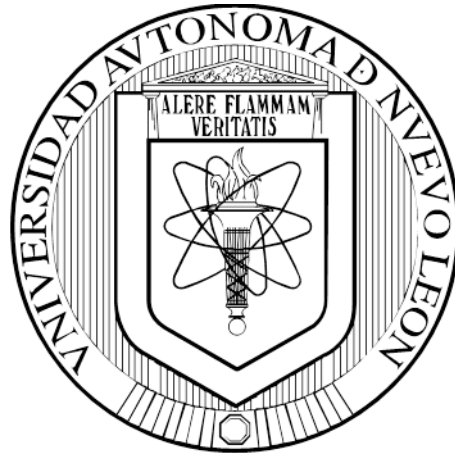


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DEL BLOQUEO DE TLR2 Y CD14 EN MACRÓFAGOS
INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis***

POR

Q.F.B. ARMANDO SALVADOR FLORES TORRES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOLOGÍA MÉDICA**

JULIO, 2015

**EFFECTO DEL BLOQUEO DE TLR2 Y CD14 EN MACRÓFAGOS
INFECTADOS DE *Mycobacterium tuberculosis***

Aprobación de la Tesis:

**Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza
Director de Tesis**

**Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Co-Director de Tesis**

**Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Miembro de la Comisión**

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Postgrado**

**EFFECTO DEL BLOQUEO DE TLR2 Y CD14 EN MACRÓFAGOS
INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis***

Presentado por:

Q.F.B. Armando Salvador Flores Torres

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza y la co-dirección del Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco.

Director

Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza

Co-DIRECTOR

**Dr. C. Adrián Geovanni Rosas
Taraco**

Miembro de la Comisión

**Dr. C. Mario César Salinas
Carmona**

DEDICATORIA

A Dios

Por darme la fuerza y el entendimiento para seguir adelante y cumplir mis metas.

A mi familia

Por su apoyo incondicional, por sus consejos y enseñanzas, por la motivación constante que me ha permitido ser la persona que soy, pero sobretodo, por su amor.

A mis amigos

Mi segunda familia: Cristóbal, Carolina, Amanda, Aranza, Ale, Edith, Antonio, Raymundo, Melissa y Yessica, porque, aunque desde lejos, me acompañaron durante estos dos años siempre dándome consejos y palabras de aliento.

Todos ustedes mucho me han dado, no será menos lo que de mí reciban.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le agradezco enormemente a mí comisión de tesis: A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, al Dr. Adrián Rosas Taraco y al Dr. Mario César Salinas Carmona por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por todo su apoyo incondicional durante estos dos años.

Le quiero agradecer también de manera muy especial a la Dra. Anna Velia Vázquez, a la Dra. Luz Isabel Pérez y al Dr. Ernesto Torres por toda su ayuda y sus consejos.

A mis compañeros de generación de maestría: Olivia, Elvis, Lizbeth, Luis, Kevin, Gustavo, Alex, Nancy, Irene, y a mis compañeros de Inmunología Erick, David y de manera especial a Flora por todos los momentos de alegrías, corajes y tristezas que pasamos juntos.

Finalmente le agradezco a personas que me ayudaron muchísimo con mis experimentos y que además se convirtieron en amigos muy importantes para mí: Edgar, Heidi, José y especialmente Azalia.

どこに行こうとしているのかわかっていなければ、
どの道を通ってもどこにも行けない。

ヘンリー・アルフレッド・キッシンジャー

*If you do not know where you are going,
every road will get you nowhere.*

Henry Alfred Kissinger

RESUMEN

Q.F.B. Armando Salvador Flores Torres

Fecha de graduación: Julio, 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Medicina

Título del Estudio: EFECTO DEL BLOQUEO DE TLR2 Y CD14 EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis*

Número de páginas: 85

Candidato para la obtención del grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica.

Área de estudio: Inmunología

Propósito y Método de Estudio: Un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha reportado previamente que receptores de la inmunidad innata como TLR2 y CD14 interactúan con la bacteria induciendo una respuesta inmune contra el bacilo. Recientemente en nuestro laboratorio se demostró el incremento de la muerte intracelular del bacilo en macrófagos KD para TLR2 y CD14. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del bloqueo de dichos receptores utilizando anticuerpos monoclonales en macrófagos THP-1 infectados con *Mycobacterium tuberculosis*. Macrófagos THP-1 fueron infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) y posterior a 48 horas de infección, los receptores TLR2 y CD14 fueron bloqueados utilizando anticuerpos monoclonales. El sobrenadante fue recuperado de los cultivos a diferentes tiempos para la cuantificación de citocinas inflamatorias (IL-6, IFN- γ , TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β). Por otro lado, las células fueron lisadas para cuantificar la carga bacteriana. Los resultados generados fueron evaluados con la prueba de ANOVA y el análisis de comparación múltiple de Tukey utilizando el software Graphpad Prism versión 6.0.

Contribuciones y conclusiones: El bloqueo de TLR2 y TLR2/CD14 con mAb favorece la muerte intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*.

FIRMA DEL ASESOR

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tuberculosis	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.3 TLR2 y CD14: Receptores de la inmunidad innata.....	4
1.4 Epidemiología de la tuberculosis	8
1.5 Citocinas	10
1.5.1 Citocinas inflamatorias: IL-6, TNF- α e IFN- γ	10
1.5.2 Citocinas antiinflamatorias: IL-10 y TGF- β	12
ANTECEDENTES	14
2.1 Papel de TLR2 y CD14 en respuesta a la infección por Mtb	14
2.2 Uso de anticuerpos monoclonales para bloquear receptores.....	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
7.1 Mantenimiento de la línea celular THP-1	22
7.2 Transformación de monocitos a macrófagos.....	23
7.3 Infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
7.4 Bloqueo con anticuerpos monoclonales	25
7.5 Determinación de la carga bacteriana.....	27
7.6 Cuantificación de citocinas.....	27
RESULTADOS	28
8.1 Mantenimiento de la línea celular THP-1	28
8.2 Transformación de monocitos a macrófagos.....	30
8.4 Bloqueo de TLR2 y CD14 de macrófagos infectados con Mtb	37
8.5 Determinación de unidades formadoras de colonias.....	42
8.6 Cuantificación de citocinas.....	44
DISCUSIÓN	54
9.1 Transformación de monocitos a macrófagos	54

9.2 Infección de macrófagos con Mtb.....	57
9.3 Modelo de bloqueo	58
9.4 Efecto del bloqueo de TLR2 y CD14 sobre la carga bacteriana de Mtb	60
9.5 Efecto del bloqueo de TLR2 y CD14 sobre la producción de citocinas	61
CONCLUSIÓN.....	65
PERSPECTIVAS.....	66
REFERENCIAS.....	65
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	66

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1. Microscopía electrónica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....</u>	<u>2</u>
<u>Figura 2. Estructura de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....</u>	<u>3</u>
<u>Figura 3. Receptores de captura y de reconocimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....</u>	<u>5</u>
<u>Figura 4. Unión de TLR2, TLR6 y CD14 para el reconocimiento de antígenos.....</u>	<u>7</u>
<u>Figura 5. Patogénesis de la tuberculosis.....</u>	<u>9</u>
<u>Figura 6. Estrategia general de transformación de monocitos a macrófagos</u>	<u>21</u>
<u>Figura 7. Expresión de marcadores de superficie de monocitos y macrófagos THP-1 transformados con PMA.....</u>	<u>24</u>
<u>Figura 8. Estrategia general del bloqueo de TLR2 y CD14</u>	<u>26</u>
<u>Figura 9. Monocitos de la línea celular THP-1.....</u>	<u>28</u>
<u>Figura 10. Cinética de crecimiento de células THP-1.....</u>	<u>29</u>
<u>Figura 11. Prueba de contaminación por <i>Mycoplasma</i>.....</u>	<u>30</u>
<u>Figura 12. Morfología durante la transformación de monocitos a macrófagos</u>	<u>31</u>
<u>Figura 13. Porcentaje de viabilidad celular durante la diferenciación</u>	<u>32</u>
<u>Figura 14. Expresión de marcadores de superficie en macrófagos THP-1...</u>	<u>33</u>
<u>Figura 15. Intensidad media de fluorescencia de CD14 y TLR2 de macrófagos transformados a diferentes tiempos.....</u>	<u>34</u>
<u>Figura 16. Prueba de fagocitosis de macrófagos transformados.....</u>	<u>35</u>
<u>Figura 17. Cuantificación de TNF-α bajo el estímulo de ESAT-6.....</u>	<u>35</u>
<u>Figura 18. Intensidad media de fluorescencia de TLR2 en macrófagos infectados y sin infectar</u>	<u>36</u>
<u>Figura 19. Intensidad media de fluorescencia de CD14 en macrófagos infectados y sin infectar.....</u>	<u>37</u>
<u>Figura 20. Fluorescencia del control de isotipo a las 6 horas.....</u>	<u>38</u>
<u>Figura 21. Dotplot antes del bloqueo de macrófagos infectados con Mtb.....</u>	<u>39</u>

<u>Figura 22. Dotplot después del bloqueo de macrófagos infectados con Mtb.....</u>	<u>40</u>
<u>Figura 23. Intensidad media de fluorescencia de macrófagos bloqueados y sin bloquear.....</u>	<u>40</u>
<u>Figura 24. Bloqueo de TLR2 en macrófagos infectados con Mtb.....</u>	<u>41</u>
<u>Figura 25. Bloqueo de CD14 en macrófagos infectados con Mtb.....</u>	<u>42</u>
<u>Figura 26. UFC de Mtb a las 6 horas de bloqueo.....</u>	<u>43</u>
<u>Figura 27. UFC de Mtb a las 24 horas de bloqueo.....</u>	<u>43</u>
<u>Figura 28. UFC de Mtb a las 48 horas de bloqueo.....</u>	<u>44</u>
<u>Figura 29. Fotografías de la carga bacteriana en macrófagos bloqueados.....</u>	<u>45</u>
<u>Figura 30. Cuantificación de IL-6 a las 6 horas de bloqueo.....</u>	<u>46</u>
<u>Figura 31. Cuantificación de IL-6 a las 24 horas de bloqueo.....</u>	<u>46</u>
<u>Figura 32. Cuantificación de IL-6 a las 48 horas de bloqueo.....</u>	<u>47</u>
<u>Figura 33. Cuantificación de TNF-α a las 6 horas de bloqueo.....</u>	<u>47</u>
<u>Figura 34. Cuantificación de TNF-α a las 24 horas de bloqueo.....</u>	<u>48</u>
<u>Figura 35. Cuantificación de TNF-α a las 48 horas de bloqueo.....</u>	<u>48</u>
<u>Figura 36. Cuantificación de IFN-γ a las 6 horas de bloqueo.....</u>	<u>49</u>
<u>Figura 37. Cuantificación de IFN-γ a las 24 horas de bloqueo.....</u>	<u>49</u>
<u>Figura 38. Cuantificación de IFN-γ a las 48 horas de bloqueo.....</u>	<u>50</u>
<u>Figura 39. Cuantificación de IL-10 a las 6 horas de bloqueo.....</u>	<u>51</u>
<u>Figura 40. Cuantificación de IL-10 a las 24 horas de bloqueo.....</u>	<u>51</u>
<u>Figura 41. Cuantificación de IL-10 a las 48 horas de bloqueo.....</u>	<u>52</u>
<u>Figura 42. Cuantificación de TGF-β a las 6 horas de bloqueo.....</u>	<u>52</u>
<u>Figura 43. Cuantificación de TGF-β a las 24 horas de bloqueo.....</u>	<u>53</u>
<u>Figura 44. Cuantificación de TGF-β a las 48 horas de bloqueo.....</u>	<u>53</u>

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla 1. Condiciones de PCR para la detección de <i>Mycoplasma</i>.....</u>	<u>23</u>
<u>Tabla 2. Grupos experimentales</u>	<u>38</u>
<u>Tabla 3. Porcentaje de eventos bloqueados a los diferentes tiempos</u>	<u>42</u>

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
APC	Alofococianina
ADC	Complejo dextrosa y albúmina
APC	Células presentadoras de antígeno
AraLAM	Lipoarabinomanano con residuos de arabinosa
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
CIITA	Transactivador de clase II
CO₂	Dióxido de carbono
CR	Receptor del complemento
DMEM	Medio esencial mínimo modificado por Dulbeco
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
ESAT-6	Proteína blanco antigénica secretada de manera temprana
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Hr	Hora
IFNγ	Interferón gamma
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IMF	Intensidad media de fluorescencia
iNOS	Enzima óxido nítrico sintetasa inducible
KD	Knock-down
KDa	KiloDalton
KO	Knock-out
MALP-2	Lipopéptido 2 activador de macrófagos
ManLAM	Lipoarabinomanano con residuos de manosa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
MyD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas
ng	Nanogramos
NK	Natural killers
NKT	Célula T Natural Killer
NRS	Especies reactivas del nitrógeno
OADC	Complejo dextrosa, albúmina y ácido oleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
LAM	Lipoarabinomanano
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Amortiguador salino de fosfatos

PE	Ficoeritrina
Poly I:C	Ácido poliriboinosilico-policitidilico
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RNAs	Ácidos ribonucleicos
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
siRNAs	RNAs de interferencia
SOCS	Proteína supresora de la señalización de citocinas
STAT-1	Transductor de señal y activador de transcripción 1
STAT-3	Transductor de señal y activador de transcripción 3
TB	Tuberculosis
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TLRs	Receptores tipo Toll
Treg	Linfocitos T reguladores
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WT	Wild-type

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por miembros del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye a *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente etiológico de TB en humanos. El bacilo de la tuberculosis infecta a millones de personas cada año, siendo la segunda causa de muerte ocasionada por enfermedades infecciosas en el mundo, después del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Esta enfermedad generalmente afecta los pulmones (tuberculosis pulmonar), pero también puede afectar otros sitios del cuerpo (tuberculosis extrapulmonar). Por lo general solo una proporción relativamente pequeña de personas infectadas con Mtb desarrollará la enfermedad (menos del 10%), sin embargo la probabilidad de desarrollar TB es alta en personas cuyo sistema inmune se encuentra comprometido, como en el caso de personas infectadas con VIH, o personas bajo tratamiento con medicamentos inmunosupresores (1).

En la actualidad, la ausencia de una vacuna completamente protectora contra la TB, el lento desarrollo de nuevos fármacos, la necesidad de regímenes terapéuticos prolongados y la emergencia de cepas multidrogo-resistentes y extremadamente drogo-resistentes de *Mtb* son cuestiones que resaltan la problemática actual de la TB (2).

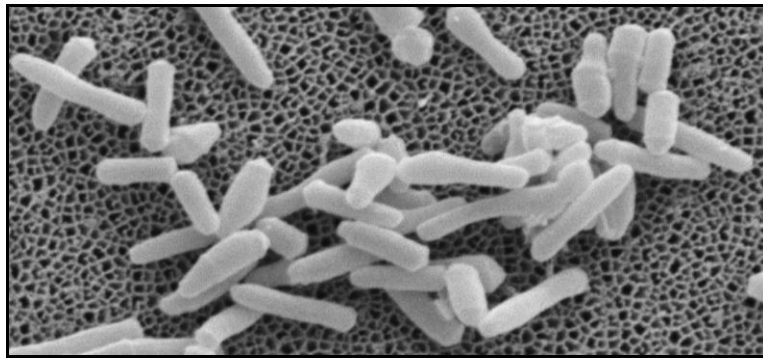


Figura 1. Microscopía electrónica de *Mycobacterium tuberculosis*. (Jean-Pierr Tossier, Franco Menozzi, Instituto Pasteur).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Las micobacterias son bacterias no móviles, no esporuladas, débilmente gram positivas, que aparecen al microscopio como bacilos de 1-4 μ m de longitud y 0.3-0.6 μ m de ancho. Están incluidas en el orden de Actinomicetales, el cual comparte con otras bacterias como *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. Una característica distintiva de estas bacterias es la presencia de ácidos micólicos en su pared celular que juegan un papel crítico para la estructura y función de la pared celular (3). Las micobacterias son bacterias intracelulares facultativas cuyas células dianas son los fagocitos, particularmente los

macrófagos y monocitos en donde se multiplican. A pesar de la existencia de muchas micobacterias ambientales, las patogénicas como Mtb son estrictamente parásitas (4).

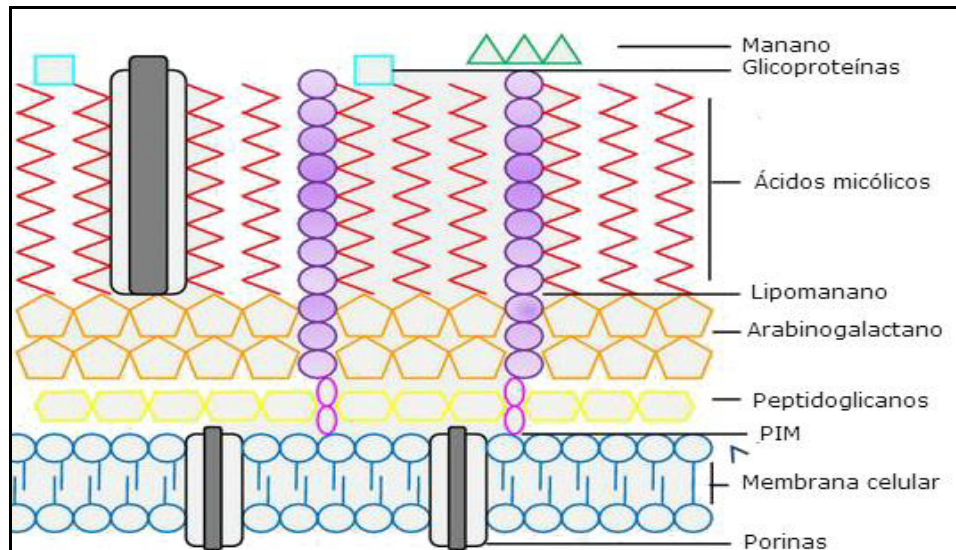


Figura 2. Estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptación de Van Crevel R., Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*, Clinical and Developmental Immunology, 2011. PIM: Manósido de fosfatidilinositol.

Mtb es un patógeno de lento crecimiento con un tiempo de duplicación de 12-24 horas bajo condiciones óptimas (5). La característica más sobresaliente de Mtb es la estructura compleja de su pared celular (Figura 2) (6), la cual es la capa más externa del bacilo, por tanto tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune (7). La pared celular está constituida principalmente por un complejo macromolecular formado por ácidos micólicos arabinogalactano-peptidoglicano (8) y posee un elevado contenido de lípidos (9). La estructura peculiar de la pared del bacilo le provee una barrera impermeable excepcional

protegiéndola de las drogas y componentes tóxicos, brindándole hidrofobicidad extrema, resistencia a la desecación, a la acidez y alcalinidad, y además juega un papel importante en su virulencia (5, 10).

1.3 TLR2 y CD14: Receptores de la inmunidad innata

El sistema inmune innato ha evolucionado para detectar y responder un amplio rango de microorganismos. La detección de microorganismos es mediada por receptores especializados llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PRRs están expresados ampliamente en células del sistema inmune como macrófagos. Después del reconocimiento del PAMP, los PRRs transducen una señal al interior de las células permitiendo la activación de factores de transcripción. Los factores de transcripción activos contribuyen al inicio del proceso inflamatorio y la maduración de células presentadoras de antígenos (APCs) involucradas en la regulación positiva de moléculas solubles y de superficie celular (11). En el caso de Mtb, existen muchos grupos de PRRs que se unen a diferentes estructuras conservadas del bacilo, incluyendo los receptores del complemento (CR1, CR3 y CR4), receptores de manosa, CD14, DC-SIGN, receptores tipo Toll, CD44 y receptores tipo scavenger (Figura 3) (12-17).

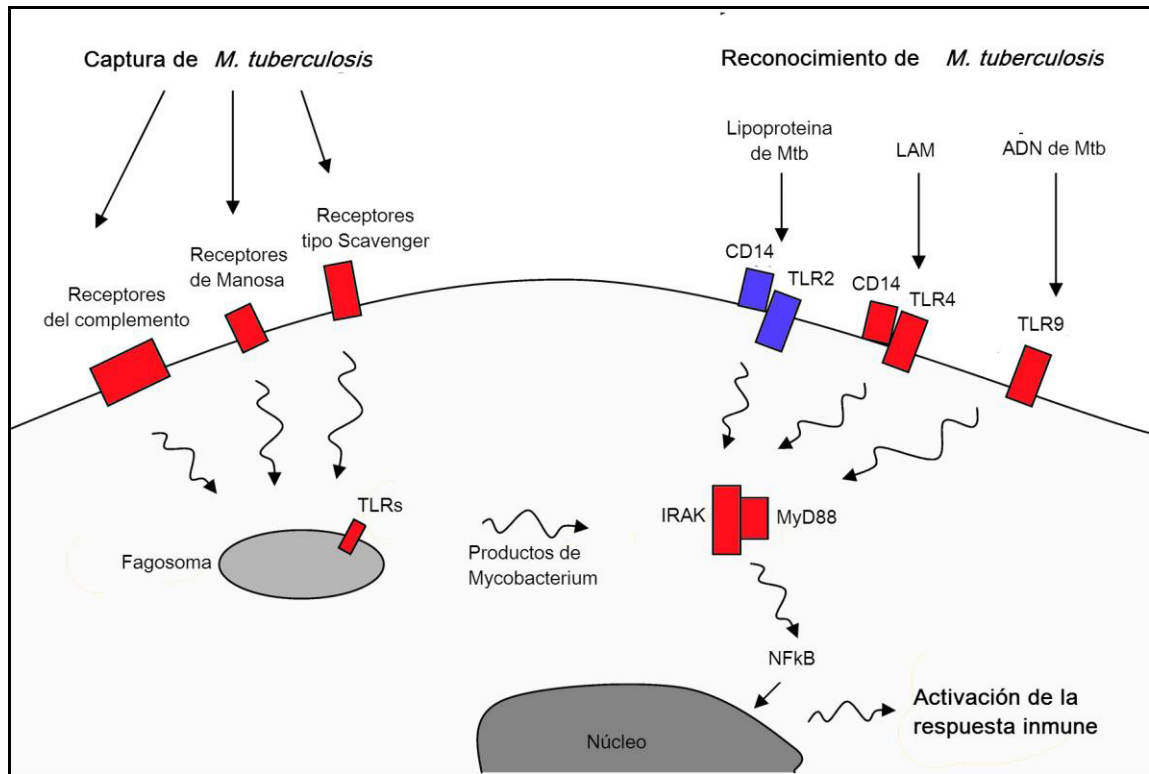


Figura 3. Receptores de captura y de reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptación de van Crevel R, Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis, Clinical Microbiology Reviews, 2002. LAM: Lipoarabinomano.

Los receptores tipo Toll (TLRs) son receptores muy bien caracterizados que reconocen un amplio rango de PAMPs (17). Los TLRs son reconocidos como miembros de la súper familia del receptor de la IL-1 (interleucina-1) y comparten una vía común de activación mediada por su dominio de señalización Toll/IL-1R (receptor de la interleucina-1) (18). En la actualidad se han descubierto diez genes que codifican para TLRs en humanos (TLR1-TLR10) y doce en ratones (TLR1-TLR9 y TLR11-TLR13) (19), de estos se han identificado los ligandos para todos ellos menos para el TLR10 de humanos y el TLR12 y TLR13 de ratones (20). Los TLRs forman heterodímeros u homodímeros para cumplir su

función de reconocimiento y señalización. La mayoría de ellos forman homodímeros con algunas excepciones, entre ellos destaca el TLR2, el cual es capaz de formar heterodímeros con TLR1 o con TLR6, lo cual le permite reconocer diferentes lipopéptidos: el heterodímero TLR1-TLR2 reconoce lipopéptidos triacilados, mientras que el heterodímero TLR2-TLR6 responde frente a lipopéptidos diacilados (21-25). Esta capacidad de reconocimiento de TLR2 es la razón por la cual diversos estudios han reportado la participación de este receptor en la respuesta de macrófagos alveolares contra Mtb donde este receptor reconoce la mayor parte de las moléculas del bacilo tales como peptidoglicanos, lipoproteínas, glicolípidos como LAM (lipoarabinomanano), AraLAM (lipoarabinomanano con residuos de arabinosa), ManLAM (lipoarabinomanano con residuos de manosa) y dimanósidos de fosfatidilinositol acilados (26).

CD14 es una glicoproteína compuesta de 375 aminoácidos ricos en repeticiones de leucina presente de manera soluble en sangre o como una proteína de membrana de 55kDa de anclaje glicosilfosfatidilinositol expresada en la superficie de monocitos, macrófagos y de leucocitos polimorfonucleares (20, 27). CD14 interactúa con muchos ligandos de TLRs y tiene una función muy importante aumentando la activación de éstos (20). Es capaz de interactuar con diversos homodímeros y heterodímeros de TLRs (Figura 4), entre esos se encuentran el TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y TLR9 (28-34). Los sitios de unión de CD14 hacia los diferentes ligandos de TLRs se solapan, de esta manera el LPS (lipopolisacárido) compete con el ADN y con

peptidoglicanos, el ácido lipoteicoico (LTA) compite con el peptidoglicano, y el ADN de doble cadena compite con polyI:IC (ácido poliriboinosilico-policitidilico) por su unión a CD14 (28, 30, 35). Aún se desconoce cómo CD14 es capaz de unirse a antígenos con tan distinta estructura molecular. Esta molécula es considerada una de las proteínas más importantes en la regulación de la respuesta inflamatoria mediada por TLR4. Dicho receptor se une al LPS conduciendo a la activación del NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas) y la expresión de citocinas mediadas por el complejo TLR4/MD2 (36). CD14 es capaz de mediar la producción de TNF- α en respuesta a ligandos del dímero TLR2-TLR6 como MALP2 (lipopéptido 2 activador de macrófagos), LTA, zymosan a y Pam₂CSK₄ (lipoproteína sintética diacilada) (20). Además CD14 se encuentra involucrado en la fagocitosis de Mtb no opsonizado por macrófagos vía el reconocimiento de componentes de la pared celular, como LAM (37).

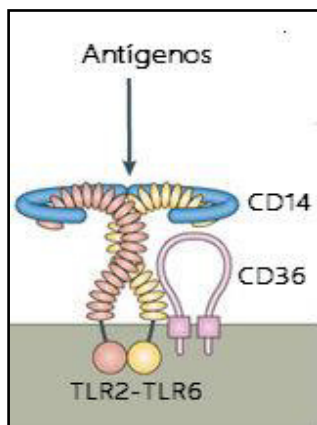


Figura 4. Unión de TLR2, TLR6 y CD14 para el reconocimiento de diferentes antígenos. Adaptación de Ploegh HL, Accessory molecules for Toll-like receptors and their function, Nature Reviews Immunology 2012.

1.4 Epidemiología de la tuberculosis

La infección por Mtb ocurre cuando algunos bacilos dispersos en el aire de un paciente con TB pulmonar activa alcanzan el alveolo de otro huésped (Figura 5) (38). Posteriormente, el bacilo es rápidamente fagocitado por macrófagos alveolares profesionales, que normalmente destruyen por mecanismos de la respuesta inmune innata a los microorganismos fagocitados (39). Las citocinas proinflamatorias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) se producen en las etapas iniciales de la infección, atrayendo neutrófilos y macrófagos los cuales fagocitarán los bacilos extracelulares y promoverán la inflamación a través de la liberación de citocinas (40). Los monocitos inflamatorios se diferenciarán en macrófagos, quienes fagocitarán a las bacterias, pero no todas ellas serán destruidas. En esta fase de la infección, la micobacteria crece logarítmicamente y los macrófagos se acumulan, ocasionando daño tisular (17).

La respuesta inmune adquirida en la tuberculosis se caracteriza por un infiltrado celular (linfocitos y otras células del sistema inmune) que formarán el granuloma. El granuloma tiene un papel dual, conteniendo la infección por una parte, la evasión y la persistencia de bacterias viables por otra (41). Después de 2 a 3 semanas de la infección, la inmunidad mediada por linfocitos T se desarrolla y las células T-antígeno específicas llegan, polarizándose principalmente a linfocitos Th1 y liberando citocinas tales como IFN- γ (interferón gamma) activando macrófagos, favoreciendo la producción de especies

reactivas del nitrógeno (RNS) para destruir la micobacteria intracelular. Subsecuentemente, el crecimiento bacteriano logarítmico se detiene y la necrosis en el granuloma inhibe el crecimiento extracelular de la micobacteria (17). De manera adicional, reportes han demostrado que las APCs pueden contribuir a un defecto en la estimulación de células T a través de la producción de citocinas inmunorreguladoras como TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) e IL-10 (interleucina-10) (38, 42).

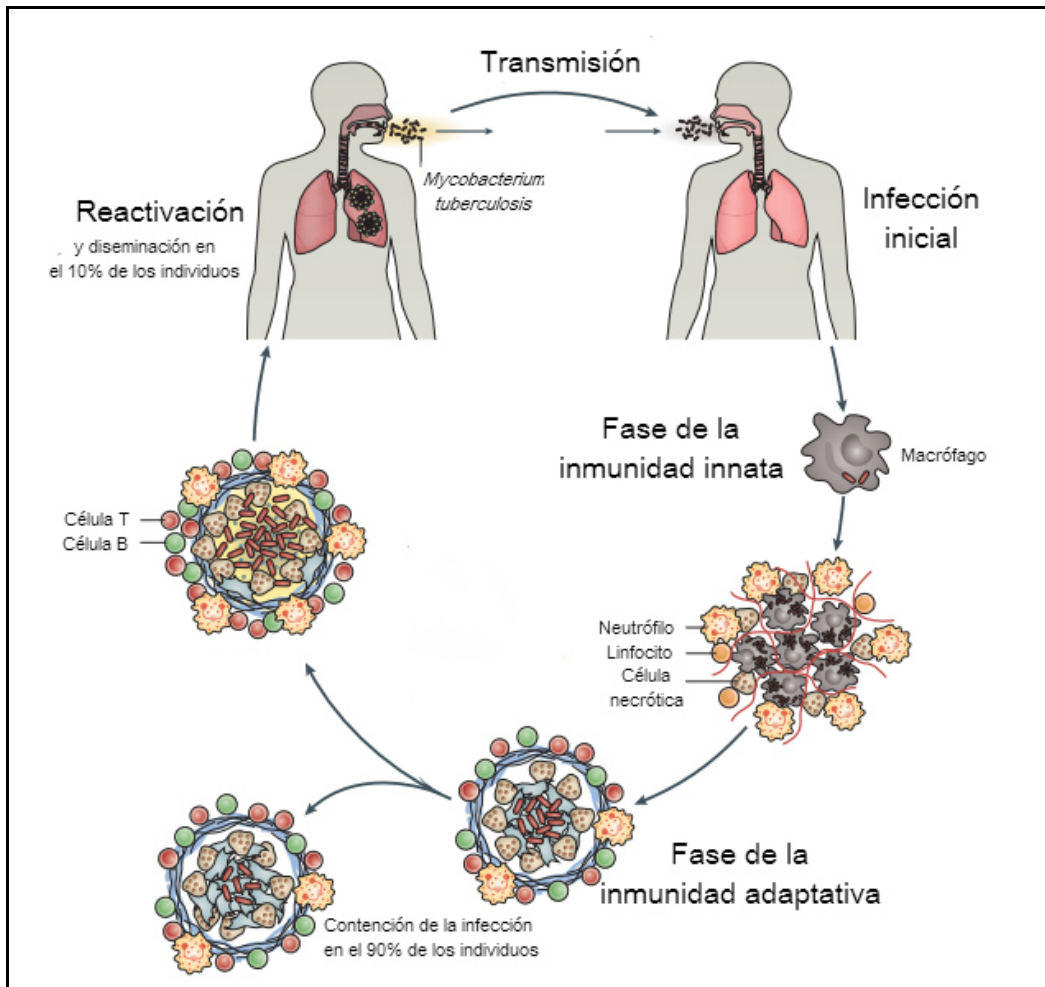


Figura 5. Patogénesis de la tuberculosis. Adaptación de Claudio Nunes-Alves MGB. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. Nature Reviews Microbiology, 2014.

1.5 Citocinas

1.5.1 Citocinas inflamatorias: IL-6, TNF- α e IFN- γ

Después de la fagocitosis de la micobacteria inhalada, los macrófagos alveolares son estimulados para secretar citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 (15, 43). La producción incrementada de IL-6 es un parámetro de muchas enfermedades inflamatorias crónicas y en conjunto con TNF- α son requeridas para la protección contra Mtb en ratones (44). A pesar de su importancia mediando la inflamación, la IL-6 no es tan importante como el TNF- α ; esta última induce en los macrófagos mecanismos antibacterianos (45). La IL-6 es importante para la resistencia contra la TB después de la infección con altas dosis de Mtb, pero no es necesaria para el control de su crecimiento a bajas dosis (46-48). Un estudio de desarrollo de vacunas empleando una subunidad de Mtb demostró la importancia de la IL-6 en la inducción de respuestas protectoras Th1 (49), sin embargo también se ha visto que puede generar un efecto inhibitorio en la señalización del IFN- γ (47). Altos niveles de IL-6 han sido encontrados en fluidos pleurales y broncoalveolares de pacientes con TB, pero a su vez se ha visto que esta citocina tiende a antagonizar los efectos del TNF- α previniendo la unión del TNF- α a los macrófagos inhibiendo su actividad antibacteriana (50-52). Por otro lado, un estudio demostró que la IL-6 favorece el crecimiento de la micobacteria intra y extracelularmente (53) mientras inhibe la producción de TNF- α y de IL-1 β a nivel transcripcional *in vitro* (54).

El TNF- α es una citocina crítica para la respuesta contra Mtb, puede estimular neutrófilos y macrófagos de manera autocrina y parácrina para inducir la apoptosis y la producción de RNS y de especies reactivas del oxígeno (ROS), trayendo como consecuencia la destrucción del bacilo (55). Esta citocina es esencial para la formación del granuloma y probablemente para su mantenimiento (56) y además es una señal importante para la activación del macrófago, en conjunto con el IFN- γ (57). Los ratones deficientes de esta citocina son incapaces de controlar la infección por Mtb, y los granulomas no se forman adecuadamente en sus pulmones (58), además los ratones en los cuales el TNF- α es neutralizado durante la fase crónica de la infección rápidamente sucumben a la enfermedad (59). El reciente desarrollo de fármacos anti-TNF- α para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas ha generado la reactivación de casos de TB (58).

Por otra parte, el IFN- γ es una citocina producida especialmente por células T para activar macrófagos e inducir la producción de ROS y RNS y es probablemente la citocina más importante para la respuesta inmune contra micobacterias (4). Esta citocina es secretada principalmente por células Th1 y células CD8⁺, células NK, NKT y APCs (60). Los ratones deficientes en IFN- γ o en su receptor son extremadamente susceptibles a Mtb y BCG (bacilo de Calmette y Guérin); dichos ratones desarrollan la infección rápidamente mostrando una alta carga bacteriana, formación progresiva y destructiva del granuloma y una muerte temprana (61, 62). Los pacientes con defectos genéticos en la función del receptor de IFN- γ o en su vía de señalización (por

ejemplo STAT1, transductor de señal y activador de transcripción 1) son particularmente propensos a infecciones crónicas por micobacterias (63). Además, el tratamiento a estos pacientes con IFN- γ exógeno genera mejoría clínica (64).

1.5.2 Citocinas antiinflamatorias: IL-10 y TGF- β

Al primer contacto de la micobacteria con los fagocitos se producen grandes cantidades de TNF- α , IL-12 y otras citocinas proinflamatorias, pero además se induce la producción de IL-10 y TGF- β las cuales pueden inhibir su efecto (65-68). Números elevados de células T reguladoras (Treg), las cuales producen estas citocinas inmunosupresoras, están reportadas en sangre periférica de pacientes con TB y en el sitio de infección (69). La producción de IL-10 seguida de la fagocitosis del bacilo puede ocurrir como una respuesta natural antimicrobiana por el huésped, o puede ser inducida por la bacteria como un mecanismo de evasión (70). La IL-10 tiene la capacidad de bloquear la maduración del fagosoma de manera dependiente de STAT-3 (Transductor de señal y activador de transcripción 3), lo cual facilita la supervivencia de Mtb y su crecimiento (71). Un mecanismo importante de destrucción de Mtb es mediante la activación de macrófagos por el IFN- γ , el cual puede ser inhibido por la IL-10 (72, 73). Además de antagonizar los efectos del IFN- γ , la IL-10 producida durante la fagocitosis puede bloquear la presentación de antígeno regulando negativamente la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (72).

De manera parecida a la IL-10, el TGF- β tiene un papel prominente en la desactivación de macrófagos y supresión de células T en respuesta a Mtb (74). Una característica importante de la TB pulmonar activa es la producción excesiva de esta citocina, donde en estudios de TB en humanos se ha visto que la IL-10 y el TGF- β puede encontrarse elevada en pulmones (75) y en suero de pacientes con TB pulmonar latente (76). En cultivos de células mononucleares fagocíticas infectadas o expuestas a los componentes de la bacteria también producen altas concentraciones de estas citocinas (77). Además, la producción de TGF- β está asociada con fibrosis durante la infección crónica con Mtb (78).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Papel de TLR2 y CD14 en respuesta a la infección por Mtb

Existen diversos reportes que indican la importancia de TLR2 en la respuesta contra Mtb. Mtb y la lipoproteína de 19-kDa inhiben la expresión del MHC-II y el procesamiento de Ag mediante un mecanismo dependiente del TLR2 el cual involucra un defecto del transactivador de clase II (CIITA) (79). La proteína ESAT-6 de Mtb (blanco antigénico secretado tempranamente) es capaz de unirse directamente al TLR2; esta unión activa a la proteína Akt (proteín-cinasa B), esta a su vez impide la unión de la proteína adaptadora MyD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88) con la proteína citoplasmática IRAK-4 (cinasa 4 asociada al receptor de interleucina 1). Al impedir esta unión se impide la cascada de señalización que normalmente concluiría en la activación del factor de transcripción NF- κ B, necesario para la producción de citocinas inflamatorias necesarias para la defensa del macrófago contra el bacilo (80).

Mtb ha desarrollado mecanismos para inhibir la maduración de los fagosomas (81, 82), y para neutralizar el ambiente ácido del compartimento fagolisosomal (83, 84) asegurando así su supervivencia dentro de los fagocitos. Sin embargo

recientemente se demostró que la bacteria es capaz de trasladarse del fagolisosoma al citosol (85), una característica solo de algunas cepas virulentas de micobacterias. En este estudio se observó que la sola infección con Mtb regula negativamente la expresión del TLR2 y de otras proteínas involucradas en la señalización vía MyD88 (85).

Para resaltar aún más la importancia de TLR2 en la respuesta contra Mtb, en un modelo de ratones knockout (KO) para TLR2 infectados con el bacilo se observó el desarrollo de lesiones granulomatosas pulmonares con infiltrados de neutrófilos, más grandes a los encontrados en ratones wild-type (WT) (86), además bajos niveles de iNOS (sintasa de óxido nítrico), TNF- α , TGF- β , IL-1 β e IL-2 comparados con los ratones WT (86).

CD14 funciona como una molécula accesoria que al unirse al TLR4 o al dímero TLR1-2 es capaz de reconocer estructuras de Mtb. El conocimiento del papel *in vivo* de CD14 durante la infección con micobacterias es relativamente limitado. La ausencia de CD14 resulta en producción reducida de TNF- α por macrófagos infectados con *M. avium in vitro*, los ratones KO presentan una reacción granulomatosa similar a los WT después de la infección intravenosa *in vivo* (87). Por otra parte, ratones KO para CD14 con TB pulmonar la mortalidad es baja comparada con los ratones WT después de 20 días de infección, la cual está acompañada de una inflamación pulmonar reducida (88).

Recientemente en nuestro laboratorio se generó un modelo knock-down (KD) para TLR2, CD14 o ambas moléculas en macrófagos derivados de monocitos de la línea celular THP-1 utilizando siRNAs (RNAs de interferencia), donde posteriormente se infectaron a los macrófagos silenciados. En este estudio se observó un incremento en la expresión de TNF- α , IL-12 e IFN- γ a las 48 horas de infección. La activación de macrófagos por IFN- γ en el modelo Knock-Down condujo a un incremento en la transcripción de iNOS, además de la reducción de la carga bacteriana, concluyendo de esta manera que los receptores de la inmunidad innata CD14 y TLR2 de macrófagos THP-1 favorecen los mecanismos de internalización y supervivencia de Mtb en un modelo de infección *in vitro* (89).

2.2 Uso de anticuerpos monoclonales para bloquear receptores

Desde hace algún tiempo se han utilizado anticuerpos monoclonales (mAb) para evaluar la función o el efecto sobre diversas moléculas en diferentes patologías. Existen estudios donde se demuestra que el bloqueo de TLR2 utilizando mAb puede ser de utilidad para algunas enfermedades. Entre estas investigaciones se encuentra la de Claudia Monaco *et al.* en el 2009, en donde bloquearon TLR2 en un modelo *in vitro* de arteriosclerosis humano. En este estudio encontraron que la señalización de TLR2 mediante MyD88 juega un papel predominante en la inflamación y en la degradación de la matriz en la arteriosclerosis humana, y sugiriendo el empleo de anticuerpos anti-TLR2 como una estrategia terapéutica para la arteriosclerosis y sus complicaciones (90).

Por otra parte, Susu M. Zughaier en el 2010 publicó un artículo en donde bloquea TLR2 en macrófagos y las estimuló con polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis*. Al bloquear TLR2 se observó una reducción significativa de los niveles de TNF- α e IL-18, concluyendo que el reconocimiento de polisacáridos capsulares de meningococos por parte de macrófagos ocurre vía TLR2 (91).

En la actualidad no se ha generado ninguna vacuna protectora contra la TB y siguen en aumento el número de casos de pacientes infectados con cepas multidrogo y extremadamente drogo-resistentes, por lo tanto es necesaria la búsqueda de nuevas terapias para contener la infección. Estudios previos señalan la importancia de TLR2 y de CD14 como moléculas de la respuesta inmune innata que participan en el reconocimiento de estructuras de Mtb y éstas han sido utilizadas como mecanismos de evasión de la respuesta inmune. El uso de mAb en un modelo *in vitro* podría ayudar a elucidar el papel de estos receptores en la TB y de esta manera generar futuras terapias para el control de la infección.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Son necesarios estudios *in vitro* para determinar el efecto del bloqueo de CD14 y TLR2 en un modelo de infección establecida para elucidar si se favorece la sobrevivencia o muerte intracelular de *M. tuberculosis*.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

El bloqueo de TLR2 y CD14 de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* favorece su muerte intracelular.

CAPÍTULO 5

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del bloqueo de TLR2 y CD14 durante la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos derivados de la línea celular de monocitos THP-1.

CAPÍTULO 6

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar el modelo de bloqueo de TLR2 y CD14 en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*.
2. Determinar el efecto del bloqueo de TLR2 y CD14 sobre la carga bacteriana en macrófagos infectados con el bacilo.
3. Cuantificar los niveles de citocinas inflamatorias (IL-6, IFN- γ y TNF- α), antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β) en el modelo de bloqueo de TLR2 y CD14 en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*.

CAPÍTULO 7

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Mantenimiento de la línea celular THP-1

La línea celular de monocitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202) se expandió en medio de cultivo RPMI1640 (Sigma R6504-1L) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (ATCC 30-2020) inactivado con calor en frascos de cultivo de 25, 75 y 125 cm² (Corning 430790, 431079 y 431080). Posteriormente, las células fueron acondicionadas en medio Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Life technologies 12491-015) con L-glutamina al 1% (Sigma G-1517) y enriquecidos con 5% de suero fetal bovino (ATCC 30-2020) inactivado. Se descartó la contaminación por *Mycoplasma* utilizando el kit PCR Universal Mycoplasma Detection (ATCC 30101-K) sembrando 10⁴ células con una confluencia del 90%. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 3 minutos a 4°C (Thermo Scientific), y se resuspendió el botón celular con buffer de lisis. Posteriormente se realizó la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) siguiendo las instrucciones del proveedor (Tabla 1). Se evaluó la viabilidad de las células durante todos los experimentos con la tinción de azul tripano (Sigma-Aldrich 468) observándolas con ayuda de una cámara de Neubauer (Baxter B3178-1) por microscopía de luz (Zeiss 470801).

Tabla 1. Condiciones de PCR para la detección de *Mycoplasma*.

	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Desnaturalización	94	30	20
Alineamiento	70→60.5	30	
Elongación	72	45	
	Continuar con los ciclos con una temperatura de alineación constante		
Desnaturalización	94	30	12
Alineamiento	60	30	
Elongación	72	45	
	Elongación final: 72°C por 4 minutos 4°C en espera		

7.2 Transformación de monocitos a macrófagos

Los macrófagos fueron transformados a partir de monocitos de la línea celular THP-1 mediante estimulación con Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA; Sigma-Aldrich 8139) a tres diferentes concentraciones (5, 10 y 15nM) a dos diferentes tiempos (48 y 72horas). Para la evaluación de la diferenciación completa se analizaron: a) morfología característica de macrófagos por microscopía (Life Technologies 4471136), b) fagocitosis utilizando perlas de látex (Polysciences 19824-1), c) viabilidad celular con la tinción de azul de tripano (SIGMA 468) y d) marcadores característicos de las etapas de diferenciación de macrófagos (Figuras 6 y 7) (92) tiñendo con anticuerpos monoclonales anti-CD14 (Conjugado con APC-Cy7, clona MΦP9, BD 557831), anti-CD35 (Conjugado con PE, clona E11, BD 559872), anti-CD44 (Conjugado con FITC, clona G44-26, BD 555478) y anti-CD282 (Conjugado con Alexa Fluor 647, clona 11G7, BD 558319) utilizando el citómetro de flujo LSRFORTESSA de BD capturando 10,000 eventos por cada tratamiento. Los resultados fueron analizados en el software Flowing Software 2.0.

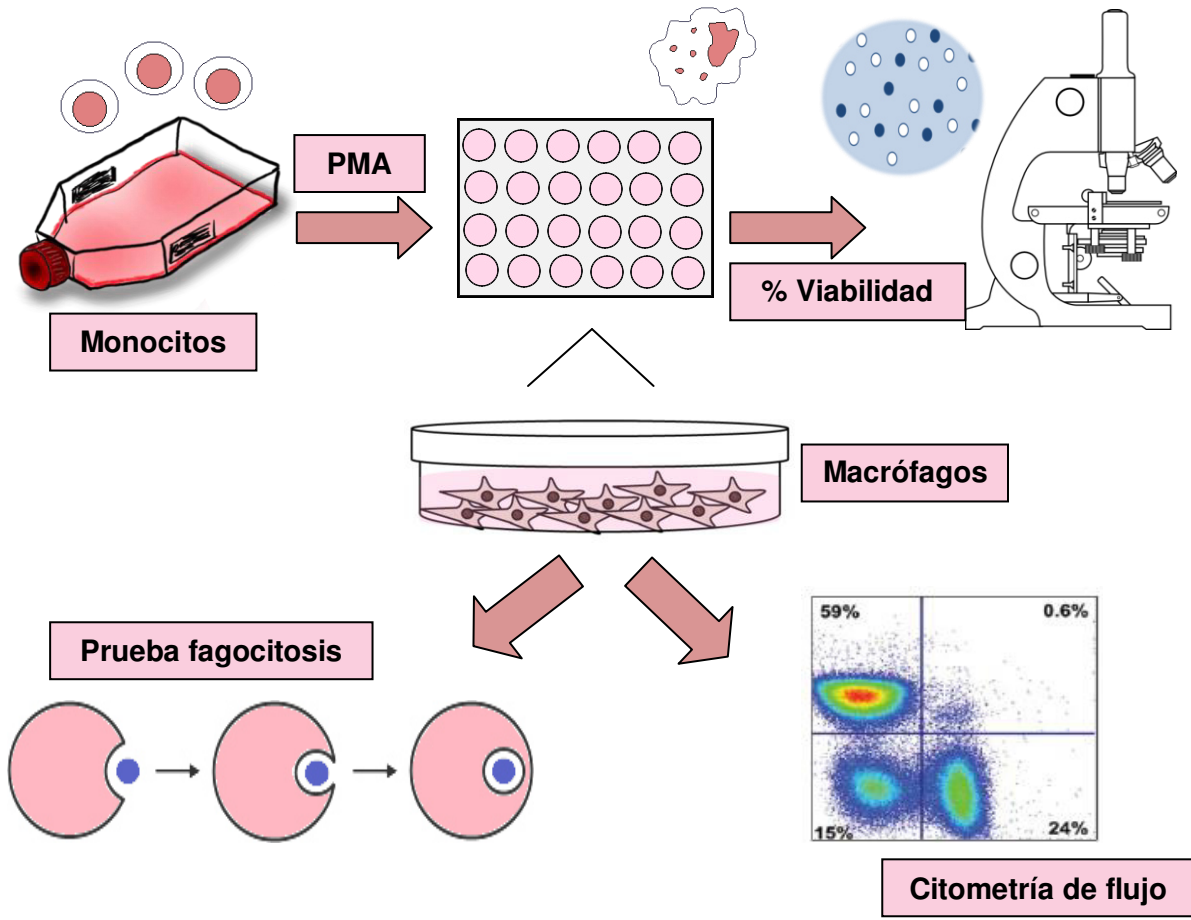


Figura 6. Estrategia general de la transformación de monocitos a macrófagos.

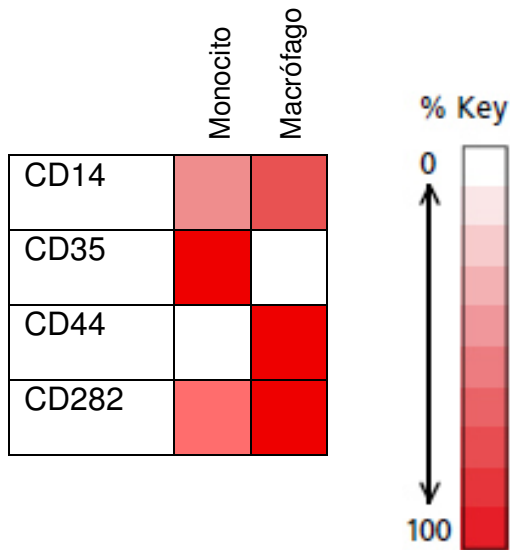


Figura 7. Expresión de marcadores de superficie de monocitos y macrófagos THP-1 transformados con PMA.

7.3 Infección con *Mycobacterium tuberculosis*

Para realizar la infección con Mtb se utilizó la cepa de referencia H37Rv (ATCC 25618) la cual se creció inicialmente en medio Middlebrook 7H9 (Difco 271310) con 0.5% de glicerol (Jalmex 56815) enriquecido con el complejo dextrosa y albúmina, ADC (BD 212352). La bacteria se dejó creciendo por tres semanas para que alcanzara el crecimiento exponencial, y posteriormente fue resembrada en agar Middlebrook 7H10 (Difco 26210) con 0.5% de glicerol y enriquecido con el complejo dextrosa, albúmina y ácido oleico, OADC (BD, 211886). Después se infectaron los macrófagos THP-1 con Mtb a una razón de infección de 5:1 (bacilos:macrófagos) utilizando el tubo número uno de la escala de McFarland. Las células se mantuvieron en cultivo por 48 horas a 37°C con 5% de CO₂ (Sterilchem gard III MCO-18AIC-UV).

7.4 Bloqueo con anticuerpos monoclonales

Se transformaron los monocitos a macrófagos con 10nM de PMA a 48horas utilizando placas de cultivo de 48 pocillos (Thermo Scientific 150687) a 1×10^5 células por pocillo en 500µL. Se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD14 (Conjugado con FITC, clona 61D3, Biogems 06211-50-25) y contra TLR2 (Conjugado con PE, clona TL2.1, Biogems 24911-60-100) para bloquear dichos receptores en los macrófagos infectados y sin infectar a diferentes tiempos (0, 6, 24 y 48horas). Para determinar la eficiencia del bloqueo se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra los mismos receptores de la misma clona con diferente fluorocromo (mAb dirigido contra TLR2 conjugado

con APC, clona TL2.1, eBioscience 17-9922-42; y dirigido contra CD14 conjugado con PE, clona 61D3, eBioscience 12-0149-42). Como control se utilizó un control de isotipo de las mismas clonas y fluorescencias que los anticuerpos utilizados para bloquear (IgG1 conjugado con FITC, clona 61D3, IgG2a conjugado con PE, clona TL2.1, BD Simultest IMK-Lymphocyte 340182). Fueron capturados 10,000 eventos por cada tratamiento. Los resultados fueron analizados en el software Flowing Software 2.0. Se contaron con dos grupos: El primer grupo fue utilizado para obtener el porcentaje de bloqueo por citometría de flujo, y otro grupo del cual se obtuvieron las células para cuantificar las unidades formadoras de colonias y el sobrenadante para medir citocinas (Figura 8).

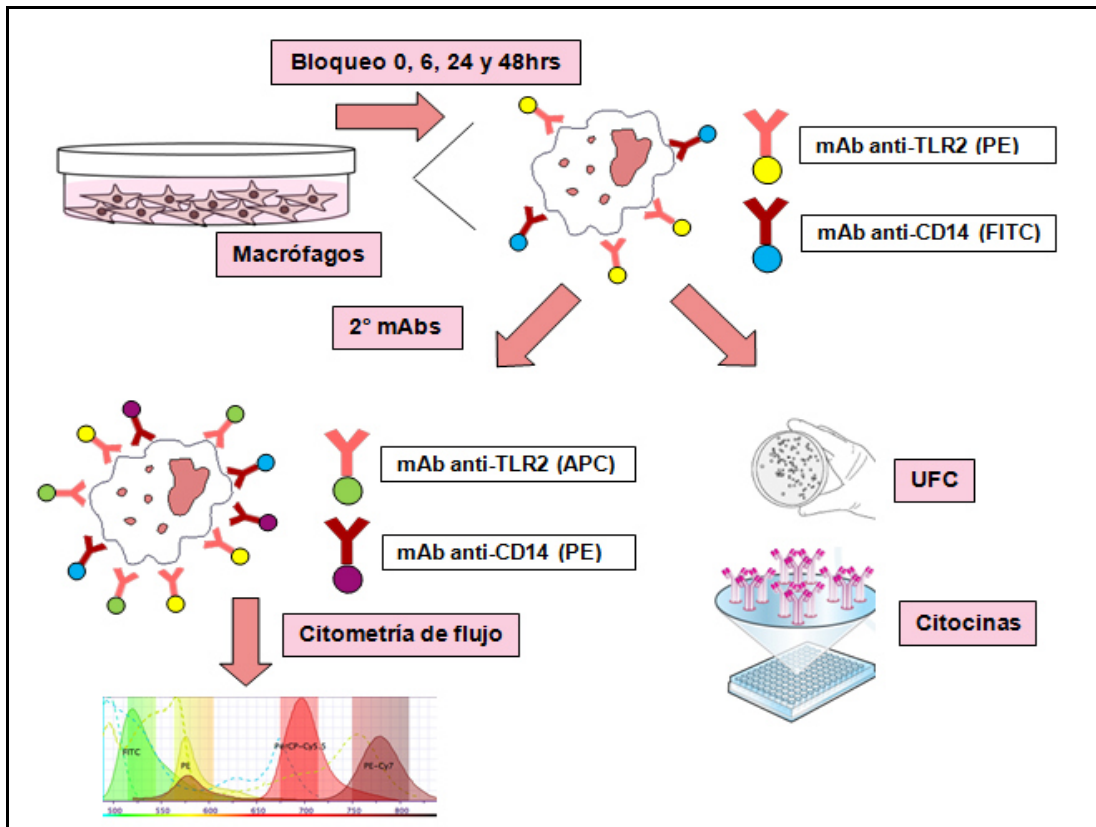


Figura 8. Estrategia general del bloqueo de TLR2 y CD14.

7.5 Determinación de la carga bacteriana

Después de los diferentes tiempos de bloqueo, las células fueron despegadas por pipeteo, centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos (Thermo Fisher SL40P), y del botón celular fueron lisadas utilizando agua estéril a 0°C. Se sembró el lisado celular realizando diluciones 1:10 en medio Middlebrook 7H10 (Difco 26210) por triplicado para cada tratamiento y se dejaron incubando 3 semanas para permitir el crecimiento bacteriano. Posteriormente, se contaron las unidades formadoras de colonias (Sol-Bat Q20) para obtener la carga bacteriana en cada uno de los grupos de estudio.

7.6 Cuantificación de citocinas

A partir de los macrófagos infectados y bloqueados se recuperó el sobrenadante de cultivo a los diferentes tiempos (0, 6, 24 y 48 horas) para la cuantificación de las citocinas IL-6 (EH2IL6, Thermo Scientific), IL-10 (EHIL10, Thermo Scientific), IFN- γ (DIF50 RyD Systems), TNF- α (EH3TNFA, y TGF- β (DB100B, RyD Systems) por ELISA. La absorbancia para cada ensayo se obtuvo utilizando un lector de placas (Biorad) a 495nm de longitud de onda. Se construyó una curva de calibración a partir de las lecturas de los estándares, mediante ésta se obtuvo la ecuación de la recta, se despejaron los valores de las lecturas y se calculó la concentración de citocinas para cada tratamiento.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS

8.1 Mantenimiento de la línea celular THP-1

Se trabajó con la línea celular THP-1 (ATCC TIB-202), la cual está constituida por monocitos humanos provenientes de una leucemia monocítica aguda. Estas células no son adherentes, su crecimiento es en suspensión celular (Figura 9), cuyo tiempo de duplicación es de aproximadamente 30 horas.



Figura 9. Monocitos de la línea celular THP-1.

Se realizó una cinética de crecimiento de las células, encontrándose un tiempo aproximado de duplicación de 30 horas desde el pase número dos (Figura 10).

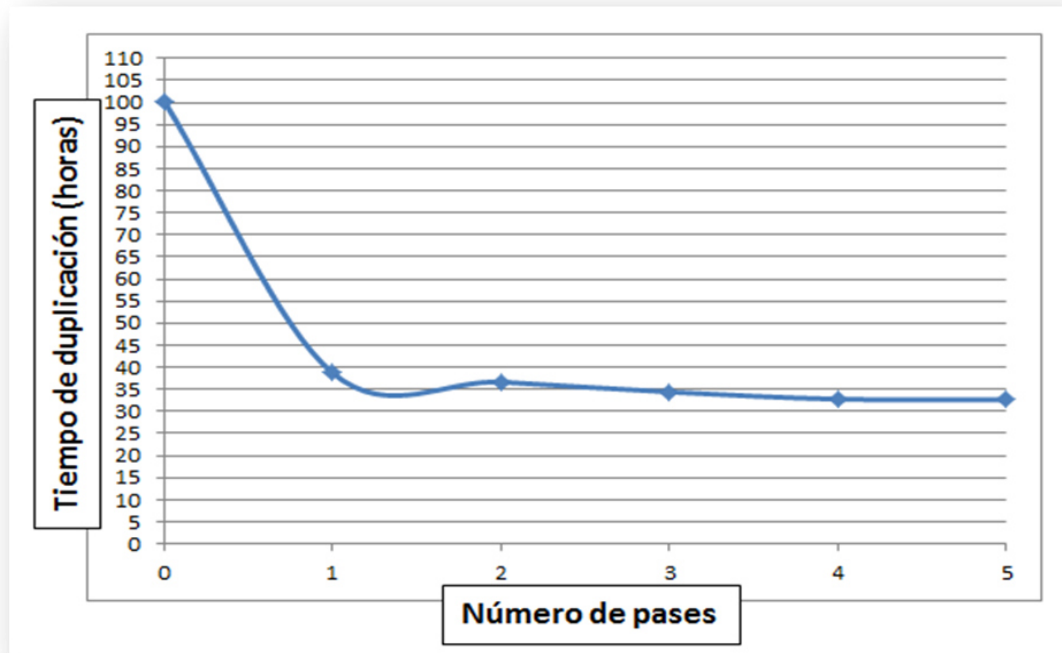


Figura 10. Cinética de crecimiento de células THP-1.

Se descartó la presencia de *Mycoplasma*, una bacteria comúnmente encontrada en líneas celulares de muy difícil detección (93). Para ello se realizó una prueba de PCR específica, la cual detecta más de 60 especies de *Mycoplasma*, incluyendo las especies más comunes que infectan cultivos celulares: *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinae* y *M. orale*. En la figura 11 se presenta un gel de agarosa al 3% donde la línea celular empleada en el estudio se encuentra libre de la bacteria al no observarse ninguna banda, distinto a lo observado en el control positivo donde se presenta una banda cercana a los 400 pares de bases.

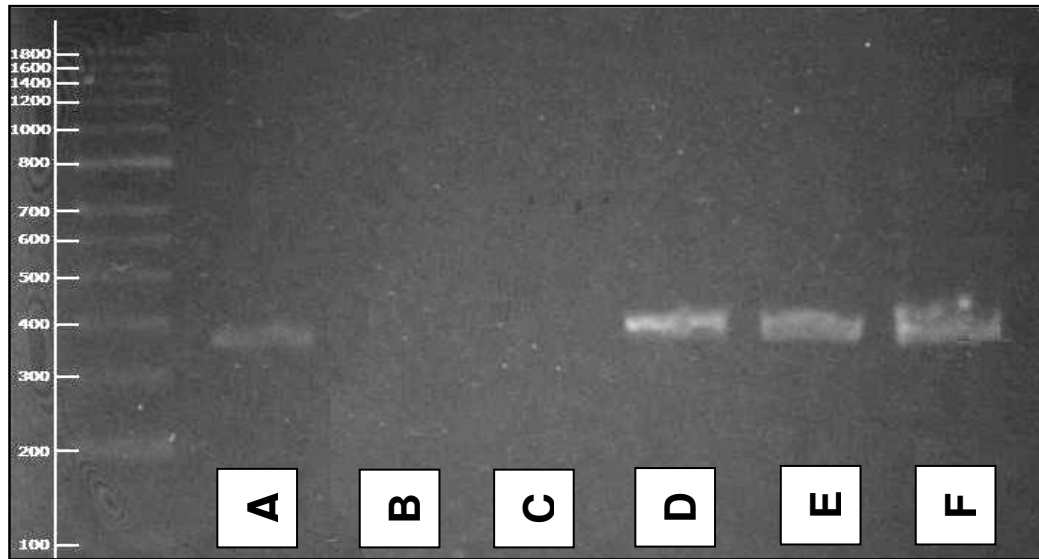


Figura 11. Prueba de contaminación por *Mycoplasma*. Gel de agarosa al 3% de muestras de células THP-1. A) Control positivo B) Control negativo (vehículo), C) Muestra 1, D) Muestra 2, E) Control positivo + muestra 1, F) Control positivo + muestra 2. Control positivo: (DNA cromosómico de *M. arginini*), Control negativo: Vehículo, Muestra 1: células THP-1, Muestra 2: células THP-1 contaminadas con *Mycoplasma*.

8.2 Transformación de monocitos a macrófagos

La diferenciación de los monocitos THP-1 puede ser estimulada con diferentes sustancias, entre ellas con forbol-12-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA o PMA). Bajo la inducción del PMA, las células THP-1 paran de proliferar y se diferencian en células con apariencia de macrófagos. La diferenciación de las células THP-1 está asociada a una alteración dramática en la morfología celular, adquiriendo una variedad de formas, sus núcleos se vuelven irregulares y pueden reconocerse vacuolas fagocíticas en su citoplasma (94).

Se probaron tres diferentes concentraciones de PMA: 5, 10 y 15nM a dos diferentes tiempos: 48 y 72 horas. La transformación completa de los monocitos a macrófagos fue evaluada en base a sus cambios morfológicos mediante microscopía, por su capacidad funcional con pruebas de fagocitosis y en base a la expresión positiva o negativa de moléculas de superficie por citometría de flujo.

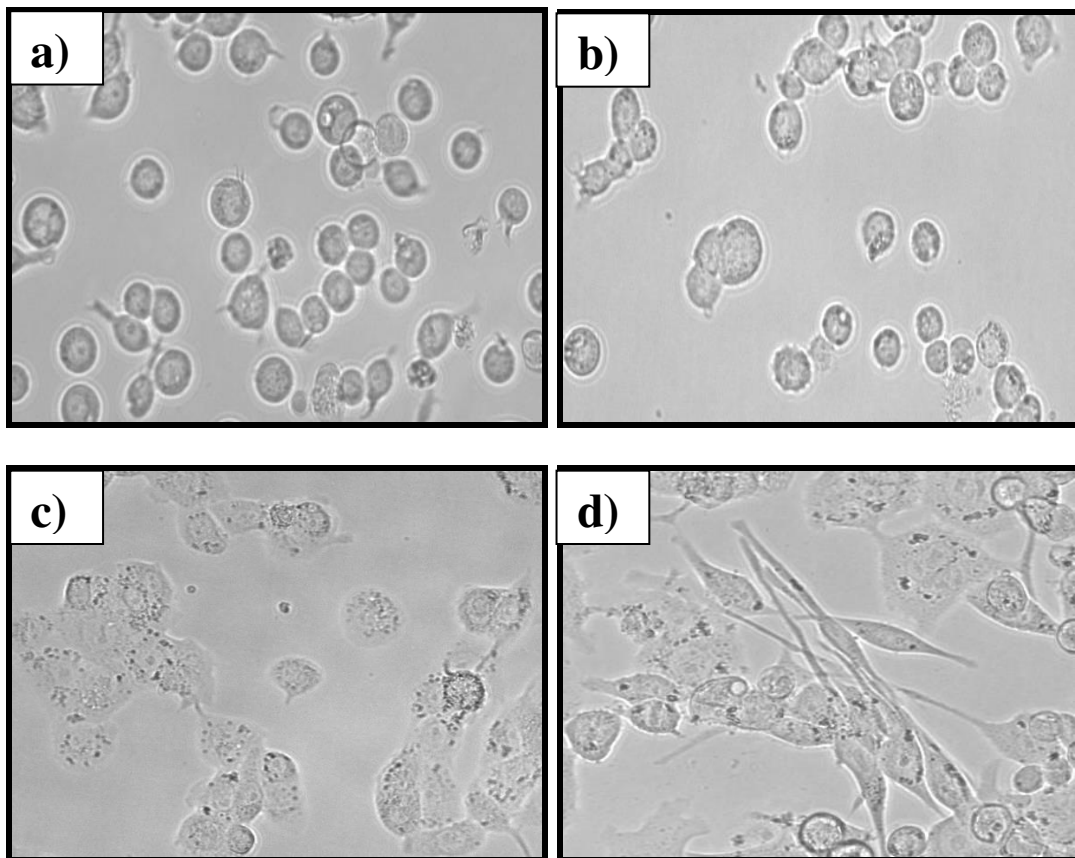


Figura 12. Morfología durante la transformación de monocitos a macrófagos. Se utilizó 10nM de PMA a las a) 0 horas de transformación, b) 24 horas de transformación, c) 48 horas de transformación y d) 72 horas de transformación.

A las 0 horas de transformación, las células tenían aún forma redonda y se encontraban en suspensión (Figura 12a). Para las 24 horas las células ya se encontraban adheridas a la placa, incrementando además su tamaño (Figura 12b). A las 48 horas incrementaron aún más su tamaño y ya se apreciaban orgánulos citoplasmáticos (Figura 12c). Finalmente, a las 72 horas después de refrescarles el medio con medio libre de PMA, las células obtuvieron diversas formas, donde la más común presentaba prolongaciones extendidas asemejando fibroblastos (Figura 12d).

De manera adicional, se evaluó la viabilidad de los macrófagos utilizando la tinción de azul de tripano, en donde se observó una viabilidad se mantuvo por mayor del 90% durante la transformación a las diferentes horas evaluadas (Figura 13).

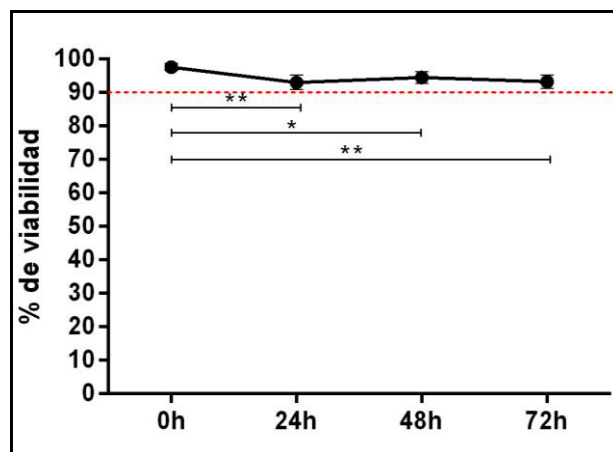


Figura 13. Porcentaje de viabilidad celular durante la diferenciación. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

Además, se evaluó el fenotipo de los macrófagos transformados a los diferentes tiempos y diferentes concentraciones en base a reportes que demuestran el aumento o la disminución de la expresión de moléculas de superficie y la disminución o desaparición de otros marcadores en la transición de monocitos a macrófagos (92) mediante citometría de flujo utilizando los marcadores CD14 (mayor intensidad en macrófagos), CD35 (presencia en monocitos, ausencia en macrófagos), CD44 (presencia en macrófagos, ausencia en monocitos) y TLR2 (mayor intensidad en macrófagos). Tanto los macrófagos transformados a las 48 y 72 horas expresaron CD44, CD14 y TLR2, y fueron negativos para CD35 (Figura 14), pero la expresión de las primeras moléculas fue mayor a las 48 horas de transformación, por lo cual se optó por utilizar este tiempo de transformación (Figura 15).

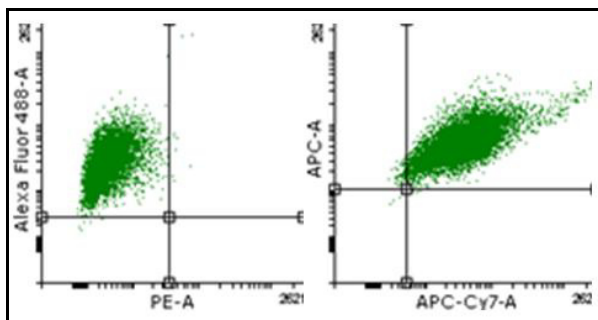


Figura 14. Expresión de marcadores de superficie en los macrófagos THP-1. a) Células positivas para Alexa Fluor 488 (CD44) y negativas para PE (CD35). b) Células positivas para APC (TLR2) y CD14 (APC-Cy7).

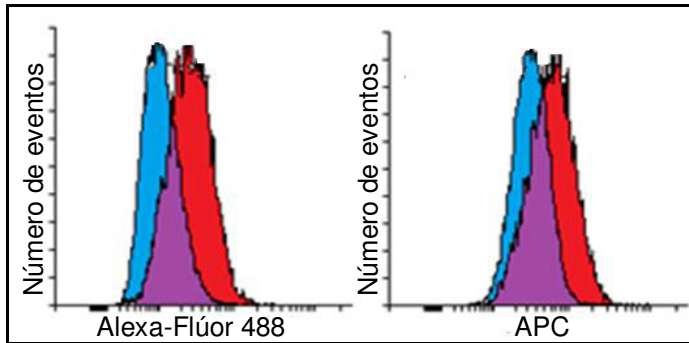


Figura 15. Intensidad media de fluorescencia de CD14 (Alexa Fluor 488) y TLR2 (APC) de macrófagos transformados a diferentes tiempos. La transformación se realizó utilizando 10nM a las 48 horas (rojo) y 72 horas (azul). El color morado indica el solapamiento de ambos tratamientos.

Una vez que se decidió el mejor tiempo de transformación (48 horas) y la mejor concentración de PMA (10nM), se realizaron pruebas funcionales de fagocitosis añadiendo 10 perlas de látex por cada macrófago (10:1) a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3 y 4 horas), donde >90% de los macrófagos fueron capaces de fagocitar las perlas a partir de la segunda hora (Figura 16).

Finalmente se realizó una prueba funcional de los macrófagos determinando la producción de TNF- α utilizando ESAT-6, una proteína anteriormente reportada que induce la producción de esta citocina en células THP-1 (95), a una concentración de 10 μ g/mL a las 0, 6, 8 y 24 horas. Los sobrenadantes fueron recuperados y se evaluó la producción de TNF- α , donde se observó que los macrófagos THP-1 son capaces de producir grandes cantidades de esta

citocina bajo el estímulo, y que la producción de TNF- α disminuye con el tiempo, siendo el pico máximo a las 4 horas (Figura 17).

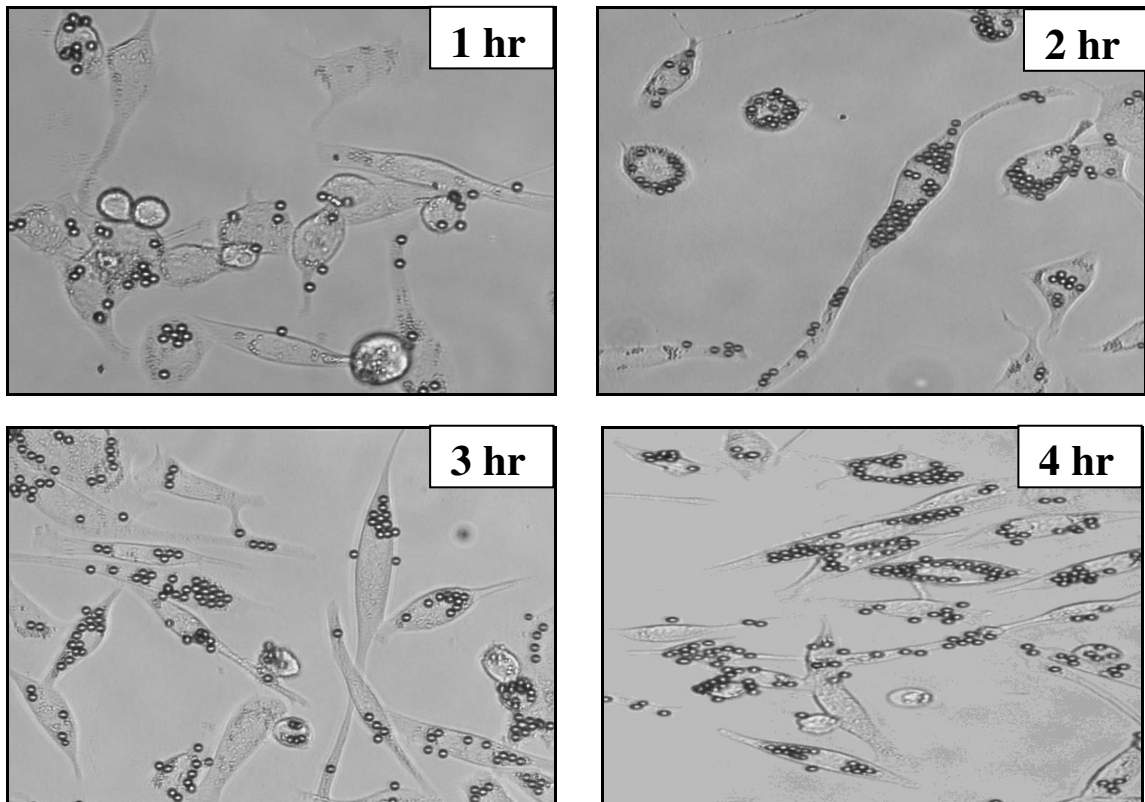


Figura 16. Prueba de fagocitosis de macrófagos.

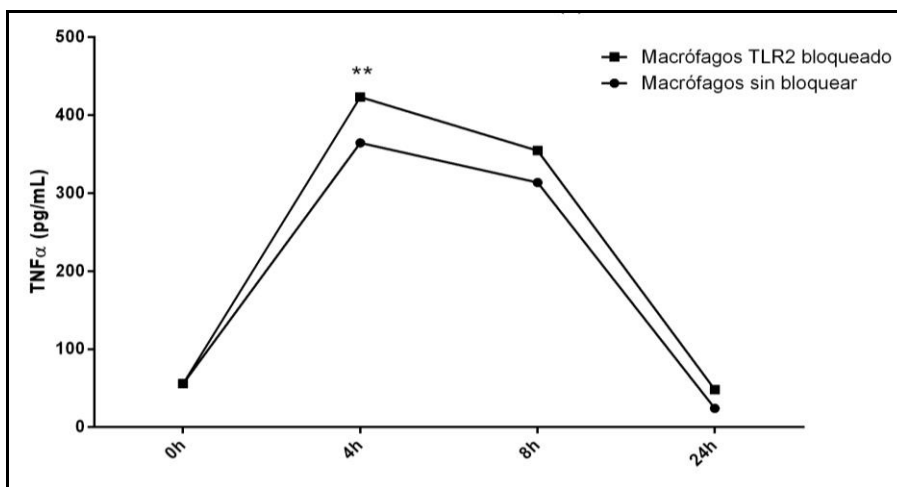


Figura 17. Cuantificación de TNF- α bajo el estímulo de ESAT-6. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

8.3 Infección de macrófagos con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Se utilizó la cepa de referencia H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* para la infección de los macrófagos transformados. Debido a reportes indican que la sola infección con *Mycobacterium tuberculosis* disminuye la expresión de TLR2 y otras moléculas involucradas en la señalización de MyD88 (85), se evaluó si se observaba el mismo fenómeno en nuestro modelo experimental. No se observaron diferencias significativas comparando los grupos de macrófagos infectados y macrófagos sin infectar al menos a los tiempos y dosis de Mtb evaluadas, $P > 0.05$ (Figura 18 y 19).

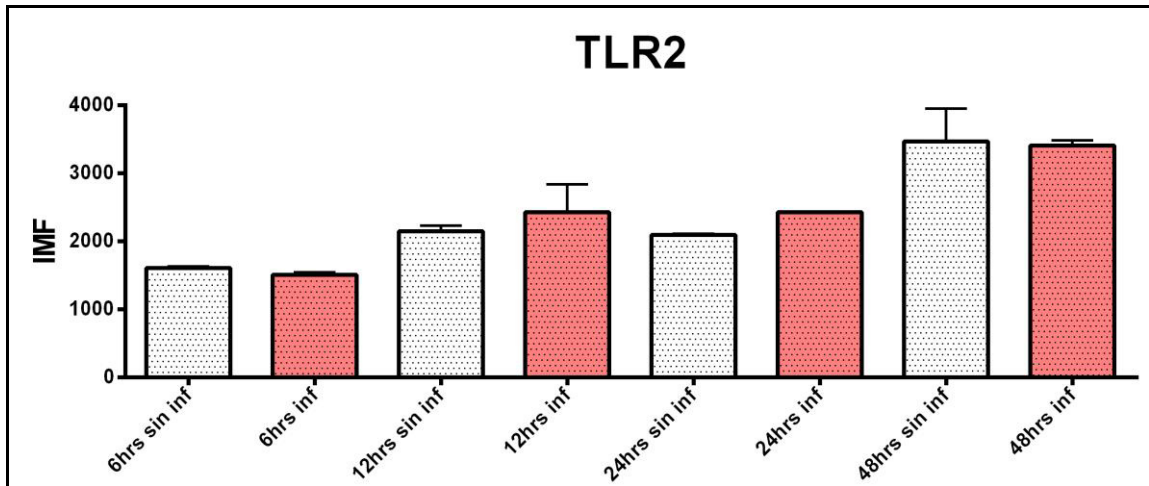


Figura 18. Intensidad media de fluorescencia de TLR2 en macrófagos infectados y sin infectar. Anova y prueba de Tukey, $P < 0.05$.

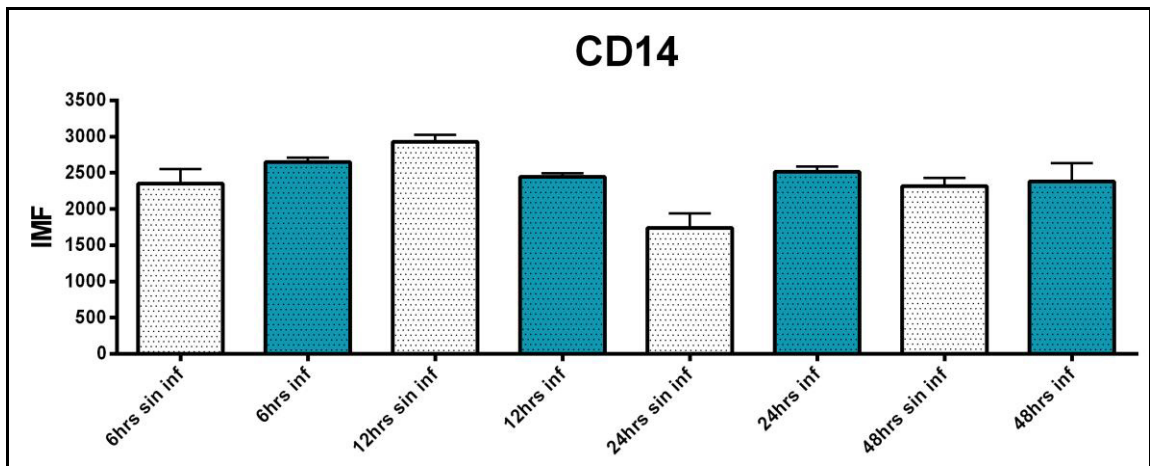


Figura 19. Intensidad media de fluorescencia de CD14 en macrófagos infectados y sin infectar. Anova y prueba de Tukey, $P < 0.05$.

8.4 Bloqueo de TLR2 y CD14 de macrófagos infectados con Mtb

Para bloquear los receptores se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra TLR2 (conjugado con PE) y contra CD14 (conjugado con FITC) a diferentes tiempos: 0, 6, 24 y 48 horas. Además se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las mismas moléculas pero conjugados con diferentes fluorocromos (TLR2 con APC; CD14 con PE) para determinar la eficiencia del bloqueo. Se utilizó un control de isotipo, siendo este un anticuerpo dirigido contra otra molécula aleatoria de la misma clona y la misma fluorescencia. Los grupos experimentales con los que se trabajaron se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Grupos experimentales.

Macrófagos sin infectar	Macrófagos infectados
Sin mAb	Sin mAb
Control de isotipo	Control de isotipo
mAb-TLR2	mAb-TLR2
mAb-CD14	mAb-CD14
mAb-TLR2/CD14	mAb-TLR2/CD14

Al utilizar el control de isotipo sobre los macrófagos infectados a los diferentes tiempos, no se observó fluorescencia ni para FITC ni para PE (Figura 20).

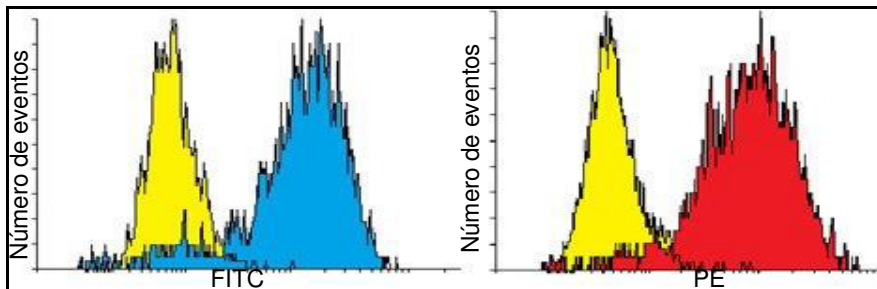


Figura 20. Fluorescencia del control de isotipo a las 6 horas. a) Histograma de color amarillo representa la fluorescencia del control de isotipo; el histograma de color azul la fluorescencia en FITC de CD14. b) Histograma de color amarillo representa la fluorescencia del control de isotipo; el histograma de color rojo la fluorescencia en PE de TLR2.

Antes de realizar el bloqueo se contaron con macrófagos teñidos solo con los mAb para evaluar la eficiencia del bloqueo, donde se puede observar en la figura 21 que los macrófagos solo presentan la fluorescencia de éstos mAb.

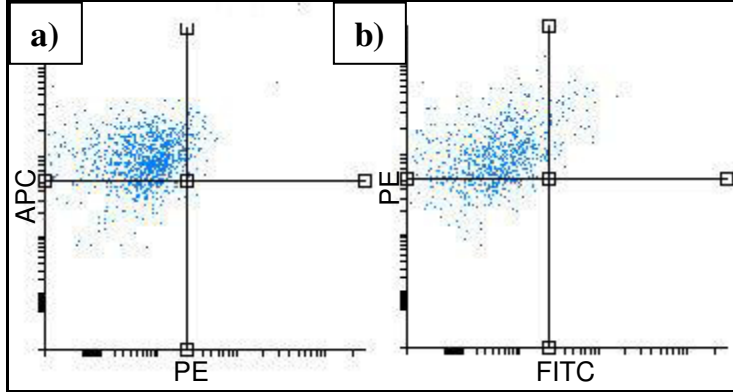


Figura 21. Dotplots antes del bloqueo de macrófagos infectados con Mtb. a) Macrófagos teñidos con mAb-TLR2 (APC); b) Macrófagos teñidos con mAb-CD14 (PE). mAb en el eje de las x: anticuerpos para bloquear; mAb en el eje de las y: anticuerpos para evaluar la eficiencia del bloqueo.

Posterior al bloqueo se evaluó la eficiencia del bloqueo. Se puede observar en la figura 22 el desplazamiento de las poblaciones de la figura 20 a la región de dobles positivas, lo que indica que además se marcarse con el mAb para evaluar la eficiencia del bloqueo se están tiñendo con los mAb para bloquear.

Se pudo apreciar una reducción de la intensidad media de fluorescencia de TLR2-APC y CD14-PE después de haber sido bloqueados con los mAb TLR2-PE y CD14-FITC (Figura 23), esto pudo apreciarse en todos los tiempos en los que fueron evaluados éstas moléculas.

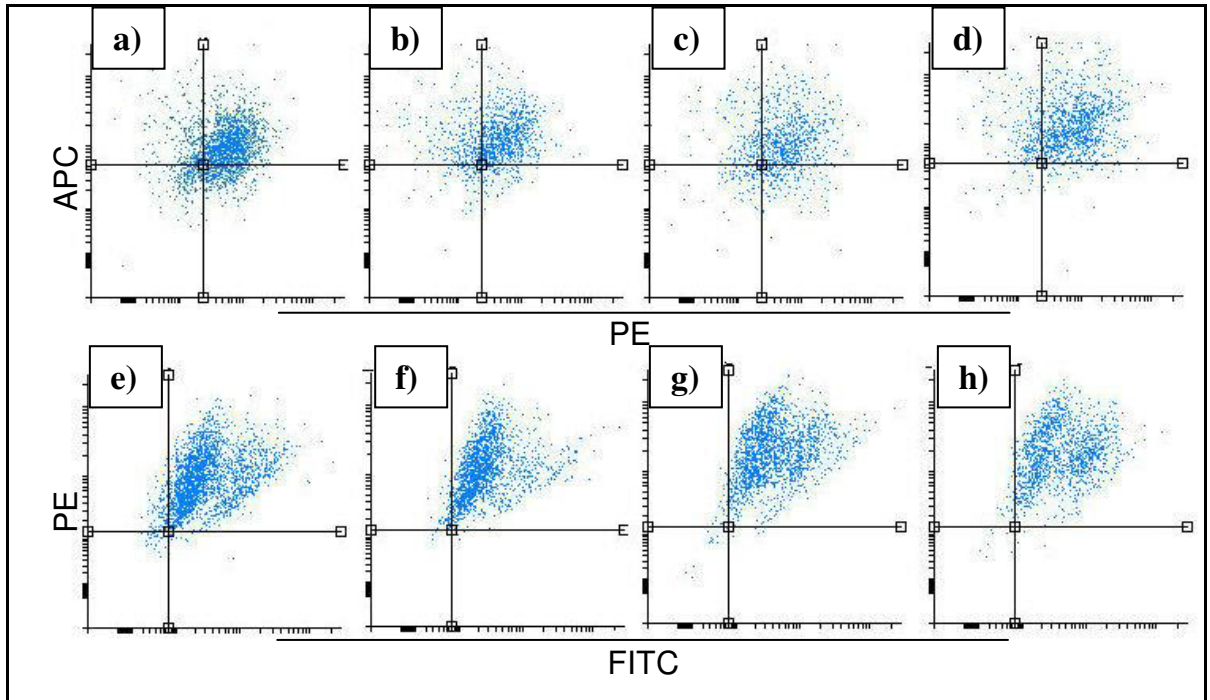


Figura 22. Dotplots después del bloqueo de macrófagos infectados con Mtb. Macrófagos bloqueados con mAb-TLR2 a las a) 0 hr, b) 6 hr, c) 24 hr y d) 48 hr; Macrófagos bloqueados con mAb-CD14 a las e) 0 hr, f) 6 hr, g) 24 hr y h) 48 hr. mAb en el eje de las x: anticuerpos para bloquear; mAb en el eje de las y: anticuerpos para evaluar la eficiencia del bloqueo.

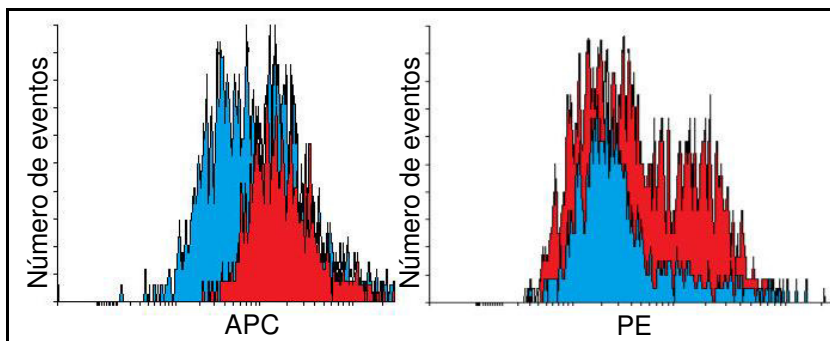


Figura 23. Intensidad media de fluorescencia de macrófagos bloqueados y sin bloquear. a) IMF de TLR2 (APC) de macrófagos bloqueados (azules) y macrófagos sin bloquear (rojos) a las 24 horas, b) IMF de CD14 (PE) de macrófagos bloqueados (azules) y macrófagos sin bloquear (rojos) a las 24 horas.

Al comparar los eventos positivos para los mAb TLR2-APC y CD14-PE en los macrófagos infectados sin bloquear y bloqueados se pudo apreciar una disminución en el porcentaje de eventos marcados con éstos mAb en todos los tiempos evaluados, mostrando además diferencias altamente significativas, $P < 0.05$ (Figuras 24 y 25).

El porcentaje máximo de eventos bloqueados utilizando el mAb-TLR2 fue del 74.28% para macrófagos sin infectar a las 48 horas, y del 65.68% para los macrófagos infectados a las 0 horas del bloqueo (Tabla 3). Para CD14, el porcentaje de eventos bloqueados máximo fue del 74.04% para macrófagos sin infectar y del 76.77 para macrófagos infectados con Mtb, ambos a las 24 horas de bloqueo (Tabla 3).

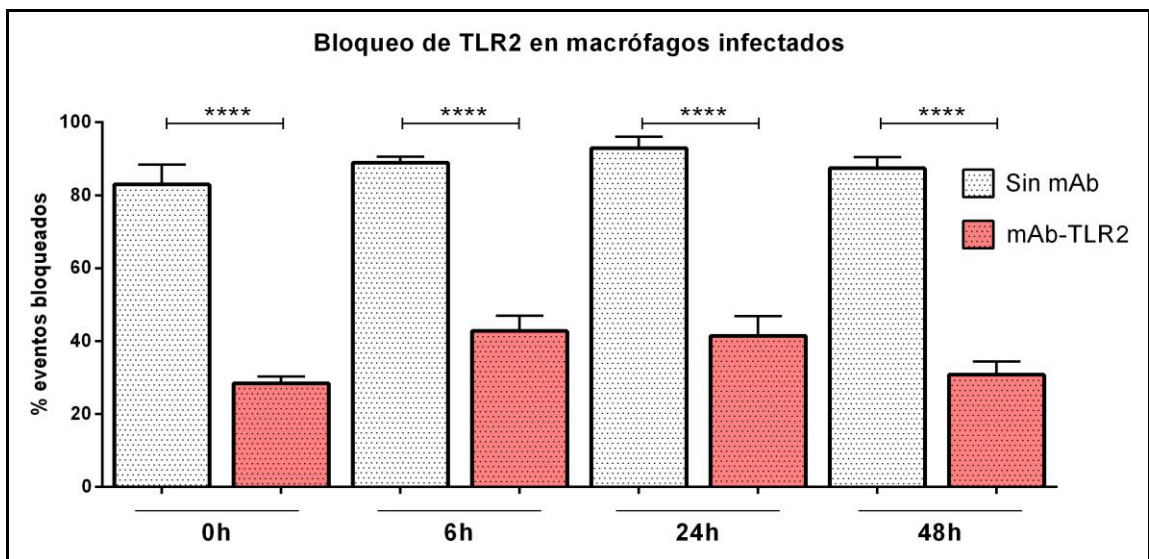


Figura 24. Bloqueo de TLR2 en macrófagos infectados con Mtb. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

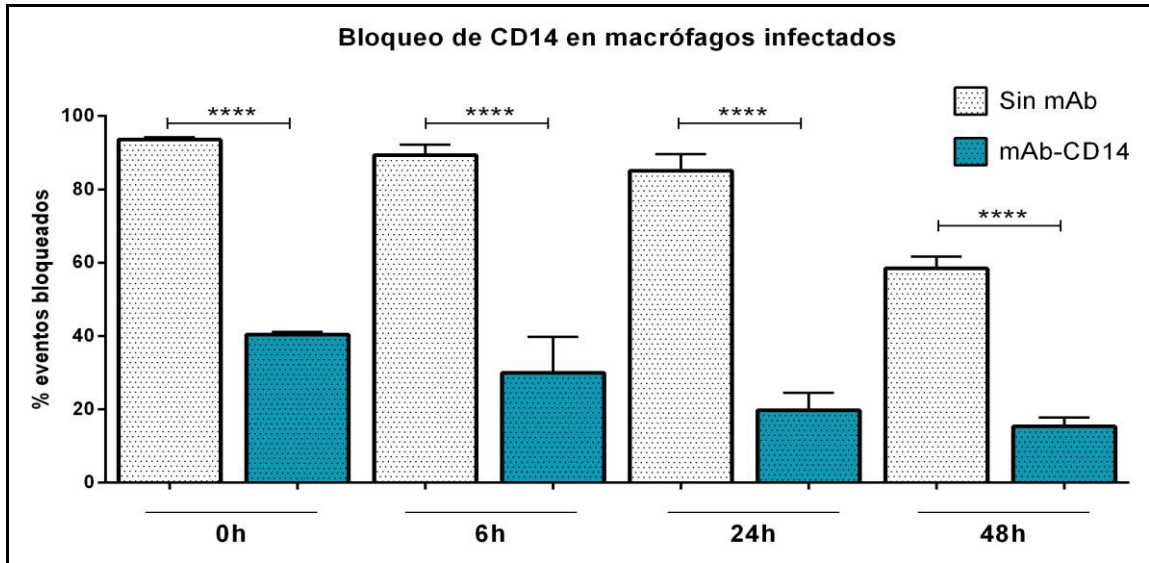


Figura 25. Bloqueo de CD14 en macrófagos infectados con Mtb. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P<0.05$).

Tabla 3. Porcentaje de eventos bloqueados a los diferentes tiempos evaluados.

Tratamientos	Porcentaje de eventos bloqueados			
	0h	6h	24h	48h
TLR2 macrófagos sin infectar	45.79%	57.98%	71.72%	74.28%
TLR2 macrófagos infectados	65.68%	51.93%	55.40%	64.79%
CD14 macrófagos sin infectar	63.91%	65.90%	74.04%	72.73%
CD14 macrófagos infectados	56.76%	66.42%	76.77%	73.78%

8.5 Determinación de unidades formadoras de colonias

Se pudo observar una disminución del crecimiento de Mtb a las 6 horas de bloqueo utilizando el mAb-TLR2 o la combinación mAb-TLR2/CD14 comparándolos con los macrófagos sin mAb o tratados con el control de isotipo ($P<0.05$), no mostrándose reducción de UFC para el mAb-CD14 (Figura 26).

Este mismo fenómeno se mantuvo a las 48 y 72 horas de bloqueo, $P < 0.05$ (Figuras 27 y 28).

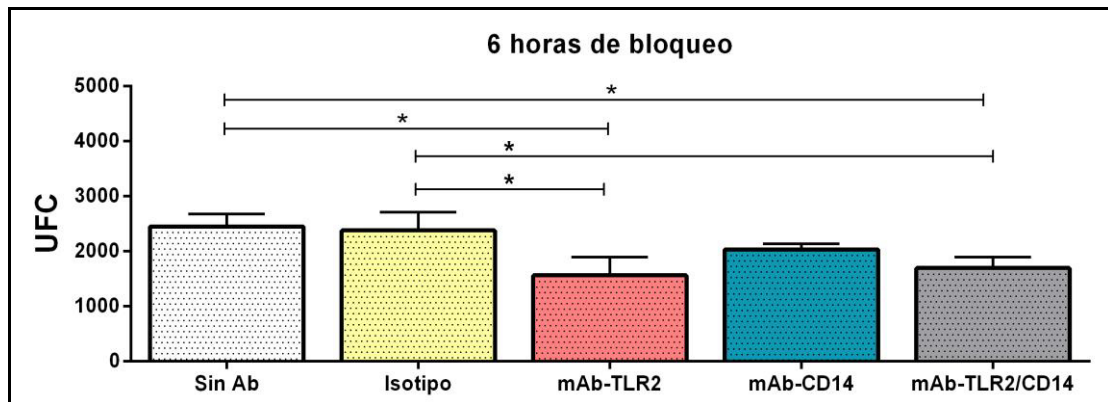


Figura 26. Unidades formadoras de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* a las 6 horas del bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

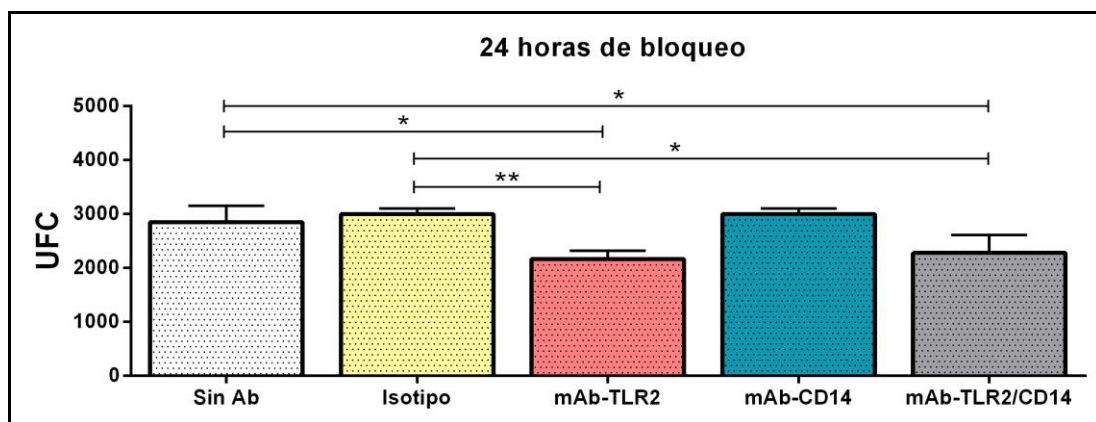


Figura 27. Unidades formadoras de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* a las 24 horas del bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

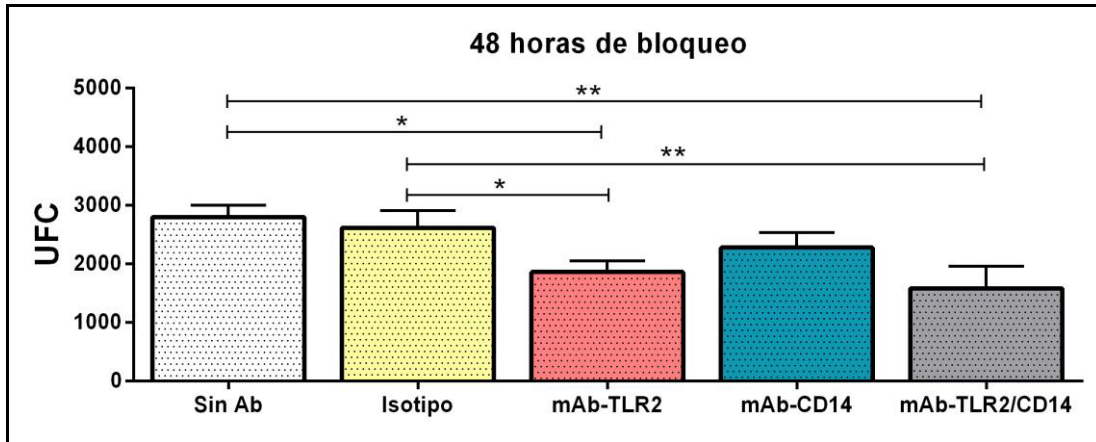


Figura 28. Unidades formadoras de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* a las 48 horas del bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

8.6 Cuantificación de citocinas

Posterior a la infección y al bloqueo, se recuperaron los sobrenadantes de los cultivos celulares para evaluar la producción de citocinas por los macrófagos bajo los diferentes tratamientos.

Al evaluar la IL-6 se observó un incremento comparando los macrófagos sin infectar e infectados durante los tres tiempos evaluados, pero solo con diferencia significativa a las 6 horas, $P < 0.05$ (Figuras 30-32). Se observó una mayor producción de IL-6 en los cultivos celulares procedentes de macrófagos bloqueados con el mAb-TLR2. Este mismo fenómeno ocurrió en menor medida en los macrófagos bloqueados con la combinación mAb-TLR2/CD14, pero no fue visto para macrófagos bloqueados con mAb-CD14.

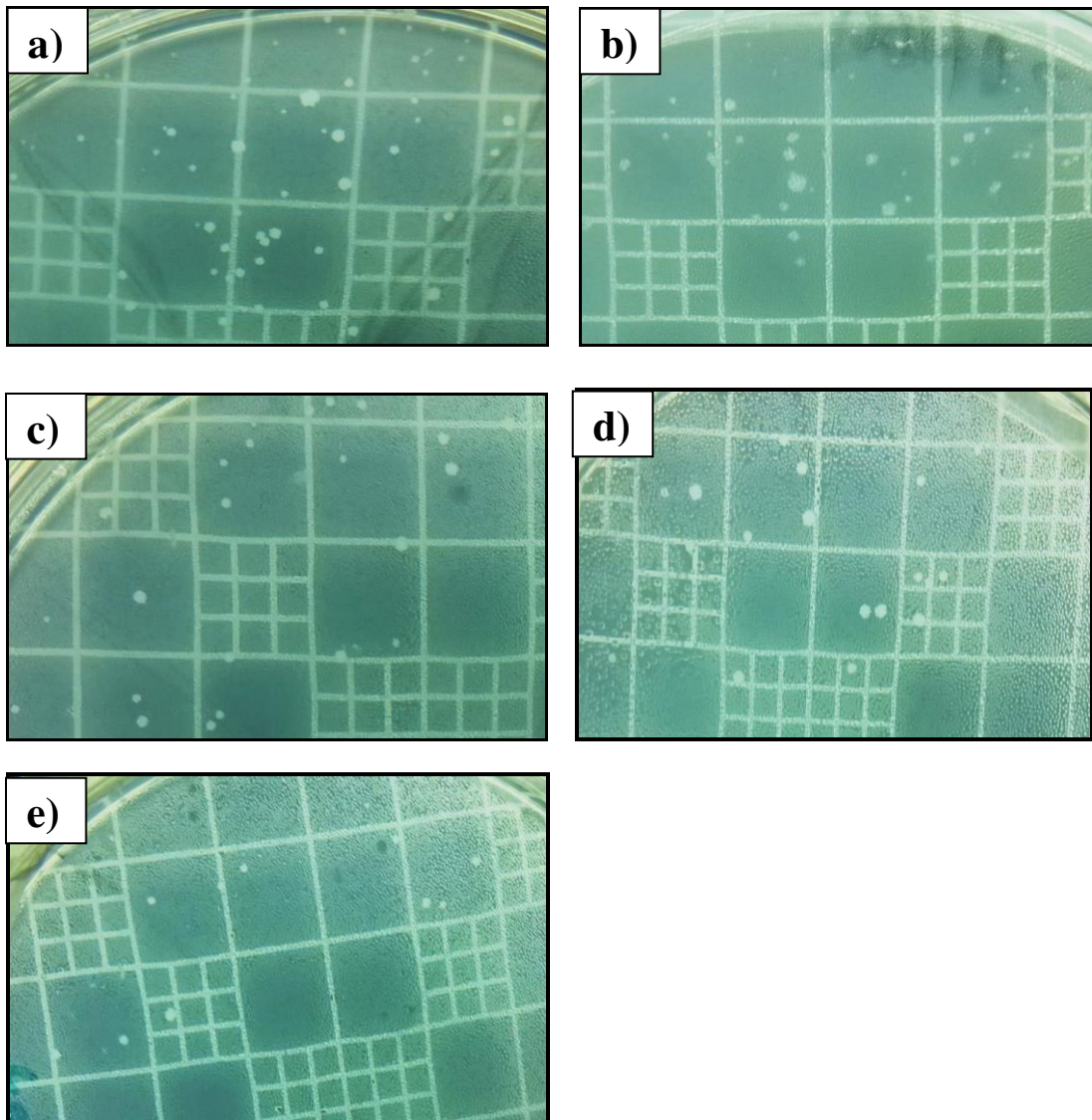


Figura 29. Fotografías de la carga bacteriana en macrófagos bloqueados: a) sin bloquear, b) control de isotipo, c) bloqueando TLR2, d) bloqueando CD14, o e) bloqueando ambos receptores.

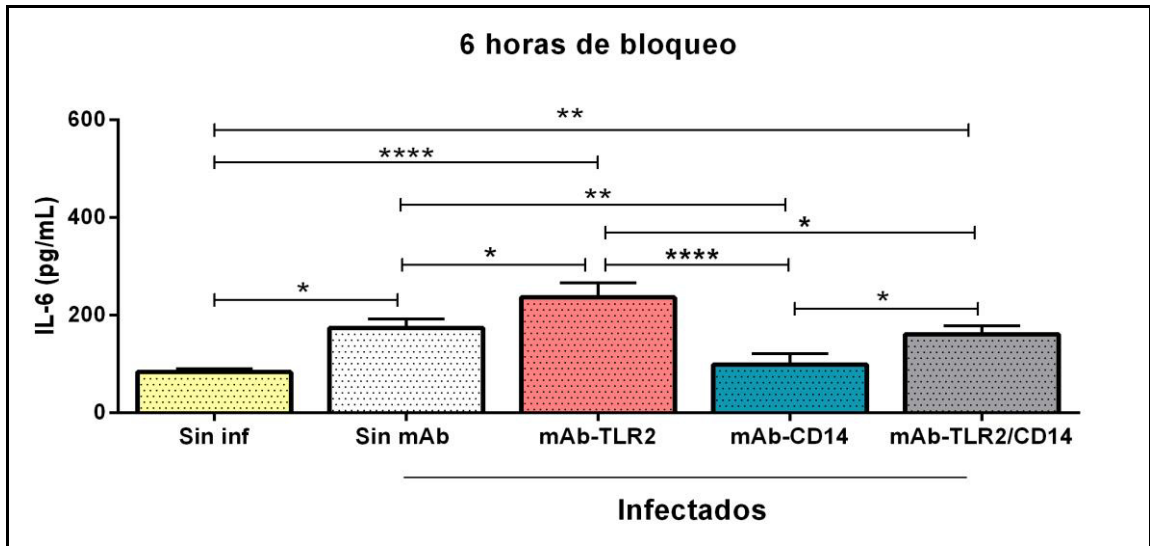


Figura 30. Cuantificación de IL-6 a las 6 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

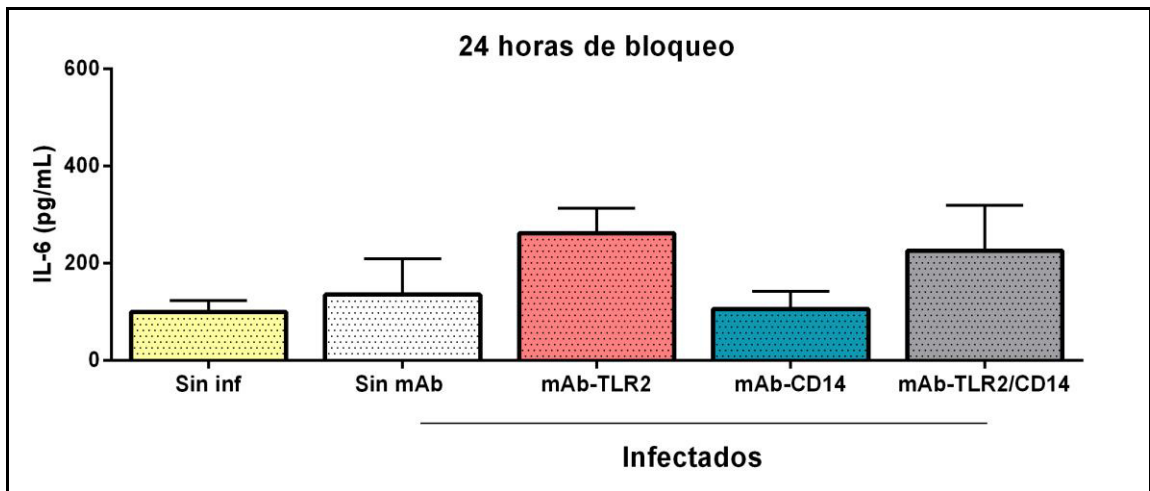


Figura 31. Cuantificación de IL-6 a las 24 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

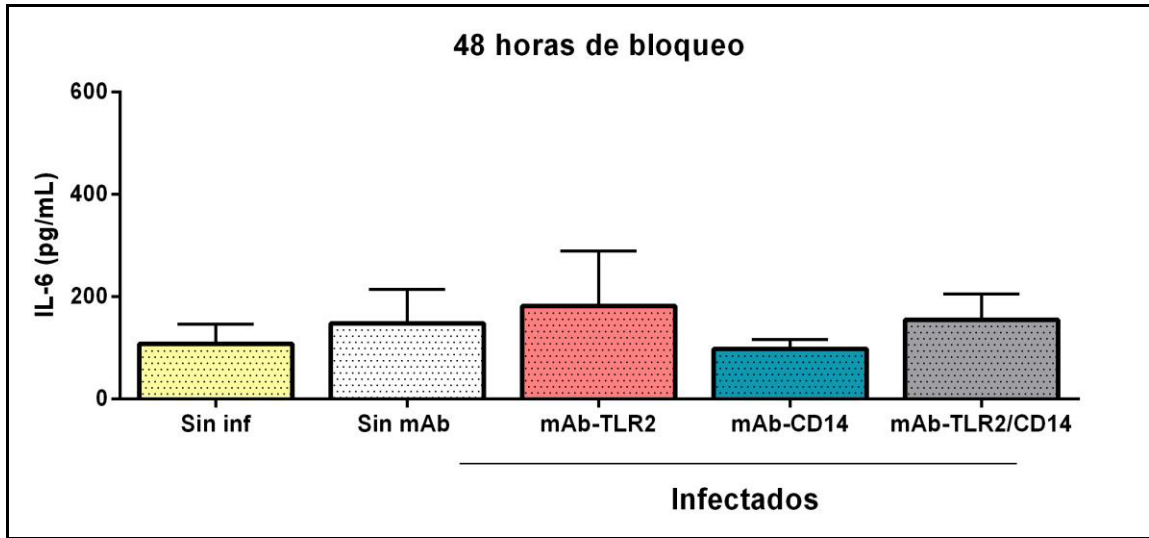


Figura 32. Cuantificación de IL-6 a las 48 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P<0.05$).

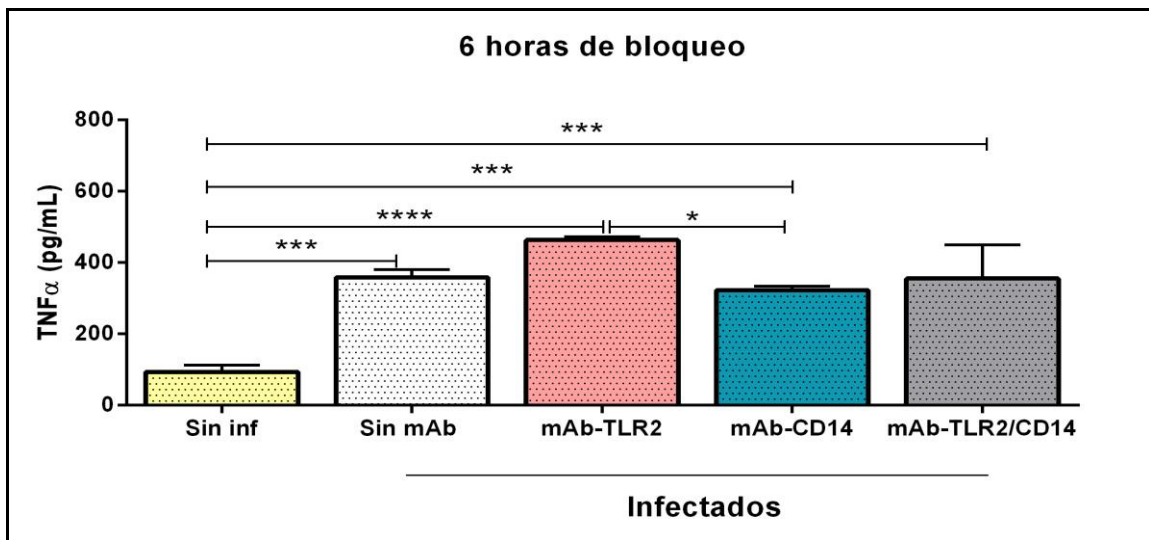


Figura 33. Cuantificación de TNF- α a las 6 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P<0.05$).

Se evaluó también la producción de TNF- α , donde se observó un incremento altamente significativo en macrófagos infectados comparándolos con los macrófagos sin infectar a las 6 horas (Figura 33). Al igual a la IL-6, se observó

Los niveles de IFN- γ fueron elevados en los macrófagos infectados comparándolos con los macrófagos sin infectar. Esta diferencia se observó durante todos los tiempos evaluados, aunque no fue estadísticamente significativa, $P < 0.05$ (Figura 36-39).

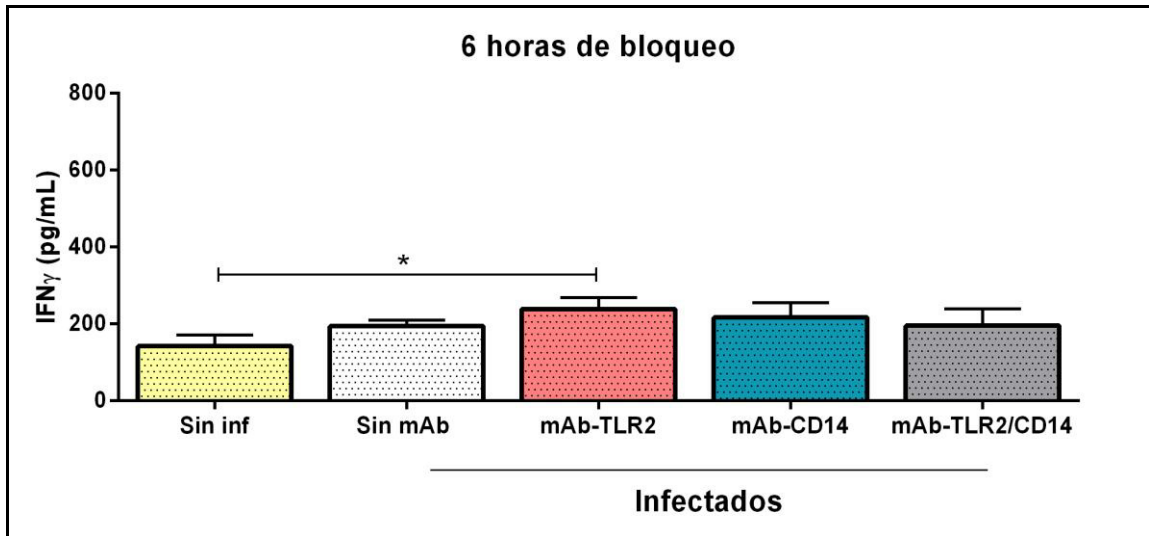


Figura 36. Cuantificación de IFN- γ a las 6 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

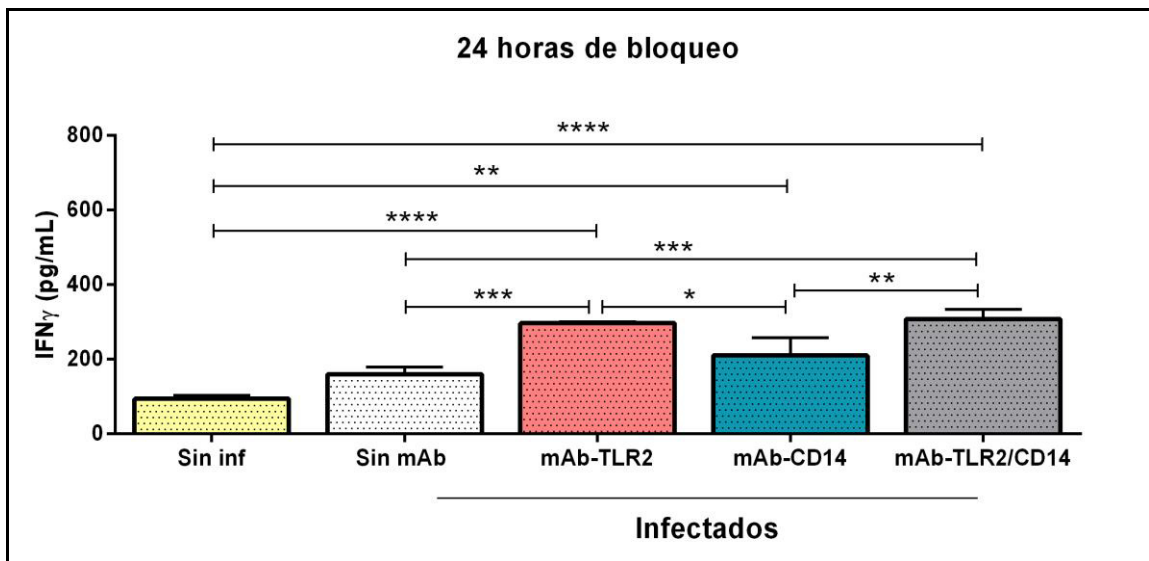


Figura 37. Cuantificación de IFN- γ a las 24 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

De manera similar a las citocinas previas analizadas, se observó un incremento en la producción de IFN- γ en los macrófagos incubados con mAb-TLR2, y de manera menos importante la combinación de mAb-TLR2/CD14. Estos cambios no fueron apreciables cuando se bloqueó CD14, $P < 0.05$ (Figura 37 y 38).

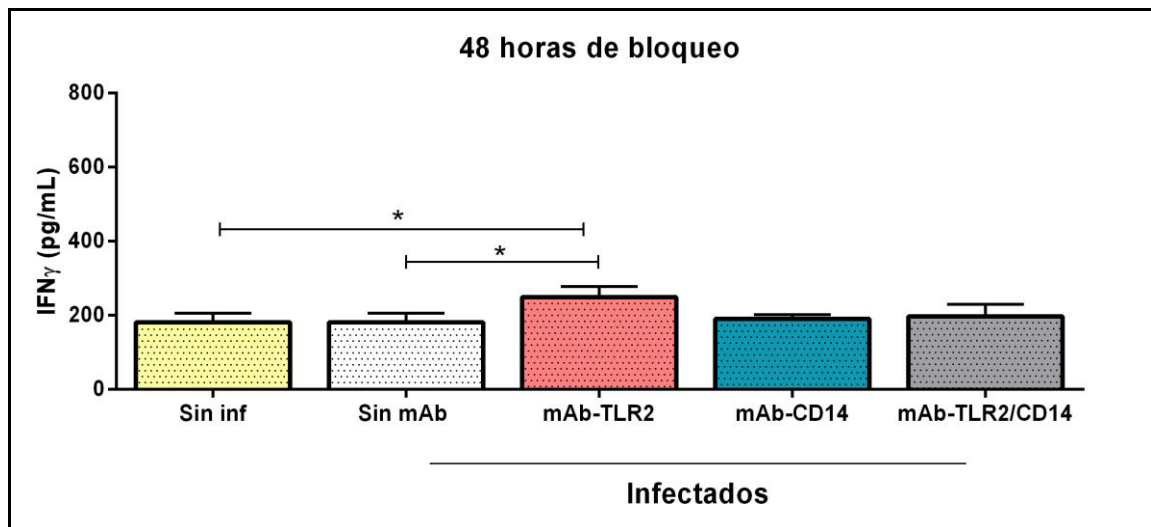


Figura 38. Cuantificación de IFN- γ a las 48 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

Se presentó un incremento de IL-10 en los macrófagos infectados con Mtb comparándolos con los macrófagos sin infección de manera similar a lo observado en las citocinas previas durante los diferentes tiempos evaluados. También se presentó una mayor producción de IL-10 cuando se bloqueó TLR2, de manera más importante a las 6 horas del bloqueo, $P < 0.05$ (Figuras 39-41).

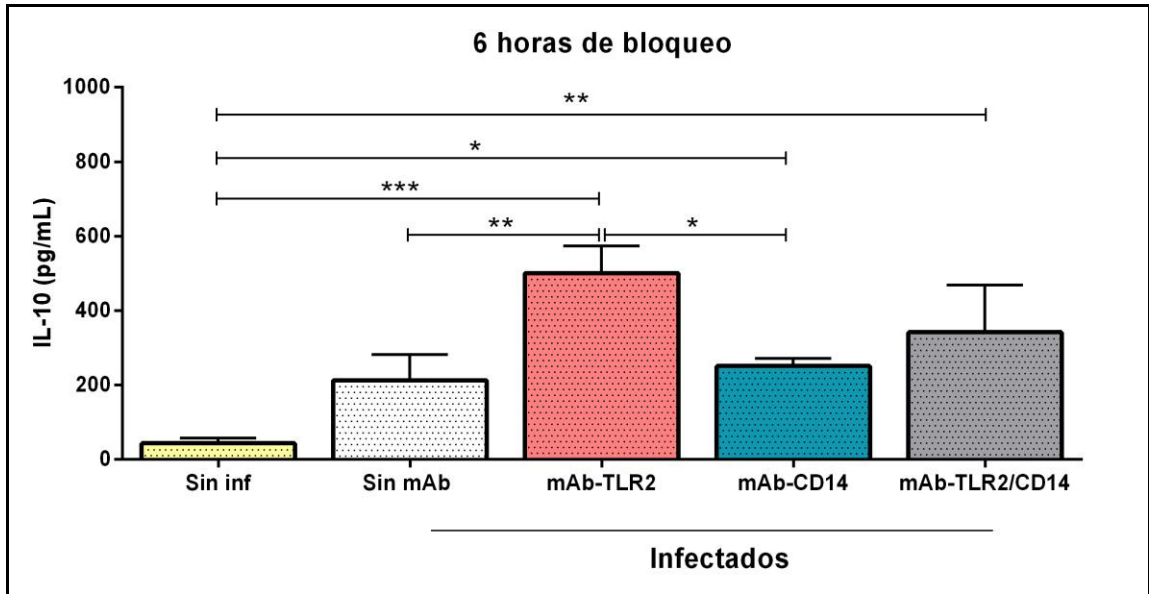


Figura 39. Cuantificación de IL-10 a las 6 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P<0.05$).

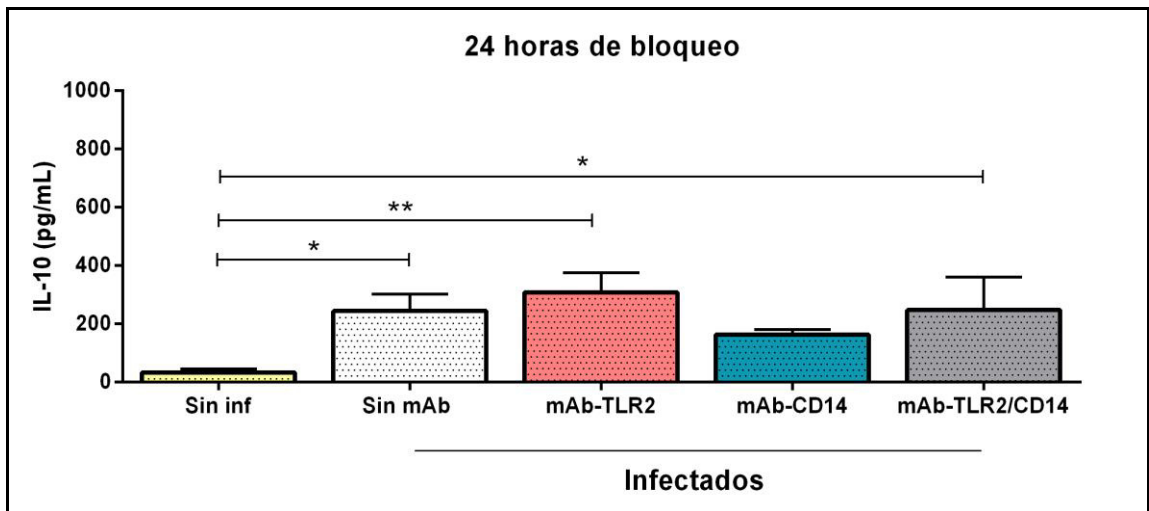


Figura 40. Cuantificación de IL-10 a las 24 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P<0.05$).

Para el caso del TGF- β no se apreció ningún cambio significativo en ninguno de los tratamientos ni tiempos evaluados, $P<0.05$ (Figuras 42-44).

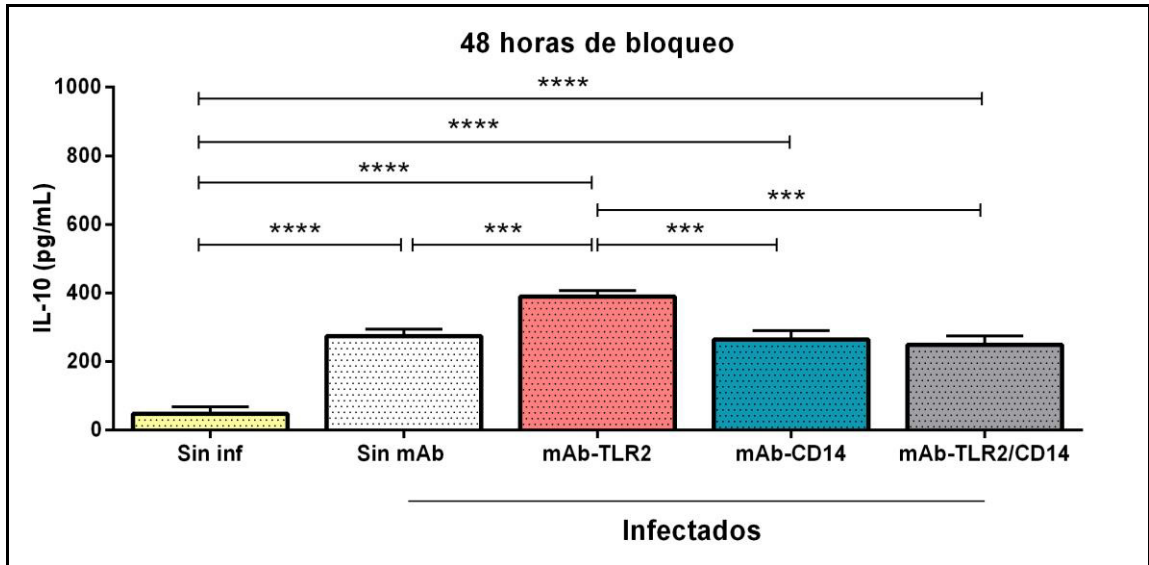


Figura 41. Cuantificación de IL-10 a las 48 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

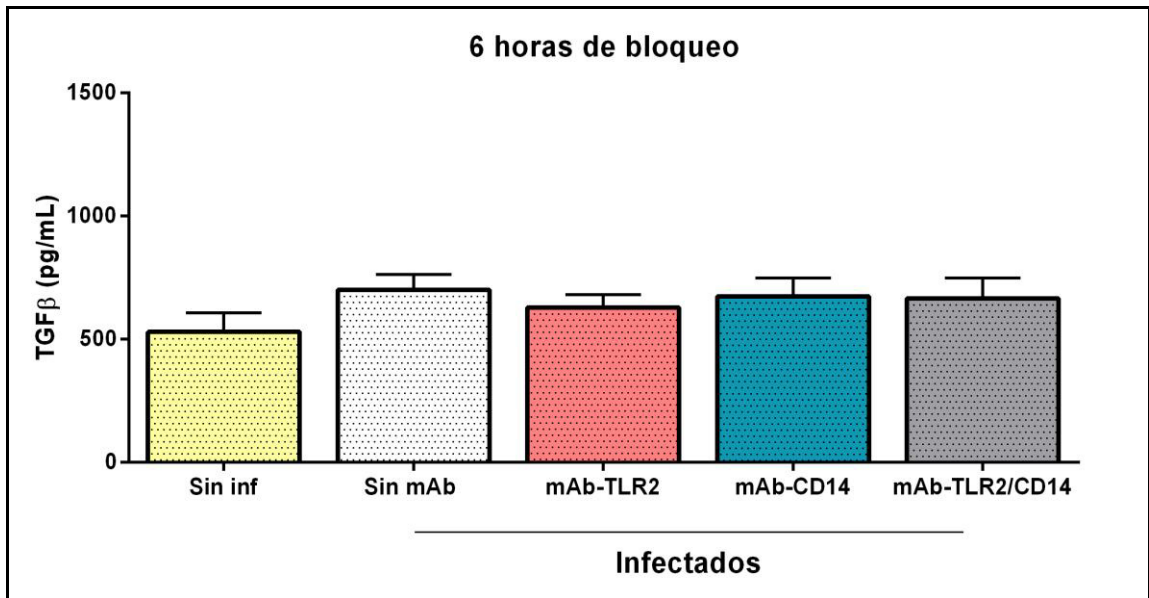


Figura 42. Cuantificación de TGF- β a las 6 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

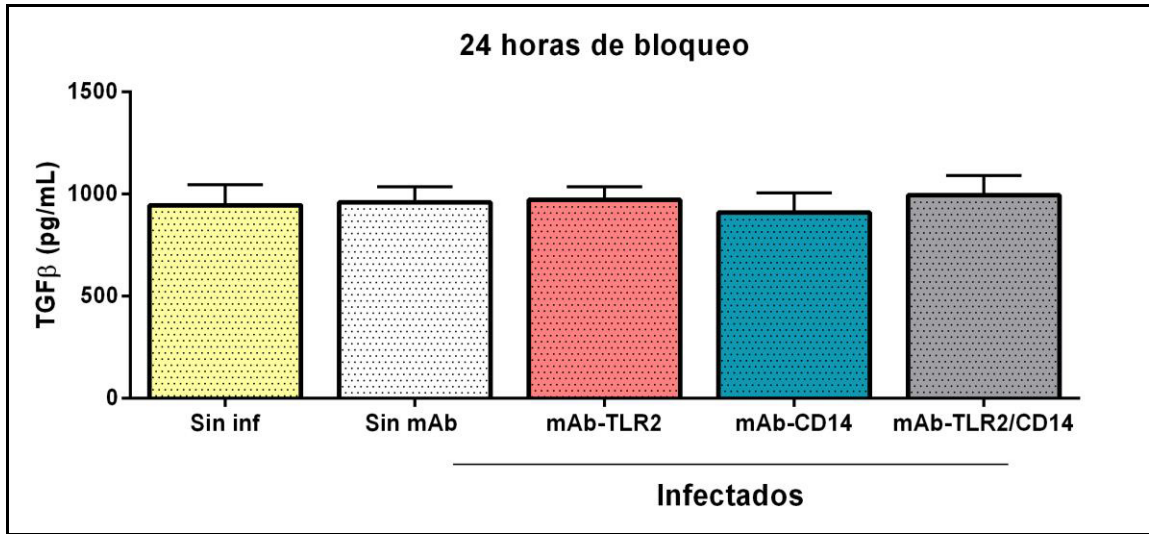


Figura 43. Cuantificación de TGF- β a las 24 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

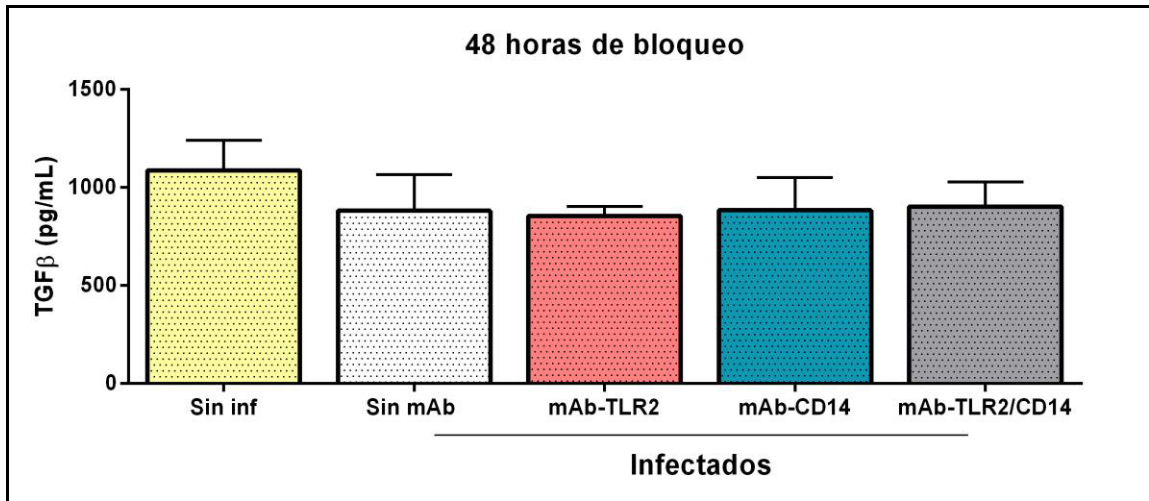


Figura 44. Cuantificación de TGF- β a las 48 horas de bloqueo. ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

CAPÍTULO 9

DISCUSIÓN

9.1 Transformación de monocitos a macrófagos

Debido a las similitudes morfológicas y metabólicas de la línea celular monocítica THP-1, ésta puede ser diferenciada a macrófagos utilizando PMA (96). Los macrófagos THP-1 diferenciados han sido utilizados ampliamente como modelos *in vitro* de macrófagos en estudios donde involucran enfermedades inflamatorias (96, 97). De hecho estudios han demostrado que los macrófagos derivados de monocitos THP-1 proveen un modelo confiable y altamente reproducible para estudios con Mtb, incluso de varias cepas (98). Sin embargo, la diferenciación con elevadas concentraciones de PMA también es capaz de estimular varios genes en las células (96, 99, 100). Para transformar macrófagos a partir de monocitos THP-1 utilizando PMA, se han utilizado muchas concentraciones de PMA, desde 10 hasta 400ng/mL (~16-540nM) sin tener en cuenta la regulación positiva de algunos genes (97, 101-104). En un estudio publicado en el 2006 (96), se reportó que las células THP-1 fueron diferenciadas de manera estable a macrófagos con 5ng/mL de PMA por 48 horas sin la sobre-expresión de los genes TNF- α , RNATES, IL-1 β , MCP-1, IL-8, MIP-1 β , CCR5, CCR2a y CCR2b, mientras que estos genes fueron sobre-expresados cuando se utilizaron concentraciones de PMA de 25-100ng/mL. Además, los macrófagos diferenciados obtenidos respondieron mejor a bajas

concentraciones de LPS (10ng/mL) o beta amiloide (125nM), lo cual es más parecido a las concentraciones biológicas. Se ha reportado por otra parte que los niveles de CD14 puede ser incrementado utilizando bajas concentraciones de PMA (96). Debido a estos antecedentes se decidió evaluar diferentes concentraciones de PMA para transformar los monocitos a macrófagos: 5, 10 y 15nM. En estos estudios no se encontró diferencia en cuanto a la morfología, viabilidad celular ni a la expresión de receptores de superficie. Debido a esto y a los antecedentes mencionados anteriormente se optó por diferenciar con 10nM de PMA.

Por otra parte se decidió evaluar la diferenciación en dos tiempos diferentes: 48 horas, tiempo recomendado en algunos estudios (96), y 72 horas debido a reportes que sugieren reemplazar el medio de cultivo después de 48 horas de diferenciación con medio libre de PMA ya que resulta benéfico para obtener un fenotipo más parecido al de los macrófagos (94). Se evaluó el porcentaje de viabilidad utilizando la prueba por exclusión de azul de tripano en cada tiempo de transformación de los macrófagos, donde siempre se obtuvo una viabilidad superior al 90% (Figura 13). Aunque se encontraron diferencias significativas en la viabilidad comparando los diferentes tiempos con el tiempo cero, esto se explica debido a que los monocitos en el tiempo cero aún se encuentran en suspensión y la prueba de azul de tripano se realiza de manera directa; por otra parte desde las 24 horas de transformación las células se encuentran ya adheridas, por lo que para realizar la prueba se requiere el despegado de las

mismas causando estrés celular y daño a la membrana, lo cual justifica la pequeña disminución de la viabilidad.

Al transformar en los diferentes tiempos se obtuvieron diferencias morfológicas pero también de expresión de receptores. A pesar de las diferencias morfológicas encontradas en los diferentes tiempos, la transformación a ambos tiempos presentó células adherentes con la presencia de orgánulos citoplasmáticos, sin embargo los macrófagos a los cuales se les refrescó el medio sin PMA presentaron una morfología más parecida a macrófagos debido a las largas prolongaciones que presentaban la mayoría de las células (Figura 12). Al evaluar la expresión de TLR2 y CD14 se encontró la expresión de éstos ligeramente disminuidos a las 72 horas de transformación (Figura 15). Debido a que ambas moléculas son clave para este estudio, se optó por utilizar los macrófagos transformados por 48 horas.

Una vez teniendo en cuenta la concentración de PMA y el tiempo de transformación se realizó una prueba funcional de fagocitosis utilizando perlas de látex a diferentes horas, en donde se apreció que la gran mayoría de las células transformadas eran capaces de fagocitar desde la segunda hora de estar en contacto con las perlas (Figura 16). Estos resultados son comparables a otros realizados en macrófagos humanos donde se observa que estas células son capaces de fagocitar completamente después de dos horas del contacto con el antígeno (105), y con estudios donde se observa la capacidad fagocítica de los macrófagos derivados de monocitos THP-1 (94). Con todos estos

resultados, se pudo concluir que los monocitos fueron transformados a macrófagos de manera satisfactoria.

9.2 Infección de macrófagos con Mtb

Debido a que existen artículos que mencionan que la sola infección con *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv regula negativamente la expresión de genes involucrados en la señalización de TLR2-MyD88 como TLR2, MyD88, IRAK4, TRAF6 y TIRAP (85), se evaluó la expresión de TLR2 y CD14 en diferentes horas de infección para asegurar que la sola infección con la bacteria no estaba causando una disminución de los receptores y que los resultados del bloqueo de los receptores fuera debido a los mAb utilizados. En los experimentos realizados desde la hora 0 hasta las 48 horas de infección no se observó disminución de la expresión de TLR2 ni de CD14 (Figuras 18 y 19). Entre las posibles causas de la discordancia de nuestro resultado con el encontrado por otros grupos de investigación se deben principalmente al modelo experimental utilizado. Por ejemplo, Aejazur Rahman et al. observaron este efecto en macrófagos obtenidos del peritoneo de ratones, lo cual indica una diferencia importante en el tipo celular que se maneja; además la dosis de Mtb fue mayor. Por lo tanto concluimos que Mtb no regula negativamente la expresión de TLR2 ni de CD14 en macrófagos THP-1 a los tiempos y dosis analizados.

9.3 Modelo de bloqueo

Desde hace tiempo se han utilizado mAb para el bloqueo de diversas moléculas para estudiar su función o efecto sobre sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre estos ya se han generado mAb dirigidos contra TLR2 para evaluar su papel en la inflamación y degradación de la matriz en la arterosclerosis humana (90), en estudios *in vitro* del reconocimiento de polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* (91), entre otros. En el presente estudio se utilizaron anticuerpos monoclonales ya reportados en la literatura (90, 91, 106) para bloquear a TLR2 y CD14, además de un control de isotipo de la misma clona y fluorescencias utilizadas.

En los resultados de citometría de flujo utilizando el control de isotipo se puede observar que no se presentó señal para ninguna fluorescencia (Figura 20), lo que indica que los resultados posteriores son debidos a la unión específica del anticuerpo con su receptor y no a la unión inespecífica del receptor Fc con receptores del macrófago.

Para evaluar la eficiencia del bloqueo se utilizaron mAb dirigidos contra los mismos receptores, pero conjugados con diferentes fluorocromos. Estos anticuerpos fueron exactamente de la misma clona y fueron añadidos en la misma concentración que los primeros. En las gráficas de dotplot (Figuras 21 y 22) se puede apreciar la unión específica de los mAb a sus receptores durante los diferentes tiempos, aunque de la misma manera se puede apreciar que los

anticuerpos que fueron añadidos para evaluar la eficiencia del bloqueo también se unen a los receptores, teniendo así una población mixta de macrófagos que está teñida con los dos anticuerpos. Una posible explicación de este resultado es el número elevado de receptores TLR2 y CD14 en la membrana de los macrófagos y probablemente sea necesario aumentar la concentración de mAb para bloquear al 100% los receptores.

Posteriormente se comparó la IMF de los mAbs utilizados para evaluar la eficiencia del bloqueo en macrófagos bloqueados y sin bloquear, donde se puede apreciar que hubo una disminución de ésta en los macrófagos que fueron previamente bloqueados comparándolos con aquellos sin bloquear (Figura 23); esto fue observado tanto en macrófagos tratados con mAb dirigidos contra TLR2 y CD14.

Debido a la población mixta de macrófagos que fueron positivos para las dos fluorescencias fue complicado determinar la eficiencia del bloqueo utilizando la IMF. Debido a esto se decidió calcular la eficiencia del bloqueo utilizando el porcentaje de eventos positivos para la fluorescencia del anticuerpo que se usó para revelar en macrófagos bloqueados y sin bloquear. Al utilizar ambos anticuerpos durante todos los tiempos evaluados hubo una disminución altamente significativa de eventos que fueron positivos solo para el anticuerpo utilizado para evaluar la eficiencia (Figuras 24 y 25). Esto fue observado de manera indistinta tanto en macrófagos infectados como en macrófagos sin infectar. De esta manera se alcanzó de un porcentaje de eventos bloqueados

del 50-65% para TLR2 y del 55-80% para CD14 en macrófagos infectados con Mtb (Tabla 3).

9.4 Efecto del bloqueo de TLR2 y CD14 sobre la carga bacteriana de Mtb

En estudios previos en nuestro laboratorio se observó una disminución significativa de la carga bacteriana en macrófagos derivados de monocitos de la línea celular THP-1 silenciados con siRNAs dirigidos contra TLR2 y TLR2/CD14. A pesar que en ese estudio los macrófagos fueron silenciados y posteriormente infectados, se observó de manera similar en el presente estudio que al utilizar mAb dirigidos contra TLR2 y la combinación TLR2/CD14 una disminución significativa en la carga bacteriana durante todos los tiempos evaluados en macrófagos ya infectados con el bacilo (Figuras 26-29). Una posible explicación de la disminución de las UFC probablemente sea a que el bloqueo de TLR2 induce la secreción de citocinas inflamatorias por el macrófago y este a su vez a través del IFN- γ como ya se ha reportado (61) la producción de ROS y RNS necesarios para la destrucción del bacilo. Mtb es capaz de utilizar la vía de señalización del TLR2 como un mecanismo de evasión y al bloquear esta ruta se favorece la activación de mecanismos microbicidas del macrófago (85) que finalizan en la disminución de unidades formadoras de colonias.

9.5 Efecto del bloqueo de TLR2 y CD14 sobre la producción de citocinas

Los mecanismos en contra de las micobacterias son relativamente poco entendidas, a pesar de ello es bien sabido que las citocinas son muy importantes para determinar el desenlace de la infección en este tipo de patógenos intracelulares (107). La evidencia crítica deriva de estudios en modelos experimentales y de observaciones en pacientes con deficiencias genéticas o inducidas por fármacos en citocinas o en sus vías de señalización. Entre las citocinas involucradas en la respuesta contra Mtb se encuentran IFN- γ TNF- α e IL-10, las cuales están bien documentadas en modelos humanos y murinos (107-109).

Las citocinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF- α actúan durante el inicio, la expansión y en algunos casos en etapas crónicas de Mtb (107). La exposición de fagocitos pulmonares a las bacterias resulta en la unión de ésta o sus productos a receptores específicos, lo cual induce la producción de citocinas por la célula infectada (107). La sola infección de Mtb induce la rápida producción de IL-6 y de TNF- α (Figuras 30 y 33) lo cual es congruente con estudios previos donde se observa que específicamente la cepa de Mtb H37Rv es capaz de inducir grandes cantidades de estas citocinas (66, 110).

Modelos experimentales han mostrado el papel de TNF- α no solo en la respuesta contra Mtb, sino también en la inmunopatología de la TB (111). Además la infección con la micobacteria o el tratamiento con moléculas de

micobacterias, como el ESAT-6 inducen la secreción de TNF- α en macrófagos (112-114), lo cual está acorde a lo encontrado en este estudio. Por otra parte, ratones deficientes de TNF- α o del receptor de TNF- α son más susceptibles a la infección por micobacterias y forman granulomas defectuosos (58, 115), resaltando así el papel de esta citocina en el control y resolución de la infección.

En nuestros resultados además se observó un incremento de IL-6, TNF- α e IFN- γ en macrófagos infectados pero además bloqueados con anticuerpos dirigidos contra TLR2 y en algunos casos con la combinación TLR2/CD14 (Figuras 30-38). Existen reportes donde Mtb es capaz de utilizar las vías de señalización de TLR2-MyD88 dependiente como mecanismo de escape (79, 116) sugiriendo que el bloqueo de TLR2 favorece el incremento de estas citocinas y con ello la producción de otros mecanismos microbicidas como NRS y ROS lo cual se correlaciona con los resultados de la carga bacteriana. Además, estos resultados se correlacionan con los resultados obtenidos por Francisco Hernández *et al.* (89) donde se observó en su modelo KD para TLR2 y CD14/TLR2 un incremento en la producción de citocinas inflamatorias, entre ellas IFN- γ y TNF- α acompañado de una mayor producción de óxido nítrico después de la infección, sugiriendo el papel de TLR2 en la respuesta contra Mtb y podría ser utilizado como blanco terapéutico en un futuro. A pesar de ello son necesarios estudios *in vivo* para evaluar el efecto del bloqueo o del silenciamiento de estos receptores.

Se conocen pocas citocinas inmunosupresoras de la función de macrófagos, entre ellas se encuentran la IL-10, cuyas propiedades antiinflamatorias desactivan este tipo de célula (117, 118). La IL-10 es producida por macrófagos después de la fagocitosis de Mtb y después de la unión con lipoarabinomano (98). No solo se ha demostrado que esta citocina suprime la respuesta de citocinas Th1 en respuesta a la infección de Mtb (119, 120), sino además regula negativamente la liberación de TNF- α de macrófagos, y su efecto inhibitorio es dependiente de su concentración (117, 118). La IL-10 se encuentra elevada en muestras de pacientes con TB (121), y está asociada con un incremento en la incidencia de la enfermedad (122). También se ha encontrado que esta citocina reduce la respuesta protectora contra Mtb en modelos animales (115, 123). Además se mostró recientemente que la IL-10 bloquea la maduración del fagosoma en macrófagos alveolares humanos (71), lo que indica que la importancia de IL-10 puede ser de doble filo, sin embargo en cepas de ratones en las cuales no limita la respuesta protectora, parece ser necesaria para el control a largo plazo de la inflamación (124).

En nuestro estudio se encontró un incremento en la producción de IL-10 al comparar los macrófagos infectados y sin infectar (Figuras 39-41), lo cual podría indicar que la sola micobacteria ejerce un efecto antiinflamatorio para de esta manera lograr su supervivencia dentro de los macrófagos al antagonizar otras citocinas inflamatorias y probablemente bloquear la maduración del fagolisosoma, lo cual se correlaciona con estudios previos (68, 70, 71, 124). De manera importante se encontró un incremento en la producción de esta citocina

en los macrófagos que fueron tratados con mAb-TLR2 (Figuras 39-41) y esto puede ser causado por el incremento significativo de la producción de citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IFN- γ) y probablemente la IL-10 trata de ejercer un ambiente de homeostasis (125). La producción de esta citocina se inicia por la activación de diferentes TLRs y requiere la participación de la proteína MyD88 (70), misma ruta de señalización utilizada por TLR2 para la producción de citocinas inflamatorias (25). Por otra parte, la citocina TGF- β es producida por otra ruta de señalización diferente, a través de proteínas SMAD (126), lo cual podría explicar que no se encontraran diferencias significativas en los diferentes tratamientos evaluados (Figuras 42-44). Sin embargo, es necesario evaluar las rutas de señalización involucradas a través de la activación de TLR2 y CD14 para poder llegar a conclusiones más acertadas.

CAPÍTULO 10

CONCLUSIÓN

El bloqueo de TLR2 y CD14/TLR2 de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* favorece su muerte intracelular. A pesar de que no se logró una eficiencia de bloqueo del 100%, el bloqueo alcanzado fue suficiente para disminuir las UFC en macrófagos bloqueados con mAb-TLR2. Además se observó un incremento de la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 lo que sugiere que probablemente se favorece un ambiente de homeostasis inducida por el aumento de citocinas inflamatorias.

CAPÍTULO 11

PERSPECTIVAS

1. Evaluar las proteínas que participan en las vías de señalización de TLR2 y CD14 (MyD88, SOCS1, IRAK-4, TRAF-1, NFkB, entre otras).
2. Evaluar la polarización de los macrófagos durante la infección con Mtb y el bloqueo de TLR2/CD14.
3. Cuantificar la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en el modelo de bloqueo.

CAPÍTULO 12

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. K.F. Global Tuberculosis Report 2014, World Health Organization 2014.
2. K. F. Global Tuberculosis Control. World Health Organization. 2009.
3. Barry CE, 3rd, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in lipid research*. 1998;37(2-3):143-79.
4. Sakamoto K. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary pathology*. 2012;49(3):423-39.
5. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of Infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2013;5(1):e2013070.
6. Besra GS CJ. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bloom BR*. 1994(285-306).
7. Britton WJ, Roche PW, Winter N. Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends in microbiology*. 1994;2(8):284-8.
8. P. D. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci*. 1998;3:1253-61.
9. Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*. 2001;11(9):107R-18R.

10. Bloch H, Segal W. Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. *Journal of bacteriology*. 1956;72(2):132-41.
11. Zanoni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013;3:32.
12. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*. 1998;66(4):1277-81.
13. Leemans JC, Florquin S, Heikens M, Pals ST, van der Neut R, Van Der Poll T. CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(5):681-9.
14. Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, et al. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(8):5513-6.
15. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology*. 1999;163(7):3920-7.
16. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*. 1997;277(5329):1091-3.
17. van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(2):294-309.

18. Sanchez D, Rojas M, Hernandez I, Radzioch D, Garcia LF, Barrera LF. Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage death. *Cellular immunology*. 2010;260(2):128-36.
19. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*. 2009;21(4):317-37.
20. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(3):168-79.
21. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007;130(6):1071-82.
22. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*. 2009;31(6):873-84.
23. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13766-71.
24. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology*. 2001;13(7):933-40.
25. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of immunology*. 2002;169(1):10-4.

26. Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The American journal of pathology*. 2004;164(1):49-57.
27. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3.
28. Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(15):8680-90.
29. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(1):269-77.
30. Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K, Tobias PS. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity*. 2006;24(2):153-63.
31. Muta T, Takeshige K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001;268(16):4580-9.
32. Nakata T, Yasuda M, Fujita M, Kataoka H, Kiura K, Sano H, et al. CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex. *Cellular microbiology*. 2006;8(12):1899-909.
33. Triantafyllou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36

and intracellular targeting. *The Journal of biological chemistry*.

2006;281(41):31002-11.

34. Yang RB, Mark MR, Gurney AL, Godowski PJ. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *Journal of immunology*.

1999;163(2):639-43.

35. Baumann CL, Aspalter IM, Sharif O, Pichlmair A, Bluml S, Grebien F, et al. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(12):2689-701.

36. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, et al. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*. 1994;1(6):509-16.

37. Peterson PK, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Anderson WR, Ulevitch RJ, et al. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infection and immunity*. 1995;63(4):1598-602.

38. Claudio Nunes-Alves MGB. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12:289-99.

39. Urdahl KB, Shafiani S, Ernst JD. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal immunology*. 2011;4(3):288-93.

40. Adrián G. Rosas Taraco AYA. Tuberculosis: Mecanismos de defensa, inmunopatogénesis y biomarcadores. *RESPYN*. 2007;8:4-10.

41. Court N, Rose S, Bourigault ML, Front S, Martin OR, Dowling JK, et al. Mycobacterial PIMs inhibit host inflammatory responses through CD14-dependent and CD14-independent mechanisms. *PloS one*. 2011;6(9):e24631.

42. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-

cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infection and immunity*. 1999;67(12):6461-72.

43. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999;285(5428):732-6.

44. Martinez AN, Mehra S, Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(8):1253-61.

45. Sodenkamp J, Waetzig GH, Scheller J, Seegert D, Grotzinger J, Rose-John S, et al. Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis. *Immunobiology*. 2012;217(10):996-1004.

46. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infection and immunity*. 1997;65(11):4843-9.

47. Nagabhushanam V, Solache A, Ting LM, Escaron CJ, Zhang JY, Ernst JD. Innate inhibition of adaptive immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *Journal of immunology*. 2003;171(9):4750-7.

48. Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and immunity*. 2000;68(6):3322-6.

49. Leal IS, Smedegard B, Andersen P, Appelberg R. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. *Infection and immunity*. 1999;67(11):5747-54.
50. Bermudez LE, Wu M, Petrofsky M, Young LS. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infection and immunity*. 1992;60(10):4245-52.
51. Tsao TC, Hong J, Huang C, Yang P, Liao SK, Chang KS. Increased TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 1999;79(5):279-85.
52. Xirouchaki N, Tzanakis N, Bouros D, Kyriakou D, Karkavitsas N, Alexandrakis M, et al. Diagnostic value of interleukin-1 α , interleukin-6, and tumor necrosis factor in pleural effusions. *Chest*. 2002;121(3):815-20.
53. Denis M, Gregg EO. Recombinant interleukin-6 increases the intracellular and extracellular growth of *Mycobacterium avium*. *Canadian journal of microbiology*. 1991;37(6):479-83.
54. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990;75(1):40-7.
55. Gan H, He X, Duan L, Mirabile-Levens E, Kornfeld H, Remold HG. Enhancement of antimycobacterial activity of macrophages by stabilization of

inner mitochondrial membrane potential. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(8):1292-300.

56. Lin PL, Plessner HL, Voitenok NN, Flynn JL. Tumor necrosis factor and tuberculosis. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research*. 2007;12(1):22-5.

57. Flesch IE, Kaufmann SH. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infection and immunity*. 1990;58(8):2675-7.

58. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995;2(6):561-72.

59. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and immunity*. 2001;69(3):1847-55.

60. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*. 2009;27:451-83.

61. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(6):2249-54.

62. Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M, et al. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to

- infection with *Bacillus Calmette-Guerin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(4):1435-40.
63. Dorman SE, Holland SM. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine & growth factor reviews*. 2000;11(4):321-33.
64. Holland SM, Eisenstein EM, Kuhns DB, Turner ML, Fleisher TA, Strober W, et al. Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma. A preliminary report. *The New England journal of medicine*. 1994;330(19):1348-55.
65. Bodnar KA, Serbina NV, Flynn JL. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infection and immunity*. 2001;69(2):800-9.
66. Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *Journal of immunology*. 2001;166(12):7033-41.
67. Hickman SP, Chan J, Salgame P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *Journal of immunology*. 2002;168(9):4636-42.
68. Shaw TC, Thomas LH, Friedland JS. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytic cells. *Cytokine*. 2000;12(5):483-6.

69. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(7):803-10.
70. Redford PS, Murray PJ, O'Garra A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal immunology*. 2011;4(3):261-70.
71. O'Leary S, O'Sullivan MP, Keane J. IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(1):172-80.
72. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001;19:683-765.
73. Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends in microbiology*. 2001;9(2):86-92.
74. Toossi Z, Ellner JJ. The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clinical immunology and immunopathology*. 1998;87(2):107-14.
75. Almeida AS, Lago PM, Boechat N, Huard RC, Lazzarini LC, Santos AR, et al. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. *Journal of immunology*. 2009;183(1):718-31.
76. Verbon A, Juffermans N, Van Deventer SJ, Speelman P, Van Deutekom H, Van Der Poll T. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clinical and experimental immunology*. 1999;115(1):110-3.
77. Aung H, Toossi Z, McKenna SM, Gogate P, Sierra J, Sada E, et al. Expression of transforming growth factor-beta but not tumor necrosis factor-

alpha, interferon-gamma, and interleukin-4 in granulomatous lung lesions in tuberculosis. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2000;80(2):61-7.

78. Hernandez-Pando R, Aguilar D, Hernandez ML, Orozco H, Rook G. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis.

European journal of immunology. 2004;34(1):174-83.

79. Pai RK, Convery M, Hamilton TA, Boom WH, Harding CV. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion.

Journal of immunology. 2003;171(1):175-84.

80. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages.

Nat Immunol. 2007;8(6):610-8.

81. Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunological reviews*.

2007;219:37-54.

82. Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V. Cell biology of *mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annual review of cell and developmental biology*.

2004;20:367-94.

83. Sinai AP, Joiner KA. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annual review of microbiology*. 1997;51:415-62.

84. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 1994;263(5147):678-81.
85. Rahman A, Sobia P, Gupta N, Kaer LV, Das G. Mycobacterium tuberculosis subverts the TLR-2-MyD88 pathway to facilitate its translocation into the cytosol. *PloS one*. 2014;9(1):e86886.
86. Sugawara I, Yamada H, Li C, Mizuno S, Takeuchi O, Akira S. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiology and immunology*. 2003;47(5):327-36.
87. Ehlers S, Reiling N, Gangloff S, Woltmann A, Goyert S. Mycobacterium avium infection in CD14-deficient mice fails to substantiate a significant role for CD14 in antimycobacterial protection or granulomatous inflammation. *Immunology*. 2001;103(1):113-21.
88. Wieland CW, van der Windt GJ, Wiersinga WJ, Florquin S, van der Poll T. CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis. *Immunology*. 2008;125(2):272-9.
89. Francisco Hernandez AYA. El papel de los receptores CD14 y TLR2 de macrófagos THP-1 en la infección por Mycobacterium tuberculosis. Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2011.
90. Monaco C, Gregan SM, Navin TJ, Foxwell BM, Davies AH, Feldmann M. Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120(24):2462-9.

91. Zughailer SM. Neisseria meningitidis capsular polysaccharides induce inflammatory responses via TLR2 and TLR4-MD-2. *Journal of leukocyte biology*. 2011;89(3):469-80.
92. Dev Mittar RP, Catherine McItyre. Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation. BD application note. 2011.
93. Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002;39(2):75-90.
94. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one*. 2010;5(1):e8668.
95. Feng Y, Yang X, Liu Z, Liu Y, Su B, Ding Y, et al. Continuous treatment with recombinant Mycobacterium tuberculosis CFP-10-ESAT-6 protein activated human monocyte while deactivated LPS-stimulated macrophage. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;365(3):534-40.
96. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2007;56(1):45-50.
97. Sakamoto H, Aikawa M, Hill CC, Weiss D, Taylor WR, Libby P, et al. Biomechanical strain induces class a scavenger receptor expression in human monocyte/macrophages and THP-1 cells: a potential mechanism of increased atherosclerosis in hypertension. *Circulation*. 2001;104(1):109-14.

98. Theus SA, Cave MD, Eisenach KD. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(3):453-60.
99. Abe T, Ohno M, Sato T, Murakami M, Kajiki M, Kodaira R. "Differentiation Induction" culture of human leukemic myeloid cells stimulates high production of macrophage differentiation inducing factor. *Cytotechnology*. 1991;5(Suppl 2):75-93.
100. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, et al. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2004;11(2):88-97.
101. Chou SF, Chen HL, Lu SC. Up-regulation of human deoxyribonuclease II gene expression during myelomonocytic differentiation of HL-60 and THP-1 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;296(1):48-53.
102. Hirakata M, Tozawa R, Imura Y, Sugiyama Y. Comparison of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on macrophage foam cell formation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;323(3):782-8.
103. Juliet PA, Hayashi T, Iguchi A, Ignarro LJ. Concomitant production of nitric oxide and superoxide in human macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;310(2):367-70.
104. Reyes L, Davidson MK, Thomas LC, Davis JK. Effects of *Mycoplasma fermentans incognitus* on differentiation of THP-1 cells. *Infection and immunity*. 1999;67(7):3188-92.

105. Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PloS one*. 2009;4(4):e5210.
106. Ma Y, Zhang X, Bao H, Mi S, Cai W, Yan H, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 differentially regulate doxorubicin induced cardiomyopathy in mice. *PloS one*. 2012;7(7):e40763.
107. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunological reviews*. 2008;226:191-204.
108. Harris J. KJ. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol*. 2010;161:1-9.
109. Zhang SY, Boisson-Dupuis S, Chappier A, Yang K, Bustamante J, Puel A, et al. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunological reviews*. 2008;226:29-40.
110. Sohn H, Lee KS, Kim SY, Shin DM, Shin SJ, Jo EK, et al. Induction of cell death in human macrophages by a highly virulent Korean isolate of *Mycobacterium tuberculosis* and the virulent strain H37Rv. *Scandinavian journal of immunology*. 2009;69(1):43-50.
111. Dambuza I, Allie N, Fick L, Johnston N, Fremont C, Mitchell J, et al. Efficacy of membrane TNF mediated host resistance is dependent on mycobacterial virulence. *Tuberculosis*. 2008;88(3):221-34.

112. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *Journal of immunology*. 1998;161(5):2636-41.
113. Keane J, Shurtleff B, Kornfeld H. TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following *Mycobacterium tuberculosis* infection inhibits bacillary growth in an IFN-gamma independent manner. *Tuberculosis*. 2002;82(2-3):55-61.
114. Roach TI, Barton CH, Chatterjee D, Blackwell JM. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of immunology*. 1993;150(5):1886-96.
115. Beamer GL, Flaherty DK, Assogba BD, Stromberg P, Gonzalez-Juarrero M, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. *Journal of immunology*. 2008;181(8):5545-50.
116. Kincaid EZ, Wolf AJ, Desvignes L, Mahapatra S, Crick DC, Brennan PJ, et al. Codominance of TLR2-dependent and TLR2-independent modulation of MHC class II in *Mycobacterium tuberculosis* infection in vivo. *Journal of immunology*. 2007;179(5):3187-95.
117. Bogdan C, Moll H, Solbach W, Rollinghoff M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *European journal of immunology*. 1990;20(5):1131-5.

118. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(6):1549-55.
119. Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, et al. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(9):1317-25.
120. Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Klucar P, Shams H, Samten B, et al. Serum cytokine concentrations do not parallel *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003;36(1):24-8.
121. Barnes PF, Lu, S., Abrams, J.S., Wang, E., Yamamura. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infection and immunity*. 1993;61:3482-9.
122. Awomoyi AA, Marchant A, Howson JM, McAdam KP, Blackwell JM, Newport MJ. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(12):1808-14.
123. Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, Fortune SM, Coulombe F, Behr MA, et al. NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*. 2009;5(7):e1000500.
124. Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Rosas-Taraco AG, Lee EJ, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*. 2009;89(2):149-57.

125. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *Journal of immunology*. 2000;164(4):2016-20.
126. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Armando Salvador Flores Torres

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en
Inmunología Médica

Título de Tesis: Efecto del bloqueo de TLR2 y CD14 en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*.

Área de Estudio: Ciencias de la Salud.

Biografía: Nacido el 24 de marzo de 1990 en la ciudad de Saltillo, Coahuila. Hijo de Armando Flores Guerrero y María Leticia Torres Ravelo.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC), institución en la cual realizó su tesis de licenciatura titulada “Utilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados en pacientes con artritis reumatoide”, estudio con el cual se graduó con mención honorífica. Realizó un intercambio a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y una estancia en la Unidad de Investigación Médica en el departamento de Inmunoquímica del Hospital de especialidades Dr. Bernardo Sepulveda del Centro Médico Siglo Veintiuno donde recibió capacitación de citometría de flujo. Durante sus estudios de Maestría obtuvo mención como alumno destacado en el programa de Inmunología de la Facultad de Medicina.