

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Formato: IAF

Informe Actividades Final de la Estancia Posdoctoral en México

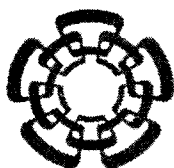
1. Fecha de presentación del Informe: 27 de agosto del 2019
2. Fecha de inicio y término de la beca otorgada: 01 de agosto del 2018- 31 de julio del 2019
3. Fecha de inicio y término del período ejercido de la beca: 01 de agosto del 2018- 31 de julio del 2019
4. % de avance del proyecto autorizado para el período de la beca otorgada (punto 2): 100%
5. Nombre y número del CVU del becario: MARTHA ESTELA ALBINO SÁNCHEZ, CVU 264069
6. Programa de Posgrado receptor: DOCTORADO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGIA CELULAR
7. Institución receptora: CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR.
8. Título del proyecto de investigación: "Papel de la deficiencia de RAR β en la regulación de células Presentadoras de Antígeno pulmonares en un modelo murino de tuberculosis experimental"
9. Objetivo, metas y periodo propuestos para la estancia.

Objetivos:

1. Establecer y caracterizar la infección por Mtb en la cepa de ratones NE75RAR β ^{-/-} con sus respectivos controles. (01/08/2018-28/02/2019)
2. Recopilación de datos del curso de la enfermedad: sobrevida, carga bacilar, inflamación, extensión de daño tisular. 30/10/2018-28/05/2019
3. Determinar por citometría de flujo, el número y porcentaje macrófagos pulmonares. 30/10/2018-28/05/2019
4. Determinar el perfil de polarización de macrófagos pulmonares (M1 y M2) por medio de ensayos de Elisa y perfil de expresión de mensajeros relacionados a la polarización. 30/10/2018-30/05/2019
5. Detallar la regulación de la polarización Macrófagos (M1- M2) en la línea celular de macrófagos alveolares de ratón M-HS, infectados con Mtb y tratados con Ácido Retinoico. 30/10/2018-28/02/2019
6. Ensayos in vitro de terapia combinada con antibióticos y vitamina A para acortar la antibioticoterapia convencional o para tratar la TB en fase inicial. 30/10/2018-28/02/2019

Metas.

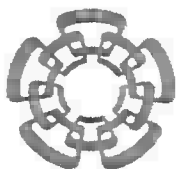
- a) Generar las bases para plantear nuevos blancos terapéuticos que coadyuven a acortar la antibioticoterapia convencional.
- b) Evaluar el papel de RAR β en la diferenciación, activación y migración de Macrófagos durante el curso de la Tb pulmonar experimental.
- c) Describir el mecanismo de regulación Ácido Retinoico-RAR β -polarización de macrófagos (M1-M2) in vitro e in vivo.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

10. Avances y descripción de los productos y/o metas comprometidos:

- Se realizó la cinética de expresión por medio de RT-qPCR en Tiempo Real de los receptores $RAR\alpha$, $RAR\beta$ y $RXR\alpha$ en muestras de pulmón provenientes de ratones (BALB/c y C57BL/6) sanos e infectados con Mtb (cepa H37Rv de Mtb) en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 post-infección.
- Se realizó inmunohistoquímica para el receptor $RAR\beta$ en pulmones provenientes de ratones sanos e infectados con Mtb (cepa H37Rv de Mtb) en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 post-infección
- Se determinó que la fuente principal de expresión del receptor $RAR\beta$ es en macrófagos pulmonares provenientes de ratones sanos e infectados con TB (cepa H37Rv de Mtb) en los días 14, 21, 28, 60 y post-infección
- Dada la importante participación de la vitamina A y sus receptores ($RAR\alpha$, $RAR\beta$ y $RXR\alpha$) en la infección con Mtb en especial en las células presentadoras de antígeno (Macrófagos) se decidió generar evidencia *in vitro* en una línea celular de macrófagos pulmonares de ratón BALB/c (MH-S). Se realizó un ensayo de "Killing" donde se analizó a los macrófagos infectados con Mtb ((cepa H37Rv) tratados con Vitamina A en tiempo de 1hr, 24 hrs, 72hr y 7 días. De este ensayo se determinó la participación de la vitamina A en procesos de eliminación de la bacteria a través de UFC, se recuperó el sobrenadante para realización de Elis as y también se extrajo RNA de los macrófagos para realiza mediciones de la expresión de mensajeros de los receptores a retinoides y expresión genes relacionados con la polarización de los macrófagos a fenotipos M1 y M2.
- Se realizó un ensayo de fagocitosis con esta línea celular MH-S y se identificó la presencia de células gigantes multinucleadas (Langhans), con mayor frecuencia fueron observadas en los grupos infectados y de mayor cantidad de núcleos al realizar el tratamiento con ácido retinoico.
- Se realizó inmunofluorescencia para determinar la polarización de los macrófagos M1-M2, se usaron los anticuerpos F4/80, CD206 e iNOS en la línea celular MH-S infectadas y tratadas con ácido retinoico.
- Se realizó la búsqueda de un marcador de fusión celular para corroborar la formación de células gigantes multinucleadas (Langhans), este marcador fue CD98.
- Debido a problemas en la reproducción de la cepa murina $RAR\beta$ L-/L- esta no se pudo utilizar, por lo cual se modificó el abordaje experimental sustituyendo el uso de la cepa $RAR\beta$ L-/L- por tratamiento con retinil acetato vía intratraqueal a ratones BALB/c en la cinética planteada en el protocolo. Se realizó el experimento en dos grupos, el primero iniciando el tratamiento con retinil acetato 7 días post-infección con la cepa H37Rv. De este grupo se obtuvieron los tiempos de tratamiento al día 14, 21, 28, 60 y 90 días. Un segundo grupo de trabajo se inició el tratamiento con retinil acetato en el día 60 post-infección y se obtuvieron datos al día 90.
- Se realizó el análisis de la población de macrófagos dividiendo a estos en dos poblaciones, macrófagos obtenidos a través de lavados bronqueo-alveolares y macrófagos tisulares tomados del tejido posterior al lavado, el análisis de estas poblaciones fue realizado por medio de citometría usando los anticuerpos F4/80, CD64, CD206, iNOS y CD86 en cada uno de los tiempos propuestos en la cinética.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

- Se obtuvieron muestras para determinar la carga bacilar a través del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC's). La disminución en la carga bacilar en los ratones tratados con Retinil Acetato, fue significativa solo en el día 21 mostrando una tendencia de disminución cuando es administrada en la fase aguda, mientras que en el día 90 se observa una diferencia significativa al alza en la carga bacilar en el grupo tratado con retinil acetato. Lo que sugiere un efecto dual en el curso de la infección.
- Otra parte del tejido fue fijado y embebido en parafina, el cual fue teñido (HE) para su análisis histopatológico y morfométrico. Los resultados corroboran una disminución significativa en el día 21 del daño tisular en el grupo infectado y tratado con retinil acetato y un aumento de áreas de neumonía en los días 60 y 90 del grupo infectado y tratado.
- Se realizó la detección in-situ de marcadores específicos para macrófagos por medio de inmunohistoquímica e inmunofluorescencias. Se analizó la expresión de F4/80, CD206 y CD98.
- Derivado del trabajo realizado en la estancia se realizó la escritura y envió para su publicación, el siguiente artículo:
A low cost antibody signal enhancer improves immunolabeling in cell culture, primate brain and human cancer biopsy
 Catalina Flores-Maldonado, PhD; M. Estela Albino-Sánchez, PhD; Juan D Rodríguez-Callejas, MSc; Argel Estrada-Mondragon, PhD; Ismael León-Galicia, PhD; Raúl Maqueda-Alfaro, MSc; Claudia Perez Cruz, PhD; Eberhard Fuchs, PhD; Alejandro García-Carrancá, PhD; Ruben G Contreras, PhD; Fanis Missirlis, PhD; Abraham Rosas-Arellano, Ph.D. 2019 Aug; Neuroscience; en revisión.

11. Actividades desarrolladas en apoyo al fortalecimiento de la calidad del programa de Posgrado receptor (Precisar la participación en el programa. Ejemplo: relación de materias, cursos o seminarios a impartir, tutoría de tesis, interacción con estudiantes, etc.):

Se impartió un seminario a alumnos del posgrado, sobre el papel de los Receptores para Ácido Retinoico en la diferenciación y migración de células presentadoras de antígeno en infecciones microbianas. Se impartió tutorías para tesis de licenciatura. Derivado de la asesoría impartida, existe una constante interacción con los estudiantes del posgrado y de licenciatura del laboratorio.

12. Cronograma de las actividades generales desarrolladas (Se deben incluir las actividades descritas en el punto anterior):

Periodo: de 07/2018 a 07/2019 (periodo indicado en el punto 3)
 mes / año mes / año

Actividad	Fecha de Inicio	Fecha de Termino	Productos esperados	Impacto en el posgrado receptor
Obtención de tejido infectado y tratado con ácido retinoico (pulmón)	01/08/2018	28/02/2019	Generar evidencia de la regulación de los RAR β en la infección con Mtb	Transmisión de conocimientos que coadyuve al mejoramiento curricular e internacionalización del posgrado
Cuantificación de poblaciones de macrófagos por medio de citometría.	01/08/2018	28/05/2019	Generar evidencia <i>In Vivo</i> de participación de la regulación de APCs por los RAR β en la Tb Exp.	Transmisión de conocimientos que coadyuve al mejoramiento curricular e internacionalización del posgrado
Inmunohistoquímica de distintos blancos celulares	30/10/2018	30/05/2019	Generar evidencia <i>In Vivo</i> de participación de	Transmisión de conocimientos que coadyuve al mejoramiento



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Biología Molecular de distintos blancos celulares	10/01/2019	10/04/2019	la regulación de APCs por los RAR β en la Tb Exp. Obtención de un potencial nuevo blanco terapéutico para Tb.	curricular e internacionalización del posgrado Transmisión de conocimientos que coadyuve al mejoramiento curricular e internacionalización del posgrado
Ensayos in vitro para detallar mecanismos finos de interacción (fagocitosis, apoptosis)	30/10/2018-	28/02/2019	Generar evidencia <i>In Vitro</i> de participación de la regulación en la polarización de macrófagos por AR en la Tb Exp.	Transmisión de conocimientos que coadyuve al mejoramiento curricular e internacionalización del posgrado
Ensayos in vitro con macrófagos (MH-S) infectados y tratados con vitamina A)	10/03/2018	30/07/2019	Publicación de datos en una revista indexada	Publicaciones conjuntas de profesor y estudiantes como resultado del proyecto de investigación
Impartición de seminarios y talleres. Asesoría y dirección de tesis de Licenciatura y maestría.	01/08/2018	30/07/2019	Generar alumnos de maestría con conocimientos ampliados de antecedentes inmunológicos y nutrición.	Ampliar la cobertura de los tópicos del posgrado actual


Martha Estela Albino Sánchez
Nombre y firma del becario

Vo.Bo. 

Dr. José Leopoldo Flores Romo
Investigador titular
Depto. Biología Celular


Dra. Guadalupe Reyes Cruz
Coordinador del Posgrado Receptor
Depto. Biología Celular



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
COORDINACIÓN ACADÉMICA
BIOLOGÍA CELULAR