



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
DR. ISMAEL COSIO VILLEGAS

*FRECUENCIA EN LA EXPRESIÓN DE TIM3 Y GALECTINA 9 EN  
DIFERENTES POBLACIONES DE ORIGEN LINFOIDE Y MIELOIDE  
DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR*

**T E S I S**  
DE POSTGRADO  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
ESPECIALISTA EN NEUMOLOGIA

**PRESENTA**  
**DRA. MARIA DE LOURDES NAVA GAMIÑO**

TUTORA. DRA. ISABEL SADA OVALLE





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Jorge Salas Hernández  
Director de Enseñanza  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. "Ismael Cosío Villegas"

Dra. Isabel Sada Ovalle  
Departamento de Bioquímica  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. "Ismael Cosío Villegas"  
Tutora de Tesis.

## DEDICATORIA

A Sergio mi mejor amigo, pareja, mi universo, mi todo.....

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por siem pre estar conmigo, por su apoyo incondicional . Gracias sin ustedes no habría volado tan lejos.

A Dra. Isabel Sada por su gran paciencia, conocimientos, tolerancia y dedicación y sobre todo por hacer realidad uno de mis más grandes sueños. Gracias.....

## INDICE

Introduccion	1
I. Antecedentes	2
II. Planteamiento del Problema	6
III. Hipótesis	6
IV. Objetivos	6
V. Justificación	7
VI. Pacientes y Métodos	8
VII. Resultados	11
VIII. Discusión y Conclusiones	17
IX. Referencias	20
X. Anexos	21

## FRECUENCIA EN LA EXPRESIÓN DE TIM3 Y GALECTINA 9 EN DIFERENTES POBLACIONES DE ORIGEN LINFOIDE Y MIELOIDE DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR.

**INTRODUCCION:** Las proteínas de la familia TIM (T-cell immunoglobulin domine por sus siglas en ingles) han sido descritas de manera reciente como importantes reguladoras de la respuesta inmune. TIM3 es una molécula que fue identificada por su expresión selectiva en linfocitos T CD4+ tipo TH1 terminalmente diferenciados y que tiene la capacidad de inducir muerte celular una vez que interacciona con su ligando conocido: galectina 9 (también conocido como LGALS9). Recientemente se estableció un modelo experimental de infección in vitro con una cepa patógena de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) en macrófagos peritoneales para evaluar el control del crecimiento intracelular bacteriano. Los resultados mostraron que los macrófagos infectados con M.tb que fueron cultivados durante 72 hrs con esplenocitos provenientes de un ratón que sobre-expresa TIM3 no solo controlaron el crecimiento intracelular de M.tb sino que indujeron su muerte. Posteriormente, se utilizó una proteína de fusión construida con la porción extracelular de TIM3 unida a una inmunoglobulina (TIM3-IgG) y trataron a los macrófagos infectados con diferentes concentraciones de dicha proteína en ausencia de linfocitos T. Tres días después se evaluó el crecimiento bacteriano y se encontró que el tratamiento de los macrófagos infectados con la proteína de fusión (TIM3-Ig) indujo muerte de M.tb en ausencia de linfocitos T en todas las concentraciones probadas. Esta es una aportación novedosa ya que en macrófago existen pocos mecanismos exitosos capaces de eliminar a M.tb. Consideramos que es indispensable identificar si la interacción entre TIM-3 y su ligando Galectina -9 es igualmente funcional en un sistema experimental que utilice células mononucleadas humanas, de ser así, se podría en un futuro diseñar una nueva opción terapéutica para la tuberculosis pulmonar susceptible y multifarmacoresistente.

**OBJETIVO GENERAL:** Identificar la frecuencia en la expresión de Tim3 y su ligando Galectina 9 en células mononucleadas de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar.

**OBJETIVO PARTICULAR:**

1.- Medir la frecuencia de expresión de TIM3 y Galectina 9 en linfocitos T CD4+, CD8+, monocitos y células NK de sangre periférica.

2.- Medir los niveles de IFN- $\gamma$  en suero de pacientes con tuberculosis pulmonar.

**HIPOTESIS:** La infección con *Mycobacterium tuberculosis* induce una reducción en la expresión de TIM3 y Galectina 9 en linfocitos T CD4+, CD8+, monocitos y células Nk que se asocia a menor control del crecimiento bacteriano.

**DISEÑO DEL ESTUDIO:** Descriptivo, Transversal y Prospectivo.

**PACIENTES Y METODOS:**

Se incluirán 12 pacientes con tuberculosis pulmonar activa sin tratamiento anti tuberculosis que acudan al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de manera consecutiva y se compararan con un grupo control constituido por 12 sujetos sanos en el periodo entre octubre 2008 y julio 2009.

A todos se les extraerá una muestra de 10ml de sangre venosa para:

1. Obtención de células mononucleadas (CMN)
2. Medición de la expresión de Tim3 y Galectina 9 en CMN.
3. Medición de los niveles de IFN- $\gamma$  en suero de pacientes con tuberculosis pulmonar.

Criterios de inclusión: Pacientes mayores de 18 años con tuberculosis pulmonar activa diagnosticada clínica, radiológica y microbiológicamente.

Sin tratamiento anti tuberculosis o en la primera semana del mismo y que acepten participar en el protocolo firmando el consentimiento informado.

Los controles serán individuos clínicamente sanos sin tuberculosis y sin VIH.

Criterios de exclusión: Pacientes con VIH, Pacientes que estuviesen recibiendo tratamiento anti tuberculosis; Mujeres embarazadas y/o en periodo de lactancia.

**RESULTADOS:** 1) los pacientes con TB tienen una menor frecuencia de células Tim3+, 2) la reducción en la frecuencia de células Tim3+ se encuentra principalmente localizada en los monocitos y en las células NK, 3) los monocitos y las células NK también tienen una menor frecuencia en la expresión de Galectina 9 y 4) los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen niveles de IFN- $\gamma$  sérico mayores que los sujetos control.

**CONCLUSIONES:** Más estudios son necesarios para identificar si la menor expresión de Tim3 y Galectina 9 en células humanas reduce el control del crecimiento bacteriano intracelular o la muerte de M.tb.

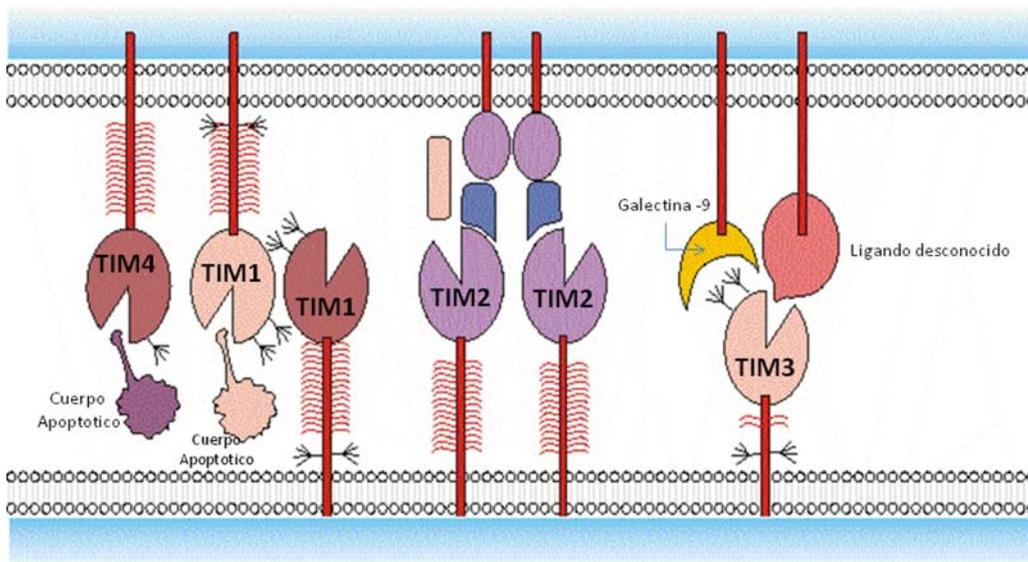
## I. ANTECEDENTES

La tuberculosis pulmonar continúa siendo la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas a lo largo del mundo (WHO Report 2008, Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing). En años recientes la emergencia de cepas resistentes y extremadamente resistentes se ha incrementado con un estimado de 489 000 casos nuevos en el año 2006 (Zignol, Hosseini et al. 2006). En la mayoría de los individuos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) la respuesta inmunológica es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano llevando a la infección latente. El papel que juega la inmunidad innata durante la tuberculosis pulmonar latente y/o durante la enfermedad activa no se ha comprendido por completo, sin embargo; en los últimos años se han estudiado con mayor profundidad diversos mecanismos inmunológicos mediados por células y moléculas del sistema inmune innato que son capaces de mediar una respuesta protectora contra M.tb (Flynn and Chan 2001; Divangahi, Mostowy et al. 2008; Korb, Schneider et al. 2008). Las proteínas de la familia TIM (T-cell immunoglobulin domain por sus siglas en inglés) han sido descritas de manera reciente como importantes reguladoras de la respuesta inmune innata. En el ratón existen 4 genes que codifican para las proteínas TIM: HAVCR1 (hepatitis A virus cellular receptor 1; también conocido como Timd1; el cual codifica para la proteína TIM1), Timd2 (el cual codifica para TIM2), Havcr2 (también conocido como Timd3; y codifica para TIM3) y Timd4 (el cual codifica para TIM4). En el humano se han descrito 3 genes que codifican para las proteínas TIM: HAVCR1 (el cual codifica para TIM1), HAVCR2 (el cual codifica para TIM3) y TIMD4 (el cual codifica para TIM4) (Kuchroo, Umetsu et al. 2003). Como su nombre lo indica, estas proteínas fueron inicialmente descritas como moléculas presentes en la superficie de los linfocitos T y de hecho TIM1, TIM2 y TIM3 son expresadas en los linfocitos T. Sin embargo, con el paso del tiempo se observó que las proteínas TIM también se expresan en otras células del sistema inmune, principalmente en células presentadoras de antígeno (CPA) (Kuchroo, Dardalhon et al. 2008).

En la tabla siguiente se muestran los diferentes miembros de la familia TIM.

Proteína TIM	Expresión en células Inmunes	Ligando	Función
TIM1	Activa células T Th2> Th1	Tim-4	Regula la respuesta celular de TH2
TIM2	Celulas B Células Th2	H-ferritin Sema4A	Regulador negativo de respuestas celulares TH2
TIM3	Células Th1 Células Dendríticas	Galectina-9	Regulador negativo de células TH1
TIM4	Células presentadoras de antígenos		Promueve la co-estimulación para la proliferación y supervivencia de células T

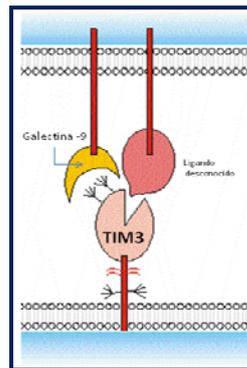
El esquema siguiente representa a los 4 miembros de la familia TIM con sus ligandos conocidos.



#### Representación esquemática de las proteínas pertenecientes a la familia TIM

TIM3 es una proteína que fue identificada por su expresión selectiva en linfocitos T CD4+ tipo TH1 (T helper 1 por sus siglas en inglés) diferenciados y que tiene la capacidad de inducir muerte celular una vez que interacciona con su ligando conocido: galectina 9 (también conocido como LGALS9) (Monney, Sabatós et al. 2002). De manera más reciente se identificó que TIM3 también puede expresarse en células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) CD11c+ y en monocitos humanos. De hecho, la estimulación de TIM3 en monocitos humanos induce la secreción de citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa),

sugiriendo que TIM3 puede tener funciones opuestas en la inmunidad innata versus la inmunidad adquirida (Anderson, Anderson et al. 2007). Dentro de las funciones que se han descrito para la proteína TIM3 se encuentran: 1) Inducción de una respuesta proinflamatoria mediada por DC debido a su actividad sinérgica con los TLRs (Toll like receptors) (receptor tipo Toll por sus siglas en inglés) (Anderson, Anderson et al. 2007) y 2) regulador negativo de la respuesta inmune tipo TH1 al interactuar con su ligando Galectina 9 (Gal9) (Monney, Sabatos et al. 2002; Zhu, Anderson et al. 2005).

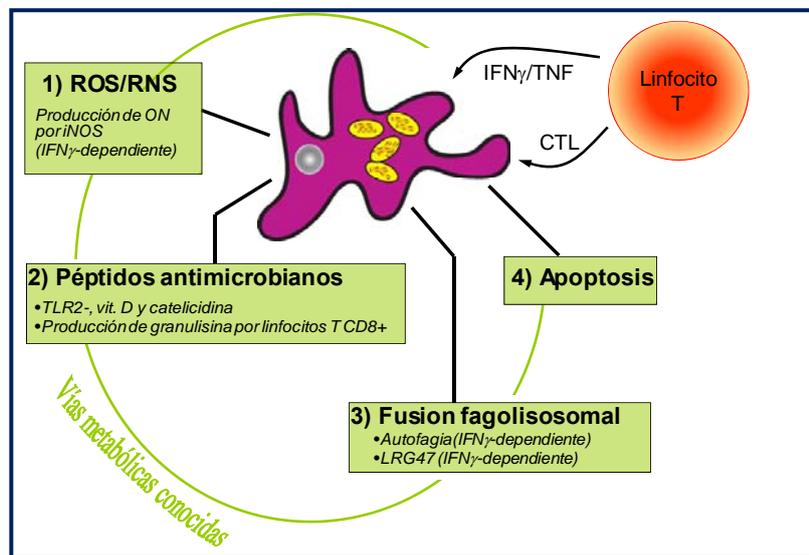


Resultados preliminares obtenidos del modelo experimental de infección in-vitro que utiliza macrófagos peritoneales de ratón y esplenocitos vírgenes provenientes de un ratón transgénico que sobreexpresa TIM3 mostraron control del crecimiento intracelular de M.tb en un 75% (reducción de las unidades formadoras de colonias), mientras que los esplenocitos vírgenes del ratón silvestre sólo lo hicieron en un 40%. Las unidades formadoras de colonias obtenidas en el día 4 fueron, en todos los casos inferiores que aquellas encontradas en el día 1 post infección, reflejo de muerte bacteriana más que del control de crecimiento intracelular (Manuscrito en preparación).

Posteriormente y utilizando el mismo modelo experimental, los macrófagos peritoneales infectados fueron tratados con una proteína de fusión de Tim3 o con una IgG humana como control. Esta proteína se construyó con la porción extracelular de Tim3 unida a la porción Fc de una inmunoglobulina. Las unidades formadoras de colonias obtenidas al día 4 post infección mostraron un 73% de reducción comparadas con el inoculo inicial traduciendo muerte de M.tb (Manuscrito en preparación).

Esta es una aportación novedosa y relevante debido a que solo existen 5 mecanismos conocidos a través de los cuales el hospedero inhibe o elimina a M.tb. 1) La acción de la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y la liberación de óxido nítrico (ON) secundarios a la producción de IFN-gamma 2) Otro de los mecanismos que dependen de la producción de IFN-gamma para el control o eliminación de M.tb es mediado por la GTPasa de 47 kDa LRG-47, 3) Dentro de los mecanismos que son independientes de

la producción de IFN-gamma, tenemos la actividad antimicrobica de monocitos y macrófagos humanos contra M.tb inducida por vitamina-D (Rook, Steele et al. 1986; Crowle, Ross et al. 1987), 4) Otro mecanismo independiente de la producción de IFN-gamma para inhibir a M.tb es mediado por la proteína granulicina. La granulicina es una proteína que se encuentra en los gránulos de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en ingles), linfocitos T CD4, T CD8 y NKT en humanos y que al igual que la proteína LL-37 forma poros membranales que inducen muerte bacteriana (Gansert, Kiessler et al. 2003). 5) Por último tenemos la apoptosis de macrófagos infectados como un mecanismo que puede por sí mismo reducir la viabilidad de M. tb además de favorecer la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8+.



**Mecanismos conocidos a través de los cuales el macrófago puede controlar el crecimiento intracelular bacteriano.**

Los resultados preliminares sugieren que el efecto micobactericida de TIM3 puede estar mediado por un mecanismo diferente a los descritos previamente, sugiriendo que la producción de óxido nítrico se desencadena por una vía independiente de la producción de IFN-gamma. Previamente se ha descrito que los pacientes con TBP tienen una producción disminuida de IFN-gamma y que éste puede ser considerado como un marcador indirecto de gravedad de la enfermedad (Sodhi, Gong et al. 1997). Si la interacción de TIM-3 con TIM3 ligando (Galectina 9) activa un mecanismo micobactericida que no requiere la presencia de IFN-gamma y que induce la muerte de M.tb, éste podría ser utilizado para generar nuevas moléculas o compuestos químicos que se an utilizados como un tratamiento novedoso en la TBP y/o en otras patologías de origen infeccioso.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Cuáles es la frecuencia en la expresión de las moléculas TIM3 y Galectina 9 en células linfoides y mieloides de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar?

## **II. HIPOTESIS**

La infección con *Mycobacterium tuberculosis* induce una reducción en la expresión de TIM3 y Galectina 9 en linfocitos T CD4+, CD8+, monocitos y células NK que se asocia a menor control del crecimiento bacteriano.

## **IV. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Identificar la frecuencia en la expresión de Tim3 y su ligando Galectina 9 en células mononucleadas de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar.

### **Objetivos Particulares**

- 1.- Medir la frecuencia de expresión de TIM3 y Galectina 9 en linfocitos T CD4+, CD8+, monocitos y células NK de sangre periférica.
- 2.- Medir los niveles de IFN- $\gamma$  en suero de pacientes con tuberculosis pulmonar.

## V. JUSTIFICACION

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud considera a la tuberculosis pulmonar como una epidemia global, con 2 billones de individuos infectados de los cuales al menos el 10% están en riesgo de desarrollar la enfermedad. En los últimos 125 años de investigación básica se descubrió a *Mycobacterium tuberculosis* como el agente causal de la tuberculosis, se desarrolló la prueba cutánea de la tuberculina, la vacuna BCG, la mayoría de los antibióticos que se utilizan para tratar la tuberculosis y se caracterizó el genoma de la bacteria. Sin embargo, todos estos avances científicos no han sido suficientes para reducir los 9,2 millones de casos nuevos y 1.7 millones de muertes que la O.M.S. informó en el año 2006. Más aún, la necesidad de utilizar 3 a 6 medicamentos en un período de 6- 9 meses aunado al pobre apego ha favorecido el desarrollo de cepas micobacterianas multiresistentes o extremadamente resistentes. Estos son los principales motivos por los cuales la mayor parte de los programas nacionales e internacionales de lucha contra la tuberculosis han destinado su presupuesto para cubrir las necesidades de dos rubros principales: prevención y tratamiento.

Este trabajo ha sido diseñado para estudiar las nuevas vías de activación celular en poblaciones de linfocitos y de células presentadoras de antígeno (monocitos, macrófagos y células dendríticas) que llevan al control del crecimiento intracelular y/o la muerte de *Mycobacterium tuberculosis* y que sean mediadas por la interacción entre TIM3 y TIM3 ligando.

## **VI. PACIENTES Y METODOS**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO:**

Prospectivo, descriptivo y transversal

### **GRUPOS DE ESTUDIO:**

- I. Pacientes con tuberculosis pulmonar
- II. Sujetos sanos

### **CRITERIOS DE INCLUSION:**

1. Individuos de entre 18 y 60 años de edad de cualquier género que hayan acudido al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con sospecha de tuberculosis pulmonar.
2. Baciloscopía positiva en expectoración espontánea por la técnica de Ziehl-Nielsen.
3. Cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis*.

### **CRITERIOS DE EXCLUSION:**

1. Que el paciente rehúse a participar en el estudio.
2. Pacientes admitidos en la unidad de cuidados intensivos y/o intermedios
3. Tuberculosis extrapulmonar

### **ANALISIS ESTADISTICO:**

Las variables normalmente distribuidas, evaluadas a través de la prueba de sesgo y kurtosis, se presentan en media y desviación estándar. Para distribuciones no normales se utilizó la mediana y el rango intercuartilar. La comparación entre grupos se realizó por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney) para variables no normales y por medio de la prueba t de student para variables con distribución normal. Para el análisis de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 y se consideró como significancia estadística a una  $p < 0.05$ .

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS:**

Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

### **REACCIONES ADVERSAS:**

La única intervención realizada en los sujetos es una venopunción, la cual se realiza por personal experto y con material estéril. La venopunción solo genera dolor leve y en algunos casos excepcionales pequeños hematomas.

### **PACIENTES:**

En este protocolo participaron individuos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, provenientes de la Consulta Externa y del Servicio Clínico 2 del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. El diagnóstico de tuberculosis pulmonar se estableció por la confirmación del crecimiento de M.tb en cultivo de esputo. Todos los pacientes incluidos fueron clasificados como clase 3 y categoría I según la Sociedad Americana del Tórax, es decir, todos los pacientes fueron casos nuevos de TB activa. Los individuos que participaron como parte del grupo control fueron voluntarios, adultos saludables y firmaron una carta de consentimiento informado.

### **REACTIVOS**

Anticuerpos monoclonales conjugados al isotiocianato de fluoresceína (FITC) dirigidos contra CD3, CD14, CD16 y TIM3, anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina (PE) dirigidos contra CD8, CD4 y anticuerpo

monoclonal conjugado a PerCp-Cy5.5 dirigidos contra Galectina 9 fueron obtenidos de PharMingen BD (San Diego, CA, USA). El medio de cultivo RPMI-1640, penicilina, saponina, paraformaldehído, suero fetal bovino, azul de tripano y las sales utilizadas para la preparación de los amortiguadores fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). El piruvato de sodio, L-glutamina y 2-mercaptoetanol fueron de Gibco BRL (Rockville, MD, USA).

### **Obtención de células mononucleadas y medición de la frecuencia de células TIM3+ y Galectina 9+.**

A partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica se obtienen las células mononucleadas (CMN) por centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (1.077) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se resuspenden en medio de cultivo complementado (RPMI 1640, HEPES 10mM, L-glutamina 200 mM). Se evalúa la viabilidad celular por la técnica de exclusión del colorante azul tripano y se ajusta la concentración a  $1 \times 10^6$  células /ml. Posteriormente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia directa e indirecta para la fenotipificación celular acorde a la metodología siguiente. Las células purificadas se tiñen durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD56, TIM3 (extracelular) y contra galectina 9 (intra y extracelular). Para cada una de las tinciones se incluyen los respectivos controles de isotipo. Después de la tinción las células se lavan 2 veces con buffer salino-fosfato (PBS) y se fijan en paraformaldehído al 1%. Las muestras se adquieren en un cytómetro de tipo FACSaria (BD Biosciences) y se analizaran con el software FlowJo (Tree Star).

### **Evaluación de la citocina IFN- $\gamma$ en suero de pacientes con tuberculosis pulmonar.**

Se realizara un ELISA sándwich para la citocina IFN- $\gamma$  acorde a las instrucciones del fabricante. Las citocinas son cuantificadas en base a una curva estándar que se realiza por triplicado para cada experimento. Los resultados son leídos en un lector de ELISA.

## VII. RESULTADOS

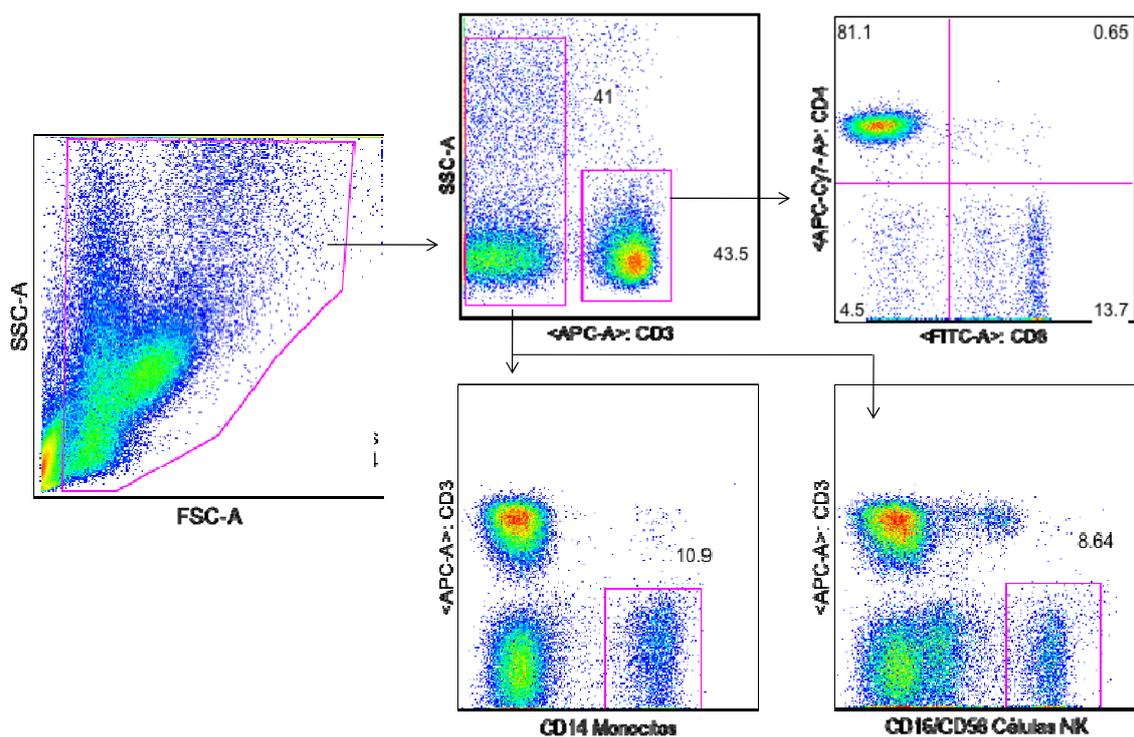
### CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Se incluyeron 12 pacientes con diagnóstico confirmado de tuberculosis pulmonar los cuales fueron considerados como casos nuevos y por lo tanto. La edad promedio de este grupo fue de  $42.5 \pm 16$  años. El grupo testigo estuvo conformado por 15 individuos sanos que tuvieron una edad promedio de  $34.8 \pm 8.6$  ( $p= 0.02$ ). En la Tabla 1 se muestran las características generales del grupo de pacientes con tuberculosis pulmonar.

VARIABLE	PACIENTES	CONTROLES
Sexo masculino <b>No/Total (%)</b>	12/45 (26.66)	10/45 (22.22)
Sexo femenino <b>No/Total (%)</b>	6/45 (13.33)	17/45 (37.77)
Edad <b>Media</b> <b>DE</b>	42.5* 16	34.9 8.9
Pacientes <b>No/Total (%)</b>		
>18 < 25	2/45 (4.4)	7/45 (15.5)
>25 < 35	6/45 (13.33)	11/45 (24.44)
>35 <45	2/45 (4.4)	6/45 (13.33)
>45<55	1/45 (2.2)	3/45 (6.66)
>55	4/45 (8.8)	0/45
Tabaquismo <b>No/Total (%)</b>	6/45 (13.33)	5/45 (11.11)
Diabéticos <b>No/Total (%)</b>	6/45 (13.33)	0/45
Adicciones <b>No/Total (%)</b>	3/45 (6.66)	0/45
Hemoglobina * <b>Media</b> <b>DE</b>	12.4 2.1	
Albumina * <b>Media</b> <b>DE</b>	3.09 0.7	
Leucocitos <b>Media</b> <b>DE</b>	10.2 7.07	
Linfocitos * <b>Media</b> <b>DE</b>	1.3 0.4	

En la Figura 1 se observa un ejemplo del tipo de análisis que se realizó para datos provenientes de citometría multiparamétrica, esto es, funciones celulares que comprenden el uso de más de 4 fluorocromos al mismo tiempo. En primer lugar se identificaron las “células vivas” en base a sus características de tamaño y complejidad. A partir de esta ventana de “células vivas” se identifican las siguientes poblaciones: linfocitos CD3+ y CD3- (los cuales comprenden a los linfocitos B, monocitos, células NK, y granulocitos), linfocitos T CD4+ y CD8+, monocitos (CD14+) y células NK (CD16+CD56+). Posteriormente a cada una de estas poblaciones se les midió la expresión de Tim3 y Galectina 9.

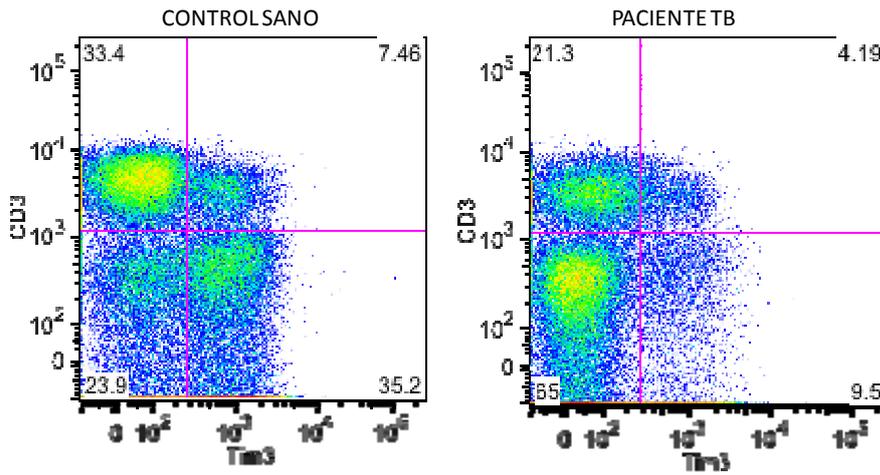
### FRECUENCIA EN LA EXPRESION DE TIM3 EN CELULAS MONONUCLEADAS



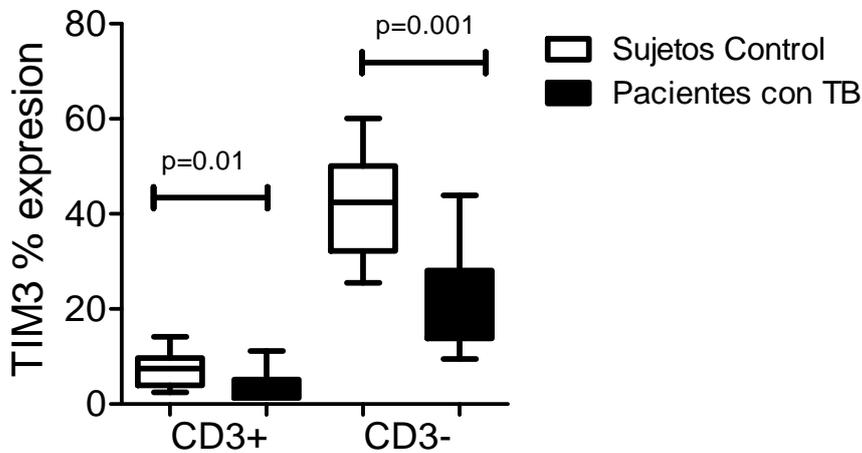
**Figura 1. Distribución de células linfoides y mieloides a partir de células mononucleadas totales.** Las diferentes subpoblaciones fueron identificadas en base a la expresión de sus marcadores típicos de superficie. El porcentaje de células positivas a cada marca se encuentra indicado en el recuadro correspondiente de cada gráfico. Este experimento es representativo de 12 experimentos independientes.

En la Figura 2 se puede observar que los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen una menor frecuencia de células CD3+Tim3+ y CD3-Tim3+ que los controles sanos. La mediana fue de 7.5% para los pacientes [rango intercuartil: riq 3.9-9.7] y 2.1% para los controles sanos [riq 1.3-5.2]. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

**A**

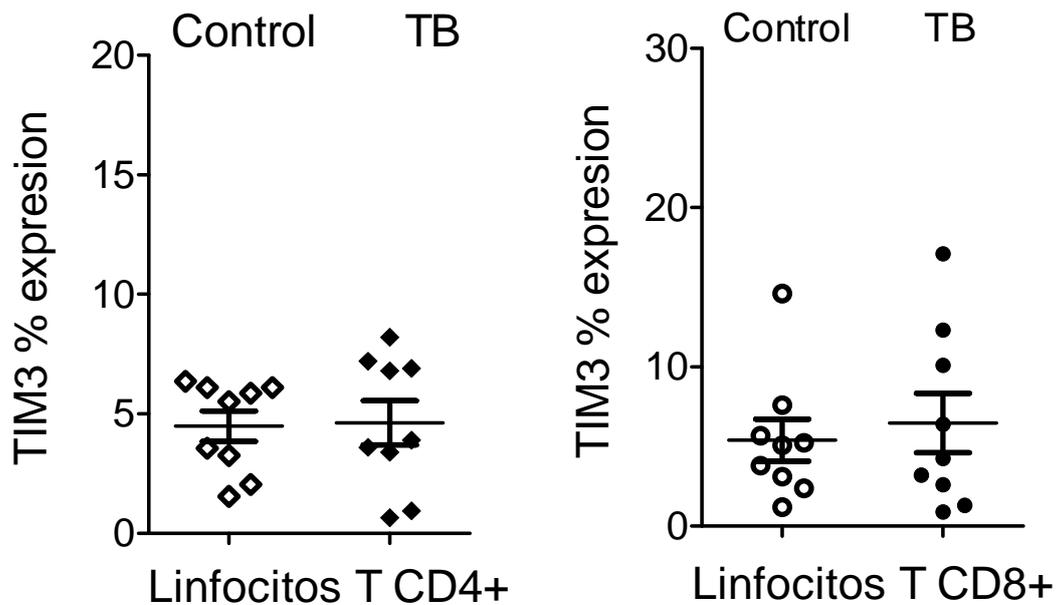


**B**



**Figura 2. Frecuencia de células CD3+ Tim3+ y CD3- Tim3+.** **A.** Las gráficas de puntos representan el porcentaje de células CD3+ Tim3+ y CD3- Tim3+ provenientes de un individuo sano y un paciente con tuberculosis. **B.** La frecuencia de células CD3+ Tim3+ y CD3- Tim3+ se obtuvo a partir de doble inmunofluorescencia directa en células mononucleadas de sangre periférica. La tinción no-específica se identificó utilizando un control de isotipo. Los datos son el resultado del promedio de 12 experimentos independientes. Los datos son expresados como medianas y rango intercuartil.

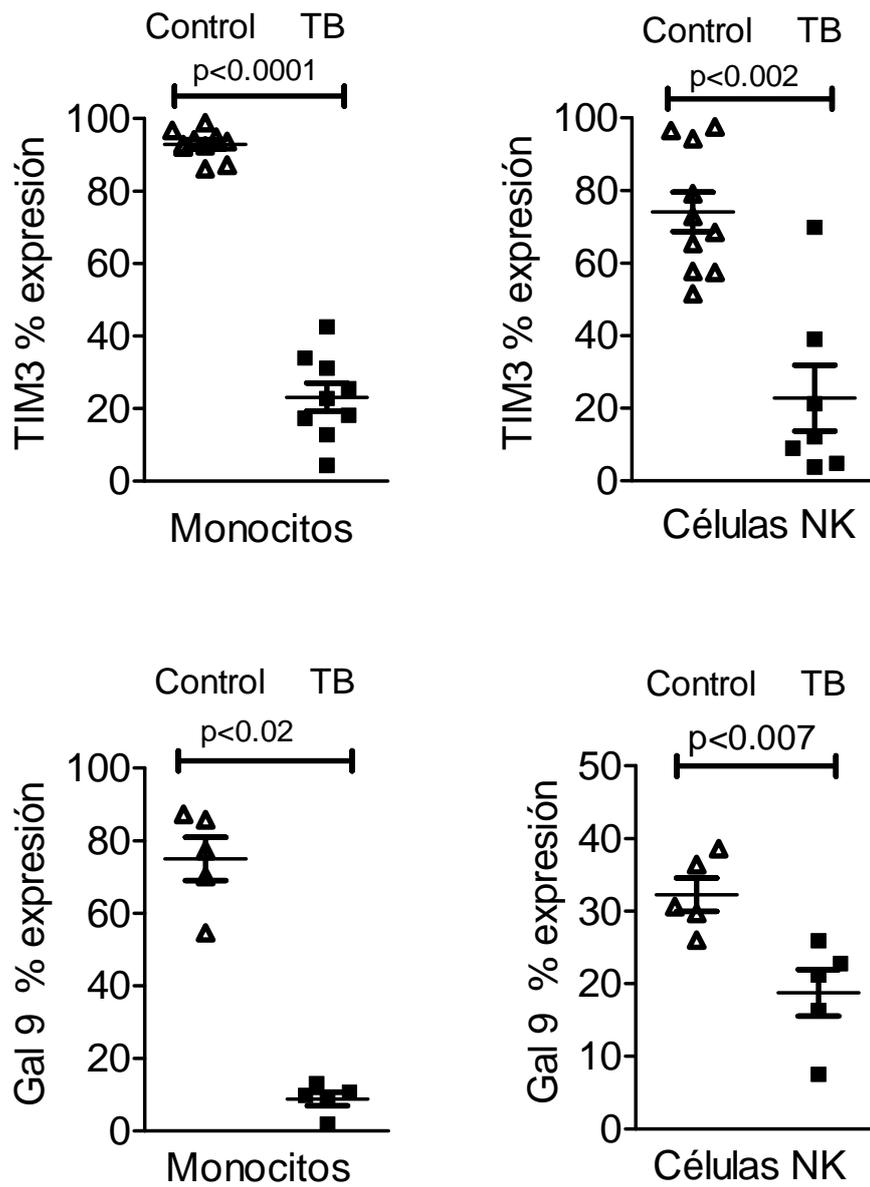
Tim3 es una molécula que fue descrita como un marcador de superficie presente en linfocitos T CD4+ tipo TH1 terminalmente diferenciados, por este motivo decidimos analizar dicha marca en linfocitos T CD4+ y CD8+. No encontramos diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 3. Expresión de Tim3 en linfocitos T CD4+ y CD8+.** La frecuencia de células Tim3+ se obtuvo a partir de triple inmunofluorescencia directa en células mononucleadas de sangre periférica. La tinción no-específica se identificó utilizando control de isotipo para cada anticuerpo. Los datos son un promedio de 9 experimentos independientes. Los datos son expresados como medianas.

### FRECUENCIA EN LA EXPRESION DE GALECTINA 9

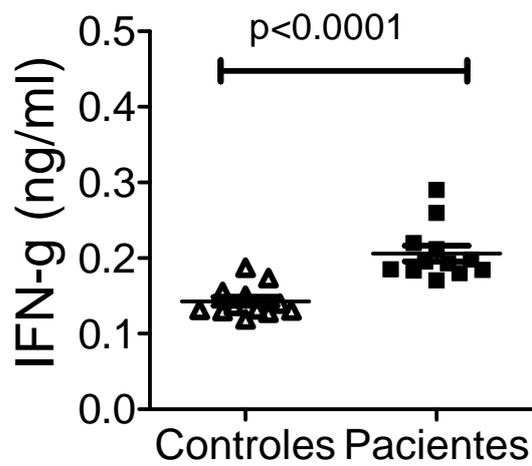
Galectina 9 es ligando conocido para Tim3 y puede ser expresado en una gran variedad de células incluyendo las de origen mieloide. Nuestro siguiente objetivo fue identificar el perfil de expresión de Tim3 y Galectina 9 en células NK y en monocitos. Ambas subpoblaciones tienen una función relevante en la inmunopatogénesis de la tuberculosis.



**Figura 4. Expresión de Tim3 y Gal9 en monocitos y células NK.** Las células mononucleadas totales fueron teñidas según la metodología descrita previamente. Los monocitos y las células NK fueron analizados a partir de una ventana de células CD3 negativas y su marcador específico de superficie (CD14+ para monocitos y CD16+CD56+ para las células NK). La tinción no-específica se identificó utilizando controles de isotipo. Los datos son un promedio de 5 experimentos independientes. Los datos son expresados como medianas  $\pm$  riq.

## NIVELES SERICOS DE IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  es una citocina que induce la expresión de Galectina 9 por este motivo consideramos importante analizar los niveles de IFN- $\gamma$  presentes en el suero de los pacientes con tuberculosis pulmonar.



**Figura 5. Niveles de IFN- $\gamma$  en suero de pacientes con tuberculosis pulmonar.** La producción de IFN- $\gamma$  fue analizada mediante ELISA. Los datos están representados como mediana  $\pm$  riq. Los datos provienen de 12 muestras independientes.

## VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de TIM3 y su ligando Galectina-9 en células linfoides y mieloides de sangre periférica proveniente de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y controles sanos. Nuestros principales resultados fueron: 1) los pacientes con TB tienen una menor frecuencia de células Tim3+, 2) la reducción en la frecuencia de células Tim3+ se encuentra principalmente localizada en los monocitos y en las células NK, 3) los monocitos y las células NK también tienen una menor frecuencia en la expresión de Galectina 9 y 4) los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen niveles de IFN- $\gamma$  sérico mayores que los sujetos control.

Tim3 es una molécula que fue inicialmente descrita como miembro de la familia TIM expresada en linfocitos CD4+ tipo TH1 terminalmente diferenciados, y en células dendríticas (Anderson, Anderson et al. 2007; Kuchroo, Dardalhon et al. 2008). En ratones, el gen que codifica para Tim3 tiene una variante alternativa que produce una forma soluble de la proteína (sTim3) además de la forma completa (flTim3). En el humano Tim3 es preferencialmente expresado en linfocitos T CD4+ tipo TH1 así como en linfocitos T CD8+ (Monney, Sabatos et al. 2002). Tim3 es también expresado en macrófagos, células dendríticas y células NK. En el año 2005, Zhu, et al identificaron a Galectina 9 como el ligando de Tim3 (Zhu, Anderson et al. 2005). Galectina 9 es expresada en la superficie de una gran variedad de células pero puede también puede ser producida como una molécula soluble que reconoce carbohidratos en la superficie de las células (Wada and Kanwar 1997). La expresión de Galectina 9 en las células del sistema inmune es incrementada por IFN- $\gamma$  (Asakura, Kashio et al. 2002). Previamente nosotros demostramos en un modelo murino de infección in vitro con *Mycobacterium tuberculosis*, desarrollado en macrófagos peritoneales de ratón que la interacción entre Tim3 y Galectina 9 controla el crecimiento bacteriano intracelular e induce la muerte de la bacteria. Esta respuesta parece estar mediado por un mecanismo independiente de la producción de IFN- $\gamma$  (manuscrito en preparación).

Nosotros aquí demostramos que la frecuencia en la expresión de TIM 3 se encuentra disminuida en células CD3+ y CD3- de pacientes con TB activa cuando se compara con sujetos control ( $p=0.01$  y  $p=0.001$  respectivamente). Cuando analizamos la expresión de Tim3 en los linfocitos T CD4+ y CD8+ no

encontramos diferencias estadísticamente significativas. Esta reducción en Tim3 fue principalmente evidente en monocitos y células NK. La misma tendencia se observó con respecto a la expresión de Galectina 9, el ligando conocido de Tim3.

Anderson et al, demostraron que la expresión de Tim3 en células del sistema inmune (monocitos y células dendríticas) induce la producción de citocinas proinflamatorias (Anderson, Anderson et al. 2007). Por otra parte, Hirashima M et al, demostraron que Galectina 9 media la maduración de células dendríticas *in vitro* evaluado por un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras e IL-12 (Dai, Nakagawa et al. 2005). Nosotros hemos demostrado en el modelo murino que cuando Tim3 interacciona con Galectina 9 en el macrófago infectado se estimula la producción de la citocina IL-1 $\beta$  la cual media la muerte de M.tb por un mecanismo que no ha sido completamente esclarecido (manuscrito en preparación). En este trabajo nosotros mostramos que los pacientes con TB tienen una reducción en la expresión de ambas moléculas, Tim3 y Galectina 9 en dos subpoblaciones cuya función es fundamental en la inmunopatología de la tuberculosis. Una de las características más importante de la respuesta inmune celular en tuberculosis es la activación de monocitos/macrófagos y células NK, subpoblaciones que cuentan con los mecanismos necesarios para eliminar a M.tb. Nosotros desconocemos hasta el momento si esta reducción en la expresión de Tim3 y Galectina 9 tiene una implicación directa en la capacidad de estas células para eliminar a M.tb. Más estudios son necesarios para identificar si la expresión reducida de Galectina 9 se asocia a una incapacidad del monocitos/macrófago para diferenciarse en una célula capaz de producir citocinas proinflamatorias y eliminar a la bacteria.

Galectina 9 es una lectina que tiene gran afinidad por las  $\beta$ -galactosidasa cuya expresión es inducida por IFN- $\gamma$  y que es conocida como un factor quimio-atrayente para eosinófilos (Kageshita, Kashio et al. 2002). Galectina 9 se encuentra presente en una gran variedad de células y puede ser secretada para interactuar con su ligando Tim3, esta interacción selectivamente induce apoptosis de los linfocitos tipo TH1 (Zhu, Anderson et al. 2005). Actualmente no existe información disponible en la literatura que sugiera un papel relevante para Galectina 9 o Tim3 en una patología como la

tuberculosis, sin embargo nosotros consideramos que la interacción entre ambas moléculas puede ser relevante en la inmunopatogenesis de la enfermedad. Es posible que M.tb este mediando por algún mecanismo no conocido la reducción la expresión de Tim3 y Galectina 9 como un mecanismo de defensa. Galectina 9 es una molécula cuya expresión es inducida en presencia de IFN- $\gamma$ , por este motivo nosotros medimos los niveles séricos de esta citocina en los pacientes con TB. Nuestros resultados mostraron que los pacientes tienen niveles séricos de IFN- $\gamma$  mayores que los controles ( $p < 0.0001$ ) sugiriendo que existe algún otro mecanismo inmunológico que está controlando la expresión de Galectina 9 y por lo tanto impidiendo su interacción con Tim3 para poder eliminar a M.tb.

En conclusión, más estudios son necesarios para identificar si la menor expresión de Tim3 y Galectina 9 en células humanas reduce el control del crecimiento bacteriano intracelular o la muerte de M.tb.

## IX. REFERENCIAS

- Anderson, A. C., D. E. Anderson, et al. (2007). "Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells." Science **318**(5853): 1141-3.
- Asakura, H., Y. Kashio, et al. (2002). "Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9." J Immunol **169**(10): 5912-8.
- Crowle, A. J., E. J. Ross, et al. (1987). "Inhibition by 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages." Infect Immun **55**(12): 2945-50.
- Dai, S. Y., R. Nakagawa, et al. (2005). "Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **175**(5): 2974-81.
- Divangahi, M., S. Mostowy, et al. (2008). "NOD2-deficient mice have impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection through defective innate and adaptive immunity." J Immunol **181**(10): 7157-65.
- Flynn, J. L. and J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol **19**: 93-129.
- Gansert, J. L., V. Kiessler, et al. (2003). "Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity." J Immunol **170**(6): 3154-61.
- Kageshita, T., Y. Kashio, et al. (2002). "Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance." Int J Cancer **99**(6): 809-16.
- Korbel, D. S., B. E. Schneider, et al. (2008). "Innate immunity in tuberculosis: myths and truth." Microbes Infect **10**(9): 995-1004.
- Kuchroo, V. K., V. Dardalhon, et al. (2008). "New roles for TIM family members in immune regulation." Nat Rev Immunol **8**(8): 577-80.
- Kuchroo, V. K., D. T. Umetsu, et al. (2003). "The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease." Nat Rev Immunol **3**(6): 454-62.
- Monney, L., C. A. Sabatos, et al. (2002). "Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease." Nature **415**(6871): 536-41.
- Rook, G. A., J. Steele, et al. (1986). "Vitamin D<sub>3</sub>, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes." Immunology **57**(1): 159-63.
- Sodhi, A., J. Gong, et al. (1997). "Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis." Clin Infect Dis **25**(3): 617-20.
- Wada, J. and Y. S. Kanwar (1997). "Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin." J Biol Chem **272**(9): 6078-86.
- Zhu, C., A. C. Anderson, et al. (2005). "The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity." Nat Immunol **6**(12): 1245-52.
- Zignol, M., M. S. Hosseini, et al. (2006). "Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis." J Infect Dis **194**(4): 479-85.

## X. ANEXOS

### Carta de Consentimiento Informado.

#### Consentimiento Informado

No. secuencial \_\_\_\_\_ Versión: 2

Acepto participar en el estudio "**Activación de monocitos y macrófagos inducida por TIM3 que lleva a la muerte de *Mycobacterium tuberculosis*: una nueva oportunidad terapéutica**" que realiza el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) con el objetivo de identificar los mecanismos inmunológicos que puedan mediar la muerte de *Mycobacterium tuberculosis*.

Estoy enterado que personas de entre 18 y 65 años de edad serán invitadas a participar voluntariamente en el estudio. Este estudio está planeado para que se incluyan 100 sujetos sanos y 100 pacientes con tuberculosis. Estoy enterado de que mi participación en el estudio no tiene costo para mí y consiste en lo siguiente:

#### PROCEDIMIENTOS:

- Primero contestaré a unas preguntas simples sobre mi historia médica.
- En seguida me realizarán una punción venosa para obtención de una muestra de 10 ml de sangre venosa periférica.
- Entiendo que mi participación en el estudio no implica un beneficio directo a mi persona, sin embargo, con mi participación contribuyo a que los investigadores conozcan más acerca de la tuberculosis y, eventualmente, eso ayudará a muchas personas en todo el mundo.

#### DURACIÓN:

- La duración total del estudio que me realizarán varía, pero en general es menor de 30 minutos, y la toma de la muestra sanguínea será única.

#### POSIBLES REACCIONES A LA TOMA DE LA MUESTRA:

- Se me ha informado que al momento de puncionar la vena del brazo podría desarrollar un leve moretón en el sitio de la punción y que se me pasará en unos dos días. También me informaron que no habrá riesgo de contaminación de ninguna enfermedad porque se usarán jeringas nuevas y estériles.

#### COSTOS:

- No tendré que pagar por la realización del procedimiento.

#### AUTORIZACIÓN PARA PARTICIPAR:

Entiendo que mi participación es voluntaria y que soy libre para retirarme en cualquier momento sin que sean afectados mi cuidado médico y derechos legales.

Estoy de acuerdo en participar en este estudio y cooperar completamente. Estoy de acuerdo en proporcionar al investigador cualquier información que pueda ser importante para el estudio.

Entiendo que la información colectada durante mi participación en este estudio es clasificada como datos personales sensibles y que no se hará referencia a mi persona por mi nombre en la base de datos del estudio o en algún reporte o publicación relacionada a este estudio. Yo entiendo que la información será usada en cumplimiento de las leyes y regulaciones aplicables.

Estoy de acuerdo en que mis datos médicos estén disponibles para los miembros del Comité de Ciencia y Bioética y que en caso de duda sobre mis derechos como sujeto en investigación podre consultar al Presidente Dra. Rocio Chapela Mendoza, Tel 54 87 17 69 y autoridades sanitarias.

Estoy de acuerdo en que si me retiro del estudio, los datos del estudio colectados antes de mi retiro pueden aun ser procesados con otros datos colectados como parte del estudio clínico.

Nombre del Paciente _____	
Firma del Paciente _____	
Fecha _____	

