad de MMP-9 es mayor en los grupos donde existe una infección por tuberculosis (tanto en el grupo de BCB y el de ACB) en comparación con el grupo control negativo, es decir en ausencia de una infección; por lo que resulta importante recordar que se obtuvo una diferencia significativa entre el grupo control negativo contra el grupo BCB ($p=0.024$), y esta diferencia se incrementó de manera significativa al compararse con el grupo de mayor carga bacteriana ($p<0.001$).

Por lo anterior, que estos resultados confirman la hipótesis planteada en este proyecto, es decir, se observó un incremento de la actividad de MMP-9 de acuerdo con el nivel de carga bacteriana presente en las muestras de esputo de pacientes con tuberculosis, es decir, una mayor actividad de MMP-9 en muestras con mayor carga bacteriana.

Este incremento en la actividad de MMP-9 podría tener efectos quimiotácticos, lo cual podría promovería el reclutamiento de nuevas células como macrófagos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, entre otras. Consecuentemente, estas células serían infectadas por los bacilos inhalados(57) o por bacilos que han proliferado dentro del macrófago al no ser eliminados por el sistema inmune y que han sido liberados por la destrucción de la célula infectada. Las consecuencias principales serían la formación de nuevos granulomas o el incremento en tamaño de los ya formados debido al acumulo de células(8,9,14).

Tomando en cuenta lo anterior, se confirma lo que en la literatura se ha comprobado, que es MMP-9 es la principal metaloproteasa que regula el reclutamiento celular y por lo tanto, la que modula la respuesta inmune(58), por ello, la actividad de MMP-9 es necesaria para el reclutamiento celular y para la formación eficiente del granuloma(16).

En este sentido, se ha descrito que en granulomas de pacientes con tuberculosis, existe una mayor presencia de MMP-9 e interesantemente una expresión disminuida de su inhibidor específico (TIMP-1)(44). Estos resultados podrían sugerir que en los datos hallados en el presente estudio existe una secreción disminuida o insuficiente de TIMP-1, para controlar la MMP-9 secretada en la infección por tuberculosis. Sin embargo, es algo que no podemos asegurar porque no se incluyó en este estudio el análisis de los inhibidores TIMP, por lo que resultaría interesante incluir su análisis en estudios posteriores para poder explicar con mayor certeza esta hipótesis de regulación.

Por otra parte, resulta evidente que en un proceso infeccioso, en donde hay daño al tejido por el proceso inflamatorio como en tuberculosis, la actividad de MMP-9 se encuentra elevada debido a que las metaloproteasas tienen como principal función reparar el tejido dañado(35,59).

En este contexto la literatura coincide con los resultados de esta investigación, ya que se ha observado que los niveles de MMP-9 en suero sanguíneo de pacientes con tuberculosis son tres veces más altos en comparación con el suero de pacientes de personas sanas(19). De manera similar Sheen y colaboradores (2009), observaron, a partir del análisis del líquido pleural de pacientes con tuberculosis, que las concentraciones de MMP-9 fueron mayores en comparación con pacientes con ataques al corazón o cáncer (11).

Ugarte y colaboradores (2013), reportaron concentraciones elevadas de MMP-9 en muestras de esputo inducido de pacientes con tuberculosis en comparación con personas sanas, además, reportaron que existía una asociación entre concentraciones elevadas de MMP-9 con la severidad de la enfermedad (21). Sin embargo, para evaluar la severidad de la enfermedad tomaron en cuenta solo síntomas clínicos de la enfermedad, lo cual no refleja de manera exacta el nivel de carga bacteriana y por lo tanto el nivel de infección en los pacientes(21).

Además, se realizó un análisis de la concentración total de MMP-9, a partir de una muestra de esputo inducida artificialmente y no tomaron en cuenta las formas en las que se presenta la enzima, principalmente la latente y activa, lo cual no muestra si la enzima cuantificada corresponde a la forma activa o latente, lo cual

es importante porque indica que cantidad de enzima esta activa y como se ha observado anteriormente cada forma de la enzima tiene una función específica dentro del organismo.

Price y colaboradores (2001), reportaron que la concentración de MMP-9 en muestras de fluido cerebroespinal de pacientes con tuberculosis meníngea es mayor, en comparación con pacientes con una infección viral u otra infección bacteriana, es decir, en la infección por tuberculosis existe un aumento directo de la actividad de MMP-9(18). Este hecho le da un valor adicional a MMP-9 ya que una concentración elevada confirmaría la presencia de tuberculosis y descartaría otras infecciones que generan cuadros respiratorios con similitud a tuberculosis.

También, se ha reportado que tanto la actividad como la expresión génica de MMP-9 se ve aumentada en ratones infectados con *Mtb*(13), estos resultados concuerdan con lo reportado por Ramos-Martínez y colaboradores (2015), al infectar ratones BALB/c con *Mtb*, quienes observaron que la expresión de MMP-9 fue mayor al día 21 posterior a la infección (14). Por otra parte, Taylor y colaboradores (2006), reportaron que en ratones infectados con *Mtb* existe un aumento de la actividad de MMP-9 pero al día 24 después de la infección (15)

Dichos antecedentes concuerdan con los resultados del presente proyecto, es decir, que existe un aumento en la actividad de MMP-9 en la infección por tuberculosis. Sin embargo, es importante enfatizar que nuestros resultados demuestran que la actividad de MMP-9 es mayor en muestras de esputo con mayor carga bacteriana, lo cual podría sugerir que este aumento se debe por la cantidad elevada de bacilos en este nivel de infección, y/o a la necesidad que tiene el organismo de reparar el tejido que se encuentra dañado por la infección (6,44,60,61).

Sin embargo, los estudios anteriormente mencionados no se enfocan en demostrar que el aumento de la actividad de la enzima puede estar relacionada con el aumento de la carga bacteriana. Lo anterior refuerza el valor de los resultados encontrados en el presente estudio, ya que se logró demostrar el comportamiento de la actividad de MMP-9 en muestras sin y con tuberculosis, con diversos grados de infección/carga bacteriana. Además se demostró que existen

diferencias estadísticamente significativas de la actividad de MMP-9 entre estos grupos, no obstante, no se ha encontrado en la literatura evidencia con la cual puedan compararse y discutir nuestros hallazgos.

Finalmente, es importante mencionar que existe un interés particular en entender el comportamiento de la actividad de MMP-9 en relación con la carga bacteriana en la infección por tuberculosis, porque la actividad de esta enzima podría indicarnos el nivel de gravedad de la infección por tuberculosis. Esto podría sugerir que la actividad de la enzima podría utilizarse como un marcador predictivo de eficacia para el tratamiento contra tuberculosis., tal y como se propuso al inicio de este proyecto. Lo anterior aplicaría para pacientes que llevan un tratamiento en contra de la tuberculosis, y que mediante el análisis de la actividad de MMP-9 muestren un aumento en su actividad, lo cual determinaría que el nivel de carga bacteriana no ha disminuido, y establecería sospechas sobre la efectividad del tratamiento, o que se trata de una tuberculosis resistente al tratamiento. Sin duda, el conocer a tiempo esta información sería de importancia para realizar una intervención más adecuada, antes de que el paciente empeore su situación o llegue a desarrollar farmacoresistencia.

En este último punto, el sector salud se enfrenta a nuevos retos con el objetivo de disminuir los altos índices de resistencia a fármacos (3,50), por lo que resultaría de suma importancia el empleo de nuevas herramientas que permitan detectar a tiempo la presencia de farmacoresistencia y proponer cambios o ajustes al tratamiento para poder reemplazarlo o indicar el más adecuado a este tipo de pacientes. Lo anterior sin duda será de gran valor en el área clínica, en virtud de que el llevar a cabo un tratamiento adecuado en la infección por tuberculosis significaría un alto índice de éxito y una disminución importante de los índices de morbilidad y mortalidad en la infección por tuberculosis (3,50).

Por todo lo anterior, el empleo de MMP-9 como un marcador predictivo de eficacia para el tratamiento contra tuberculosis podría tener una aplicación importante, por lo que se requiere profundizar más en su estudio para establecer su valor definitivo en la atención y manejo clínico de tuberculosis.

CONCLUSIONES

Hasta donde se tiene conocimiento este es el primer reporte en donde se evalúa la presencia de MMP-9 en muestras de esputo de pacientes con y sin tuberculosis.

El análisis estadístico permitió comprobar la hipótesis planteada en este proyecto, es decir, que el incremento de la actividad de MMP-9 aumenta conforme se incrementa el número de bacterias presentes en las muestras de esputo. Hasta donde tenemos conocimientos este es el primer reporte en donde se evalúa la presencia de MMP-9 y las diferentes formas de la enzima (dimérica, asociada a lipocalina, latente y activa) en muestras de esputo de pacientes con y sin tuberculosis.

Estos resultados sugieren que en la infección por tuberculosis, existe una participación importante de la forma activa de MMP-9 y que existe una relación entre la carga bacteriana con la actividad de MMP-9 en muestras de esputo.

A partir de lo anterior se propone que MMP-9 podría ser utilizada como un marcador predictivo de eficacia para el tratamiento contra tuberculosis.

Los beneficios que se podrían obtener serían aplicados al área clínica, porque se podría intervenir durante el tiempo que los pacientes con tuberculosis estén en tratamiento, para comprobar que se está aplicando el adecuado o para realizar un cambio del mismo, y así evitar que el paciente desarrolle complicaciones como farmacorresistencia o se genere un mayor daño al tejido pulmonar.

PERSPECTIVAS

Se propone aumentar el número de muestras de cada grupo e incluir pacientes de cualquier edad.

Tomando en cuenta los resultados de este proyecto, se propone desarrollar más estudios que permitan determinar la viabilidad de emplear a MMP-9 como un marcador predictivo de eficacia para el tratamiento contra tuberculosis.

También, se propone analizar la expresión del mRNA de MMP-9 y su inhibidor específico, TIMP-1, así como la actividad de estos.

Así mismo, realizar un análisis más profundo de la regulación de la actividad y secreción de las formas de MMP-9, en el huésped y en el bacilo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y Salud, artículo 17 apartado II, señala que el riesgo asociado en esta investigación fue de riesgo mínimo. En virtud de que la muestra clínica que se analizó fue obtenida a partir de la empleada para realizar el diagnóstico de la infección de tuberculosis, sin interferir en ningún momento en el diagnóstico e integridad del paciente. La jurisdicción V, VIII y el LESP donaron las muestras incluidas en este proyecto, por lo tanto, no se tuvo contacto con el paciente. En el mismo sentido fueron proporcionados la edad y sexo de los pacientes, a partir de la solicitud de examen bacteriológico de cada paciente.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

Se determinaron por el manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis de la OMS y la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la protección ambiental, Salud ambiental, Residuos peligrosos biológico-infecciosos, Clasificación y especificaciones de manejo. La manipulación de las muestras de esputo se realizó en una campana de bioseguridad nivel II tipo A en las instalaciones del laboratorio de microbiología del ISP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva de Tuberculosis. OMS. 2015.
2. Organización Mundial de la Salud. Reporte global de tuberculosis 2015. Vol. 53, OMS. 1989.
3. Salud de S. Situación actual de la tuberculosis en México. SS.
4. Lattante R. Anatomía patológica de la inflamación crónica granulomatosa. Facultad de Ciencias Médicas. Argentina; 2012.
5. Delgado I, Molinos Á, Obando I. Tuberculoma pulmonar gigante: forma atípica de presentación de tuberculosis primaria en la infancia. Arch Bronconeumol. 2011;47(1):52–7.
6. Wani R. Tuberculosis 2: Fisiopatología y microbiología de tuberculosis pulmonar. Rev Médica del Sur Sudán. 2013;6(1):10–2.
7. Saunders BM, Britton WJ. Vida y muerte en el granuloma: inmunología de tuberculosis. Immunol y Biol Cel. 2007;85(2):103–11.
8. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. Nat Rev Immunol. 2012;12:352–66.
9. Volkman HE PT y ZJ. Tuberculous Granuloma Induction via Interaction of a Bacterial Secreted Protein with Host Epithelium. NIH public Access. 2013;18(9):1199–216.
10. Dorhoi A, Kaufmann SHE. Pathology and immune reactivity : understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. Semin Immunopathol. 2015;14.
11. Sheen P, Chaudhary K, Tovar M, Santillan C, Sosa J, Caviedes L, et al. High MMP-9 activity characterises pleural tuberculosis correlating with granuloma formation. euro. 2009;9(33):134–41.
12. Salgame P. MMPs en tuberculosis : creadoras y destructoras del tejido de granuloma. Rev Investig clínica. (13):9–11.
13. Rivera-marrero CA, Schuyler W, Roser S, Roman J. Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of Mycobacterium tuberculosis. Microb Pathog. 2000;29:231–44.
14. Ramos AG, Enciso JA, Espinosa I, Mata D, Rivas B, Trujillo V, et al. La expresión cinética de metaloproteinasas y sus inhibidores tisulares en experimental murino en tuberculosis pulmonar. Investig Exp el pulmón. 2015;41(1):1–11.

15. Taylor JL, Hattle JM, Dreitz SA, Troudt JM, Izzo LS, Basaraba RJ, et al. Role for Matrix Metalloproteinase 9 in Granuloma Formation during Pulmonary Mycobacterium tuberculosis Infection □ †. *Infect Immun*. 2006;74(11):6135–44.
16. Quiding-Järbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun*. 2001;69(9):5661–70.
17. Elkington P, Green J, Emerson J, Lopez L, Boyle J, O’Kane C, et al. Sinergia sobre la regulación celular en la secreción epitelial de metaloproteína de matriz-9 en tuberculosis. *Rev Am respiración Cel y Biol Mol*. 2007;37:431–7.
18. Price NM, Farrar J, Tran TT, Nguyen TH, Tran TH, Friedland JS. Identificación de un fenotipo de degradación de la matriz en la tuberculosis humana in vitro e in vivo. *Rev Inmunol*. 2001;166(6):4223–30.
19. Hrabec E, Stręk M, Zięba M, Kwiatkowska S, Hrabec Z. Circulación de niveles de la metaloproteína de matriz-9 se correlaciona con la gravedad de la enfermedad en pacientes con tuberculosis. *Rev Int Tuberc y enfermedades del pulmón*. 2002;6(8):713–9.
20. Mohamad N, Margoushy E, Khaleel AT. Metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in tuberculosis and malignant pleural effusion. *Egypt J Chest Dis Tuberc*. 2013;62(2):235–40.
21. Ugarte-Gil CA, Elkington P, Gilman RH, Coronel J, Tezera LB, Bernabe-Ortiz A, et al. Concentraciones de MMP-1, -3 y -8 e esputo inducido durante el tratamiento de la tuberculosis. *PLoS One*. 2013;8(4):1-8
22. Izzo A, Izzo L, Kasimos J, Majka S. Un inhibidor de metaloproteasa de matriz promueve la formación de granulomas en la fase temprana de la infección pulmonar por Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*. 2004;84(6):387–96.
23. Kumarguru B. Las lesiones de células gigantes de los pulmones: un estudio histopatológico y morfométrico de siete casos de autopsia. *D Clínica y Diagnóstico Investig*. 2015;9:12–6.
24. Sundararajana S, Babub S, Dasa SD. Comparison of localized versus systemic levels of Matrix metalloproteinases (MMPs), its tissue inhibitors (TIMPs) and cytokines in tuberculous and non-tuberculous pleuritis patients. *Am Soc Histocompat Immunogenet*. 2012;73(1):985–91.
25. Gideon HP, Phuah J, Myers AJ, Bryson BD, Rodgers A, Coleman MT, et al. Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists , but a Balance of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines Is Associated with Sterilization. *PLOS Pathog*. 2015;1:1–28.
26. Perrin FMR, Woodward N, Phillips PPJ, Mchugh TD, Nunn AJ, Lipman MCI,

- et al. Radiological cavitation , sputum mycobacterial load and treatment response in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(May):1596–602.
27. Zyl-smit RN Van, Binder A, Meldau R, Mishra H, Semple PL, Peter J, et al. Comparison of Quantitative Techniques including Xpert MTB / RIF to Evaluate Mycobacterial Burden. *PLoS One*. 2011;6(12):10.
 28. Kenneth R. *Microbiología médica*. 5th ed. McGraw Hill; 2010. 374-382.
 29. Forbes, A. Sahm, D. Weissfeld A. *Diagnóstico microbiológico*. 12th ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2009. 1160.
 30. Elkington PT, Ugarte-Gil CA, Friedland JS. Metaloproteasas de matriz en tuberculosis. *Rev Respir Eur*. 2011;38(2):456–64.
 31. Arakaki P, Marques M, Santos M. Polimorfismo de MMP-1 y su relación con el proceso patológico. *Rev Biocienc*. 2009;34:313–20.
 32. Reyes G. Aspectos estructurales y funcionales de las metaloproteinasas de la matriz y sus inhibidores como potenciales terapéuticos [Tesis]. Universidad de Matanzas; 2008.
 33. Visse R, Nagase H. Metaloproteasas de matriz e Inhibidores de metaloproteasa de matriz: estructura, función y bioquímica. *Circ Res*. 2003;92(8):827–39.
 34. Parks W, Shapiro S. Metaloproteasas de matriz en la biología del pulmón. *Investig Respir*. 2001;2(1):10–9.
 35. Hernández-montoya J, Pérez-rubio G, Ramos JP, Ramírez MM, Abraham CR, Venegas AR. Participación de las metaloproteinasas de matriz extracelular en la EPOC. *Neumol Cir Torax*. 2014;73(2):128–37.
 36. Elkington PTG, Nuttall RK, Boyle JJ, Kane CMO, Horncastle DE, Edwards DR, et al. Mycobacterium tuberculosis , but Not Vaccine BCG , Specifically Upregulates Matrix Metalloproteinase-1. *Am J Respir Crit care Med*. 2005;172(25):1597–604.
 37. Löffek S, Schilling O, Franzke C-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*. 2011;38(1):191–208.
 38. Miner JH. *Extracellular matrix in development and disease*. San Diego: Elsevier; 2005:2-4
 39. Snoek-van Beurden P a M, Von den Hoff JW, Beurden PAMS, Hoff JWV Den. Técnicas de zimografía para el análisis de metaloproteasas de matriz y sus inhibidores. *Biotechniques*. 2005;38(1):73–83.
 40. Malla N, Sjøli S, Winberg J, Hadler-olsen E, Uhlin-hansen L. Biological and

Pathobiological Functions of Gelatinase Dimers and Complexes. *Connect Tissue Res.* 2008;49(180):180–4.

41. Provatopoulou X, Gounaris A, Kalogera E, Zagouri F, Flessas I, Goussetis E, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and their complex MMP-9/NGAL in breast cancer disease. *BMC Cancer.* 2009;9:1-7
42. Hutchinson F, Nordisk N. Expression, purification, crystallization and crystallographic characterization of dimeric and monomeric human neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL). *Acta Crystallogr.* 1998;2:93–5.
43. Carlo A DI. Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in sera and urine of patients with kidney tumors. *Oncol Lett.* 2013;9(5):1677–81.
44. Elkington P, O’Kane C, Friedland J. La paradoja de metaloproteinasas de la matriz en la enfermedad infecciosa. *Inmunol clínica y Exp.* 2005;142:12–20.
45. Kane CMO, Elkington PT, Jones MD, Caviedes L, Tovar M, Gilman RH, et al. STAT3, p38 MAPK y NF-kB conduce la oposición de secreción de MMP-1 de monocitos-dependiente de fibroblastos en tuberculosis. *Rev Am respiración Cel y Biol Mol.* 2010;43(16):465–74.
46. Joven J, Villabona C, Julia G. *Diccionario de medicina.* España: Marín, S.A. Barcelona 1990; 289.
47. Anaya Muñoz A, Arjona Estévez J, Medellín Urquiaga X, Montiel Romero L, Navarro Ramírez I, Talamás Salazar M, et al. *Glosario de términos básicos sobre derechos humanos.* 1st ed. Ciudad de México: Comisión de Derechos Humanos del Distrito Federal; 2005:147
48. Balandrano Campos S. *Manual de Técnicas de Laboratorio para el Exámen Baciloscópico.* Secr Salud. 2003;1–72.
49. Organización Panamericana de la Salud. *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I Baciloscopia.* Tuberculosis. 2008;64.
50. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2016.* WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2016.
51. Mohammed MA, Seleim MF, Abdalla MS, Sharada HM, Hady A, Wahab AA. Urinary high molecular weight matrix metalloproteinases as non-invasive biomarker for detection of bladder cancer. *BMC Urol.* 2013;13(25).
52. Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Toth M, Kotra LP, et al. Characterization of the Monomeric and Dimeric Forms of Latent and Active Matrix Metalloproteinase-9. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2661–8.

53. Am M, Ca M, Lr Z, Ts DS, Taba M, Jm T. Gingival crevicular fluid levels of MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2010;9(37):180–90.
54. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa Type IV Collagenase with the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Prevents Dimerization, Complex Formation with Interstitial Collagenase, and Activation of the Proenzyme with Stromelysin. *J Biol Chem.* 1992;267(7).
55. Kubben FJGM, Sier CFM, Hawinkels LJAC, Tschesche H, Duijn W Van, Zuidwijk K, et al. Clinical evidence for a protective role of lipocalin-2 against MMP-9 autodegradation and the impact for gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2007;3:2–9.
56. Ramos-martínez AG, Enciso-moreno JA, Espinosa-ayala I, Rivas-santiago B, Trujillo-paez V, Monárrez- J, et al. Expression kinetics of metalloproteinases and their tissue inhibitors in experimental murine pulmonary tuberculosis Expression kinetics of metalloproteinases and their tissue inhibitors in experimental murine pulmonary tuberculosis. *Exp Lung Res.* 2015;2148(January 2017).
57. Martin CJ, Carey AF, Fortune SM, Diseases I, Hospital MG. A bug ' s life in the granuloma. *Semin Immunopathol.* 2017;38(2):213–20.
58. Elkington P, Shiomi T, Breen R, Nuttall RK, Ugarte-gil CA, Walker NF, et al. MMP-1 impulsa inmunopatología de la tuberculosis humana y en ratones transgénicos. *Rev Investig clínica.* 2011;121(5):1827–33.
59. Vincenti MP. Signal Transduction and Cell-Type Specific Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression : Can MMPs be Good for You ? *J Cell Physiol.* 2007;(June):355–64.
60. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted. *physiol Rev.* 2009;87(1):69–98.
61. Andrea P-M, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;8(3):221–33.
62. Becerra B EI. Actividad enzimática de MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en muestras de expectoración de pacientes con tuberculosis con y sin diabetes mellitus [Tesis]. Universidad Veracruzana; 2014.

ANEXO I Protocolo de técnicas, soluciones y reactivos

Manejo de muestras de esputo y obtención de sobrenadante

1. Se obtienen dos alícuotas de la muestra de esputo recolectada en tubos Eppendorf, aproximadamente 250 µl por tubo, una alícuota se almacena a 4°C y la segunda alícuota a -80°C.
2. Para obtener el sobrenadante del esputo, se descongela la alícuota almacenada a -80°C y se coloca sobre hielo para poder manipularla.
3. Observar la muestra y clasificarla como diluida, si se puede tomar fácilmente con la pipeta, y espesa, si la consistencia de la muestra hace difícil manipularla.
4. Después de hacer la clasificación, en un tubo Eppendorf tomar 40 µl de muestra diluida y mezclar con 200 µl de agua MiliQ, en el caso de ser una muestra espesa se tomará un volumen parecido a 40 µl y mezclar con 200 µl de agua MiliQ.
5. Mezclar con el Vortex para homogeneizar perfectamente la muestra.
6. Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
7. Separar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf.
8. Desechar el botón en un contenedor rojo con ácido acético.

Técnica de baciloscopía

La técnica de baciloscopía se realiza de acuerdo a como se establece en el manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen baciloscópico que ha adoptado la Secretaria de Salud.

Preparación de reactivos y colorantes

1) Carbol-Fucsina.

Para 1000 ml:

Fucsina básica.....3 g

Alcohol de 95.....100 ml

Fenol acuoso*

(Agua destilada cbp 1000 ml).

Disolver por agitación en un matraz de aforo, agregando lentamente el alcohol. Enseguida agregar la solución de fenol acuoso*. Agitar y agregar agua destilada hasta completar 1000 ml, dejar reposar 24 horas y filtrar. Volver a filtrar una vez por semana, la cantidad que se va a utilizar.

*Fenol acuoso: fundir 45 g de fenol en cristales más 10 ml de agua destilada, calentando en baño María hasta que se disuelva completamente y luego enfriar. Se agrega el volumen resultante total para la preparación de la Carbol-Fucsina.

2) Solución decolorante: (alcohol ácido).

Para 1000 ml:

Ácido clorhídrico.....30 ml

Alcohol al 95%.....970 ml

Dejar escurrir lentamente el ácido clorhídrico por las paredes del matraz que contiene el alcohol. Agitar suavemente.

3) Azul de metileno.

Para 1000 ml:

Azul de metileno.....1 g

Agua destilada cbp 1000 ml

Disolver por agitación y filtrar.

4) Solución desinfectante (Fenol al 5%).

Para 1000 ml:

Fenol en cristales.....50 g

Agua destilada cbp 1000 ml

Disolver por agitación.

Preparación del extendido en frotis de la muestra de esputo

- 1) Rotular el portaobjetos en la parte del extremo izquierdo con el número de identificación de la muestra correspondiente.

- 2) Para hacer el extendido usar un aplicador o palillo de madera. Hacer un frotis de 2 cm de largo x 1 cm de ancho.
- 3) Dejar secar el frotis a temperatura ambiente.
- 4) Solo después que el extendido se ha secado, fijar el frotis pasando sobre la laminilla la flama del mechero con suavidad 2 o 3 veces, evitando el sobrecalentamiento.
- 5) Al terminar la preparación de frotis, desinfectar el área de trabajo con fenol al 5% y esterilizar el recipiente con los aplicadores, el papel y material usados sobre la mesa. También radiar con luz UV el área de trabajo incluido el cuarto en donde se trabaja.

Tinción del extendido (Ziehl-Neelsen)

- 1) Cubrir completamente cada portaobjetos con carbol-fucsina. Este colorante teñirá los bacilos de color rojo.
- 2) Calentar (usando un hisopo de algodón mediano impregnado con alcohol), las laminillas con la carbol fucsina hasta producir vapores visibles. Esta operación debe durar aproximadamente 5 minutos.
- 3) Enjuagar suavemente con agua destilada hasta quitar el colorante de la laminilla.
- 4) Colocar sobre la superficie del portaobjetos alcohol ácido al 3% (solución decolorante). Dejar el alcohol ácido sobre el portaobjetos de 1 a 2 minutos.
- 5) Enjuagar cuidadosamente con agua destilada.
- 6) Cubrir con azul de metileno todo el portaobjetos, no más de 1 minuto.
- 7) Enjuagar el portaobjetos cuidadosamente con agua destilada.
- 8) Dejar secar a temperatura ambiente sobre una gradilla. No secar las laminillas por calentamiento.

Observación microscópica

- 1) Enfocar el portaobjetos con el lente objetivo de 40x antes de usar el de 100x

- 2) Después de encontrar el área adecuada, cambiar a la lente objetivo de 100x.
- 3) Examinar sistemáticamente 100 campos útiles.
- 4) Terminada la observación de cada laminilla, limpiar el aceite de inmersión del objetivo con papel seda o gasa, absorbiendo el aceite sin frotar la superficie de la lente.

Resultados del examen microscópico

Los resultados del examen se reportan bajo un método estandarizado informando la baciloscopía en cruces. La Secretaria de Salud ha adoptado, en recomendación por la OPS, la escala adoptada internacionalmente para el informe de los resultados examinados por la técnica de Ziehl-Neelsen(48,49), Tabla 1.

Resultado del examen microscópico	Informe
No se encuentran BAAR en los 100 campos observados	No se observan bacilos ácido alcohol resistentes
Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados	Nº exacto de bacilos en 100 campos
Se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 campos observados	Positivo (+)
Se observan de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

Tabla 1. Escala adoptada internacionalmente para el informe de los resultados de extendidos examinados por la técnica de Ziehl-Neelsen. Tomado del Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico(48)

Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico

1. En la balanza analítica pesar 0.002 g (2 mg) de albúmina sérica bovina (BSA) en un tubo Eppendorf de 1 ml y agregar 1 ml de Agua MiliQ.
2. Preparar un gráfico de dispersión lineal para el estándar de BSA en un rango de 0.5-20 μ g/mL. Como se indica a continuación:

Tubo	BSA (2 mg/ml)	Agua MiliQ	[] BSA mg/ml
	μ l	μ l	
A	5	45	0.2
B	10	40	0.4
C	20	30	0.8
D	30	20	1.2
E	40	10	1.6
F	50	0	2

3. Colocar en una placa de 96 pozos por triplicado, 4 μ L de cada estándar, muestras y del blanco (reactivo A + reactivo B).
4. Añadir un volumen de 80 μ L de BCA (50 porciones del reactivo A y 1 porción del reactivo B) a cada pozo. El reactivo A contiene carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en hidróxido del sodio 0.1M. El reactivo B es una solución del sulfato cúprico al 4%, por ejemplo, para 87 pozos se deberá mezclar 139.2 μ l de reactivo B y 6820.8 μ l de reactivo A.
5. Incubar por 30 minutos a 37°C sin agitación.
6. Antes de sacar la placa del cuarto de cultivo radiar con luz UV 15 minutos.
7. Registrar la absorbancia a 562 nm a temperatura ambiente en un lector de microplacas.
8. Determinar la concentración de la muestra a partir del gráfico de dispersión lineal del estándar, restando previamente la absorbancia del blanco (solución de reactivo A + reactivo B).

9. Ajustar a 2500 µg por línea para geles de caseína y acrilamida(62).

Protocolo de geles para zimografía de 4.5 x 8.2 cm

Para realizar los geles se limpiará todo el material con jabón y posteriormente con agua MiliQ, después secar con sanitas.

Con los cristales y los peines se debe de tener especial cuidado, después de lavarlos con jabón se utilizará alcohol al 70% para limpiar el exceso de grasa y posteriormente con agua MiliQ, se procederá a secar con papel absorbente que no deje pelusa o restos de papel en el cristal, los cuales podrían causar defectos en el gel.

Se utilizan cristales para hacer geles de 1 mm y peines de 1 mm con 10 dientes.

Gel de acrilamida al 8.5%

1. Armar los cristales, pegar papel parafilm en el flanco derecho e izquierdo y colocar pinzas negras sobre el papel parafilm para hacer presión entre los dos cristales. Se calienta agarosa sin bromuro de etidio para usarla como sellador, una vez que esté caliente la agarosa con una pipeta automática de 1000 µl se coloca cuidadosamente la agarosa debajo de los cristales y en los flancos derecho e izquierdo. Se deja gelificar aproximadamente por 15 minutos para proceder a preparar el gel.
2. Con un marcador y una regla medir del fondo del pozo en dirección al fondo del gel y marcar en 1.5 cm la placa de vidrio delgada para tener una señal del nivel que debe de llenarse el gel de resolución.
3. Para preparar el gel de resolución, en un tubo falcón de 15 ml se añade 5.5 ml de agua MiliQ.
4. Añadir 3.15 ml de Tris base 1.5 M pH 8.8, se mezcla agitando el tubo con la mano, cuidadosamente, después agregar 3.4 ml de acrilamida, se mezcla agitando el tubo con la mano, con cuidado y posteriormente se vierten 125 µl de SDS 10%, se mezcla agitando el tubo con la mano.
5. Se preparan 3 pipetas, una para el APS, otra para el TEMED y finalmente una de 1000 µl para verter la solución entre los cristales. Con una pipeta ya

preparada se agrega 125 μ l de APS al 10%, al verter el APS se debe de verificar se introduzca la punta, para asegurarse que se agrega a la mezcla, se mezcla agitando el tubo con cuidado, con otra pipeta se agregan 5 μ l de TEMED, se agita por última vez con la mano cuidadosamente.

6. Mezclar todo y con la pipeta de 1000 μ l verter entre las placas de vidrio hasta la marca (punto 2), evitar que se formen burbujas, si se llegaron a formar agregar agua saturada con butanol para removerlas y así poder nivelar el gel.
7. Se deja polimerizar 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Cuando esté polimerizado el gel quitar el agua saturada con butanol sobrante con ayuda de tiras de papel filtro, evitando tocar el gel.
9. Se prepara el gel de concentración al 4% en otro tubo falcón, se mezcla 4.715 ml de agua destilada, 825 μ l Tris 1 M pH 6.8, 860 μ l de acrilamida, 66.5 μ l de SDS al 10%, 66.5 μ l APS al 10% y 6.5 μ l de TEMED.
10. Mezclar rápidamente y verter con ayuda de una pipeta hasta el tope de los vidrios, procurando no hacer burbujas, colocar el peine.
11. Dejar polimerizar a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos.
12. Con mucho cuidado quitar los peines, tratando de quitar con el mismo peine el exceso de acrilamida polimerizada para evitar que obstruyan los pozos y lavar primero con la ayuda de agua MilliQ y posteriormente se lavan los pozos del gel con solución de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS) con ayuda de una jeringa.
13. Si los geles no se van a utilizar en ese momento se pueden guardar en cámara húmeda con solución de corrida. En un toper se coloca papel filtro y se agrega solución de corrida para humedecer el papel filtro, después de colocan los geles (todavía con la placa de vidrio) y se etiquetan para saber que gel es y se almacenan a 4°C.

Gel de gelatina al 8.5%.

1. Las placas de vidrio se prepararon de acuerdo a lo mencionado en el paso 1 y 2 del protocolo de Gel de acrilamida al 8.5%.

2. Para preparar el gel de resolución, se pesa 0.0125 g de gelatina en un tubo falcón de 15 ml.
3. Disolver la gelatina en 5.5 ml de agua MilliQ, calentar en baño maría a 65°C por 15 minutos hasta que la gelatina esté completamente disuelta, esperar a que baje su temperatura para proceder.
4. Añadir 3.150 ml de Tris 1.5M pH 8.8, 3.400 ml de acrilamida, 125 µl de SDS 10%.
5. Agregar 125 µl de APS al 10%, al verter el APS se debe de verificar se introduzca la punta, para asegurarse que se agrega a la mezcla, se mezcla agitando el tubo con cuidado, con otra pipeta se agregan 5 µl de TEMED, se agita por última vez con la mano cuidadosamente.
6. Mezclar todo y con la pipeta de 1000 µl verter entre las placas de vidrio hasta la marca, evitar que se formen burbujas, si se llegan a formar agregar agua saturada con butanol para removerlas y así poder nivelar el gel.
7. Se deja polimerizar 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Cuando esté polimerizado el gel quitar el agua saturada con butanol sobrante con ayuda de tiras de papel filtro, evitando tocar el gel.
9. Seguir con el paso 9 del protocolo de Gel de acrilamida al 8.5%

1 L de Tris base pH 8.8 1.5 M

Tris base 181.71g

Aforar a un litro con agua, ajustar el pH a 8.8 con HCl.

100 ml de acrilamida

Acrilamida 30 g

Bisacrilamida 0.8 g

Aforar a 100 ml con agua. Posteriormente filtrar con filtros de 0.45 micras con ayuda de una jeringa de 10 mL, vaciando en otro frasco limpio, de color ámbar, preferentemente. Guardar la solución a 4°C.

100 ml de Duodecil sulfato de sodio (SDS) 10%

SDS 10 g

Aforar a 100 ml con agua

10 ml de Persulfato de amonio (APS) 10%

APS 1 g

Aforar a 10 ml con agua. Guardar en alícuotas de 500 µl y almacenar a -80°C

1 L de Tris base pH 6.8 1.0 M

Tris base 121.14 g

Aforar a un litro con agua, ajustar el pH a 6.8 con HCl.

1 L de Tris base pH 8 1.0 M

Tris base 121.14 g

Aforar a un litro con agua, ajustar el pH a 8 con HCl.

1 L de solución de corrida

Tris base 3.02 g

Glicina 14.1 g

SDS 1 g

Aforar a un litro con agua.

1 L de Azul de Coomassie

Isopropanol 300 ml

Ácido acético 100 ml

Azul de Coomassie 2.5 g

Aforar a un litro con agua.

1 L de solución de desteñido

Metanol o isopropanol 100 ml

Ácido acético 100 ml

Aforar a un litro con agua.

10 ml de Buffer de carga 2x de proteínas

SDS 0.8 g

Azul de bromofenol (BPB) 0.02 g

Glicerol 5 ml

Tris pH 6.8 1.25 ml

Aforar a 10 ml con agua.

Electroforesis de geles

1. Debido a que se manejan muestras de baciloscopía, se trabajar dentro de la cabina de bioseguridad nivel II en el cuarto de cultivo del laboratorio de ecología y salud pública.
2. Se realizan los cálculos necesarios para obtener las condiciones, volumen y cantidad de muestra que se va a utilizar en cada pozo, llevar a cabo un control de cada gel en una hoja de Excel.
3. Se acomodan los geles en la cámara y se agrega solución de corrida hasta el nivel que se requiera. Se debe de tener cuidado de que las placas de vidrio estén correctamente instalados, la solución de corrida deberá cubrir por lo menos 2 mm arriba de los geles.
4. Se agrega en cada pozo la cantidad de muestra con el buffer de carga (125 mM Tris pH 6.8, 8 % SDS, 50 % glicerol, .002 % BPB).
5. Ajustar el voltaje a 140 V y no mover hasta que el colorante salga del gel, de esa forma podemos saber cuándo detener la electroforesis, aproximadamente 2 horas para cuatro geles.
6. Cuando termine la electroforesis, sacar los geles y cortar una pequeña esquina del gel desde el pozo 1 para orientar (cortar y desechar el gel de concentración para conservar solo el gel de resolución).
7. Para el gel de acrilamida, teñir con Azul de Coomassie por 3 horas (en forma alterna se tiñe ese mismo día por 15 minutos, se regresa el Azul de Coomassie al frasco, se agrega agua MilliQ y se deja a temperatura ambiente sin agitación y así al otro día se termina de teñir 2 horas 45 minutos). Después de teñir, se destiñe con solución de desteñido por 2 horas aproximadamente, primero se destiñe 15 minutos con solución reciclada y 1 hora 45 minutos con solución de desteñido nueva, observar el gel y detener la tinción hasta que se logren observar las bandas y un fondo azul claro (en forma alterna, se destiñe por 15 minutos aproximadamente, se desecha la solución de desteñido, se agrega agua MilliQ al toper y se deja a temperatura ambiente sin agitación y al otro día se termina de desteñir 1 hora 45 minutos aproximadamente). Ese mismo día

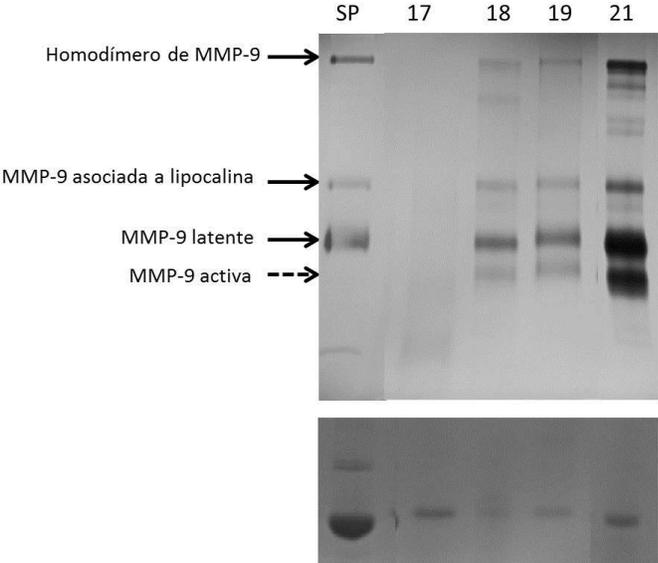
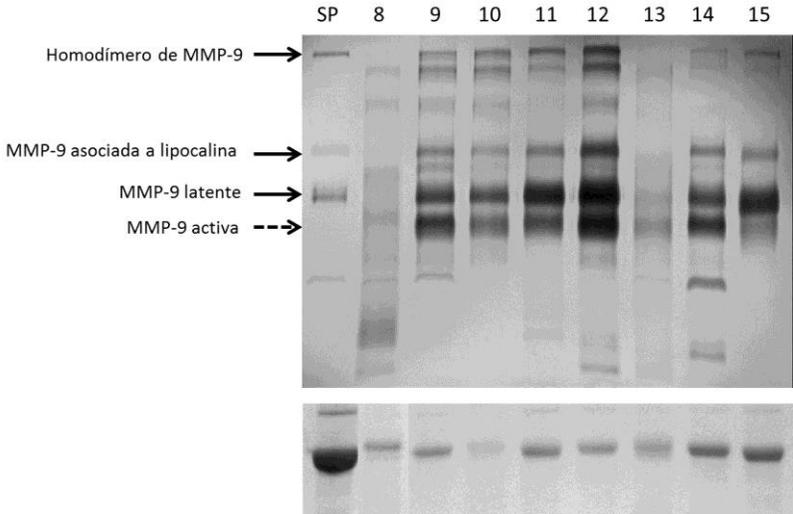
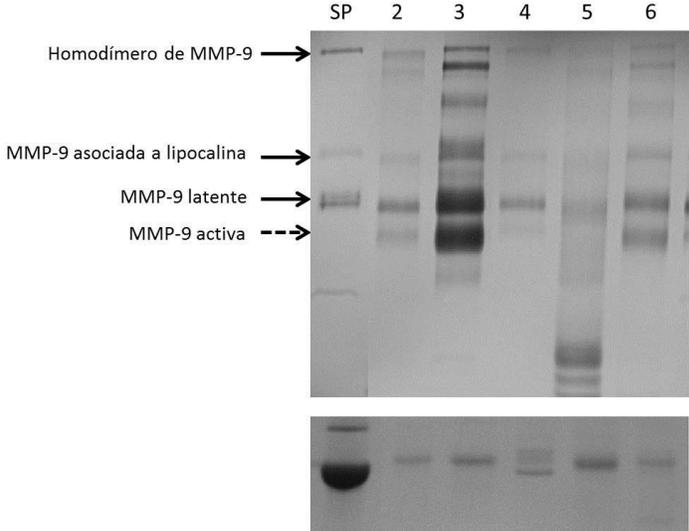
- se procede a tomar la foto en el fotodocumentador, antes de colocar los geles a 4°C.
8. Pasar los geles positivos de gelatina a un traste con solución de lavado con CaCl_2 , los geles negativos de gelatina a un traste con solución de lavado con EDTA, agitar por 15 minutos en el agitador orbital a 50 rpm. La solución debe de ocupar más de la mitad del frasco.
 9. Después desechar esa solución y volver agregar la solución de lavado fresca correspondiente a cada gel y dejar toda la noche en el agitador orbital a 50 rpm.
 10. Para los geles de detección de actividad metaloproteasa, al otro día, desechar la solución de lavado que tienen los geles de gelatina, lavar mínimo 10 veces con agua MilliQ manualmente. Después de lavar, a los geles positivos se le agrega la solución de incubación con CaCl_2 , en cambio a los geles negativos la solución de incubación con EDTA. Tanto los geles positivos como los negativos de gelatina se incuban a 37°C en la estufa por 1 hora.
 11. Después de la incubación desechar la solución de incubación y agregar colorante Azul de Coomassie y teñir por dos horas en el agitador orbital a 50 rpm (en forma alterna se tiñe por 15 minutos ese mismo día, se regresa el Azul de Coomassie al frasco, se agrega agua MiliQ al toper y se deja a temperatura ambiente sin agitación y al otro día se termina de teñir 1 hora 45 minutos).
 12. Después se destiñe por 15 minutos, se cambia por solución de desteñido fresca por 1 hora 45 minutos en agitación a 50 rpm (en forma alterna, se destiñe por 15 minutos, se desechar la solución de desteñido, se agrega agua MiliQ al toper y se deja a temperatura ambiente sin agitación y al otro día se termina de desteñir 1 hora 45 minutos).
 13. Por precaución los geles se deben de radiar con luz UV por 15 minutos con el traste tapado, para ello se debe de colocar el traste en el transiluminador en la cámara de extracción.
 14. Después se toma la foto en el fotodocumentador, antes de colocar los geles a 4°C.

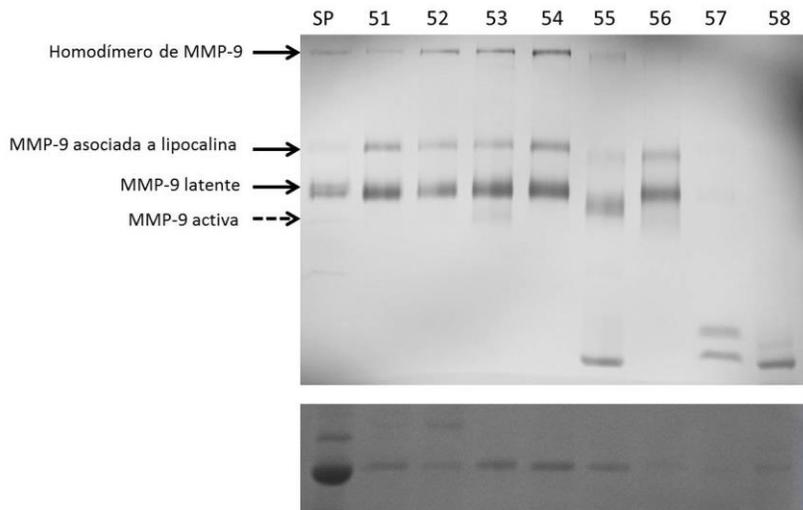
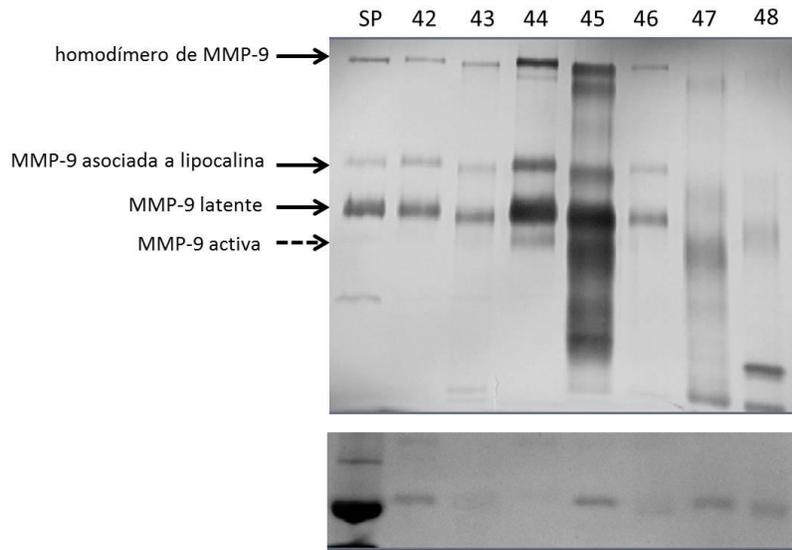
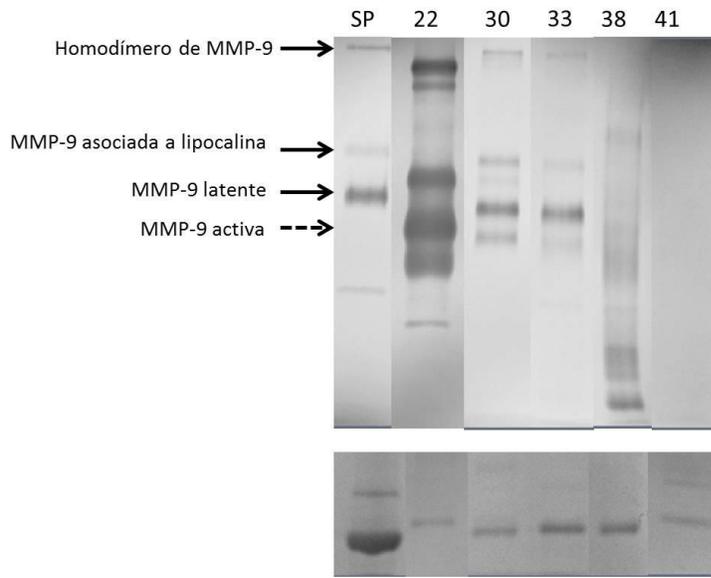
Análisis por densitometría mediante el programa ImageJ

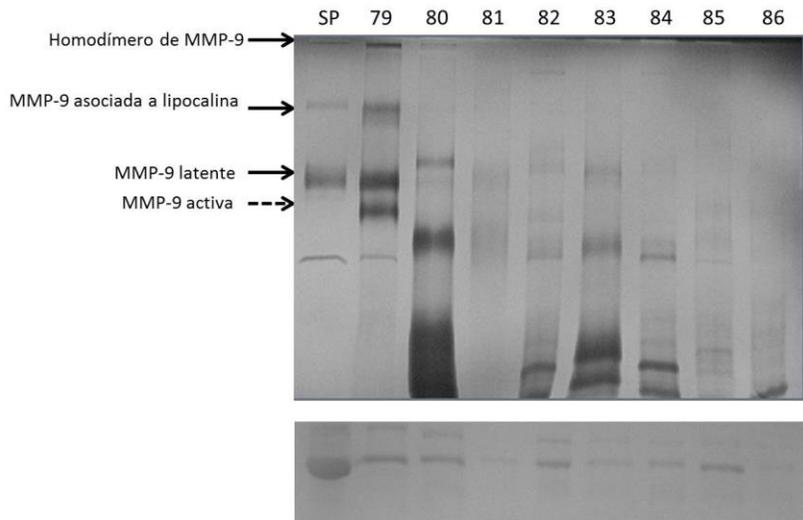
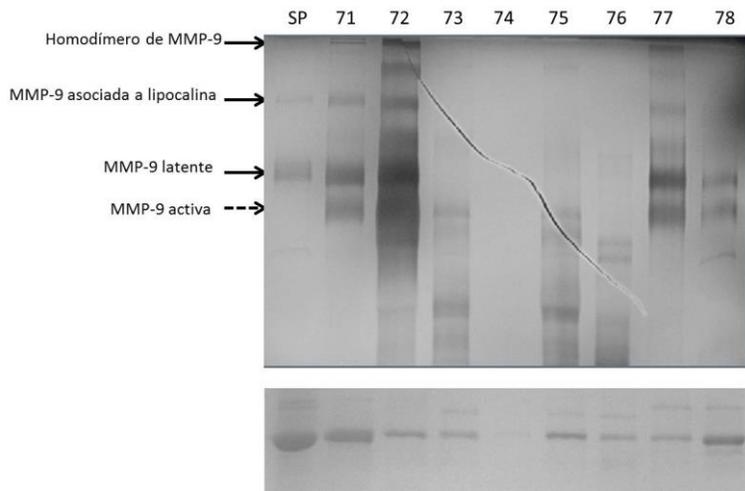
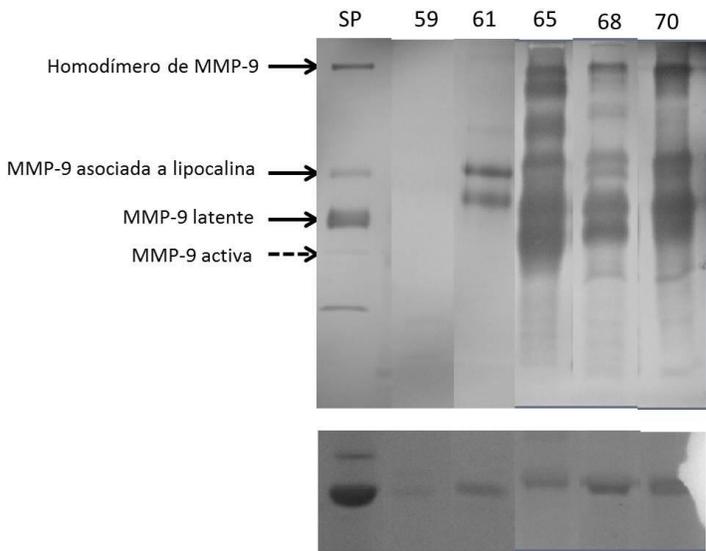
El análisis de densitometría se realiza con el programa ImageJ versión 1.48v de la siguiente manera.

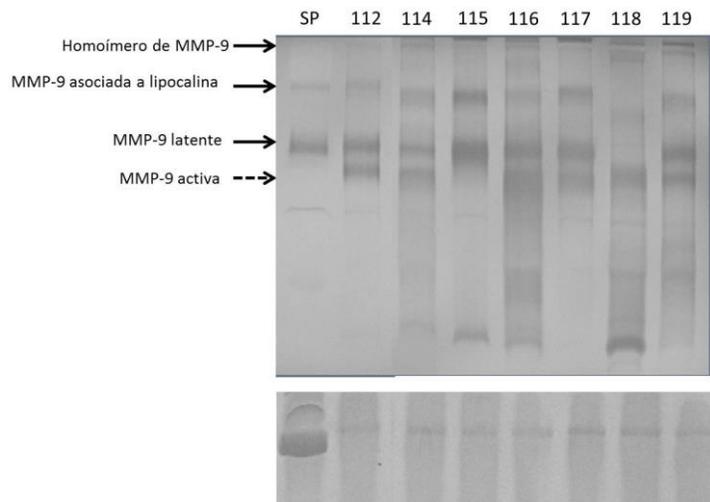
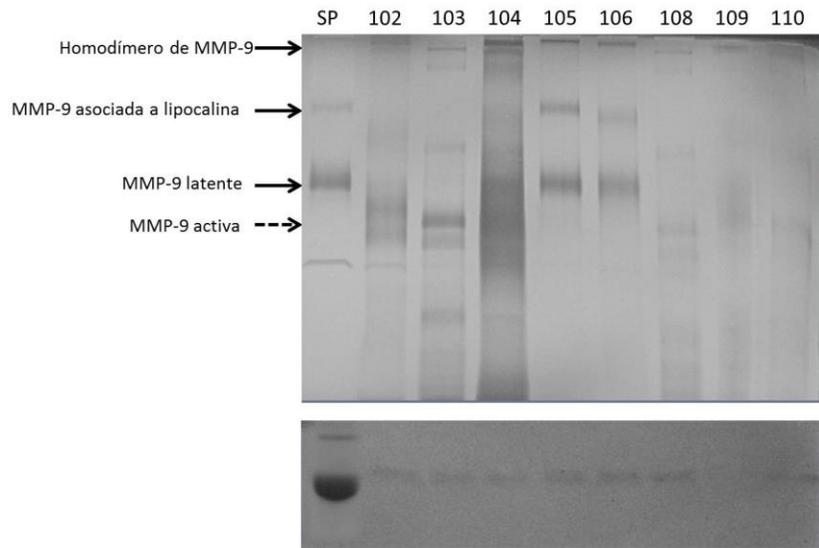
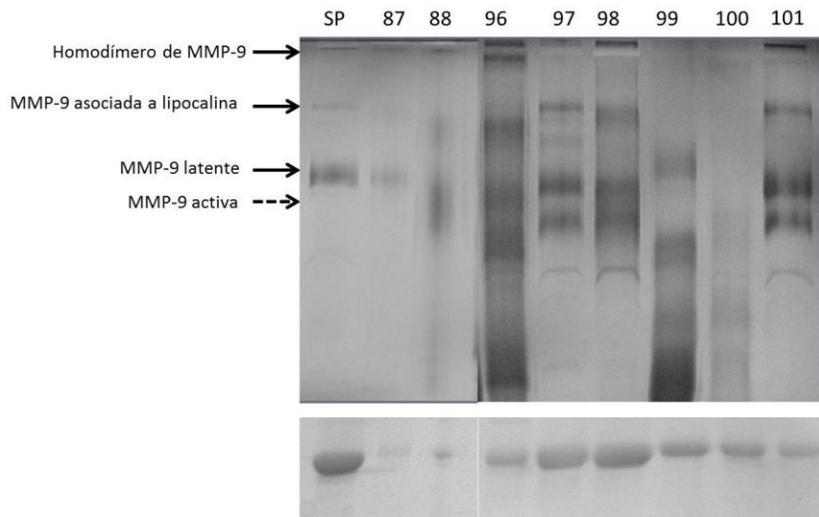
1. Se usa la herramienta de opción rectangular para poder seleccionar el carril de lado izquierdo de la imagen del gel.
2. Se selecciona la opción Analyze-Gels-Select First Lane; aparecerá un rectángulo amarillo con un número en el centro de este.
3. Se procede a mover el cuadro amarillo al siguiente carril, y se selecciona Analyze-Gels-Select Next Lane. De esta manera, se selecciona el siguiente carril y se procede a repetir el mismo proceso con todos los carriles de interés.
4. Después, se selecciona Analyze-Gels-Plot Lanes; se abrirá una ventana que muestra los perfiles del área bajo la curva de las bandas seleccionadas.
5. Se selecciona la herramienta "Straight", y se procede a dibujar una línea debajo de las curvas para que se forme un área cerrada.
6. Con ayuda de la herramienta "Wand", se da un clic dentro de las curvas ya delimitadas para poder medir el área cerrada en píxeles.
7. Se realiza una medición por triplicado de cada área de la banda y se genera una base de datos en Excel.

ANEXO II. Zimogramas









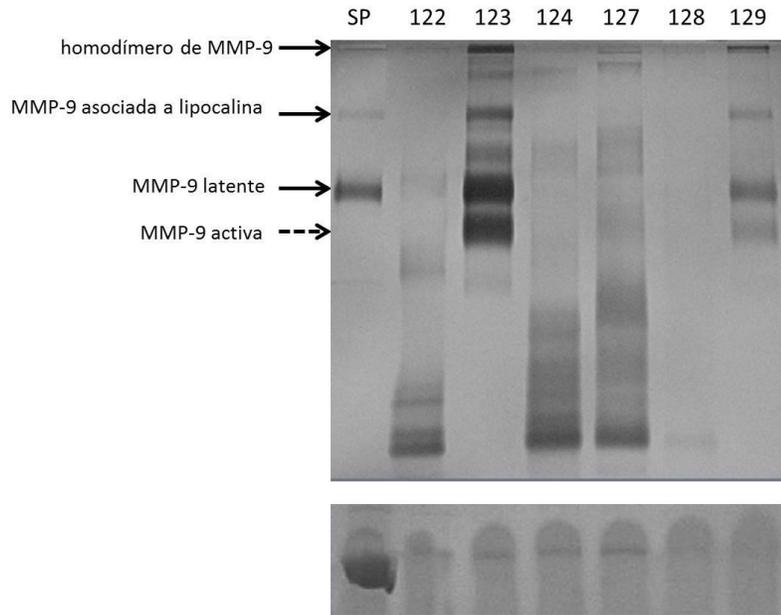


Figura 1. Detección de la actividad enzimática de MMP-9 y sus formas en gel copolimerizado con gelatina al 8.5% (Imagen superior) y detección del patrón electroforético de proteínas por tinción con Azul de Coomassie en gel de acrilamida al 8.5% (Imagen inferior) en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis

La concentración de proteínas fue ajustada a 2.5 μg por pozo en 10 μl de SB.

Abreviaturas: SP: Sangre periférica.