



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina

EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE  
CITOTOXICIDAD DE LINFOCITOS T CD8+ TCR  
 $\alpha\beta+$ /TCR $\alpha\beta-$  DE SANGRE DE PACIENTES CON  
TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA

T E S I S

Para obtener el grado de:  
Doctor en Ciencias (Inmunología)

P R E S E N T A

Q.C Leslie Chávez Galán

Asesor de tesis

Dr. Ricardo Lascurain Ledesma



Ciudad Universitaria, México; Mayo 2012



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.

ÍNDICE _____	I
Dedicatoria _____	III
Agradecimientos _____	IV
Prólogo _____	V

## Capítulo 1: TUBERCULOSIS

1.1 Respuesta inmune frente a Mtb _____	2
1.2 Mtb inhibe la respuesta inmune _____	6

### Artículo

Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel Mdel C, Sada-Ovalle I, Lascurain R. Mycobacterium tuberculosis main immune response evasion mechanisms. Gac Med Mex. 2009 Jul-Aug;145(4):323-30.

## Capítulo 2: LINFOCITOS T CITOTÓXICOS EN TUBERCULOSIS

2.1 Introducción _____	9
2.2 Antecedentes _____	10
2.3 Hipótesis _____	12
2.4 Objetivo general _____	12
2.5 Objetivos particulares _____	12
2.6 Material y métodos _____	14
2.7 Estandarización _____	19
2.8 Resultados y discusión _____	26
2.9 Conclusión _____	38

### Artículo

Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. Cell Mol Immunol. 2009 Feb;6(1):15-25.

## Capítulo 3: RECEPTORES TIPO *TOLL* (TLRS) EN TUBERCULOSIS

3.1 Introducción	39
3.2 Antecedentes	41
3.3 Hipótesis	41
3.4 Objetivo general	41
3.5 Objetivos particulares	41
3.6 Material y métodos	43
3.7 Estandarización	47
3.8 Resultados y discusión	51
3.9 Conclusión	72

### Artículos

Chávez-Galán L, Sada-Ovalle I, Baez-Saldaña R, Chávez R, Lascurain R. Monocytes from tuberculosis patients that exhibit cleaved caspase 9 and denaturalized cytochrome c are more susceptible to death mediated by Toll-like receptor 2. *Immunology*. 2012 Apr;135(4):299-311.

Chávez-Galán L, Ramírez-Velásquez KD, Sada-Ovalle I, Lascurain R. "Identificación de la expresión de moléculas CD1 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar". *Neumol Cir Torax*, 2010; Vol. 69 (3): 163-169.

BIBLIOGRAFÍA	74
Lista de figuras	88
Lista de cuadros	91

## **Dedicatoria**

A los pacientes que han sido víctimas de la tuberculosis pulmonar, en especial, a los que decidieron formar parte de este proyecto; ya que sin ellos no sería posible la existencia de esta tesis, ¡Gracias!

A la UNAM, nuestra máxima casa de estudios en México, sobra decir porque...



**La miseria (1886), Cristóbal Rojas (1857-1890)**

## **Agradecimientos**

A la vida, por la abundancia en que me ha dado...

A Tommy, porque su amor y apoyo incondicional fueron mi principal estímulo.

A mis padres y hermanos, por un sin fin de motivos...

Al Dr. Ricardo Lascurain, por su gran paciencia y apoyo.

A la Dra. Isabel Sada, por su apoyo y confianza en mi trabajo.

A todos los compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica, Dra. Pati, Sra. Rosa, Blanca, Mary, Agustín, Paco, Karina, Noé, Demetrio, y tantos otros que pasaron por ahí, gracias por esos buenos momentos.

A todas las personas que formaron parte de mi vida en diversos momentos y me ayudaron a ser lo que ahora soy.

## Prólogo

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, en la actualidad se le atribuyen ~2.2 millones de decesos anuales a nivel mundial. El principal agente etiológico de la enfermedad es el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, este bacilo ha logrado establecer una relación parasitaria con el humano; aunque se ha estudiado esta relación no se ha esclarecido con exactitud los mecanismos que le dan este éxito de sobrevivencia.

Un estudio preliminar de nuestro laboratorio mostró que los monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar morían por una vía independiente del MHC-I, al estar en cocultivo con linfocitos T CD8+ autólogos. El objetivo de esta tesis fue esclarecer cuál subpoblación de linfocitos T CD8+ realizaba citotoxicidad independiente al MHC-I, además, evaluar las moléculas que se han relacionado bajo diferentes contextos al proceso de muerte celular, por ejemplo, NKG2D, CD1, MICA/B, TLR2.

La redacción de la presente está dividida en 3 capítulos:

El capítulo 1 comienza con una introducción general sobre la tuberculosis, aquí describo brevemente la respuesta inmunitaria celular que se activa ante la infección por el bacilo, incluyo una descripción de la participación de los linfocitos T (CD4+, CD8+ o el TCR  $\gamma\delta$ ) y de las células presentadoras de antígeno. Asimismo, hay una descripción breve de los principales mecanismos de evasión que *Mycobacterium tuberculosis* ha desarrollado para sobrevivir en el hospedero. Al final del capítulo se incluye un artículo de revisión (Gac Med Mex. 2009 Jul-Aug; 145(4):323-30), producto del desarrollo de esta tesis, en donde se detallan estos mecanismos de evasión.

En el segundo capítulo mi objetivo fue esclarecer cuáles moléculas participan en la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ sin restricción al MHC-I en enfermos de tuberculosis pulmonar. Para esto, se realizaron cocultivos de linfocitos T CD8+ con monocitos autólogos estimulando con el filtrado de cultivo de la cepa H37Rv. Nuestros resultados de fenotipificación muestran un incremento de linfocitos T CD8+ TCR $\alpha\beta$  aunado a disminución de células NK en enfermos con tuberculosis pulmonar, al compararlos con los de sujetos control. Además los linfocitos T CD8+ provenientes de enfermos de tuberculosis pulmonar llevan a cabo su mayor capacidad citotóxica con 20  $\mu\text{g/mL}$  de filtrado de H37Rv; mientras que las células provenientes de sujetos control requieren de 40  $\mu\text{g/mL}$ . Otro hallazgo relevante que mostraron los ensayos de citotoxicidad fue que los monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar mueren por un mecanismo dependiente del receptor *Toll* tipo 2 (TLR2). Al final del capítulo se incluye un artículo de revisión (Cell Mol

Immunol. 2009 Feb;6(1):15-25), donde se discuten los mecanismos de citotoxicidad que utilizan las células para inducir muerte celular.

En el tercer y último capítulo mi objetivo fue esclarecer la muerte de monocitos, vía TLR2, al ser estimulados con antígenos solubles micobacterianos. Para esto se realizaron cultivos de monocitos incubados con antígenos micobacterianos o ligandos sintéticos para TLR2. La caracterización fenotípica mostró que los enfermos de tuberculosis pulmonar tienen mayor frecuencia de células CD14+ en sangre; además, un mayor porcentaje de monocitos que expresan las moléculas CD1b, MICA/B y TLR2 comparado con células provenientes de sujetos control. Estos enfermos también tienen concentraciones de TNF- $\alpha$  sérico. Los resultados mostraron que los monocitos de enfermos de tuberculosis pulmonar son células caspasa 9+ citocromo c+ y tienen mayor susceptibilidad a la muerte en ausencia de estímulo antigénico, lo que sugiere daño mitocondrial. Al final de este capítulo anexo 2 artículos, en el primero mostramos que los pacientes con tuberculosis tienen un porcentaje incrementado de monocitos CD1B+ pero no a otras isoformas de esta molécula (Neumol Cir Torax, 2010; Vol. 69 (3): 163-169); en el segundo, mostramos que los monocitos de enfermos de tuberculosis pulmonar presentan mayor tasa de muerte, aún en ausencia de estímulo antigénico y esto puede ser mediado por la molécula TLR2 (Immunology. 2012 Apr;135(4):299-311).



## Capítulo 1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que afecta a la población mundial, el panorama internacional sobre TB lo informa la Organización Mundial de la Salud (OMS), quien en 2008 reportó que anualmente se diagnostican ~9.2 millones de casos nuevos y mueren ~1.7 millones (1). En México, el anuario de morbilidad de 2008 informó que hay una incidencia de tuberculosis pulmonar (TBP) de 14.09 por cada 100,000 habitantes, la edad en que prevalece la enfermedad es entre 25 y 44 años (2). Si consideramos que en este intervalo de edad la población es económicamente activa, deducimos que esta enfermedad genera serias repercusiones económicas.

El principal agente etiológico de TBP en el humano es *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), patógeno intracelular que tiene la capacidad de persistir de manera indefinida dentro de las células mononucleadas del hospedero (3). Pertenece al orden de los *actinomicetos* y a la familia *Mycobacteriaceae*, algunas de las especies que conforman esta familia son: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*. Morfológicamente Mtb es un bacilo que mide entre 1-10  $\mu\text{m}$  de largo y 0.2-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho (4). Son bacterias de lento crecimiento, posee una compleja pared celular que es abundante en lípidos, glicolípidos y polisacáridos, los cuales son parte de los antígenos que secreta e importantes inductores de la respuesta inmune (5,6).

## 1.1 Respuesta inmune frente a Mtb.

La infección por Mtb ocurre cuando un sujeto inhala bacilos que han sido exhalados al ambiente en gotas de saliva, las cuales permanecen por varias horas en el aire; estimaciones de dosis mínima de infección indican que es suficiente 1 bacilo inhalado para que la infección se establezca (7).

Una vez que la bacteria es inhalada, el bacilo llega a los alveolos pulmonares donde es fagocitado principalmente por macrófagos alveolares o células dendríticas. Posteriormente se induce una respuesta inflamatoria localizada, la cual promueve el reclutamiento de células mononucleadas a partir de los vasos sanguíneos vecinos (8). Inicialmente se forma una masa amorfa de macrófagos y monocitos, luego llegan los linfocitos al sitio de la infección para formar una estructura celular altamente organizada denominada granuloma, el cual ayuda a detener el progreso de infección a enfermedad y es una lesión característica de TBP (3,7,8). El granuloma está conformado básicamente por macrófagos y linfocitos, los macrófagos se diferencian en varios tipos celulares especializados como las células gigantes multinucleadas, macrófagos espumosos (*foamy*) y macrófagos epiteloideos. Todas estas células rodean un centro necrótico caseoso característico de los granulomas. (Figura 1)

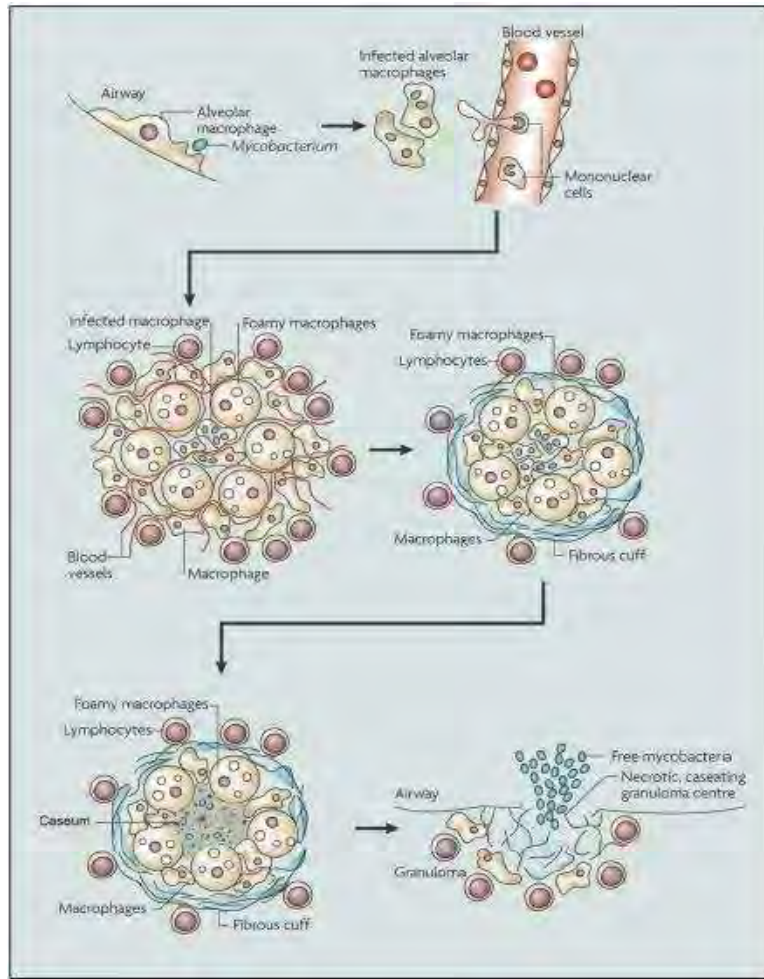


Figura 1. Participación celular para la formación del granuloma. Tomado directamente de Science. 2010;328(5980):852-6.

La participación de las células fagocíticas como macrófagos y células dendríticas para controlar el crecimiento de Mtb ha sido claro. Sin embargo, la participación de los linfocitos no fue apreciado hasta 1975 cuando se documentó que éstos eran necesarios para proporcionar inmunidad frente a Mtb (9). Actualmente se conoce que el macrófago o la célula dendrítica que fagocita al bacilo migra hacia los ganglios linfáticos para activar a los linfocitos T y generar células efectoras.

Posteriormente, los linfocitos T efectores salen a circulación y migran al sitio de la infección para proveer de una eficiente protección (10). (Figura 2)

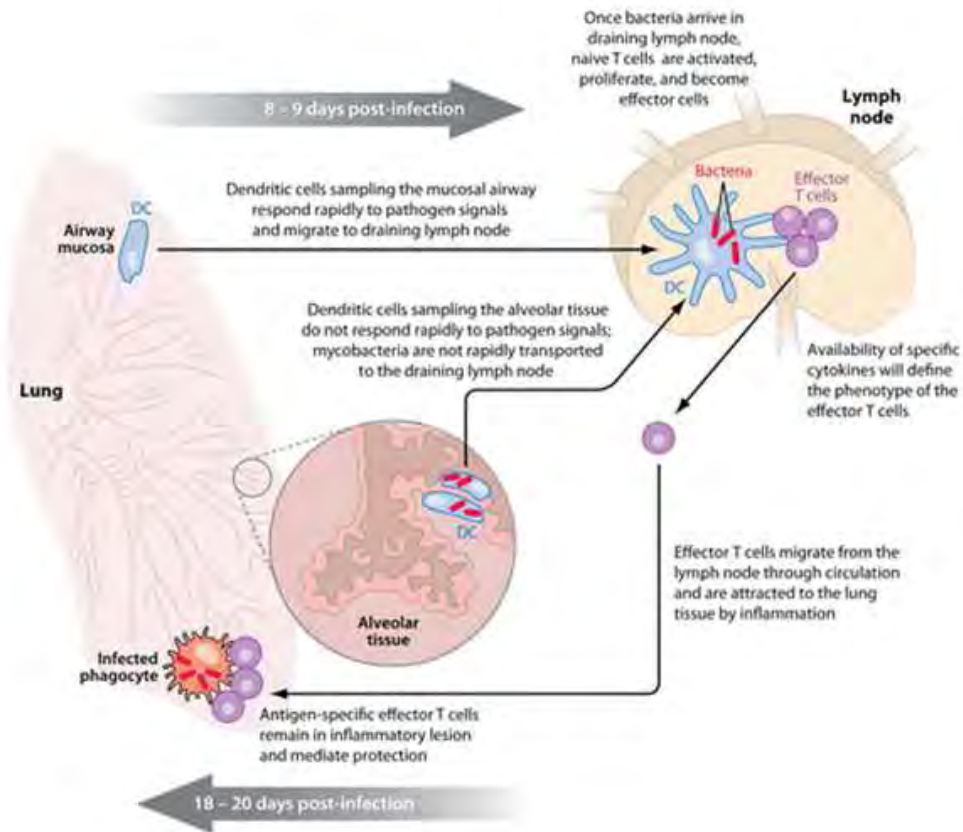


Figura 2. Participación de linfocitos T en la respuesta inmune a Mtb. Tomado directamente de Annu Rev Immunol. 2009;27:393-422.

Los linfocitos  $T\alpha\beta$   $CD4+$  expresan en la superficie celular el correceptor  $CD4$  y el receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) con las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  además del  $CD3$ . Su función principal es secretar citocinas que regulan los procesos inmunitarios, su activación está restringida a la interacción de su TCR con un antígeno específico presentado a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) (11). Estos antígenos son de

naturaleza proteica y son degradados por el sistema fago-lisosoma (12). En TBP, la respuesta protectora está mediada por los linfocitos  $T\alpha\beta$   $CD4^+$  que secretan citocinas, principalmente de tipo Th1 como  $IFN-\gamma$ , IL-2,  $TNF-\alpha$  y  $TNF-\beta$ , lo que favorece la activación de otras poblaciones celulares (13,14). También existen reportes que indican que los linfocitos  $T\alpha\beta$   $CD4^+$  inducen muerte de células fagocíticas en respuesta a la infección por Mtb (15).

Otra población linfocitaria relevante en la inmunidad contra Mtb son los linfocitos  $T\alpha\beta$   $CD8^+$  (16,17), los cuales reconocen al antígeno mediante la interacción de su TCR con el péptido antigénico unido a las moléculas MHC de clase I (MHC-I) (18). El origen de los antígenos presentados por MHC-I es proteico y endógeno, son marcados por un proceso de ubiquitinación y degradados por el proteasoma (12). Aunque algunos reportes indican que esta población celular libera citocinas como  $IFN-\gamma$  y  $TNF-\alpha$  (14), su principal función consiste en lisar células infectadas, por lo que son denominados linfocitos citotóxicos. Generalmente este proceso ocurre por la liberación de gránulos líticos que tiene almacenados en su citoplasma y de manera menos frecuente ocurre por la interacción Fas/FasL (19). En los últimos años, se ha demostrado que existe un proceso denominado "Presentación cruzada", en donde antígenos de origen exógeno son presentados a través de moléculas MHC-I o CD1 y reconocidos por linfocitos  $T\alpha\beta$   $CD8^+$  (20-22).

Los linfocitos T cuyo TCR está conformado por cadenas  $\gamma\delta$  también son importantes en la respuesta inmune frente a Mtb (23, 24). Se ha encontrado que los linfocitos  $T\gamma\delta$  reconocen antígenos de origen no proteico como los glicolípidos y

los fosfolípidos que son presentados en el contexto de moléculas de la familia CD1 (25, 26). Se considera a los linfocitos T $\gamma\delta$  una población celular citotóxica, ya que almacena grandes cantidades de granulicina (27). Aparentemente esta función la realizan principalmente por la vía de secreción de gránulos (28, 29). A diferencia de los linfocitos T citotóxicos clásicos ( $\alpha\beta$  CD8+), la función citotóxica de los linfocitos T  $\gamma\delta$  al parecer está condicionada a la presencia de la molécula NKG2D, al menos en modelos de cáncer (30).

Diversos reportes muestran que los linfocitos T  $\gamma\delta$  son la principal fuente de IL-17 en infecciones por micobacteria (31, 32), lo que sugiere que estas células tienen una función importante para el proceso inflamatorio y la formación del granuloma (33). Por otro lado, se ha reportado que esta población celular es una importante fuente de IFN- $\gamma$  (34), citocina que entre otras funciones es necesaria para activar mecanismos bactericidas en el macrófago infectado (35).

## **1.2 Mtb inhibe la respuesta inmune**

A pesar que el sistema inmune del hospedero es eficiente para controlar la infección por Mtb no es suficiente para eliminar al patógeno (36). La bacteria ha desarrollado mecanismos que le han permitido su éxito de supervivencia en el humano, y establece una relación parasitaria que beneficia al bacilo.

*Mycobacterium tuberculosis* evade la respuesta inmune mediante diversos mecanismos, una revisión más detallada de estos mecanismos ha sido publicada en la Gaceta Médica de México (anexo al final del capítulo). Algunos de los puntos

más importantes sobre los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por Mtb se describen a continuación:

- i) **Mtb elimina a los Intermediarios Reactivos del Nitrógeno e Intermediarios Reactivos del Oxígeno:** En 1997 se reportó que el gen *noxR1* de Mtb le confiere resistencia contra los radicales libres por un mecanismo no esclarecido (37). Posteriormente, se describió que Mtb tiene el sistema de secreción SecA2, el cual libera a las enzimas superóxido dismutasa (SodA) y catalasa peroxidasa (KatG) (38), enzimas que se encargan de mantener el fagosoma sin radicales libres.
- ii) **Mtb inhibe la maduración del fagosoma:** Inicialmente se observó que la falta de acidificación en los fagosomas que contenían a la micobacteria se debía a una exclusión de la ATPasa vacuolar (39). Posteriormente, se demostró que el 90% de los fagosomas que contienen bacilos vivos retienen una proteína denominada TACO (Tryptophane aspartate-containing coat protein), sugiriendo que TACO es capaz de evitar la fusión fagolisosomal porque regula procesos de señalización dependientes de calcio (40,41). También fue descrito que el lipoarabinomanana (glicolípido de la pared de Mtb) inhibe la fusión fagolisosomal debido a que tiene la capacidad de modificar tamaño, peso y estructura de los dominios ricos en colesterol-esfingomielina (*Raft* lipídico) de las membranas fagosomales lo que impiden una fusión adecuada (42).

iii) **Mtb regula de manera negativa la expresión de moléculas MHC-II:**

Hmama Z y colaboradores informaron que los macrófagos infectados in-vitro con Mtb disminuyen la expresión de MHC-II probablemente por un defecto en el transporte endocítico (43). Posteriormente se demostró en modelo murino que las células dendríticas infectadas con Mtb no presentan disminución en la expresión de MHC-II, pero son ineficientes para activar a los linfocitos T CD4+ probablemente por una respuesta disminuida al IFN- $\gamma$  (44).

iv) **Mtb incrementa la muerte por necrosis y disminuye la apoptosis:**

Chen M y colaboradores demostraron que la cepa patógena H37Rv desencadena la formación de un poro que afecta tanto a membrana interna como externa de la mitocondria, lo que ocasiona pérdida del potencial de membrana y genera un gradiente de protones que altera la cadena respiratoria; y finalmente se incrementa la producción de aniones superóxido que ocasiona la muerte por necrosis (45). Otro mecanismo descrito mediante el cual las cepas patógenas, como H37Rv, favorecen la necrosis es inducir la sobre expresión de Mcl-1 (molécula anti-apoptótica de la familia bcl-2) así como la disminución en el RNAm para Fas (46,47).



# Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Mycobacterium tuberculosis*

Leslie Chávez-Galán,<sup>a</sup> María del Carmen Arenas-Del Ángel,<sup>a</sup> Isabel Sada-Ovalle<sup>a</sup> y Ricardo Lascurain<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México D.F., México

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 12 de diciembre de 2008

Aceptado: 15 de mayo de 2009

## RESUMEN

En la actualidad, la tuberculosis pulmonar es considerada un problema grave de salud mundial. Para entender el proceso infeccioso de la tuberculosis es necesario conocer las interacciones entre la respuesta inmune del hospedero y su agente causal. Actualmente se han realizado grandes avances en la identificación de nuevas moléculas y genes que participan activamente en los mecanismos de evasión, generando la posibilidad de que en un futuro próximo se diseñen diversos compuestos químicos para el desarrollo de vacunas o terapias que tengan como blanco estas moléculas o genes. Sin embargo, no se han esclarecido completamente los diversos mecanismos con que cuenta la micobacteria para evadir la respuesta inmune del hospedero. En esta revisión se discute la evidencia experimental reciente sobre los mecanismos propuestos para el éxito de la bacteria.

### Palabras clave:

*Mycobacterium tuberculosis*, evasión respuesta inmune, tuberculosis

## SUMMARY

Pulmonary tuberculosis is currently considered a serious health problem worldwide. To understand tuberculosis infection we need to know the interaction between the host's immune response and the microorganism causing tuberculosis. Ample research has been carried out to identify new molecules and genes involved in the evasion mechanism of the host's immune response. This knowledge has generated the possibility that future therapeutic schemes will be designed to fight these particular molecules or genes. We reviewed recent experimental evidence on the mechanisms that will successfully fight against mycobacteria.

### Key words:

*Mycobacterium tuberculosis*, avoid immune response, tuberculosis

## Introducción

El último informe de la Organización Mundial de la Salud indica que cada año hay 9.2 millones de casos nuevos de tuberculosis a nivel mundial.<sup>1</sup> Si se considera que solo 5 a 10 % llega a desarrollar la enfermedad, debe existir alrededor de 92 millones de individuos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) anualmente. En la mayoría de los casos el proceso infeccioso es controlado por el sistema inmune.<sup>2,3</sup>

*M. tuberculosis* es un patógeno intracelular que tiene la capacidad de sobrevivir y persistir dentro de las células fagocíticas mononucleadas del hospedero. Esto se debe en parte a que su pared celular es abundante en lípidos bioactivos que le confieren baja permeabilidad y algunos están relacionados con la patogénesis.<sup>4-6</sup> La primera interacción que tiene *M. tuberculosis* con el hospedero es con componentes

del sistema inmune innato, como macrófagos alveolares y células dendríticas (DC) a través de receptores como los tipo Toll (TLR). Estos receptores promueven la transcripción de genes que favorecen la secreción de citocinas y quimiocinas e inducen apoptosis, entre otras reacciones, con la finalidad de regular la respuesta inmune adaptativa.<sup>7-11</sup> La interacción entre *M. tuberculosis* y el sistema inmune innato inicia la respuesta inflamatoria local, que se caracteriza por un reclutamiento exagerado de células mieloides al pulmón.<sup>2</sup> Posteriormente, las bacterias viables se diseminan hacia los ganglios linfáticos regionales, donde los linfocitos T son activados vía MHC y se generan linfocitos T efectoros que también serán reclutados al pulmón.<sup>2-3,12</sup> En la respuesta inmune adaptativa las principales poblaciones celulares que intervienen son los linfocitos T CD4+, cuya función principal es secretar citocinas tipo Th1 (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL2) y los linfocitos T CD8+, que llevan a cabo su actividad citotóxica contra

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Ricardo Lascurain. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., México. Fax: (55) 5665 4623. Correo electrónico: rlascurain@yahoo.com.mx

células infectadas.<sup>3,12</sup> Existen otras subpoblaciones celulares que también participan en el control de la tuberculosis pulmonar pero en bajo porcentaje; un ejemplo de estas subpoblaciones son los linfocitos T  $\gamma\delta$  y los linfocitos NKT, que no presentan restricción a moléculas MHC para reconocer al antígeno.<sup>13,14</sup>

La participación de las diferentes poblaciones celulares en la respuesta inmune a *M. tuberculosis* ha sido ampliamente documentada. Sin embargo, la bacteria tiene gran capacidad para persistir de manera indefinida dentro de los macrófagos<sup>15</sup> gracias a una variedad de mecanismos que ha desarrollado para evadir la respuesta inmune del hospedero. Por tal motivo, en esta revisión se discutirán los más relevantes que *M. tuberculosis* utiliza para favorecer su vida intracelular por largos periodos.

### ***M. tuberculosis* inhibe a los intermediarios reactivos del nitrógeno e intermediarios reactivos del oxígeno**

Los macrófagos son considerados células altamente dinámicas que desempeñan un papel fundamental en la defensa del hospedero contra *M. tuberculosis*. Una vez que los macrófagos alveolares fagocitan a *M. tuberculosis* se inicia una serie de mecanismos bactericidas por parte del sistema inmune innato.<sup>2,12</sup> Uno de los más importantes se conoce como “estallido respiratorio”, cuyo objetivo es la eliminación de las bacterias fagocitadas.<sup>16</sup> El mecanismo requiere el adecuado ensamblaje y activación de la enzima NADPH oxidasa para producir anión superóxido ( $O_2^-$ )<sup>17</sup> y de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) para producir óxido nítrico (NO).<sup>18</sup> En 1997 se identificó el gen *noxR1* en *M. tuberculosis*, el cual codifica para la proteína NoxR1,<sup>19</sup> dicho gen solo se ha encontrado en cepas virulentas de *M. tuberculosis* y al parecer le confiere resistencia contra los radicales libres.

iNOS es una enzima cuya función en macrófagos es inducida por el estímulo de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Su función es favorecer la formación de NO<sup>18,20</sup> cuando es reclutada en los fagosomas. Sin embargo, evidencia experimental sugiere que los fagosomas donde se encuentra *M. tuberculosis* excluyen a iNOS.<sup>21</sup> Aparentemente la presencia de la enzima iNOS en el fagosoma es dependiente de una proteína llamada EBP50 (*Ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50*).<sup>22</sup> La función de EBP50 es mantener a las proteínas celulares ancladas a la actina del citoesqueleto. Sin embargo, los fagosomas que contienen a *M. tuberculosis* no retienen a EBP50 y en consecuencia se excluye a iNOS del fagosoma.<sup>22</sup>

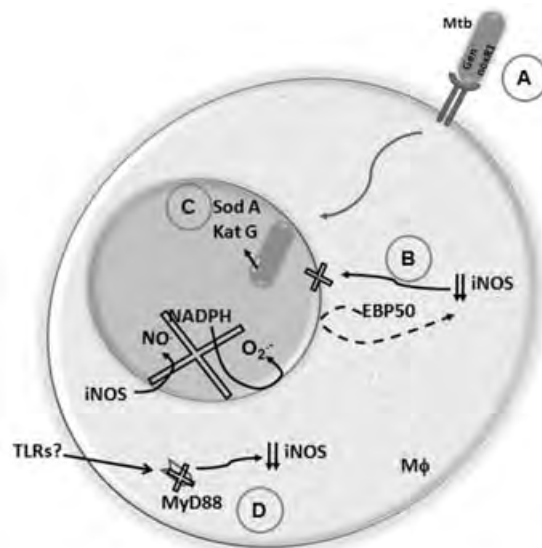
*M. tuberculosis* secreta proteínas con propiedades antigénicas a través de diversos sistemas de secreción como Sec, SecA2, ESX1.<sup>23,24</sup> Se ha descrito que el sistema SecA2 es importante para la liberación de las enzimas superóxido dismutasa (SodA) y catalasa peroxidasa (KatG).<sup>23</sup> La función de ambas enzimas es mantener el fagosoma sin radicales libres. Debido a que SodA actúa sobre  $O_2^-$  para convertirlo en  $H_2O_2$  y  $O_2$ ,  $H_2O_2$  inmediatamente es transformado en  $H_2O$  y  $O_2$  por la enzima KatG.<sup>23</sup> De esta manera, el ambiente intracelular

está exento de radicales libres, lo cual es benéfico para la sobrevivencia de la bacteria.<sup>23-25</sup>

Recientemente se describió que el sistema de secreción SecA2 también es un mecanismo importante que evita que el macrófago infectado produzca citocinas inflamatorias. Se ha observado que macrófagos infectados con la cepa H37Rv deficiente de *secA2* fueron capaces de controlar el crecimiento intracelular bacteriano, incrementando de manera considerable la producción de TNF $\alpha$  e IL6. Asimismo, aumentó la expresión de moléculas MHC-II e intermediarios reactivos del nitrógeno.<sup>26</sup> La disminución de iNOS también ha sido informada en ratones deficientes de *MyD88*<sup>-/-</sup>,<sup>27</sup> por lo que en este contexto es de interés evaluar la participación de otras vías de señalización como las dependientes de TLR (Figura 1).

### ***M. tuberculosis* inhibe la maduración del fagosoma**

La fagocitosis de *M. tuberculosis* es un proceso activo que depende de la interacción con diversos receptores de superficie expresados en las células presentadoras de antígeno, ejemplos de estos receptores son el receptor 3 de complemento (CR3), el receptor de manosa DC-SIGN y los receptores Fc.<sup>28-30</sup> Sin embargo, cada uno puede tener un efecto distinto en la sobrevivencia de *M. tuberculosis* una vez que se encuentre dentro del macrófago. Se ha propuesto que la fagocitosis de patógenos a través de receptores Fc induce el estallido respiratorio y favorece la respuesta inflamatoria en macrófagos, mientras que la fagocitosis dependiente de



**Figura 1.** *M. tuberculosis* inhibe la formación de radicales libres. A) El gen *noxR1* de micobacterias patógenas inhibe la formación de radicales libres. B) El fagosoma infectado no retiene EBP50 y en consecuencia iNOS no ingresa al fagosoma para realizar su función. C) El sistema de secreción SecA2 de *M. tuberculosis* libera las enzimas SodA y KatG, las cuales neutralizan el efecto de los radicales libres. D) La deficiencia de moléculas MyD88 afecta la expresión de iNOS aunque se desconoce si algún TLR participa en regular a iNOS.

CR3 evita la activación del macrófago.<sup>31</sup> Shilamada y colaboradores<sup>28</sup> informaron que el receptor de manosa puede inducir señales que inhiben la fusión fagolisosomal de una manera dependiente de glucosfolípidos. Por lo tanto, el receptor que utiliza *M. tuberculosis* para ingresar a la célula hospedera puede ser una estrategia benéfica que le ayuda a evadir su eliminación inmediata o a largo plazo.

Una vez que la bacteria se encuentra en el fagosoma se inicia un proceso de maduración cuya finalidad es la fusión del fagosoma con lisosomas. Los lisosomas contienen una gran cantidad de enzimas líticas que trabajan a pH de 4.5 a 5, lo que favorece un ambiente ácido idóneo para la degradación de las partículas fagocitadas.<sup>32</sup> No obstante, desde la década de 1990 se ha demostrado que *M. tuberculosis* tiene la capacidad de detener el proceso de maduración fagosomal permaneciendo en un estadio de fagosoma temprano.<sup>33</sup> Inicialmente se observó que la falta de acidificación en los fagosomas que contenían a la micobacteria se debía a una exclusión de la ATPasa vacuolar.<sup>34</sup> La falta de acidificación por exclusión de ATPasa vacuolar tiene efectos negativos porque la degradación y presentación de antígeno no es eficiente. En 2006, Singh y colaboradores<sup>35</sup> demostraron que la ATPasa vacuolar es necesaria para la degradación de antígenos de *M. tuberculosis*, como el antígeno de 85 kDa.

Otra estrategia propuesta como responsable de evitar la fusión fagosoma-lisosoma fue descrita por Ferrari y colaboradores,<sup>36</sup> quienes demostraron que cerca de 90 % de los fagosomas que contienen bacilos vivos retienen una proteína denominada TACO (*tryptophane aspartate-containing coat protein*, también llamada P57 o coronina 1). La función de TACO es mantener unida la membrana plasmática con el citoplasma celular para de esta manera integrar las señales recibidas de manera extracelular con el citoplasma.<sup>37</sup> Otra observación aportada por el grupo de Ferrari es que cuando el macrófago fagocita a *M. tuberculosis*, la proteína tubulina se disocia inmediatamente de TACO y es liberada hacia el citoplasma, mientras que TACO permanece retenida en el fagosoma. No es claro si TACO modifica la polimerización de la tubulina y en consecuencia se inhiben algunas funciones de movilidad en el citoesqueleto, o si TACO bloquea algún receptor importante para que se lleve a cabo la fusión. Otro posible mecanismo de acción de TACO en la infección por *M. tuberculosis* fue propuesto por Jayachandran y colaboradores;<sup>38</sup> ellos sugirieron que TACO es capaz de evitar la fusión fagolisosomal debido a que regula procesos de señalización dependientes de calcio. Así, una vez que el macrófago ha sido infectado ocurre un influjo normal de calcio, sin embargo, al estar TACO retenida en el fagosoma hay ausencia de ésta en el citoplasma, en consecuencia, en ausencia de esta molécula no hay actividad de la calcineurina, la cual es necesaria para la fusión fagolisosomal. En infecciones por *Mycobacterium leprae* se observó que la retención de TACO se asocia a productos de secreción de la micobacteria en el fagosoma y no por una interacción directa con la micobacteria,<sup>39</sup> por lo que sería interesante determinar si los productos de secreción de *M. tuberculosis* también son eficientes para retener a TACO. Se ha propuesto que TACO permanece retenida en el fagosoma debido a que las mico-

bacterias patógenas liberan una enzima llamada LpdC (*lipamide dehydrogenase C*), la cual se une a TACO mediante interacciones dependientes de colesterol e IFN $\gamma$ .<sup>40</sup>

Otras proteínas del macrófago son las llamadas Rab, las cuales son GTPasas de bajo peso molecular que forman parte de la superfamilia de las proteínas Ras y están relacionadas en el proceso de fusión de membranas y transporte vesicular.<sup>41</sup> Estas proteínas se han identificado como marcadores importantes de la maduración fagosomal, por ejemplo: Rab5 se encuentra en fagosomas tempranos, mientras que Rab7 en fagosomas tardíos.<sup>42,43</sup> Sun y colaboradores publicaron que la micobacteria secreta un factor que inactiva la interacción de Rab7 con RILP (*Rab7-interacting lysosomal protein*), unión necesaria para que ocurra la fusión con los lisosomas.<sup>44</sup> También existe evidencia experimental que sugiere que Rab14 es reclutada y mantenida por largos periodos en los fagosomas que contienen *M. tuberculosis*; al parecer la bacteria inhabilita a Rab14 para que promueva la interacción fagosoma-lisosoma.<sup>45</sup>

Recientemente, Master y colaboradores describieron que *M. tuberculosis* expresa un gen denominado *zmp1*, el cual codifica para la metaloproteasa Zn(z+), cuya función es evitar el procesamiento de la IL1 $\beta$  que promueve un efecto negativo para la activación del inflamosoma y esto a su vez retarda la maduración fagosomal.<sup>46</sup> Sin embargo, Makino y colaboradores<sup>47</sup> demostraron *in vitro* que cuando los monocitos precursores de DC son incubados con IL1 $\beta$ , la DC es ineficiente para estimular linfocitos T. Por lo que la función de la IL1 $\beta$  en el contexto de la tuberculosis pulmonar no es concluyente.

Por otra parte, algunos glucolípidos de la pared micobacteriana pueden interactuar con diversos receptores en la célula hospedera, importantes para iniciar la respuesta inmune. Por ejemplo, los TLR pueden iniciar señales significativas de activación en la célula.<sup>11</sup> Posterior a la interacción TLR/ligando se inducen señales de activación celular en donde participa la vía de las MAPK cinasas. No obstante la activación de esta vía, puede interferir con la fusión del fagosoma porque la vía de las MAPK cinasas converge con la vía de las moléculas EEA1 (*early endosome autoantigen 1*) y Rab5, deteniendo el proceso de maduración fagosomal.<sup>48</sup> Al respecto, Jung y colaboradores informaron que cuando se activa la vía de las MAPK como consecuencia de la interacción de las glucoproteínas de 38 kDa de *M. tuberculosis* con TLR2 o TLR4, se favorece la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL6.<sup>49</sup> De manera más reciente, Souza y colaboradores demostraron que la acidificación fagosomal es parcialmente dependiente de TLR2; la evidencia experimental sugiere que el bloqueo de este receptor incrementa la acidificación de los fagosomas.<sup>50</sup>

Las citocinas también ejercen un efecto importante sobre el transporte endocítico; se ha señalado que la citocina IL6 induce la expresión de Rab5, lo que estimula compartimentos en etapas tempranas.<sup>51</sup> Sobre esta misma citocina previamente se informó que cuando es secretada por macrófagos infectados, tiene la capacidad de inducir una respuesta subóptima al IFN $\gamma$  en macrófagos no infectados.<sup>52</sup>

Además de las funciones que se modifican en el macrófago a consecuencia de la infección por *M. tuberculosis*, se



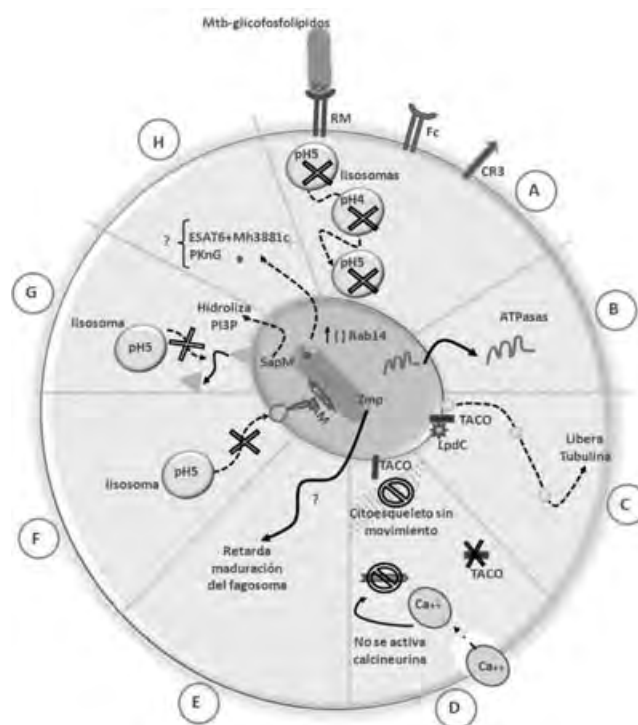
han estudiado componentes de la micobacteria que pueden ser responsables de la inhibición de la fusión fagolisosomal. Por ejemplo, lipoarabinomanana (LAM) es un glucolípidos de membrana secretado dentro del fagosoma que contiene a la bacteria.<sup>53</sup> Se ha propuesto que LAM inhibe la fusión fagolisosomal debido a que tiene la capacidad de modificar tamaño, peso y estructura de los dominios "raft" ricos en colesterol-esfingomielina de las membranas fagosomales; estas modificaciones impiden una fusión adecuada,<sup>54</sup> aunque falta definir si estos raft "modificados" están involucrados para retener a la proteína TACO en el fagosoma. Existen informes donde células suprimidas de colesterol disminuyen su capacidad de fagocitosis pero promueven una adecuada fusión fagolisosomal.<sup>55,56</sup> Por otra parte, la molécula fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3-P) es un lípido que se genera de manera local en las membranas fagosomales y es el sitio de anclaje de proteínas como EEA1 y Hrs (*early endosome antigen 1* y *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*, respectivamente), las cuales están involucradas en el proceso de maduración fagosomal,<sup>57,58</sup> siendo necesaria la presencia de PI3-P en el fagosoma para promover la fusión fagolisosomal. En este sentido, Vergne y colaboradores demostraron que *M. tuberculosis* secreta al citosol la fosfatasa lipídica SapM, la cual hidroliza al PI3-P, lo que promueve que continuamente PI3-P se esté eliminando de los fagosomas que contienen a la micobacteria, y en consecuencia no hay anclaje de las proteínas mencionadas para formar el fagolisosoma.<sup>59</sup> Este mecanismo de exclusión de PI3-P puede ser mediado principalmente por LAM.<sup>60</sup> La proteína PknG (*eukaryotic-like serine/threonine protein kinase G*) de *M. tuberculosis* también es secretada dentro del fagosoma y participa en la inhibición de la fusión fagolisosomal por un mecanismo poco claro.<sup>61</sup> No obstante, Majlessi y colaboradores corroboran que la proteína PknG participa en la inhibición fagolisosomal sin afectar la presentación antigénica restringida al MHC-II.<sup>62</sup>

MacGurn y colaboradores demuestran que las micobacterias deficientes del sistema de secreción ESX-1 son menos eficientes para sobrevivir dentro del macrófago y observaron que hay una fusión fagolisosomal efectiva, por lo que proponen que las proteínas liberadas por el sistema ESX-1 inhiben dicha maduración.<sup>63</sup> Xu y colaboradores<sup>64</sup> demuestran que a través del sistema de secreción ESX-1 en *M. marinum* se liberan cuatro proteínas: CFP10, ESAT6, MM1553 y Mh3881c, esta última es homóloga de Rv3881c en *M. tuberculosis*. Los autores señalan que la porción c-terminal de la proteína Mh3881c es requerida para que sea secretada ESAT6 y participe en la inhibición de la fusión fagolisosomal<sup>63,64</sup> (Figura 2).

## Regulación negativa de moléculas MHC-II

Los linfocitos T CD4+ son una población celular ampliamente estudiada en tuberculosis pulmonar; reconocen antígenos peptídicos presentados por moléculas MHC clase II y posteriormente secretan citocinas tipo Th1 como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL2,<sup>65,66</sup> promoviendo la activación y proliferación de macró-

fagos y otras poblaciones linfocitarias. Hmama y colaboradores informaron que los macrófagos infectados *in vitro* con *M. tuberculosis* disminuyen la expresión de MHC-II probablemente por un defecto en el transporte endocítico.<sup>67</sup> Posteriormente, Sánchez y colaboradores observaron que monocitos de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar también tienen una expresión disminuida de MHC-II, específicamente la isoforma DR, aunque los niveles óptimos fueron recuperados después de iniciado el tratamiento antituberculoso.<sup>68</sup> La disminución en la expresión de MHC-II disminuye la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4+, en consecuencia hay menor activación celular, producción de citocinas y reducción de los mecanismos micobactericidas, favoreciendo la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos infectados. Se ha informado que los linfocitos



**Figura 2.** Inhibición del proceso de maduración fagolisosomal. A) *M. tuberculosis* favorece una fagocitosis mediada por receptor de manosa (MR) y este receptor puede evitar la fusión fagolisosomal. B) Los fagosomas infectados excluyen ATPasas, lo que evita una acidificación. C) La proteína TACO permanece retenida en el fagosoma, al parecer por la proteína LpdC, lo que promueve liberación de tubulina y un probable movimiento ineficiente del citoesqueleto. D) TACO regula los movimientos del citoesqueleto dependientes de calcio, pero al estar retenida en el fagosoma no ocurren estos movimientos. E) El gen *zmp* de *M. tuberculosis* puede inducir un retraso en la maduración fagosomal. F) LAM induce una modificación en los lípidos de la membrana fagosomal y en consecuencia no hay fusión con los lisosomas. G) SapM hidroliza a PI3-P, liberándose de la membrana fagosomal y, por lo tanto, no hay sitio de anclaje para moléculas que participan en la fusión fagolisosomal. H) ESAT6 requiere la porción c-terminal de Mh3881c para poder inhibir la fusión fagolisosomal. También es liberada la proteína PknG pero se desconoce su función.

T CD4+ de pacientes con tuberculosis pulmonar que son activados por el complejo HLA-DR2/péptido-*M. tuberculosis*, regulan de manera negativa la activación de células citotóxicas, dichos linfocitos TCD4+ reducen la producción de IFN $\gamma$  e IL12,<sup>69</sup> aunque se requiere mayor evidencia experimental para determinar el papel de la isoforma DR2 en la infección por *M. tuberculosis*.

En el modelo murino se ha descrito que después de la infección *in vitro* por *M. tuberculosis* las DC no disminuyen la expresión de MHC-II, pero al igual que los macrófagos infectados son ineficientes para activar a los linfocitos T CD4+ probablemente por una respuesta disminuida al IFN $\gamma$ .<sup>70</sup> Diversa evidencia experimental demuestra que la vía de señalización dependiente de TLR2 es importante para que se responda de manera deficiente al IFN $\gamma$ .<sup>71-73</sup> Se ha descrito que algunos antígenos de *M. tuberculosis* pueden interactuar con TLR2, entre éstos las lipoproteínas LpqH (19 kDa) y LprG.<sup>74,75</sup> De manera más reciente se aisló una tercera proteína denominada LprA, cuya función no es completamente clara debido a que al estar en co-cultivo con células dendríticas promueve un incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, pero cuando LprA se pone en contacto con macrófagos induce disminución en la expresión de moléculas MHC-II y en consecuencia hay menor presentación de antígeno.<sup>76</sup> Aunque la disminución de moléculas MHC-II es un mecanismo de defensa que utiliza *M. tuberculosis* para sobrevivir y modificar la respuesta inmune, no es completamente

clara la participación de los diferentes antígenos de *M. tuberculosis* y su impacto en la expresión de MHC-II (Figura 3).

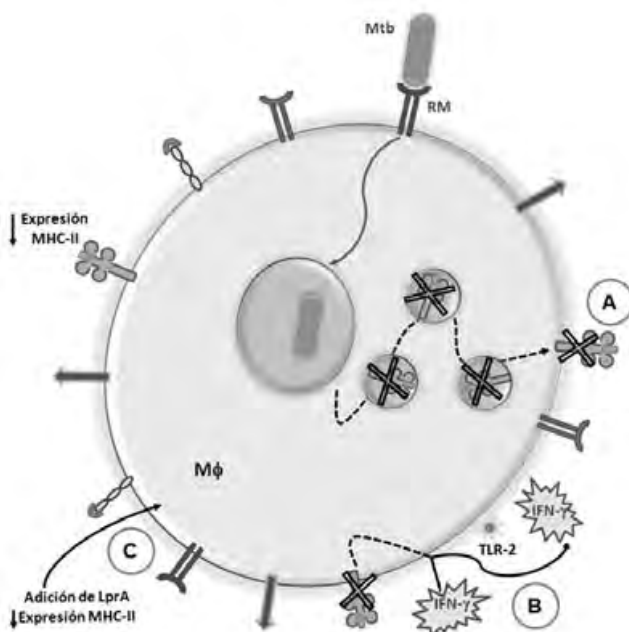
## Necrosis versus apoptosis

Uno de los mecanismos que utiliza el hospedero para defenderse de *M. tuberculosis* es la muerte celular por apoptosis,<sup>77,78</sup> la cual puede ser desencadenada por dos vías distintas: la intrínseca (dependiente de daño mitocondrial) o la extrínseca (dependiente de receptores de muerte). La apoptosis depende de la activación de una cascada de proteínas llamadas caspasas, las cuales mediante una serie de procesos enzimáticos degradan el ADN e inducen la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por otras células para evitar que se libere el contenido intracelular. Otro tipo de muerte celular es por necrosis, proceso que ocurre en menos tiempo y permite que el contenido intracelular se libere debido a que la célula "estalla".<sup>79</sup> En la infección por *M. tuberculosis* está ampliamente documentado que las cepas patógenas evaden frecuentemente la apoptosis con la finalidad de disminuir la presentación antigénica y favorecen la necrosis para facilitar la infección de nuevas células.<sup>80-82</sup>

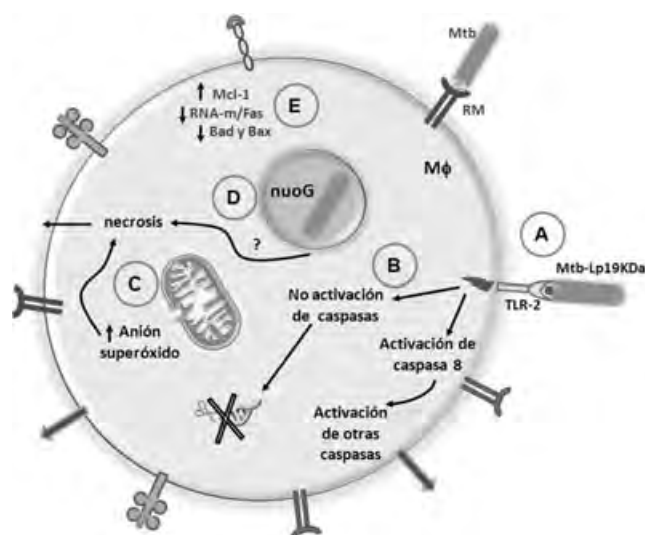
Existen informes de antígenos de *M. tuberculosis* que tienen la capacidad de inducir apoptosis, por ejemplo, López y colaboradores informaron que la porción proteica de la lipoproteína de 19 kDa induce apoptosis en células fagocíticas por un mecanismo que depende de la interacción con TLR2 y de la participación de la caspasa-8, pero no de la caspasa-9.<sup>83</sup> A diferencia de este informe, Lee y colaboradores describieron una apoptosis independiente de caspasas y al parecer dependiente de proteasas lisosomales, que puede observarse cuando infectan macrófagos murinos con alto MOI (*multiplicities of infection*).<sup>84</sup> Al respecto, O'Sullivan y colaboradores coinciden en que altos MOI de infección promueven una apoptosis independiente de caspasas pero no la apoptosis clásica, ya que carece de características fundamentales de este proceso, por ejemplo, no ocurre la fragmentación nuclear.<sup>85</sup>

Un mecanismo asociado a mayor necrosis de macrófagos infectados fue descrito por Chen M y colaboradores, quienes demuestran que la cepa patógena H37Rv promueve la formación de un poro mitocondrial que afecta a la membrana interna y externa de la mitocondria, lo que ocasiona pérdida del potencial de membrana y en consecuencia se genera un gradiente de protones que altera la cadena respiratoria, esto aumenta la producción de anión superóxido y, finalmente, la muerte por necrosis.<sup>86</sup> Park JS y colaboradores concluyeron que las células fagocíticas infectadas con cepas clínicas virulentas morían en su mayoría por necrosis.<sup>87</sup>

Otras tácticas que utiliza *M. tuberculosis* para inhibir el proceso apoptótico han sido analizadas a través del estudio de ciertos genes. En 2007 se identificó el gen *nuoG* que solo está presente en las cepas patógenas de *M. tuberculosis*, el cual al parecer le confiere la propiedad de evadir la apoptosis en macrófagos infectados.<sup>88</sup> El mecanismo de evasión puede estar asociado a la sobreexpresión de la molé-



**Figura 3.** Regulación negativa de la expresión de moléculas MHC-II. A) *M. tuberculosis* puede afectar el transporte endocítico de moléculas MHC-II. B) Los antígenos de la micobacteria al interactuar con TLR2 promueven una respuesta disminuida al IFN $\gamma$ , lo que causa la disminución de MHC-II. C) En el macrófago LprA induce una disminución en la expresión de MHC-II. MR = receptor de manosa. MHC-II = moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II.



**Figura 4.** Necrosis versus apoptosis en infección por *M. tuberculosis*. A) Al interactuar TLR2 con la lipoproteína de 19 kDa induce muerte celular a través de caspasa-8. B) También se ha observado muerte independiente de caspasas sin fragmentación de ADN. C) *M. tuberculosis* puede dañar la capa externa e interna de la mitocondria, lo que favorece la pérdida del potencial de membrana, aumento de anión superóxido y finalmente necrosis. D) El gen *nuoG* favorece la necrosis por un mecanismo no esclarecido. E) También hay aumento de la molécula antiapoptótica Mcl-1 y disminución de RNAm para Fas y moléculas Bax y Bad, lo cual favorece la inhibición de la apoptosis.

cula antiapoptótica Mcl-1, cuya función es promover la integridad de la membrana mitocondrial. Parece que solo las cepas patógenas como H37Rv son capaces de inducir la sobreexpresión de Mcl-1.<sup>89</sup> Asociado al incremento en la expresión de Mcl-1 se ha encontrado que hay disminución en el RNAm para Fas, proceso que favorece la proliferación bacteriana intracelular.<sup>90</sup> En diversos modelos de infección con *M. leprae* se ha descrito que aunado al incremento de Mcl-1, la bacteria es capaz de inducir disminución de las moléculas proapoptóticas Bad y Bax,<sup>91</sup> siendo necesario realizar una caracterización completa de las diferentes moléculas involucradas en un proceso de apoptosis durante la infección por *M. tuberculosis*, lo cual puede facilitar el desarrollo de futuros blancos terapéuticos para inducir apoptosis, evitar la muerte por necrosis y un mejor control en la replicación de *M. tuberculosis* (Figura 4).

## Conclusiones

*M. tuberculosis* es un patógeno intracelular cuyo éxito de sobrevivencia consiste en su gran capacidad para evadir la respuesta inmune de su hospedero. En este sentido se han descrito vías de secreción en la micobacteria que liberan enzimas que neutralizan los radicales libres. Este efecto puede también ser mediado por el gen *noxR1*. El proceso de

inhibición de la fusión fagolisosomal es otro mecanismo por el que la micobacteria permanece en el macrófago, y puede ser consecuencia de proteínas del microambiente intracelular como TACO, EBP50 o PI3-P, o extracelulares como L6, o incluso por efecto de genes propios de la bacteria como *zmp1*. Otra estrategia eficiente para *M. tuberculosis* es inducir disminución en la expresión de moléculas MHC-II, ya que de esta manera evita la activación de poblaciones celulares e induce que su célula hospedero tenga una respuesta disminuida a IFN o mediante un transporte endocítico ineficiente. Finalmente, aunque existen informes respecto a que en la infección por *M. tuberculosis* se promueve la muerte por necrosis mediante daño mitocondrial, al parecer esto le da ventaja para infectar nuevas células vecinas, así también se informan procesos de apoptosis que no presentan características propias de este tipo de muerte.

## Referencias

1. World Health Organization. Global TB control report 2008. Geneva, Switzerland: WHO; 2008.
2. Martino A. Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity. *J Biosci* 2008;33:137-144.
3. Stenger S. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis* 2005;64:iv24- iv28.
4. Brown AK, Bhatt A, Singh A, Salaria E, Evans AF, Besra GS. Identification of the dehydratase component of the mycobacterial mycolic acid-synthesizing fatty acid synthase-II complex. *Microbiology* 2007;153:4166-4173.
5. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-544.
6. Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, et al. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:5157-5162.
7. Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J Biol Chem* 2005;280:20961-20967.
8. Pompei L, Jang S, Zamylyny B, Ravikumar S, McBride A, Hickman SP, et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol* 2007;178:5192-5199.
9. Puissegur MP, Lay G, Gilleron M, Botella L, Nigou J, Marrakchi H, et al. Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and beta integrin-mediated pathway. *J Immunol* 2007;178:3161-3169.
10. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggest S, Devaux B, Radolf JD, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999;285:736-739.
11. 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;285:732-736.
12. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol* 2007;5:39-47.
13. Huang D, Shen Y, Qiu L, Chen CY, Shen L, Estep J, et al. Immune distribution and localization of phosphoantigen-specific Vγ2Vδ2 T cells in lymphoid and nonlymphoid tissues in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2008;76:426-436.
14. Kulpraneet M, Sukwit S, Sumransurp K, Chuenchitra T, Santiwatanakul S, Srisurapanon S. Cytokine production in NK and NKT cells from *Mycobacterium tuberculosis* infected patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38:370-375.
15. Hernández-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, Orozco H, Harboe M, et al. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 2000;356:2133-2138.
16. Iles KE, Forman HJ. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res* 2002;26:95-105.
17. Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Donald LJ, Duckworth HW, Carpene X, et al. Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *J Biol Chem* 2004;279:43098-43106.



18. **MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF.** Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5243-5248.
19. **Ehrt S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M, Gunzburg S, Nathan C, et al.** A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997;186:1885-1896.
20. **Lin QY, Jin LJ, Cao ZH, Xu YP.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase by *Acanthopanax senticosus* extract in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2008;118:231-236.
21. **Miller BH, Fratti RA, Poschet JF, Timmins GS, Master SS, Burgos M, et al.** *Mycobacteria* inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect Immun* 2004;72:2872-2878.
22. **Davis AS, Vergne I, Master SS, Kyei GB, Chua J, Deretic V.** Mechanism of Inducible Nitric Oxide Synthase Exclusion from *Mycobacterial* Phagosomes. *PLoS Pathog* 2007;3:e186.
23. **Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR Jr.** SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2003;48:453-464.
24. **McLaughlin B, Chon JS, MacGurn JA, Carlsson F, Cheng TL, Cox JS, et al.** A *Mycobacterium* ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. *PLoS Pathog* 2007;3:e105.
25. **Ng VH, Cox JS, Sousa AO, MacMicking JD, McKinney JD.** Role of KatG catalase-peroxidase in *Mycobacterial* pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol* 2004;52:1291-1302.
26. **Kurtz S, McKinnon KP, Runge MS, Ting JP, Braunstein M.** The SecA2 secretion factor of *Mycobacterium tuberculosis* promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response. *Infect Immun* 2006;74:6855-6864.
27. **Scanga CA, Bafica A, Feng CG, Cheever AW, Hiemy S, Sher A.** MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun* 2004;72:2400-2404.
28. **Shimada K, Takimoto H, Yano I, Kumazawa Y.** Involvement of mannose receptor in glycopeptidolipid-mediated inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Microbiol Immunol* 2006;50:243-251.
29. **Le Cabec V, Carréno S, Moisan D, Bordier C, Maridonneau-Parini I.** Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *J Immunol* 2002;169:2003-2009.
30. **Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, et al.** DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197:121-127.
31. **Caron E, Hall A.** Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 1998;282:1717-1721.
32. **Harrison RE, Bucci C, Vieira OV, Schroer TA, Grinstein S.** Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 2003;23:6494-6506.
33. **Clemens DL, Horwitz MA.** Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 1995;181:257-270.
34. **Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, et al.** Lack of acidification in *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994;263(5147):678-681.
35. **Singh CR, Moulton RA, Armitage LY, Bidani A, Snuggs M, Dhandayuthapani S, et al.** Processing and presentation of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B epitope by murine macrophages is dependent on the phagosomal acquisition of vacuolar proton ATPase and in situ activation of cathepsin D. *J Immunol* 2006;177:3250-3259.
36. **Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J.** A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of *Mycobacteria*. *Cell* 1999;97:435-447.
37. **Gatfield J, Albrecht I, Zanolari B, Steinmetz MO, Pieters J.** Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled-coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. *Mol Biol Cell* 2005;16:2786-2798.
38. **Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, et al.** Survival of *Mycobacteria* in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 2007;130:37-50.
39. **Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M.** Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem* 2006;39:107-112.
40. **Dehmane AE, Soualhine H, Bach H, Sendide K, Itoh S, Tam A, et al.** Lipoamide dehydrogenase mediates retention of coronin-1 on BCG vacuoles, leading to arrest in phagosome maturation. *J Cell Sci* 2007;120:2796-806.
41. **Wickner W, Schekman R.** Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:658-664.
42. **Vieira OV, Bucci C, Harrison RE, Trimble WS, Lanzetti L, Gruenberg J, et al.** Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 2003;23:2501-2514.
43. **Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflacker B, et al.** The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 1992;70:715-728.
44. **Sun J, Deghmane AE, Soualhine H, Hong T, Bucci C, Solodkin A, et al.** *Mycobacterium bovis* BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation. *J Leukoc Biol* 2007;82:1437-1445.
45. **Kyei GB, Vergne I, Chua J, Roberts E, Harris J, Junutula JR, et al.** Rab14 is critical for maintenance of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *EMBO J* 2006;25:5250-5259.
46. **Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, et al.** *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* 2008;3:224-232.
47. **Makino M, Maeda Y, Mukai T, Kaufmann SH.** Impaired maturation and function of dendritic cells by *Mycobacteria* through IL-1beta. *Eur J Immunol* 2006;36:1443-1452.
48. **Fratti RA, Chua J, Deretic V.** Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes. *J Biol Chem* 2003;278:46961-46967.
49. **Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, Son JW, et al.** The *Mycobacterium tuberculosis* 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infect Immun* 2006;74:2686-2696.
50. **Souza CD, Evanson OA, Weiss DJ.** Role of cell membrane receptors in the suppression of monocyte anti-microbial activity against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb Pathog* 2008;44:215-223.
51. **Bhattacharya M, Ojha N, Solanki S, Mukhopadhyay CK, Madan R, Patel N, et al.** IL-6 and IL-12 specifically regulate the expression of Rab5 and Rab7 via distinct signaling pathways. *EMBO J* 2006;25:2878-2888.
52. **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. *J Immunol* 2003;171:4750-4757.
53. **Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL.** *Mycobacterial* lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun* 1988;56:1232-1236.
54. **Hayakawa E, Tokumasu F, Nardone GA, Jin AJ, Hackley VA, Dvorak JA.** A *Mycobacterium tuberculosis*-derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains. *Biophys J* 2007;93:4018-4030.
55. **De Chastellier C, Thilo L.** Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable *Mycobacteria* in phagolysosome-derived autophagic vacuoles. *Cell Microbiol* 2006;8:242-256.
56. **Kaul D, Anand PK, Verma I.** Cholesterol-sensor initiates *M. tuberculosis* entry into human macrophages. *Mol Cell Biochem* 2004;258:219-222.
57. **Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H.** Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J* 2001;20:5008-5021.
58. **Patki V, Virbasius J, Lane WS, Toh BH, Shpetner HS, Corvera S.** Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7326-7330.
59. **Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V.** Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4033-4038.
60. **Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V.** *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5437-5442.
61. **Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, et al.** Protein kinase G from pathogenic *Mycobacteria* promotes survival within macrophages. *Science* 2004;304:1800-1804.
62. **Majlessi L, Combaluzier B, Albrecht I, Garcia JE, Nouze C, Pieters J, et al.** Inhibition of phagosome maturation by *Mycobacteria* does not interfere with presentation of *Mycobacterial* antigens by MHC molecules. *J Immunol* 2007;179:1825-1833.
63. **MacGurn JA, Cox JS.** A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infect Immun* 2007;75:2668-2678.
64. **Xu J, Laine O, Masciocchi M, Manoranjan J, Smith J, Du SJ, et al.** A unique *Mycobacterium* ESX-1 protein co-secreted with CFP-10/ESAT-6 and is necessary for inhibiting phagosome maturation. *Mol Microbiol* 2007;66:787-800.
65. **Antas PR, Sales JS, Pereira KC, Oliveira EB, Cunha KS, Sarno EN, et al.** Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with *Mycobacterial* infections. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1119-1129.
66. **Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, et al.** Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 2007;178:5217-5226.
67. **Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies AR, de Jong G, Reiner NE.** Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J Immunol* 1998;161:4882-4893.
68. **Sánchez MD, García Y, Montes C, París SC, Rojas M, Barrera LF, et al.** Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. *Microbes Infect* 2006;8:2492-2500.

69. **Rajeswari DN, Selvaraj P, Raghavan S, Jawahar MS, Narayanan PR.** Influence of HLA-DR2 on perforin-positive cells in pulmonary tuberculosis. *Int J Immunogenet* 2007;34:379-384.
70. **Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Núñez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, et al.** Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol* 2007;179:2509-2519.
71. **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. *J Immunol* 2007;179:3187-3195.
72. **Lafuse WP, Álvarez GR, Curry HM, Zwilling BS.** Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium inhibit IFN- $\gamma$ -induced gene expression by TLR2-dependent and independent pathways. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:548-561.
73. **Fortune SM, Solache A, Jaeger A, Hill PJ, Belisle JT, Bloom BR, et al.** Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage responses to IFN- $\gamma$  through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2004;172:6272-6280.
74. **Banaiee N, Kincaid EZ, Buchwald U, Jacobs WR Jr, Ernst JD.** Potent inhibition of macrophage responses to IFN- $\gamma$  by live virulent Mycobacterium tuberculosis is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J Immunol* 2006;176:3019-3027.
75. **Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH.** Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 2004;173:2660-2668.
76. **Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV.** Mycobacterium tuberculosis LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol* 2006;177:422-429.
77. **Placido R, Mancino G, Amendola A, Mariani F, Vendetti S, Piacentini M, et al.** Apoptosis of human monocytes/macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection. *J Pathol* 1997;181:31-38.
78. **Danelishvili L, McGarvey J, Li YJ, Bermúdez LE.** Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol* 2003;5:649-660.
79. **Edinger AL, Thompson CB.** Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:663-669.
80. **Keane J, Remold HG, Kornfeld H.** Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 2000;164:2016-2020.
81. **Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, et al.** Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 2003;9:1039-1046.
82. **Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, et al.** Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 2006;24:105-117.
83. **López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE.** The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol* 2003;170:2409-2416.
84. **Lee J, Remold HG, leong MH, Kornfeld H.** Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of Mycobacterium tuberculosis is mediated by a novel caspase-independent pathway. *J Immunol* 2006;176:4267-4274.
85. **O'Sullivan MP, O'Leary S, Kelly DM, Keane J.** A caspase-independent pathway mediates macrophage cell death in response to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun* 2007;75:1984-1993.
86. **Chen M, Gan H, Remold HG.** A mechanism of virulence: virulent Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J Immunol* 2006;176:3707-3716.
87. **Park JS, Tamayo MH, González-Juarrero M, Orme IM, Ordway DJ.** Virulent clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 2006;79:80-86.
88. **Velmurugan K, Chen B, Miller JL, Azogue S, Gurses S, Hsu T, et al.** Mycobacterium tuberculosis nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog* 2007;3:e110.
89. **Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, McMaster WR.** Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* 2003;170:430-437.
90. **Zhang J, Jiang R, Takayama H, Tanaka Y.** Survival of virulent Mycobacterium tuberculosis involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. *Microbiol Immunol* 2005;49:845-852.
91. **Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R.** M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of bad and bak and upregulation of Mcl-1 gene expression. *BMC Microbiol* 2006;6:78.



## Capítulo 2. LINFOCITOS T CITOTÓXICOS EN TUBERCULOSIS

### 2.1 Antecedentes

La citotoxicidad es un proceso fundamental para mantener la homeostasis en el organismo; mediante esta función se eliminan células dañadas o infectadas (48). Cuando los linfocitos T citotóxicos (linfocitos T CD8+ $\alpha\beta$ +) interactúan con antígenos presentados por la célula blanco a través de las moléculas MHC-I, se activan y liberan el contenido de sus gránulos líticos; los cuales contienen proteínas como perforina, granzimas y granulicina. La granulicina es importante en el control de infecciones micobacteriales (49), es miembro de la familia de las proteínas parecidas a las saposinas, formar poros en la membrana por sus interacciones electrostáticas con los lípidos (50). La perforina polimeriza en la membrana celular para formar poros que funcionan como un conductor pasivo de Granzimas (51). Sin embargo existe controversia en cuanto a la formación exacta del poro de perforina tal y como fue discutido en una revisión previa (anexo artículo al final del capítulo). Las Granzimas son proteínas de la familia de proteasas de serina, las más abundantes dentro del gránulo lítico son la Granzima-A que induce apoptosis independiente de caspasas pero dependiente de un complejo denominado SET, el cual se transloca del retículo endoplásmico al núcleo, mientras que la Granzima-B induce apoptosis dependiente de caspasas y daño mitocondrial (52-54). Los gránulos líticos están rodeados por una bicapa lipídica que expresa glicoproteínas de membrana asociadas a lisosomas como CD107a, CD107b y CD63, por lo que la expresión de estas moléculas se utiliza como marcador de la degranulación (55).

La vía dependiente de la interacción Fas-FasL consiste en la unión de FasL, presente en la membrana del linfocito citotóxico, con su receptor Fas expresado en la célula blanco. Esta unión causa un reclutamiento de dominios de muerte asociados a Fas (FADD), la caspasa 8 hidroliza a la molécula Bid (56), Bid activada interacciona con las moléculas BAX y BAK en la membrana externa de la mitocondria, lo que lleva a la formación de un poro que permite la liberación de citocromo c (57). Aunque no está esclarecido si BAX y BAK polimerizan para formar el poro o si regulan poros preexistentes en la membrana de la mitocondria, si es claro que la principal consecuencia de la liberación de citocromo c es la activación de caspasa 9, molécula que interacciona con caspasa 3 para que ocurra la degradación de DNA nuclear (58).

La participación de los linfocitos T CD8+ $\alpha\beta$ + para proveer una mejor respuesta inmune en las infecciones con Mtb está ampliamente documentada (59,60). Sin embargo, también se ha demostrado que en infecciones por Mtb los linfocitos T $\gamma\delta$  pueden llevar a cabo función citotóxica, aunque para esto requieren de la participación de otras moléculas como NKG2D y MICA/B (30).

## **2.2 Antecedentes:**

En estudios preliminares de citotoxicidad encontramos que linfocitos T CD8+ lisan a monocitos autólogos en presencia del Filtrado de cultivo de la cepa H37Rv de Mtb y que el 100% de la lisis celular se inhibe con anticuerpos anti-HLA-A,B,C en células de individuos sanos, mientras que en células de enfermos de TBP, esta inhibición no ocurre. Los resultados sugieren una citotoxicidad celular realizada

por subpoblaciones de linfocitos T CD8+ sin restricción al MHC-I, por ejemplo, linfocitos T CD8+ que expresen TCR  $\gamma\delta$ . Por lo que resulta importante esclarecer el mecanismo y moléculas involucradas en la citotoxicidad generada por los linfocitos T CD8+ ante la infección por Mtb.

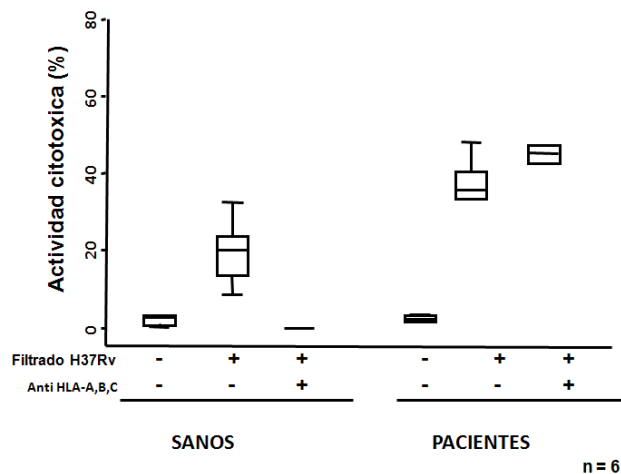


Figura 1. La citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ de enfermos de tuberculosis pulmonar es independiente de la molécula MHC-I. Co-cultivo de linfocitos T CD8+ y monocitos autólogos estimulados con proteínas de filtrado de cultivo de la cepa H37Rv de Mtb durante 4 hrs de incubación. Técnica utilizada: liberación de deshidrogenasa láctica.

### Justificación

Los diferentes mecanismos de citotoxicidad que llevan a cabo los linfocitos T CD8+ son una actividad de inmunidad protectora necesaria para conservar la salud del paciente. Pero también debemos estudiar las diferentes subpoblaciones que realizan citotoxicidad, principalmente las que nos proporcionan una alternativa

contra diferentes grupos de antígenos de Mtb, y así conocer cuando esta actividad puede resultar patológica y de que subpoblación se originó.

### **Planteamiento del problema**

Conocer la subpoblación de linfocitos T CD8+ y las moléculas de superficie involucradas en la actividad citotóxica que permanece después de bloquear el MHC-I en células de enfermos de TBP.

### **2.3 Hipótesis**

Si hay linfocitos T CD8+ sin restricción del MHC y hay linfocitos T $\gamma\delta$  que tienen actividad citotóxica, entonces los linfocitos T CD8+ que expresan TCR $\gamma\delta$  podrían ser los responsables de reconocer al antígeno y generar la citotoxicidad mediante una vía no clásica.

### **2.4 Objetivo general**

Evaluar moléculas involucradas en la actividad citotóxica que realizan las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en sangre venosa de enfermos de TBP.

### **2.5 Objetivos particulares**

1. Identificar la frecuencia de linfocitos T CD8+ (TCR $\alpha\beta$ + y TCR $\alpha\beta$ -) y linfocitos T  $\gamma\delta$  a través de citometría de flujo (inmunofluorescencia directa) en enfermos de TBP y en sujetos control.
2. Identificar la expresión de las siguientes moléculas: FasL, CD25, CD69, NKG2D y NKG2A a través de citometría de flujo (Inmunofluorescencia

directa e indirecta) en linfocitos T CD8+ de enfermos de TBP y en sujetos control.

3. Evaluar la actividad citotóxica\* en las diferentes subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T CD8+ TCR $\alpha\beta$ +, TCR $\alpha\beta$ - y linfocitos T  $\gamma\delta$ ) de enfermos de TBP y de sujetos control, mediante el bloqueo de:

a) Moléculas HLA-I

b) Moléculas TLR-2 y 4

\*Estos experimentos se realizarán en condiciones basales y estimulando con antígenos solubles derivados de un filtrado del sobrenadante del cultivo de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Filtrado H37Rv). Previamente se determinará la concentración óptima de antígeno para la realización del ensayo.

### **Diseño**

Se trató de un estudio de carácter prospectivo, observacional, transversal y comparativo.

### **Análisis estadístico**

Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5. Se analizó la distribución de las variables con la prueba Shapiro-Wilk para conocer el comportamiento de normalidad. Para comparar dos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos o una prueba *t*-student para datos paramétricos de dos muestras independientes. Para comparaciones múltiples se utilizó una prueba ANOVA seguida de una Dunn. La significancia estadística será  $P < 0.05$ .

## **Grupos**

Se incluyeron dos grupos:

- I. Individuos sanos de entre 18 a 60 años.
- II. Enfermos de TBP sin antecedentes de tratamientos antituberculosos previos, sin tratamiento en la actualidad o en la primera semana del mismo.

## **Criterios de inclusión para enfermos de TBP**

- a. Individuos de entre 18 y 60 años de edad, cualquier género que hayan acudido a la Unidad de Atención en Tuberculosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- b. Sospecha clínica de tuberculosis pulmonar.
- c. Baciloscopía positiva por la técnica de Ziehl-Neelsen.
- d. Ausencia de otra co-morbilidad (HIV+, diabetes+, cáncer).

## **Criterios de exclusión**

- a. Que el paciente rehúse a participar en el estudio.
- b. Enfermos admitidos en la UC Intensivos y/o Intermedios
- c. Demostración de tuberculosis extrapulmonar

## **Criterios de eliminación**

- a. Cultivo negativo para *Mycobacterium tuberculosis* después de 70 días.

## **2.6 MATERIAL Y METODOS**

### **Obtención de células mononucleadas (CMN).**

Las CMN se obtuvieron a partir de una muestra de 30 mL de sangre periférica mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque de densidad de 1.077 provisto por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), fueron centrifugadas 350g 30 minutos a 15°C. Se recuperaron las células de la interface, 3 lavados con solución salina de fosfatos 1X a pH 7.2 (PBS), finalmente, las células se cuantificaron en una cámara de Neubauer. La viabilidad celular fue valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripano al 0.4% en PBS.

### **Inmunofluorescencia directa:**

Para la inmunofluorescencia se utilizaron anticuerpos acoplados a un fluorocromo como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina con cianina 5 (PECy5). Los anticuerpos utilizados estaban dirigidos contra las siguientes moléculas y conjugados a los fluorocromos indicados: CD3-PECy5, CD8-PECy5, CD8-PE, CD8-FITC, TCR $\alpha\beta$ -FITC, TCR $\gamma\delta$ -PE, CD28-FITC, CD69-FITC, CD25-PE, CD95L-PE, CD56-PE, CD56-FITC, CD16-PE, NKG2D-PE, NKG2A-PE, CD161-FITC. En cada experimento se utilizaron controles de isotipo conjugados a los fluorocromos FITC, PE, PECy5. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD Bioscience Pharmingen (San diego, CA, USA).

Las CMN ( $2 \times 10^5$ ) se centrifugaron a 200g 5 minutos, se decantó el sobrenadante y al "botón" celular (en ~50  $\mu$ L de PBS) se adicionó la concentración óptima de los anticuerpos (previamente estandarizada). La células se incubaron 20 minutos en hielo (para la reacción antígeno-anticuerpo), se les adicionó 300  $\mu$ L de PBA (PBS 1X + 0.2% Azida de sodio + 0.2% Albúmina), se centrifugaron 5 minutos a 200g Finalmente, las células se resuspendieron en solución de FACS Flow para su

análisis por citometría de flujo. Las células que fueron analizadas horas después, se les adicionó 100  $\mu$ L de *p*-formaldehído al 1% en PBS.

### **Adquisición y análisis de CMN:**

Las muestras fueron analizadas en un citómetro FACS Calibur de Becton Dickinson con software Cell Quest. Se obtuvieron 10,000 células, en una gráfica de puntos de tamaño celular contra granularidad celular se delimitó la región de linfocitos. Los controles de isotipo se incluyeron para verificar que los fluorocromos utilizados no proporcionaban una fluorescencia inespecífica. Posteriormente se graficó CD8+ *versus* la molécula a identificar acorde a los objetivos particulares (TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ , FasL, CD25, CD69, NKG2D o NKG2A). Para realizar triple fluorescencia se graficó CD8+ *versus* tamaño celular y se delimitó una segunda región y a partir de ésta, se realizaron los análisis correspondientes. Mediante gráficas para las canales de fluorescencia del citómetro (FL1, FL2 y FL3), los datos fueron nuevamente analizados en el programa FlowJo (Tree Star) versión 9.0.2 para evaluar los porcentajes de expresión de las moléculas identificadas por los anticuerpos.

### **Purificación de células CD14+.**

Las células CD14+ se obtuvieron a partir de las CMN mediante el método de inmunomagneto selección positiva (MACS) siguiendo las indicaciones del proveedor (Miltenyi, Germany). Brevemente, las CMN se incubaron 20 minutos a 4°C con un anticuerpo anti-CD14 acoplado a perlas magnéticas. Posteriormente, se les adicionó 1 mL de PBS a las células y fueron centrifugadas a 200g por 5



minutos a 15 °C, al “botón” celular se le adicionó 1.0 mL de PBS y la suspensión celular fue colocada en una columna magnética sobre un imán y eluida con 3 mL de PBS para eliminar todas aquellas células que no se retuvieron en la columna. Finalmente, la columna fue retirada del imán y las células retenidas (CD14+) fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de PBS. El grado de pureza de las células CD14+ (monocitos) fue verificada por citometría de flujo usando anticuerpos anti-CD14.

### **Purificación de linfocitos T CD8+**

Las células CD14- fueron centrifugadas a 350g 5 minutos a 15°C, se resuspendió en 1 mL de PBS, las células se cuantificaron en la cámara de Neubauer. Por el método de inmunomagneto selección positiva (MACS) se obtuvieron linfocitos T CD8+ siguiendo las indicaciones del proveedor (Miltenyi, Germany). Brevemente, las células CD14- se incubaron 20 minutos a 4°C con un anticuerpo anti-CD8 acoplado a perlas magnéticas, posteriormente se les adicionó 1 mL de PBS a las células y fueron centrifugadas a 200g por 5 minutos a 15 °C, al “botón” celular se le adicionó 1.0 mL de PBS y la suspensión celular fue colocada en una columna magnética sobre un imán y eluida con 3 mL de PBS para eliminar las células que no se retuvieron en la columna. Finalmente, la columna fue retirada del imán y las células retenidas (CD8+) fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de PBS. La pureza de las células CD8+ (célula efectora) fue verificada por citometría de flujo usando anticuerpos anti-CD8.

### **Tinción de linfocitos T CD8+ con CFSE:**

Los linfocitos T CD8+ purificados fueron cuantificados, se tiñeron con 200nM/mL de 5-carboxifluoreceína diacetato succinimidil ester (CFSE), se incubaron 15 minutos en constante agitación. Para detener la reacción del CFSE, se adicionaron 10 mL de medio de cultivo RPMI-1640 al 10% SFB (61,62) y centrifugaron a 350g durante 5 minutos a 10 °C. Finalmente, el “botón” celular se resuspendió en RPMI-1640 10% SFB, el volumen del medio de cultivo se ajustó a  $1 \times 10^5$  linfocitos TCD8+CFSE+ por cada 100  $\mu$ L. Antes de continuar con el ensayo de citotoxicidad se verifico por microscopía de fluorescencia que los linfocitos TCD8+ estaban teñidos con CFSE (linfocitos T CD8+CFSE+).

**Ensayo de citotoxicidad:**

Se realizaron cocultivo de células CD14+ y células CD8+CFSE+ por 4hrs a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en presencia o ausencia de antígeno proveniente de Filtrado de H37Rv (63). Al termino del tiempo de cultivo las células se recuperaron y se les adicionó 300  $\mu$ L de PBS, se centrifugaron a 350g 5 minutos a 15 °C, al “botón” celular se le agregó 3 $\mu$ l de 7-AAD 20 minutos a 4°C en oscuridad, se realizó un lavado con PBS, el “botón” celular fue resuspendido en 250  $\mu$ L de Facs Flow y adquiridos mediante citometría de flujo (62). El análisis de porcentaje (%) de muerte específica a antígeno se obtuvo a través del cálculo que se describe a continuación:

$$\% \text{ de Lisis específica} = \frac{100 \times (\% \text{ lisis de muestra} - \% \text{ de lisis basal})}{100 - \% \text{ lisis basal}}$$

Lisis de muestra = Lisis celular en presencia de blanco-efectoras.

Lisis basal = Lisis celular en ausencia de efectoras.

## **2.7 Estandarización**

### **Región de células CD8+.**

En las siguientes gráficas de puntos mostramos un ejemplo representativo de como delimitamos la región de linfocitos. Realizamos una gráfica de puntos por tamaño contra granularidad celular se delimitó la región de linfocitos, a partir de esta región analizamos la reacción inespecífica conferida por los controles de isotipo, con esto mostramos que los fluorocromos no proporcionen un fondo positivo. Posteriormente en la misma región de linfocitos hacemos una región para células CD8+ y analizamos la expresión de las otras moléculas como se muestra a continuación.

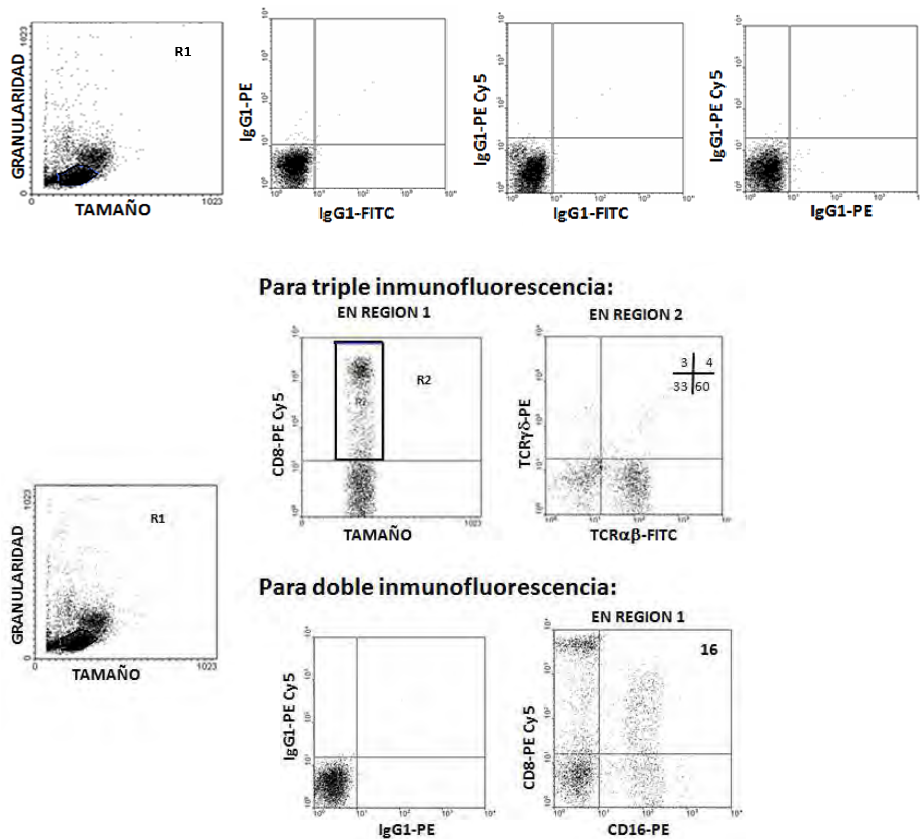


Figura 2: Uso de controles de isotipo y delimitación de la región de linfocitos. Gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo donde indicamos el uso de los controles de isotipo y, la delimitación de la región de linfocitos para dobles o triples inmunofluorescencias.

### Concentración óptima de cada anticuerpo.

Para cada anticuerpo iniciamos con una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad celular para delimitar la región de la población de linfocitos. Posteriormente, colocar los cuadrantes de la gráfica de acuerdo a los controles de isotipo, la curva de estandarización generalmente fue iniciada con 5 y 10 µl de una dilucion 1:10 (Anticuerpo:PBA) y volúmenes de anticuerpo sin diluir (2-5 µl).

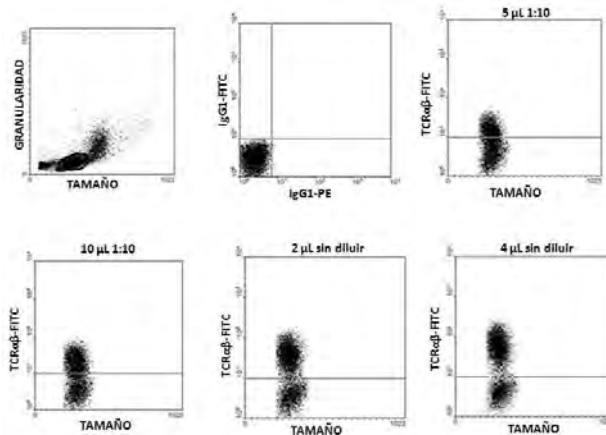


Figura 3: Identificación de la concentración óptima de anticuerpo. Gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo, imagen representativa del procedimiento que se realizó para identificar la concentración óptima de cada anticuerpo utilizado para inmunofluorescencias.

### **Pureza de linfocitos T CD8+ (Célula citotóxica) y células CD14+ (monocito)**

Después de realizar la inmunomagneto selección positiva a las células CD14-, como se describió en material y métodos, la pureza de las células CD8+ se verificó mediante citometría de flujo. Como se muestra a continuación nuestros datos indican que la pureza de células CD8+ que se obtienen con la técnica de inmunomagneto selección positiva fue de al menos 90% y la pureza de células CD14+ fue de ~94% .

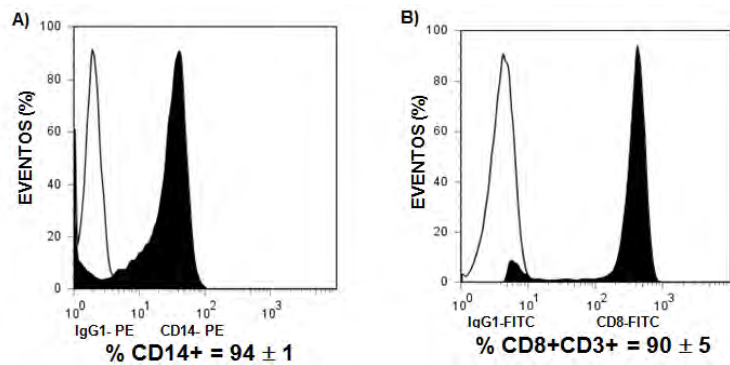


Figura 4: Pureza de células CD8+ y CD14+ para ensayos de citotoxicidad. Histogramas obtenidos por citometría de flujo, indican que la pureza de las poblaciones celulares para los ensayos de citotoxicidad fue de al menos el 90% para las células CD8+ (panel A) y de 94% para las CD14+ (panel B).

### Tinción de linfocitos T CD8+ con CFSE

A la población celular CD8+ purificada por inmunomagneto selección positiva se incuban con 200 nM de CFSE por cada  $1 \times 10^6$  células CD8+, nuestros datos muestran que las células CD8+ fueron teñidas eficientemente con el CFSE, esto fue corroborado por microscopía de fluorescencia (Figura 5 panel B) y por citometría de flujo graficando CD8 *versus* CFSE (Figura 5 panel A).

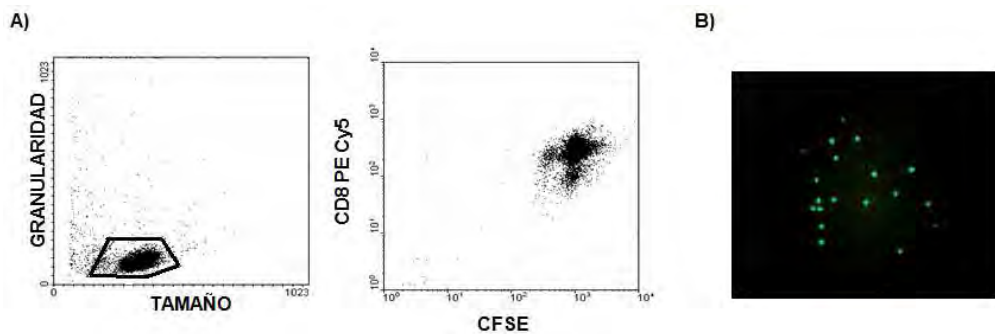


Figura 5: Las células CD8+ se tiñen eficientemente con 200 nM de CFSE. El panel A muestra una gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo, se graficó CD8+ *versus* CFSE. En el panel B se observa mediante microscopía de fluorescencia células CD8+ teñidas con CFSE.

### Concentración óptima de uso de CFSE

Para identificar citotoxicidad celular dependiente de antígeno, mediante citometría de flujo, se requiere que la célula efectora (linfocitos citotóxicos) sea identificada con el colorante CFSE y así excluir a las células efectoras de la muerte de las células blanco (monocitos). La estandarización de CFSE consistió en teñir células CD8+ con diferentes concentraciones del colorante hasta obtener como concentración óptima 200nM.

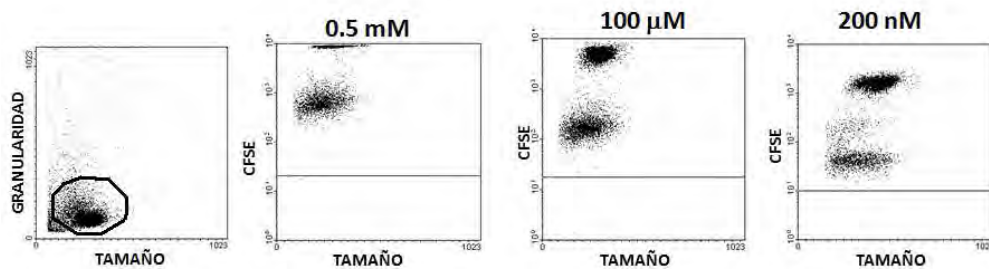


Figura 6: La concentración óptima de CFSE es 200 nM. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo, usando concentraciones de 0.5 mM, 100 μM y 200 nM, estos datos indican que 200 nM es la concentración óptima para teñir las células CD8+.

Con esta concentración de CFSE (200 nM) observamos por citometría que al parecer existían 2 poblaciones en linfocitos TCD8+ purificados. Sin embargo, al

considerar que el CFSE se une de manera inespecífica a proteínas, existía la posibilidad de que no fueran 2 poblaciones celulares, sino células CD8+ se encontraban en diferente ciclo celular y por lo tanto hay unas con mayor o menor cantidad de CFSE. Para comprobar esto decidimos incubar las células con colchicina a una concentración de 2.5  $\mu\text{M}$  (64) para sincronizarlas y posteriormente teñirlas con CFSE 200nM

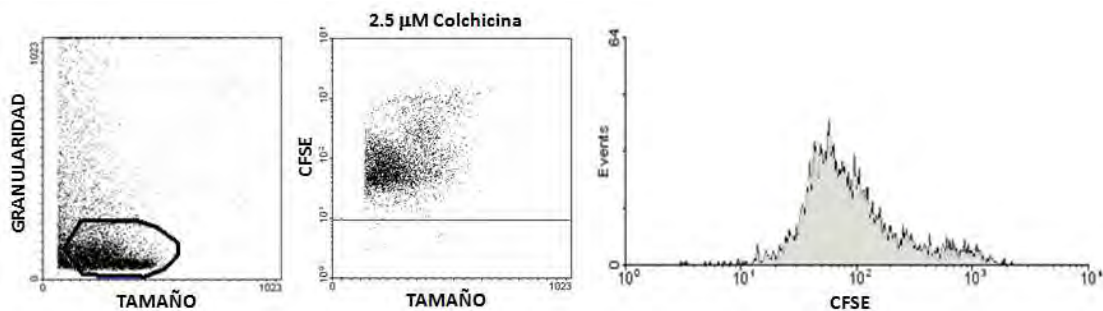


Figura 7: Células en misma fase del ciclo celular son homogéneas a la tinción por CFSE. Gráficas de puntos e histograma obtenidos por citometría de flujo, al ser sincronizadas en el mismo ciclo celular la tinción de CFSE para las células CD8+ se observa homogénea.

Este experimento demostró que al sincronizar las células se obtiene una sola población teñida con CFSE, esto, aunado al porcentaje de pureza obtenido por citometría de flujo en la población purificada se demostró que son linfocitos T CD8+ teñidos con CFSE.

### **Concentración óptima de antígeno.**

Para encontrar la concentración óptima de antígeno realizamos ensayos de citotoxicidad en sujetos sanos y enfermos. La curva de concentración de proteína



de antígeno fue entre 0 a 50  $\mu\text{g}$ . Estos datos indicaron que la concentración óptima de proteína de antígeno a utilizar es de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

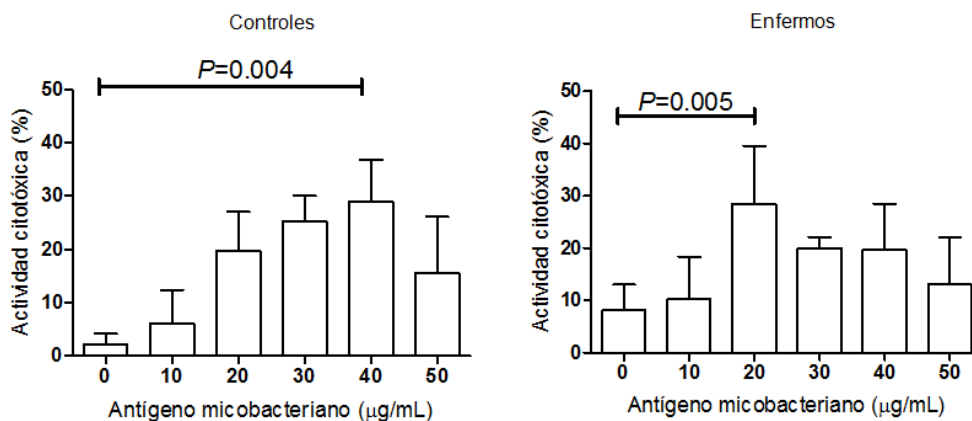


Figura 8: 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína antigénica se observa el mayor porcentaje de citotoxicidad. Ensayos de citotoxicidad específica al antígeno indican que con 20  $\mu\text{g}$  de proteína antigénica los linfocitos T CD8+ de enfermos de TBP llevan a cabo su mayor actividad citotóxica.

### Concentración óptima de anticuerpo para bloquear HLA-I

Para conocer la concentración óptima del anticuerpo para bloquear HLA-I primero se realizó una incubación con un anticuerpo anti HLA-I unido a un fluorocromo (FITC), para conocer el porcentaje basal de expresión de esta molécula en células CD14+ purificadas. Posteriormente,  $1 \times 10^5$  células CD14+ se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpo bloqueador anti HLA-I, transcurridos 15 minutos (para la reacción antígeno-anticuerpo) las células fueron lavadas con PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti HLA-I unido a un fluorocromo y así se identificó la concentración a la cual el anticuerpo bloqueador bloquea la

mayor cantidad de expresión de estas moléculas. Los resultados obtenidos indican que con 3µg/mL de anticuerpo bloqueamos ~98% de las moléculas HLA-ABC.

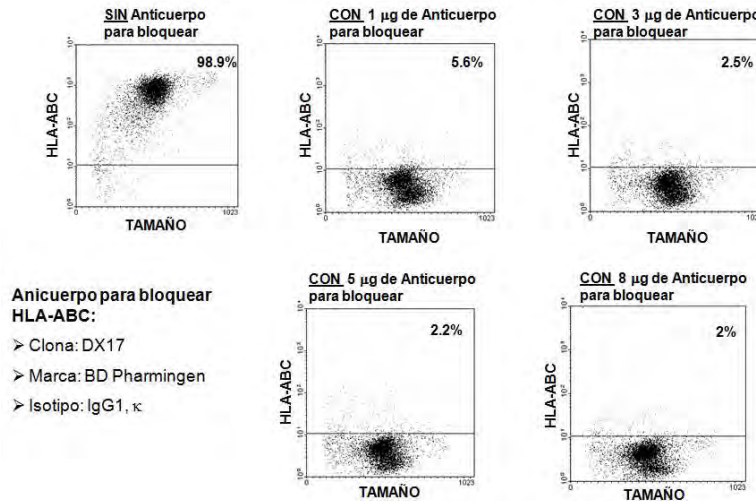


Figura 9: Con 3µg/mL del anticuerpo bloqueador anti HLA-ABC se bloquea el 98% de las moléculas HLA-ABC. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo donde indican el porcentaje de expresión de moléculas HLA-ABC después de utilizar un anticuerpo bloqueador para esta misma molécula.

## 2.8 Resultados y discusión

### ➤ Porcentaje de expresión TCR αβ o TCRγδ en células CD8+

Para conocer los porcentajes de células CD8+ con TCRαβ o TCRγδ se realizó triple inmunofluorescencia en CMN obtenidas de sangre periférica de enfermos de TBP y sujetos control. Como fue descrito en la sección de estandarización, se inició con una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad celular, posteriormente fue delimitada la región de linfocitos. Inicialmente se adquirieron los controles de isotipo para colocar los cuadrantes en el lugar que limita la auto

fluorescencia. Posteriormente se graficó tamaño celular *versus* CD8+ para hacer una nueva región en la fracción positiva para CD8, y finalmente graficar TCR $\alpha\beta$  *versus* TCR $\gamma\delta$  en la región de células CD8+, y así se obtuvo el porcentaje de linfocitos T CD8+ que expresan TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$ .

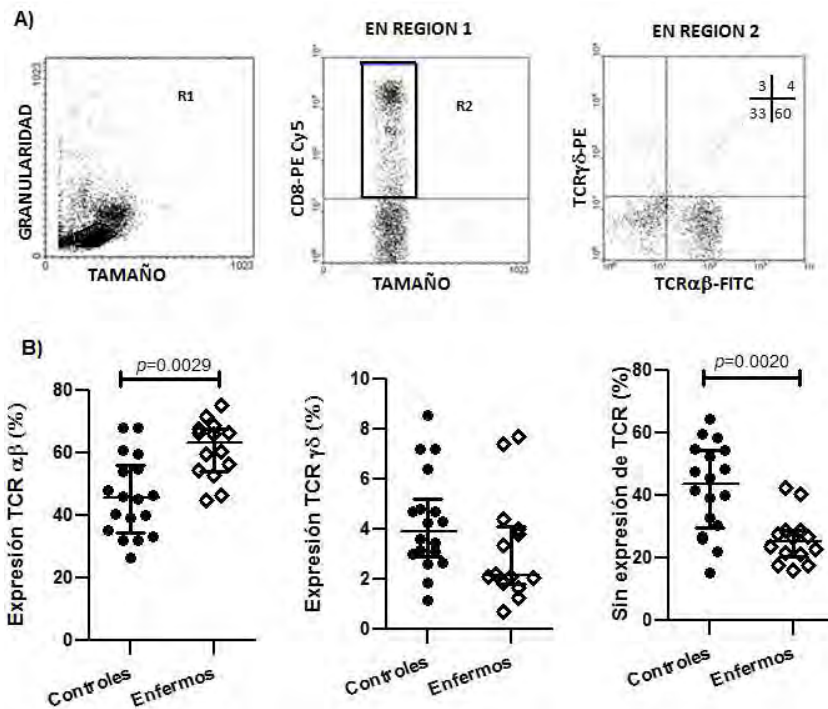


Figura 10. Enfermos de TBP tienen mayor porcentaje de linfocitos TCD8+ TCR  $\alpha\beta$ . Panel A, Gráficas de puntos representativas para obtener el porcentaje de expresión de TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$  en región de células CD8+. Panel B, porcentaje de expresión de TCR $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  o sin expresión de TCR, respectivamente, en células CD8+. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (25-75), el valor de *P* obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

### Cuadro 1

Expresión de TCR en células CD8+

Población	Sano (n=18)	Enfermo (n=14)	Valor de <i>P</i>
TCR $\alpha\beta$	46 (35-56)	63 (54-68)	0.0029
TCR $\gamma\delta$	4 (3-5)	2 (2-4)	0.0946
TCR neg.	44 (30-55)	25 (20-29)	0.0020

Nuestros datos mostraron que los enfermos de TBP tienen un mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ TCR  $\alpha\beta$ +, aunque con este resultado no podemos afirmar que es una expansión clonal (porque se requiere medir las variables de la cadena  $\beta$  de TCR), este resultado concuerda parcialmente con lo observado por Jacobsen M y colaboradores (65), en donde demuestran que niños con tuberculosis pulmonar presentan una expansión clonal de linfocitos T CD8+.

Por otro lado, a pesar que en la literatura se ha reportado un incremento en el porcentaje de células con TCR  $\gamma\delta$  en enfermos de tuberculosis (66,67), nosotros no encontramos alguna diferencia estadísticamente significativa, argumentamos que esta discrepancia de resultados se debe a que en otros trabajos las células  $\gamma\delta$  que se evalúan son las dobles negativas para el receptor CD4 o CD8 de los linfocitos y nosotros lo que evaluamos son los linfocitos T que expresan el receptor CD8 y además TCR $\gamma\delta$ . Por lo que básicamente concluimos que no hay diferencia en el porcentaje de células T CD8+ TCR $\gamma\delta$ + en enfermos de TBP comparados con sujetos control.

Debido a que la gráficas de puntos indican un porcentaje de células CD8+ sin expresión de TCR ( $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ ) e interesantemente ese porcentaje de células

resultaba menor en enfermos de TBP decidimos explorar a mayor detalle esta población celular. Considerando que las células NK (*natural killer*) expresan la cadena  $\alpha$  de la molécula CD8 (68) y nuestro anticuerpo comercial reconoce la misma cadena entonces se infirió que la población celular CD8+ que no expresa TCR son células NK y se encuentran disminuidas en el paciente con tuberculosis.

Para poder demostrar nuestra hipótesis se realizó doble inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos a la molécula CD8 y CD3 para que nos mostrara cual era la porción de células CD8+ que indudablemente eran linfocitos T CD8+ así como incluir anticuerpos para detectar moléculas relacionadas a las células NK como CD16, CD56 y CD161.

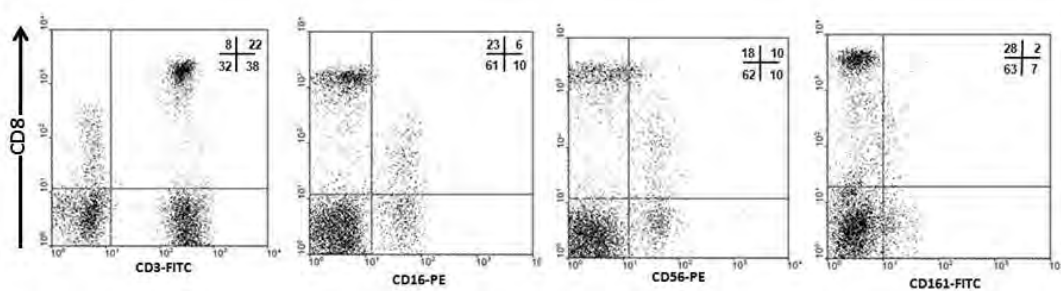


Figura 11. Gráficas de puntos representativas del porcentaje de expresión de CD16, CD56 y CD161 en células CD8+.

Estos experimentos sugieren que las células CD8+ que no expresan TCR son células NK, ya que la misma fracción de células CD3 negativas (molécula fenotípica de linfocitos T) si expresan CD16 y CD56. Comparando con células de sujetos control, el porcentaje de células NK en enfermos de TBP está disminuido (44 [30-55] *versus* 25 [20-29] sano y enfermo, respectivamente).

➤ **Expresión de la molécula NKG2D y NKG2A en linfocitos T CD8+**

Para identificar la expresión de las moléculas de la familia NKG2 se realizó doble inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos anti-CD8 *versus* anti-NKG2D o anti-NKG2A, de acuerdo con la literatura todas las células CD8+ expresan NKG2D (69) pero no NKG2A.

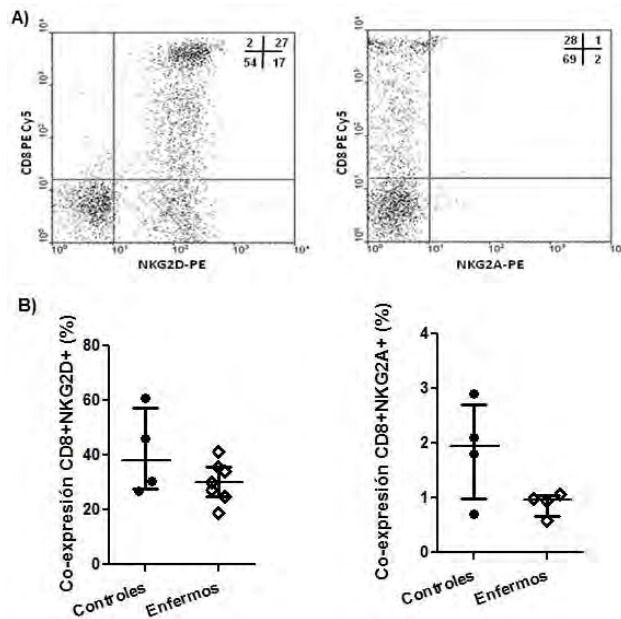


Figura 12. Enfermos con TBP tienen el mismo porcentaje de linfocitos TCD8+NKG2D+ y TCD8+NKG2A+ que los sujetos control. Panel A, Gráfica de puntos representativas del porcentaje de co-expresión de las moléculas NKG2D y NKG2A, respectivamente, en células CD8+. Panel B, porcentaje de expresión de NKG2D y NKG2A, respectivamente, en células CD8+. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (25-75), el valor de *P* obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

**Cuadro 2**

Expresión de moléculas de la familia NKG2 en linfocitos T CD8+

Población	Sano (n=4)	Enfermo (n=7)	Valor de <i>P</i>
NKG2D	38 (28-57)	30 (25-36)	0.3152
NKG2A	2 (1-3)	1 (1-1)	0.2000

Estos datos concuerdan con lo previamente reportado por Bauer S y colaboradores (69), debido a que no encontramos diferencia estadísticamente significativa en la expresión de moléculas NKG2D o NKG2A en células CD8+ de enfermos de TBP comparada con sujetos control.

➤ **Expresión de las moléculas CD69 y CD25 en linfocitos T CD8+**

La expresión de las moléculas CD69 y CD25 son marcadores de activación celular temprana y tardía respectivamente (70), nuestro objetivo fue evaluar si los linfocitos T CD8+ de sangre periférica expresan alguna de estas moléculas con la finalidad de esclarecer si cursan por un proceso de activación, la expresión de moléculas se realizó en las células obtenidas de sangre periférica, en cultivo de 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y en células que se estimularon con filtrado de cultivo de la cepa H37Rv, PMA-IO (como control de activación) y sin estímulo.

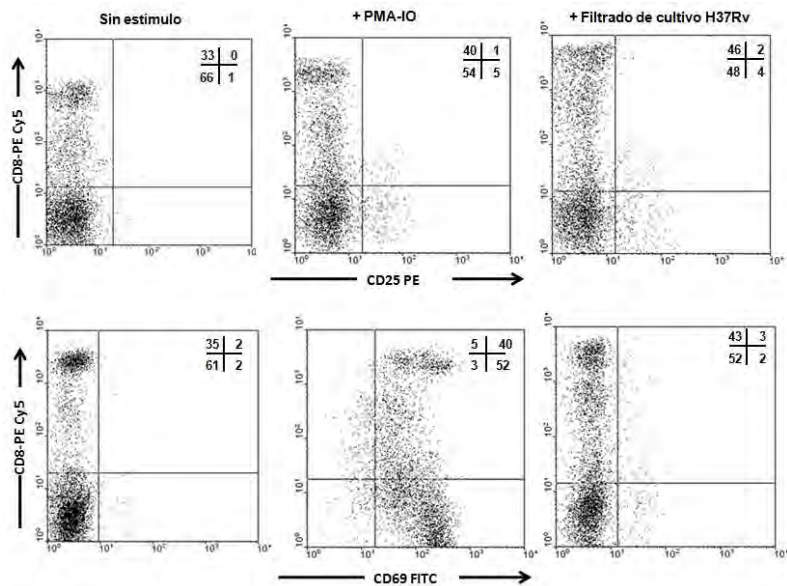


Figura 13. Gráfica de puntos representativa del porcentaje de co-expresión de la molécula CD25 (gráficas superiores) y CD69 (gráficas inferiores) en células CD8+. Estas gráficas muestran que utilizando un activador inespecífico (PMA-IO, columna intermedia) la expresión de CD69 (marcador de activación temprana) ocurre de manera eficiente, comparado con la expresión *per se* de las moléculas de activación (primer columna). A pesar del estímulo de PMA-IO no hay expresión de CD25 (marcador de activación tardía). Finalmente estimular el cultivo con el filtrado de cultivo de H37Rv (última columna) tampoco hay expresión de moléculas de activación, probablemente el tiempo de activación (24 hrs) es insuficiente ya que algunos reportes indican que la expresión de éstas moléculas en respuesta a antígenos ocurre posterior a las 96 hrs (70).



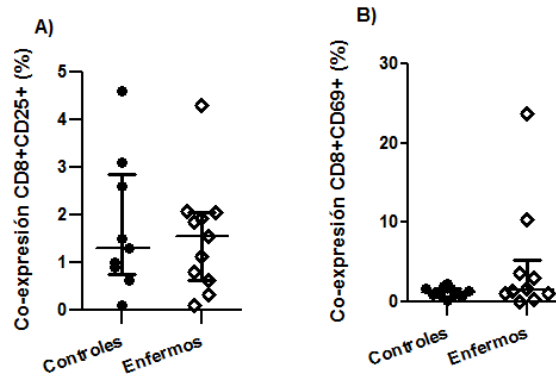


Figura 14. Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de linfocitos TCD8+ CD25+ y TCD8+CD69+ que los sujetos control. Panel A, porcentaje de expresión de CD25 en células CD8+. Panel B, porcentaje de expresión de CD69 en células CD8+. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (25-75), el valor de *P* obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

### Cuadro 3

Expresión de moléculas de activación en linfocitos T CD8+

Población	Sano (n=10)	Enfermo (n=10)	Valor de <i>P</i>
CD25	1 (1-3)	2 (1-2)	0.8792
CD69	1 (1-2)	2 (1-5)	0.3071

Nuestros datos muestran que los linfocitos T CD8+ de enfermos de TBP no se encuentran en un estado de activación diferente al de los sujetos controles, lo que podría afectar la respuesta citotóxica al presentarle células infectadas (para los ensayos de citotoxicidad), las células provenientes de enfermos de TBP o sujetos control responden de manera eficiente a estímulo inespecífico (PMA-IO), este resultado concuerda con lo reportado por Antas PR y colaboradores (70) quienes

encuentran que tanto linfocitos T CD4+ como linfocitos T CD8+ expresan eficientemente CD69 después de un estímulo de 24 hrs con PHA (Phytohaemagglutinin).

➤ **ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD, CO-CULTIVOS DE MONOCITOS Y LINFOCITOS TCD8+**

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con una pureza de poblaciones celulares (efectora y blanco) mayor al 90%, posteriormente identificamos la concentración óptima de antígeno y de anticuerpos bloqueadores.

➤ **Concentración óptima de antígeno para los ensayos de citotoxicidad de co-cultivos de linfocitos T CD8+/monocitos autólogos**

Para los ensayos de citotoxicidad se realizó una curva de concentración de proteína de antígeno para conocer la concentración óptima a utilizar, la curva fue a concentraciones crecientes de proteína, partimos de 0 (sin estímulo), 10, 20, 30, 40 y 50 µg de proteína del Filtrado H37Rv.

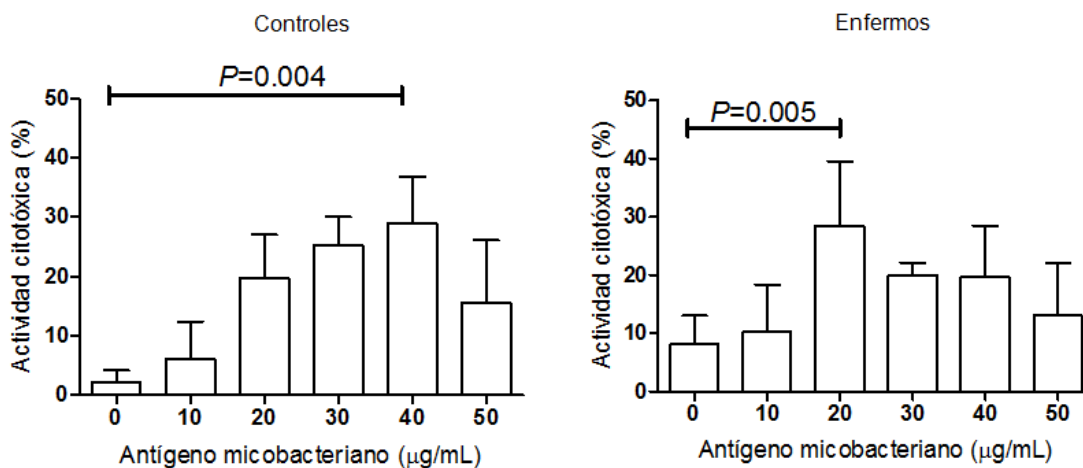


Figura 15. Porcentaje de muerte celular al utilizar diferentes concentraciones de Filtrado H37Rv. Los datos representados son promedio  $\pm$  desviación estándar, el valor de *P* fue obtenido mediante ANOVA seguida de una Dunn para comparaciones múltiples.

#### Cuadro 4

Porcentaje de actividad citotóxica a diferentes concentraciones de antígeno.

Población	0 $\mu$ g prot.	10 $\mu$ g prot.	20 $\mu$ g prot.	30 $\mu$ g prot.	40 $\mu$ g prot.	50 $\mu$ g prot.
Sano n=4	2 $\pm$ 3	6 $\pm$ 6	20 $\pm$ 6	25 $\pm$ 5	<b>29 <math>\pm</math> 8</b>	16 $\pm$ 11
Enfermo n=4	7 $\pm$ 6	13 $\pm$ 13	<b>31 <math>\pm</math> 13</b>	20 $\pm$ 2	20 $\pm$ 9	13 $\pm$ 9

De acuerdo a los datos obtenidos en la curva de concentración de proteína de Filtrado H37Rv se determinó que la concentración de proteína a utilizar en los ensayos de citotoxicidad sería 20  $\mu$ g, porque a esa concentración se observó el mayor porcentaje (31  $\pm$  13) de citotoxicidad en enfermos de TBP. Interesantemente, en los sujetos control se requiere del doble de concentración de proteína antigénica para que se observe el mayor porcentaje de citotoxicidad (29  $\pm$  8), es decir, los sujetos control requieren de 40  $\mu$ g de antígeno proteico para llevar a cabo su máxima capacidad de citotoxicidad.

#### ➤ **Ensayo de citotoxicidad en co-cultivo de linfocitos T CD8+/CD14+**

Los cocultivos de linfocitos TCD8+/monocito se realizaron como fue explicado en la sección de material y métodos. Brevemente, se realizó un co-cultivo de célula efectora (CD8+) teñido con CFSE y célula blanco (CD14+) en una relación 1:1 (condiciones utilizadas en nuestro antecedente), se estimuló con 20 mg de proteína de Filtrado H37Rv durante 4 hrs a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Se recuperaron las células y fueron teñidas con 7-AAD durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

Finalmente fueron analizadas en un citometro de flujo y reanalizadas en el programa Flow Jo.

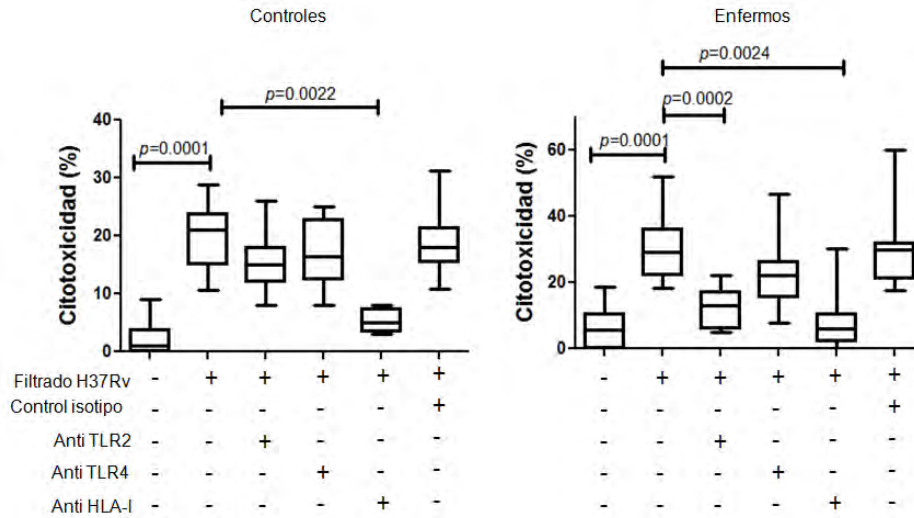


Figura 16. La citotoxicidad de los monocitos de paciente con TBP es dependiente de HLA-I y de TLR2 (panel derecho) a diferencia de lo observado para los monocitos de sujetos control que solo depende de HLA-I (panel izquierdo). Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (25-75), el valor de  $P$  fue obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Nuestro resultado muestra que en sujetos control la muerte de monocitos en presencia de linfocitos TCD8+ solo depende de la molécula HLA-I. Sin embargo, los monocitos que provienen de enfermos de TBP, sufren un proceso de muerte que es dependiente de HLA-I y de TLR2.

Aunque nuestro antecedente indica que en enfermos de TBP esta citotoxicidad no es bloqueada en presencia de anti-HLA-I, nuestros datos muestran que si se inhibida la citotoxicidad, aunque se observa una mayor dispersión de los datos en

la muerte celular de enfermos de TBP al bloquear HLA-I. Esta discrepancia de resultados puede atribuirse a la diferencia de técnica utilizada, es decir, en el caso del antecedente se utilizó la técnica de liberación de deshidrogenasa láctica, mientras que para nuestros experimentos decidimos utilizar una técnica por citometría de flujo. El cambio de técnica estuvo fundamentado en que los enfermos de TBP normalmente cursan por un estado linfopénico (71), así que al purificar las poblaciones celulares la cantidad final obtenida es baja y debido a que en la técnica de liberación de deshidrogenasa láctica lo ideal es realizar cada condición por triplicado, consideramos necesaria la adaptación de una nueva técnica que no requiriera los triplicados y de esta manera llevar a cabo la mayor cantidad de condiciones en el mismo sujeto. Por lo que con el cambio de técnica nuestros datos indican que los monocitos de enfermos de TBP sufren una muerte celular que en presencia de linfocitos T CD8+ está restringida a la molécula HLA-I. Un resultado que cabe resaltar es la muerte de monocitos que depende de la molécula TLR-2. Hasta el momento no se ha descrito que los linfocitos T CD8+ expresen un ligando para TLR2 y, que el resultado de esta interacción sea una vía a través de la cual se active la citotoxicidad del linfocito. Con esto, resulta necesario identificar si para que ocurra esta muerte del monocito se requiere la participación de los linfocitos T CD8+ o es una muerte celular que ocurre en los enfermos de TBP por una vía que depende de la cascada de señalización de TLR2.

## 2.9 Conclusión

En conjunto, nuestros datos muestran que los enfermos de TBP tienen en circulación mayor porcentaje de células T CD8+ TCR $\alpha\beta$ +, mientras que para los linfocitos T CD8+ TCR $\gamma\delta$ + no existe diferencia estadística significativa al comparar los datos de enfermos de TBP y sujetos control.

Aunque hay un incremento de células T CD8+ TCR  $\alpha\beta$ + en sangre, éstas no muestran activación en enfermos de TBP al ser comparadas con las células de los sujetos control. Sin embargo, son células que responden a menor concentración de antígenos solubles de *Mycobacterium tuberculosis*. Finalmente, los ensayos de citotoxicidad indicaron que la muerte de los monocitos cocultivados con linfocitos CD8+ es completamente dependiente de la molécula HLA-I en los sujetos control. A diferencia de los controles, la citotoxicidad que llevan a cabo los linfocitos CD8+ de enfermos de TBP cocultivados con monocitos autólogos no solo depende de la vía del HLA-I, sino también de la molécula TLR2, así que consideramos necesario esclarecer la muerte celular que ocurre por esta última vía.

## Review

# Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes

Chávez-Galán L<sup>1</sup>, Arenas-Del Angel MC<sup>1</sup>, Zenteno E<sup>2</sup>, Chávez R<sup>2</sup> and Lascurain R<sup>1,2,3</sup>

One of the functions of the immune system is to recognize and destroy abnormal or infected cells to maintain homeostasis. This is accomplished by cytotoxic lymphocytes. Cytotoxicity is a highly organized multifactor process. Here, we reviewed the apoptosis pathways induced by the two main cytotoxic lymphocyte subsets, natural killer (NK) cells and CD8<sup>+</sup> T cells. In base to recent experimental evidence, we reviewed NK receptors involved in recognition of target-cell, as well as lytic molecules such as perforin, granzymes-A and -B, and granulysin. In addition, we reviewed the Fas-FasL intercellular linkage mediated pathway, and briefly the cross-linking of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor pathway. We discussed three models of possible molecular interaction between lytic molecules from effector cytotoxic cells and target-cell membrane to induction of apoptosis. *Cellular & Molecular Immunology*. 2009;6(1):15-25.

**Key Words:** apoptosis, cytotoxic cell, granule-dependent exocytosis, FasL, TNF

## Introduction

Cytotoxic function constitutes an important part of the cell-mediated immune system. Cytotoxicity is a highly organized multifactor process performed by different cells from the immune system. This process consists in inducing target cell death through cytotoxic effector cells. Natural killer (NK) cells and CD8<sup>+</sup> T cells are two of the main cell populations considered as cytotoxic cells, because their most important activity is to remove abnormal or infected cells to prevent the development of malignancies, and to eliminate intracellular pathogens (1-4).

NK cells are large, granular lymphocytes that mediate crucial functions of innate immunity mainly against viral infections (4). NK cells destroy target cells negatively or deficiently expressing classical and non-classical major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules, such as human leukocyte antigens HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E and HLA-G (5-8). Somatic cells express HLA-A, -B, -C, and -E, whereas HLA-G is found in the human placenta (9). NK cell cytolytic activity is also induced through the

expression of cell stress-induced MHC class I-related chain A (MICA) and B (MICB) proteins (10). In contrast, CD8<sup>+</sup> T cells kill target cells by recognition of MHC-I restricted peptide antigens or CD1-restricted nonpeptide antigens (11, 12). For the recognition of antigens, CD8<sup>+</sup> T cells use an antigen-specific receptor, which is the outcome of genomic segment recombination during the development (13).

NK cell activity occurs in an antigen-nonspecific manner mediated by a wide range of inhibitory and activating surface receptors. These NK receptors have been grouped in: a) C-type lectin-like receptors (CD94 and NKG2 family); b) immunoglobulin-like transcripts (ILTs) or leucocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs); and c) killer immunoglobulin-like receptors (KIRs).

Regarding the first group, CD94 molecule forms a hetero-dimeric complex with any member of the NKG2 family (NKG2-A, -B, -C, -D, -E, and -F). The activating or inhibitory function of the heterodimer complex depends on the cytoplasm region of NKG2 molecules. Accordingly, NKG2A and B have immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) groups that act as inhibitors (14-16), whereas NKG2C, NKG2D, and NKG2E lack ITIMs, instead they transmit activating signals (17-19). NKG2C is associated with a 12 kDa DNA-activating protein (DAP-12), a factor containing an immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) that provides cellular activating signals (17). Although NKG2D lacks ITAMs, it forms an activating receptor complex with a 10 kDa DAP (DAP-10), which contains a binding site for the recruitment of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) required for signal transduction (18, 20). NKG2E is similar to NKG2C in its cytoplasmic domain (19), which allows its association with DAP-12 (21). It seems that, NKG2F could regulate cell activation by competition for DAP12 with other receptors,

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", Mexico;

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico;

<sup>3</sup>Correspondence to: Dr. Ricardo Lascurain, Laboratorio 6, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional, Autónoma de México, 04510 Mexico. P. O. Box 70159. Tel: +52-55-5623-2169, Fax: +52-55-5616-2419, E-mail: rlascurainl@yahoo.com.mx

Received Jan 6, 2009. Accepted Feb 11, 2009.

such as NKG2C and NKG2E, although its exact function is not fully known (21).

NKG2A, B, C, E, or F receptors are expressed on NK cells, CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  lymphocytes, CD4<sup>+</sup> T cell subsets, and NKT cells (1, 10, 22-25), all of which recognize HLA-E (17, 21, 26-28) complexed to an MHC class I leader sequence (29). In this fashion, they monitor the expression of MHC-I molecules on target cells. Likewise, NKG2D is also expressed on NK cells,  $\gamma\delta$  T cells, and CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells, which recognize MICA and MICB ligands on stressed cells (30).

The second group of NK cell receptors corresponds to ILTs, also known as LILRs. The ILT cell surface molecules constitute a family of activating and inhibitory receptors expressed on myeloid and lymphoid cells. ILT1 (LIR7) is a receptor expressed on myeloid and lymphoid cells, but that lacks ITIMs (31). It has been reported that ILT1/LIR7 activates human eosinophils and basophils (32, 33). ILT7 is a similar activating receptor that has been proposed as a marker for plasmacytoid dendritic cells (34, 35). ILT1 and ILT7 are associated with the Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  adaptor molecule in their cytoplasmic tails (31, 34). Regarding other members of this family, ILT2 (LIR1), ILT3, ILT4 (LIR2), and ILT5 are all polymorphic inhibitory receptors containing ITIMs in their cytoplasmic tails (36). ILT2 is expressed on NK cells, dendritic cells, and all T cells (37), whereas ILT4 is found mainly in monocytes (38). ILT2 and ILT4 bind preferentially to the nonclassic MHC molecule HLA-G, with a higher affinity than to classic MHC-I, suggesting that these molecules can regulate the immune response in the maternal-fetal interface (38-40). ILT3 is a receptor expressed on dendritic cells, monocytes, and endothelial cells (41). It has been reported that ILT3 expression on endothelial cells is induced by interleukin (IL)-10 and interferon (IFN)- $\alpha$  (42, 43). ILT6 is a receptor with scarce polymorphism (44) that activates T cell proliferation when produced by macrophages in a soluble form (45). Other receptors have also been identified, including ILT8, ILT9, and ILT10, but their functions are still unknown (46, 47).

Concerning KIRs, these molecules possess a characteristic structure of immunoglobulin domains in the extracellular region. They have also a cytoplasmic tail that determines their biological function (48). Long cytoplasmic domains contain ITIM groups that cause inhibitory effects, while short domains are activators and contain a lysine residue comparable to those from the NKG2 activator group to which DAP is linked. KIR molecules are denominated either short (S) or long (L), for example KIR3DL, based on the extracellular domain number and the length of the cytoplasmic domain. Classic and non-classic MHC-I molecules are KIR ligands, such as HLA-G and HLA-Cw3, which are recognized by KIR2DL4 and KIR2DL2, respectively (6, 40).

In spite that CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells differ in the target cell-recognition and activation mode, their effector functions are carried out in the same way (Figure 1). A final consequence from cytotoxic activity is target cell death. However, the exact nature of how cell death occurs is very important, since this determines the amount of damage

inflicted upon neighboring cells. Cell death can be caused by either necrosis or apoptosis.

**Necrosis:** In this process, cells undergo irreversible morphological changes that take place in a fast and disorderly manner. A large number of intracellular components are released into the intercellular space due to cell burst. Necrosis causes damage to the surrounding tissue because it promotes an inflammatory process (49).

**Apoptosis:** Cells also undergo morphological changes, but these take place in a programmed and controlled fashion. Initially, there is a limited chemical alteration on the apoptotic cell membrane, followed by nuclear chromatin condensation, cytoplasmic shrinking, dilated endoplasmic reticulum and, finally, a packaging of intracellular contents into cell bladders denominated "apoptotic bodies". These apoptotic bodies are then phagocytosed by surrounding phagocytes, thus preventing the release of the cytoplasmic content to the outside. Hence, the development of an inflammatory response and damage to the neighboring cells are avoided (49, 50).

Apoptosis can be induced by three pathways: a) granule-dependent exocytosis pathway, b) Fas-FasL intercellular linkage-mediated pathway, and c) cross-linking of TNF and TNFR type I.

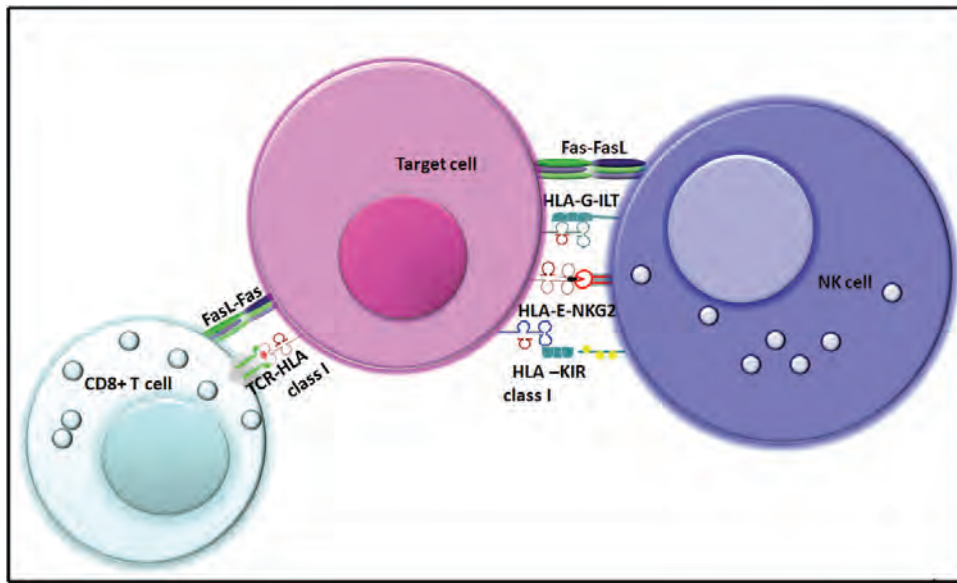
## Granule-dependent exocytosis pathway

This pathway is established through intracellular signaling after target cell recognition by a cytotoxic lymphocyte (NK or cytotoxic T cell). In exocytosis or degranulation, there is microtubules mobilization that leads the preformed granules or lysosomes of the cytotoxic cell towards the point of contact with the target cell, releasing stored lytic molecules (51, 52). Degranulation can be detected by exposure of the lysosomal-membrane-associated glycoproteins, CD107a, CD107b, and CD63, on the lymphocyte surface (53). These molecules are found in the granule-membrane inner surface and are exposed onto the lymphocyte surface through degranulation (53-55). It has been suggested that lysosomal-membrane-associated glycoproteins and the soluble protein cathepsin-B play an important role in avoiding lymphocyte self-destruction. The lytic granule contains a proteoglycan matrix that maintains protease enzymes in an inactive stage (56). The lytic granules mature through an hMunc13-4-dependent maturation process that is required to efficiently release lytic molecules on the target cell (57). The lytic molecules stored in granules that induce apoptosis are perforin, granzymes (Grzs), and granulysin.

### Perforin

The importance of this molecule has been evaluated in animal models or human disease observations. Mice with perforin deficiency develop spontaneous lymphoma (58) and, in patients with familial hemaphagocytic lymphohistiocytosis, a mutation in the perforin gene causes evident diminution of their immune response to infections by intracellular pathogens (59).



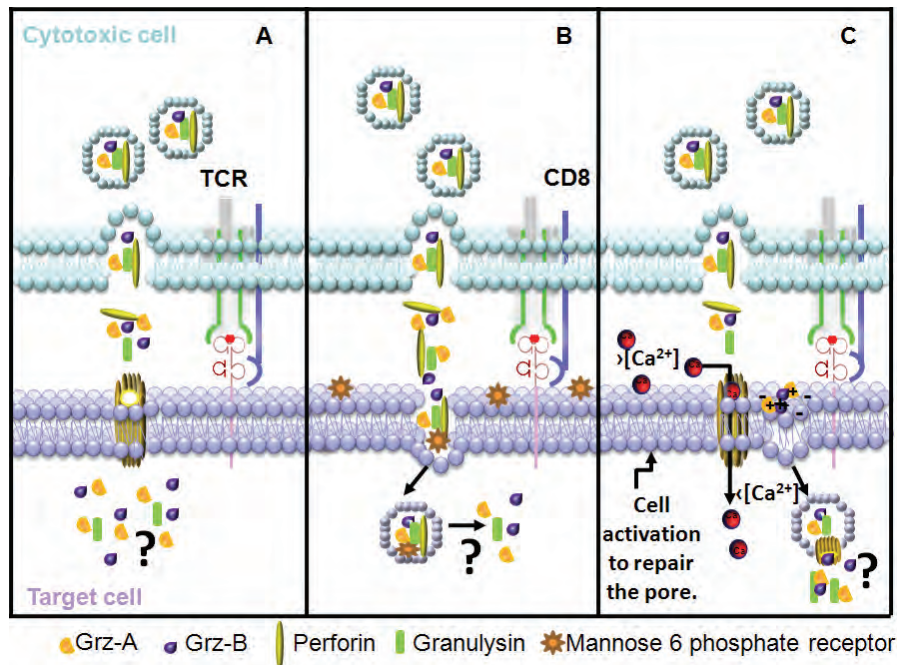


**Figure 1. CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells recognize the target cell through different receptors.** Although both cytotoxic cells act upon target cells inducing apoptosis, the mechanism of lymphocytes mediated-cell recognition is different. NK cells kill target cells in an antigen-nonspecific manner regulated by a wide range of inhibitory and activating surface receptors. In contrast, CD8<sup>+</sup> T cells destroy target cells by recognition of HLA class I restricted peptide antigen. Fas molecule is expressed on target cells, whereas FasL molecule is expressed on cytotoxic cells. TCR, T cell receptor; ILT, immunoglobulin-like transcripts; NKG2, NK cell group 2 transmembrane receptors; KIR, killer immunoglobulin-like receptor.

Despite to be the first protein isolated from lytic granules, perforin has caused controversies because its structure, action mechanism, and synergism with other molecules are unclear (60). Structurally, perforin has an N-terminal domain with lytic ability, and then a region of 150 amino acid residues whose function remains unknown (61). In the middle of perforin there is an  $\alpha$ -helix amphipathic domain that regulates its transmembranal insertion and confers the stability required to form pores upon the target cell membrane (62). Finally, it has a C-terminal domain, this region is able to make catenary's interactions of calcium-dependent membrane binding (63). The second domain of the latter region is essential for the binding between cell membrane and perforin; at the end of the 20 amino acid residues, there is a signal sequence for N-glycosydic linkage and a breaking site considered important for perforin activation (64).

Perforin is found in a soluble monomer shape within granules and, after the cytotoxic-cell/target-cell junction, perforin is released by exocytosis (54). Once it is anchored, perforin begins the polymerization in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  to form cylindrical pores with an internal diameter of 5 to 20 nm (63, 65, 66). The perforin pores can serve as passive conductos of granzymes and granulysin through the target cell membrane and could also allow an ionic exchange, which causes an osmotic unbalance and in consequence, the cell death (Figure 2A) (65). However, in spite of this being the most accepted hypothesis, there is little experimental evidence to support it. The controversy lies in the mechanism and function of perforin. Motyka et al. have shown that in the

absence of perforin, granzyme (Grz)-B is introduced into the target cell because granzyme forms a complex with the mannose-6-phosphate receptor independently from cations. Subsequently, the complex is internalized by endocytosis. Once inside the cell, the granzymes and granulysin are released favoring interaction with their substrate to induce apoptosis (Figure 2B) (67). However, Trapani et al. suggest that the mannose receptor is not necessary for the entry of Grz-B into the target cell (68). Keefe D et al. showed evidence that Grzs adhere to the cell surface by electrostatic linkage, whereas the perforin pore induces  $\text{Ca}^{2+}$  flow from the extracellular towards the intracellular environment (69).  $\text{Ca}^{2+}$  entrance causes activation in the target cell, which attempts to amend the pore in the cell membrane to avoid necrosis (69). In consequence, the Grzs are internalized together with perforin and are released in the cytoplasm of the target cell (Figure 2C). However, the presence of perforin is required to induce apoptosis (70). The evidence indicates that perhaps perforin is not essential for the entrance of proteases into the target cell, but it is required for cytolysis. In different proposed models, the function of perforin is not elucidated, and has been limited to cell surface, or to endosome membrane, or both. The query remains about how granzymes are released from the endosome (whether they are internalized by endocytosis) because their dimensions and molecular structure would prevent their passing through the perforin pore. It could be speculated at least a chemical or physical factor (pH, other proteins, etc.) originated from the intracellular trade, might be altering the structure and/or the size of either the Grzs or the pore (Figure 2).



**Figure 2. Three proposed models for internalization of lytic molecules.** (A) Perforin polymerizes on the target cell membrane forming a pore through which granzymes (Grz)-A, -B, and granulysin enter to induce apoptosis. (B) The target cell membrane expresses mannose-6-phosphate receptor that forms a complex with Grz-B, which is then internalized together with Grz-A and granulysin inside vesicles and released by pore-forming perforin into the cytoplasm, where these molecules exert their function. (C) The pore formed by perforin allows the entry of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  activating the target cell, which attempts to repair the damage and endocytoses the membrane region together with lytic molecules adhered by electrostatic linkages. TCR, T cell receptor; red sphere,  $\text{Ca}^{2+}$  ions;  $> [\text{Ca}^{2+}]$ , high concentration of calcium ions;  $< [\text{Ca}^{2+}]$ , low concentration of calcium ions.

Concentration of the perforin released at the contact site between the cytotoxic effector cell and the target cell is still unknown. For functional studies on the role of perforin, dose-response assays are needed, which, in consequence could help to determine its optimal concentration for future experiments. At the sublytic concentration of perforin, a 10% necrotic cell death is observed, and the range varies from 50 to 500 ng/ml. At a lower concentration, the granzymes are not released, whereas, at a higher concentration, perforin causes necrosis on most cells. Perforin is an unstable molecule; therefore, the amounts vary according to the cytotoxic cell population (69, 71).

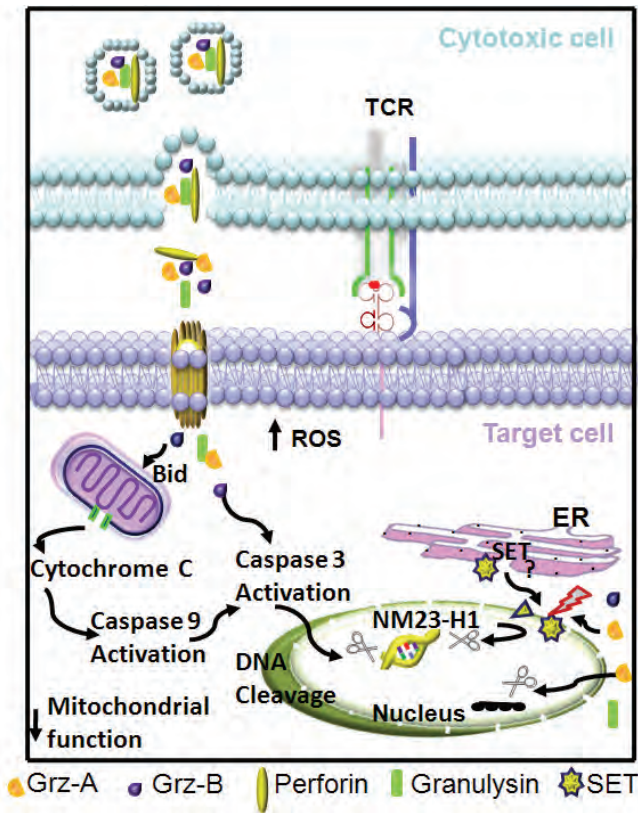
### Granzymes

Granzymes are soluble proteins of a globular structure, belonging to the serine-proteases family. Grz-A and Grz-B are the most abundant within lytic granules (72). Granzymes are released as a multi-molecular complex, inducing apoptosis by caspases-independent or -dependent pathways (71). Caspases are found in cell cytoplasm as inactive precursor molecules that need to be hydrolyzed to begin their activity. According to their function, Grzs are grouped as follows: a) inflammatory, b) initiator (of stress signals), and c) effector (of apoptosis) (71, 73).

Grz-A induces caspase-independent apoptosis, activating a slow process of cell death. It cleaves single-stranded DNA,

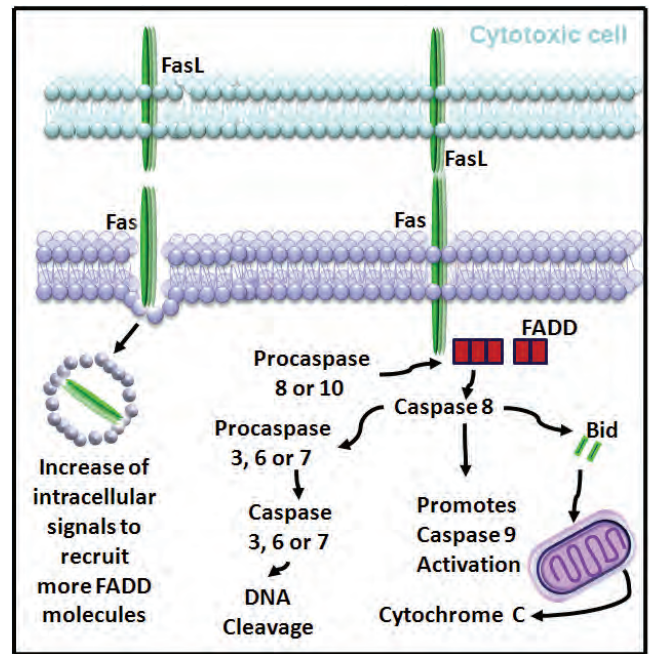
and hydrolyzes proteins containing basic amino acids such as arginine or lysine (74, 75). Grz-A activates an endoplasmic reticulum associated complex (the SET complex), which is conformed by two tumor-suppressor proteins, phosphoprotein 32 (pp32) and nonmetastatic protein 23 homologue 1 (NM23-H1), and three Grz-A substrates: oncoprotein SET, high mobility group 2 (HMG-2) protein, and apurinic endonuclease 1 (Ape1) (74, 76, 77). A characteristic of apoptosis is the increase of reactive oxygen species (ROS) and decrease of the mitochondrial membrane potential, a process that seems to play a pivotal role in the SET translocation into cell nucleus *via* mechanism that is not fully understood (Figure 3) (74, 75, 78). Once inside the cell nucleus, Grz-A cleaves SET (specific inhibitor for NM23-H1), and the cleavage of SET releases NM23-H1, which degrades chromosomal DNA (Figure 3) (74, 76). It is also postulated that Grz-A cleaves to histone 1, modifying the nucleosomal center, so chromatin is relaxed and DNA is fragmented by endonucleases (79). Extracellular activity of Grz-A has been also reported by either fragmenting the IL-1 $\beta$  pro-peptide at the Asp116 site to give rise to the active form of IL-1 $\beta$  or activating fibroblasts to secrete cytokines, such as IL-6, IL-8 and IFN- $\gamma$  (74, 76, 80, 81).

Grz-B cleaves protein substrates in the carboxyl side on acidic amino acids, especially aspartic acid; some Grz-B substrates appear in pre- or post-mitochondrial phase (71).



**Figure 3. Mechanisms by which lytic molecules act upon target cell.** Once inside the target cell, Grz-A activates an endoplasmic reticulum (ER) associated complex, which is conformed by phosphoprotein 32 (pp32), nonmetastatic protein 23 homologue 1 (NM23-H1), oncoprotein SET, high mobility group 2 (HMG-2) protein, and apurinic endonuclease 1 (Ape1). The increase of reactive oxygen species (ROS) and less of the mitochondrial membrane potential induce the translocation of the SET/NM23-H1 complex into cell nucleus by an unclear mechanism. Then, Grz-A cleaves SET, which activates NM23-H1, an endonuclease that fragments chromosomal DNA. In addition, Grz-B cleaves Bid or activates caspase 3 directly, which degrades DNA. Truncated-Bid, in turn, causes permeability of the mitochondrial outer membrane and cytochrome-C release with a diminution of mitochondrial function. Cytochrome-C induces activation of caspase 9 that enhances the apoptosis process by downstream activation of caspase 3. TCR, T cell receptor.

Grz-B can induce apoptosis rapidly through two pathways. In the first, it activates caspase 3 directly, which promotes the fragmentation of DNA, or of nuclear membrane crucial components or of the cytoskeleton (82, 83). In the second pathway, Grz-B promotes permeability of the mitochondrial outer membrane and cleaves Bid, a molecule from the Bcl-2 family (82). In turn, Bid induces cytochrome-C release from mitochondria and other apoptogenic intermembrane molecules, such as HtrA2/Omi, endoG, and AIF into the cytoplasm (84). Cytochrome-C is important to trigger the formation of apoptosomes and activation of caspase 9, which enhances caspase 3 activation, decreasing mitochondrial function and, in consequence, causing cell death (83) (Figure



**Figure 4. Apoptosis mediated by Fas-FasL pathway.** The interaction of the FasL trimer with Fas induces the trimerization of Fas-associated death domain (FADD) molecules that recruit procaspase 8 or 10. Then, procaspase 8 or 10 is activated. Increase of intracellular signaling enhances the recruitment of FADD molecules. Caspase 8 activates procaspases 3, 6 or 7, and activates Bid promoting cytochrome-C release. Caspase 8 also cleaves procaspase 9, which also becomes activated. Finally, activated caspases 3, 6, and 7, degrade chromosomal DNA leading to target cell death.

3). It has been reported that caspase 8 is activated under physiologic conditions in order to accelerate the target cell destruction (82). Some authors propose that Grz-B preferentially triggers apoptosis due to an alteration of the mitochondrial membrane rather than by the direct action of caspases (71, 73). However, it continues to be a controversial topic.

Although it has been reported that the activity from both granzymes, Grz-A and Grz-B, is dependent on cathepsin-C, Sutton et al. observed that in cathepsin-C-knockout mice, apoptosis is induced by Grz-B, pointing out that only Grz-A is cathepsin-dependent, suggesting that wild-type cytotoxic cells secrete more Grz-B for DNA fragmentation in a caspase-dependent manner (85).

Lytic granule contains also orphan granzymes, but their function is less been defined. However, these molecules are essential for cytolysis of the target cell in knockout mice. In humans, Grz-K is a trypsin-like protease that induces apoptosis by Bid-dependent mitochondrial outer membrane damage (86). Grz-H is a chymotrypsin-like protease (chymase) that seems to have synergistic functions with Grz-B (87). Grz-M is a serine protease highly expressed in NK cells, and it induces cell death without DNA fragmentation (88). Grz-M cleaves the actin-plasma membrane



linker, ezrin, and the microtubule component  $\alpha$ -tubulin, disorganizing the microtubule network (89). In mice, there are other granzymes such as C, D, E, F, G, and K; and rats have granzymes C, I, K and M, which show distinct structural and functional characteristics (90).

### **Granulysin**

As a cytolytic molecule and member of the saposin-like proteins family, granulysin is a small cationic protein encoded in the human chromosome 2 (there is no homologous molecule in the mouse). Granulysin is stored in granules from NK cells, cytotoxic T cells, helper T cells, and NKT cells; its active form weighs 9 kDa and it is expressed from 3 to 5 days after cell activation (91). Because granulysin has a structural similarity to the saposins. It has been suggested that its lytic activity occurs when its interactions, mainly with negative charges from target-cell mitochondrial membrane lipids, induce cell membrane damage (91). This mechanism induces release of cytochrome-C and decreases of mitochondrial function, which is related with the perforin-pore (92). Recently, Walch et al. showed that the granulysin-dependent cell lysis augments in the presence of perforin (93). Another mechanism by which this molecule induces cell death is through caspase-3 activation (92). The function of granulysin is not only limited to cytolysis but is also a leukocyte chemoattractant or activator at nano-molar concentrations in an inflammatory environment (94). In just micromolar concentrations, granulysin causes cellular lysis, thus this molecule plays an important role in the field of rejecting allografts (95). It has also been reported that granulysin level in blood serum is an important marker of immunological status in gastric carcinoma patients (96).

### **Fas-FasL intercellular linkage-mediated pathway**

This apoptosis pathway is important in the control of constantly stimulated T cells, and in promoting tolerance to self-antigens, aside from being a homeostatic mechanism of the cytotoxic T cell activity. In defects of this pathway, mice develop lymphoproliferative disorders, and humans develop the autoimmune lymphoproliferative syndrome, of which there are various types (Ia, Ib, II, III, and IV) depending on the site at which the mutation is found. All of these processes are controlled by one punctual mutation (97). Other pathologic disorders reflect the importance of molecules involved in this pathway; for instance, when mice *lpr* and *gdl* genes are altered (human Fas and FasL homologous), they develop proliferative disease of the renal tubule (98). Likewise, there is over-expression of Fas in infected CD4<sup>+</sup> T cells from patients with HIV (99).

Effector T cells and NK cells express FasL (CD178), whereas target cells express Fas (CD95 or Apo-1), thus these cells are susceptible to apoptosis mediated by this pathway (100, 101). Fas molecule is a cell surface protein that weighs 45 kDa. It was identified by an apoptosis-inducing antibody on human cell lines (102). Fas belongs to the tumor necrosis

factor receptor (TNFR)-I type family. It has one extracellular domain rich in cysteins that binds FasL, and another cytoplasm domain involved in death signals (103). FasL is an inductive molecule expressed on T cells, and weighs 40 kDa. It is homologous to the cytokine tumor necrosis factor (TNF), and is a member of the TNFR-II type family (102). FasL is constitutively expressed on cells of immune privileged organs, such as brain, anterior chamber of eyes, and testes. In consequence, FasL protects these privileged sites from the action of immune system cells, as an additional regulatory mechanism of self-tolerance (104). The FasL expression depends on the transcription factors level. The positive regulators are NFAT, Egr2/Egr3, NF $\kappa$ B, AP-1, c-myc SP1, and B1/Cdk1, whereas the negative regulators are c-Fos and CIITA (105-107). Some regulatory factors function by binding directly to FasL DNA, while others indirectly regulate transcription factors (107).

FasL can be expressed in three ways: the first as highly arranged trimers anchored on the cell surface membrane, it is a primary mediator of apoptosis. In the second, FasL is anchored to intracellular membrane microvesicles, where it is stored until expressed on the cell surface in response to physiological stimuli. The last corresponds to a soluble FasL, which is generated by degradation of the membranous shape (during the first minutes of expression) due to the activity of a metalloprotease matrix whose function is to catalyze the degradation of extracellular matrix proteins (108-111). The soluble FasL molecule has either pro-apoptotic or anti-apoptotic properties since soluble FasL is an inefficient homotrimer binding to Fas. When these molecules interact, the outcome is null signaling with no apoptosis. On the contrary, soluble FasL can induce apoptosis after its association or aggregation with extracellular matrix proteins. In addition, apoptosis is induced when soluble FasL forms tetramers or highly arranged structures (111). Fas/FasL pathway plays an important role in graft rejection (112), where soluble FasL can be chemotactic to neutrophils, during the acute rejection of a graft transplant (113).

Binding of Fas with FasL causes trimerization and recruitment of Fas-associated death domain (FADD) proteins through homotypic death domain interactions. In turn, trimerized FADD recruits either procaspase 8 or 10, which undergo a process of autoproteolysis to become an activated caspase (114). Assembly of these components results in the formation of a death-inducing signaling complex (DISC), which is pivotal in the receptors-dependent apoptosis (114). Caspase 8 interacts with procaspases 3, 6, or 7 and, through a process of transproteolysis, they become activated caspases. Finally, these effector caspases cleave DNA (Figure 4). Caspase 8 can also hydrolyze Bid, which causes damage to the mitochondrial outer membrane and trigger cytochrome-C release (115, 116) (Figure 4).

Besides FasL, another member of the TNFR family is the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), also known as Apo-2L (117). TRAIL has two receptors, TRAIL-R1 (death receptor 4, DR4) and TRAIL-R2 (DR5), which belong to the TNFR family too (118, 119). Once linked to TRAIL,

these receptors engage FADD proteins in their cytoplasmic portion. Then FADD proteins recruit procaspase 8 that is activated within the DISC (120, 121). Caspase 8 is able to trigger the apoptosis process either through interaction with procaspases 3, 6, 7 or Bid cleavage, as mentioned above.

It has been reported that induction of apoptosis by death receptors occurs in two modes, dependent on the cell type. Cells that die due to apoptosis accompanied by large amounts of active caspase-8 originated at the DISC are denominated type I, whereas cells wherein receptor-mediated death relies mostly on the release of pro-apoptotic factors from the mitochondria are denominated type II (122). Type I cells rapidly internalize Fas into an endosomal compartment in a clathrin-actin dependent manner (123), which is a requirement to assemble of DISC components. Thus, type I cells require Fas internalization to enhance signaling events toward the apoptosis process (124). In contrast, FasL-stimulated type II cells require amplifying the apoptosis signal through a contribution from the mitochondria (123). Recently, it has been shown that FasL-induced endocytic vesicles reach the mitochondrial compartment leading to type II cell demise (125).

Regarding TRAIL receptors, the same biological phenomenon appears to occur. Kohlhaas et al. reported that the TRAIL receptor internalization is not necessary for DISC formation and apoptosis induction (126). However, the TRAIL-induced apoptosis entails a loss of mitochondrial membrane potential (127) perhaps by caspase 8 activity. Caspase 8 can induce a loss of mitochondrial membrane potential, which promotes releasing of cytochrome-C (83, 122). The cytochrome-C is important to trigger apoptosis process in the target cell by downstream activation of caspase 3 (83, 128) (Figure 4).

One evident difference between the Fas-FasL intercellular linkage-mediated pathway and the granule-dependent exocytosis pathway is the persistent induction of apoptosis by FasL in cytotoxic T cells. The elimination of FasL from the cell surface requires 2 to 3 hours, this period permits to continue exerting cytotoxicity even in the absence of stimulus *via* TCR (129). Thus, Fas-expressing neighbor cells could be eliminated, though they did not express the specific antigen recognized by T cytotoxic cell. This explains the promiscuity of this pathway as compared to the granule-dependent pathway (130). Recently, Cunningham et al. showed that PI-9 (proteinase inhibitor 9) expression, an inhibitor of the human Grz-B, blocks cytotoxicity exerted by both the Fas-FasL pathway and the granule pathway in cell lines (131). This suggests that granzymes play an important role in the death receptor pathway or that PI-9 acts in an additional manner on caspases.

### Cross-linking of TNF and TNFR type I dependent pathway

TNF is a cytokine produced by activated cells that induces cell apoptosis, inflammatory processes, cell activation, and differentiation (132, 133). The TNF molecule can induce

receptor oligomerization increasing the ligand binding affinity (134). The receptors of TNF (TNFR) can be grouped into three classes: 1) having cytoplasmic death domains, 2) linked to adaptor molecules denominated TNF receptor associated factors (TRAFs), and 3) soluble receptors (135, 136).

In TNF-induced apoptosis by contribution of FADD molecules, initially after interaction with TNF, the TNFR undergoes multimerization to form the DISC signaling downstream through the caspase activation cascade and mitochondrial changes (137). Moreover, the TNF-TNFR complex also leads to the recruitment of TRAF molecules that signal downstream, activating the transcription factors NF- $\kappa$ B and JNK (138, 139). Chandel et al. suggest that TRAFs play an important role in regulating the increase of intracellular reactive oxygen species (ROS), and that TRAFs regulate the cellular redox status (140).

TNF-TNFR complex has also been shown to enhance NADPH oxidase activity promoting a burst of oxidative stress and leading to necrotic cell death (141, 142).

### Summary

Cytotoxicity is an activity performed by specialized cells such as NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells. NK cells show diverse receptors for the recognition of altered-cells; these receptors activate or inhibit NK cell-cytotoxicity depending on signalization by ITAM or ITIM groups in the cytoplasmic portion, respectively.

NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells, despite of acting upon target cells in the same way, inducing apoptosis, the mechanisms of lymphocytes mediated-cell recognition are different. NK cells destroy target-cells deficiently expressing molecules involved in antigen presentation, such as classic and non-classic MHC. This NK cell activity occurs independently of the presented specific antigen. In contrast, cytotoxic T cells kill target-cells processing and presenting specific antigen through MHC class I or CD1 molecules.

Apoptosis can be induced by three pathways: a) granule-dependent exocytosis pathway, b) Fas-FasL intercellular linkage-mediated pathway, and c) cross-linking of TNF and TNFR type I. In the first pathway, lytic molecules such as perforin, granzymes, and granulysin participate. However, just how these molecules access the target-cell has not been clearly elucidated so far. In the second and third pathways, Fas or TNFR receptors trimerization is required to lead intracellular signalization towards the apoptosis process.

Elucidation of the molecular mechanisms of apoptosis will allow gaining precise knowledge on the participating phenomena. On the other side, their elucidation will shed light on the biological problems involved in infectious and lymphoproliferative processes.

### References

1. Walsh KB, Lanier LL, Lane TE. NKG2D receptor signaling

- enhances cytolytic activity by virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells: evidence for a protective role in virus-induced encephalitis. *J Virol.* 2008;82:3031-3044.
2. Gullo CA, Hwang WY, Poh CK, Au M, Cow G, Teoh G. Use of ultraviolet-light irradiated multiple myeloma cells as immunogens to generate tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Immune Based Ther Vaccines.* 2008;6:2.
  3. Verhoeven DH, de Hooge AS, Mooiman EC, et al. NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Mol Immunol.* 2008;45:3917-3925.
  4. Siriani MC, Campagna M, Scaramuzzi D, et al. Control of human herpes virus type 8-associated diseases by NK cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1096:37-43.
  5. Stern M, Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood.* 2008;112:708-710.
  6. Maenaka K, Juji T, Nakayama T, et al. Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. *J Biol Chem.* 1999;274:28329-28334.
  7. Sanni TB, Masilamani M, Kabat J, Coligan JE, Borrego F. Exclusion of lipid rafts and decreased mobility of CD94/NKG2A receptors at the inhibitory NK cell synapse. *Mol Biol Cell.* 2004;15:3210-3223.
  8. Yu Y, Wang Y, Feng M. Human leukocyte antigen-G1 inhibits natural killer cytotoxicity through blocking the activating signal transduction pathway and formation of activating immunologic synapse. *Hum Immunol.* 2008;69:16-23.
  9. Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. HLA class I protein expression in the human placenta. *Early Pregnancy.* 2001;5:67-69.
  10. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285:727-729.
  11. Mescher MF, Agarwal P, Casey KA, Hammerbeck CD, Xiao Z, Curtsinger JM. Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin Immunol.* 2007;19:153-561.
  12. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:929-941.
  13. Abbey JL, O'Neill HC. Expression of T-cell receptor genes during early T-cell development. *Immunol Cell Biol.* 2008;86:166-174.
  14. Le Dréan E, Vély F, Olcese L, et al. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol.* 1998;28:264-276.
  15. Masilamani M, Nguyen C, Kabat J, Borrego F, Coligan JE. CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse. *J Immunol.* 2006;177:3590-3596.
  16. Lieto LD, Maasho K, West D, Borrego F, Coligan JE. The human CD94 gene encodes multiple, expressible transcripts including a new partner of NKG2A/B. *Genes Immun.* 2006;7:36-43.
  17. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity.* 1998;8:693-701.
  18. Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing *via* a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol.* 2003;4:557-564.
  19. Vance RE, Jamieson AM, Raulet DH. Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J Exp Med.* 1999;190:1801-1812.
  20. Wu J, Song Y, Bakker AB, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science.* 1999;285:730-732.
  21. Kim DK, Kabat J, Borrego F, Sanni TB, You CH, Coligan JE. Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Mol Immunol.* 2004;41:53-62.
  22. Arlettaz L, Villard J, de Rham C, et al. Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8<sup>+</sup> TCR αβ lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2004;34:3456-3464.
  23. Bhagat G, Naiyer AJ, Shah JG, et al. Small intestinal CD8<sup>+</sup> TCR γδ<sup>+</sup> NKG2A<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest.* 2008;118:281-293.
  24. Ortega C, Romero P, Palma A, et al. Role for NKG2-A and NKG2-C surface receptors in chronic CD4<sup>+</sup> T-cell responses. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:587-595.
  25. Ota T, Takeda K, Akiba H, et al. IFN-γ-mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2. *Blood.* 2005;106:184-192.
  26. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 1998;391:795-799.
  27. Kaiser BK, Barahmand-Pour F, Paulsene W, et al. Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol.* 2005;174:2878-2884.
  28. Kaiser BK, Pizarro JC, Kerns J, Strong RK. Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:6696-6701.
  29. Petrie EJ, Clements CS, Lin J, et al. CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *J Exp Med.* 2008;205:725-735.
  30. Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M, Cosman D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:L222-231.
  31. Nakajima H, Samaridis J, Angman L, Colonna M. Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor γ-chain. *J Immunol.* 1999;162:5-8.
  32. Tedla N, Bandeira-Melo C, Tassinari P, et al. Activation of human eosinophils through leukocyte immunoglobulin-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:1174-1179.
  33. Sloane DE, Tedla N, Awoniyi M, et al. Leukocyte immunoglobulin-like receptors: novel innate receptors for human basophil activation and inhibition. *Blood.* 2004;104:2832-2839.
  34. Cho M, Ishida K, Chen J, et al. SAGE library screening reveals ILT7 as a specific plasmacytoid dendritic cell marker that regulates type I IFN production. *Int Immunol.* 2008;20:155-164.
  35. Ju XS, Hacker C, Scherer B, et al. Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. *Gene.* 2004;331:159-164.
  36. Velten FW, Duperrier K, Bohlender J, Metharom P, Goerdts A. A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity *in vitro*. *Eur J Immunol.* 2004;34:2800-2811.
  37. Saverino D, Fabbi M, Ghiotto F, et al. The CD85/LIR-1/ILT2

- inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions. *J Immunol.* 2000;165:3742-3755.
38. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8856-8861.
  39. Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, et al. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:16412-16417.
  40. LeMaout J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J.* 2005;19:662-664.
  41. Chang CC, Silvia EA, Ho EK, Vlad G, Suci-Foca N, Vasilescu ER. Polymorphism and linkage disequilibrium of immunoglobulin like transcript 3 gene. *Hum Immunol.* 2008;69:284-290.
  42. Kim-Schulze S, Seki T, Vlad G, et al. Regulation of ILT3 gene expression by processing of precursor transcripts in human endothelial cells. *Am J Transplant.* 2006;6:76-82.
  43. Gleissner CA, Zastrow A, Klingenberg R, et al. IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. *Eur J Immunol.* 2007;37:177-192.
  44. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4778-4783.
  45. Kabalak G, Koch S, Dobberstein B, et al. Immunoglobulin-like transcripts as risk genes for autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1110:10-14.
  46. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev.* 2001;181:20-38.
  47. Torkar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol.* 1998;28:3959-3967.
  48. Presnell SR, Zhang L, Ramilo CA, Chan HW, Lutz CT. Functional redundancy of transcription factor-binding sites in the killer cell Ig-like receptor (KIR) gene promoter. *Int Immunol.* 2006;18:1221-1232.
  49. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008;44:205-221.
  50. Lu Q, Zhang Y, Hu T, Guo P, Li W, Wang X. C. elegans Rab GTPase 2 is required for the degradation of apoptotic cells. *Development.* 2008;135:1069-1080.
  51. Shen DT, Ma JS, Mather J, Vukmanovic S, Radoja S. Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8<sup>+</sup> T cells. *J Leukoc Biol.* 2006;80:827-837.
  52. Ma JS, Monu N, Shen DT, et al. Protein kinase C  $\delta$  regulates antigen receptor-induced lytic granule polarization in mouse CD8<sup>+</sup> CTL. *J Immunol.* 2007;178:7814-7821.
  53. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods.* 2003;281:65-78.
  54. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991;173:1099-1109.
  55. Chan KS, Kaur A. Flow cytometric detection of degranulation reveals phenotypic heterogeneity of degranulating CMV-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in rhesus macaques. *J Immunol Methods.* 2007;325:20-34.
  56. Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med.* 2002;196:493-503.
  57. Ménager MM, Ménasché G, Romao M, Knapnougel P, et al. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol.* 2007;8:257-267.
  58. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 2000;192:755-760.
  59. Muralitharan S, Wali YA, Dennison D, et al. Novel spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in ethnic Omani patients. *Am J Hematol.* 2007;82:1099-1102.
  60. Voskoboinik I, Trapani JA. Addressing the mysteries of perforin function. *Immunol Cell Biol.* 2006;84:66-71.
  61. Natarajan K, Cowan JA. Solution structure of a synthetic lytic peptide: the perforin amino terminus. *Chem Biol.* 1998;5:147-154.
  62. Ponting CP, Parker PJ. Extending the C2 domain family: C2s in PKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\theta$ , phospholipases, GAPS, and perforin. *Protein Sci.* 1996;5:162-166.
  63. Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, et al. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem.* 2005;280:8426-8434.
  64. Uellner R, Zvelebil MJ, Hopkins J, et al. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J.* 1997;16:7287-7296.
  65. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today.* 1995;16:194-201.
  66. Sauer H, Pratsch L, Tschopp J, Bhakdi S, Peters R. Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1063:137-146.
  67. Motyka B, Korbutt G, Pinkoski MJ, et al. Manose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell.* 2000;103:491-500.
  68. Trapani JA, Sutton VR, Thia KY, et al. A clathrin/dynamic and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol.* 2003;160:223-233.
  69. Keefe D, Shi I, Feske S, et al. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity.* 2005;23:249-262.
  70. Froelich CJ, Orth K, Turbov J, et al. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem.* 1996;271:29073-29079.
  71. Waterhouse NJ, Sedelies KA, Trapani JA. Role of bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 2006;84:72-78.
  72. Takata H, Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8<sup>+</sup> T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J Immunol.* 2006;177:4330-4340.
  73. Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med*

- Biol. 2008;615:13-23.
74. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003;112:659-672.
  75. Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5746-5751.
  76. Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, et al. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell*. 2006;23:133-142.
  77. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, et al. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem*. 2001;276:43285-43293.
  78. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005;22:355-370.
  79. Zhang D, Pasternack MS, Beresford PJ, Wagner L, Greenberg AH, Lieberman J. Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J Biol Chem*. 2001;276:3683-3690.
  80. Irmeler M, Hertig S, MacDonald HR, et al. Granzyme A is an interleukin 1  $\beta$ -converting enzyme. *J Exp Med*. 1995;181:1917-1922.
  81. Sower LE, Klimpel GR, Hanna W, Froelich CJ. Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL-6 and IL-8 production in fibroblast and epithelial cell lines. *Cell Immunol*. 1996;171:159-163.
  82. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heiben JA, et al. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem*. 2001;276:12060-12067.
  83. Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, et al. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol*. 2003;160:875-885.
  84. Waterhouse NJ, Sedelies KA, Sutton VR, et al. Functional dissociation of  $\delta$ Psim and cytochrome c release defines the contribution of mitochondria upstream of caspase activation during granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2006;13:607-618.
  85. Sutton VR, Waterhouse NJ, Browne KA, et al. Residual active granzyme B in cathepsin C-null lymphocytes is sufficient for perforin-dependent target cell apoptosis. *J Cell Biol*. 2007;176:425-433.
  86. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Fan Z. Granzyme K directly processes Bid to release cytochrome C and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *J Biol Chem*. 2007;282:12104-12111.
  87. Andrade F, Fellows E, Jenne DE, Rosen A, Young CS. Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *EMBO J*. 2007;26:2148-2157.
  88. Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, et al. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J Biol Chem*. 2004;279:22236-22242.
  89. Bovenschen N, de Koning PJ, Quadir R, et al. NK cell protease granzyme M targets  $\alpha$ -tubulin and disorganizes the microtubule network. *J Immunol*. 2008;180:8184-8191.
  90. Kaiserman D, Bird CH, Sun J, et al. The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *J Cell Biol*. 2006;175:619-630.
  91. Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U. Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes. *BMC Immunol*. 2007;8:9.
  92. Kaspar AA, Okada S, Kumar J, et al. A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol*. 2001;167:350-356.
  93. Walch M, Latinovic-Golic S, Velic A, et al. Perforin enhances the granulysin-induced lysis of listeria innocua in human dendritic cells. *BCM Immunol*. 2007;8:14.
  94. Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol*. 2005;174:5243-5248.
  95. Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K, Halloran PF. The transcriptome of human cytotoxic T cells: similarities and disparities among allostimulated CD4<sup>+</sup> CTL, CD8<sup>+</sup> CTL and NK cells. *Am J Transplant*. 2008;8:627-636.
  96. Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H, et al. Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:1322-1327.
  97. Bi LL, Pan G, Atkinson TP, et al. Dominant inhibition of fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) type Ib. *BMC Med Genet*. 2007;8:41.
  98. Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology*. 2004;127:1760-1774.
  99. Ji J, Chen JJ, Braciale VL, Cloyd MW. Apoptosis induced in HIV-1-exposed, resting CD4<sup>+</sup> T cells subsequent to signaling through homing receptors is Fas/Fas ligand-mediated. *J Leukoc Biol*. 2007;81:297-305.
  100. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med*. 2000;6:782-789.
  101. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas Ligand (CD95L). *Science*. 1998;282:1714-1717.
  102. Starling GC, Bajorath J, Emswiler J, Ledbetter JA, Aruffo A, Kiener PA. Identification of amino acid residues important for ligand binding to Fas. *J Exp Med*. 1997;185:1487-1492.
  103. Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, et al. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol*. 2005;168:1087-1098.
  104. Ramaswamy M, Siegel RM. A FAScinating receptor in self-tolerance. *Immunity*. 2007;26:545-547.
  105. Sun M, Ames KT, Suzuki I, Fink PJ. The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J Immunol*. 2006;177:1481-1491.
  106. Dzialo-Hatton R, Milbrandt J, Hockett RD Jr, Weaver CT. Differential expression of Fas ligand in Th1 and Th2 cells is regulated by early growth response gene and NF-AT family members. *J Immunol*. 2001;166:4534-4542.
  107. Gourley TS, Chang CH. Cutting edge: the class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *J Immunol*. 2001;166:2917-2921.
  108. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 2007;211:19-26.
  109. Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med*. 1999;5:90-96.
  110. Zuccato E, Blott EJ, Holt O, et al. Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and



- phosphorylation. *J Cell Sci.* 2007;120:191-199.
111. Knox PG, Milner AE, Green NK, Eliopoulos AG, Young LS. Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand. *J Immunol.* 2003;170:677-685.
  112. Miyagawa-Hayashino A, Tsuruyama T, Egawa H, et al. FasL expression in hepatic antigen-presenting cells and phagocytosis of apoptotic T cells by FasL<sup>+</sup> Kupffer cells are indicators of rejection activity in human liver allografts. *Am J Pathol.* 2007;171:1499-1508.
  113. Dupont PJ, Warrens AN. Fas ligand exerts its pro-inflammatory effects *via* neutrophil recruitment but not activation. *Immunology.* 2007;120:133-139.
  114. Carrington PE, Sandu C, Wei Y, et al. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell.* 2006;22:599-610.
  115. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94:481-490.
  116. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94:491-501.
  117. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995;3:673-682.
  118. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* 1997;276:111-113.
  119. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 1997;16:5386-5397.
  120. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* 2000;12:599-609.
  121. Muppidi JR, Lobito AA, Ramaswamy M, et al. Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006;13:1641-1650.
  122. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17:1675-1687.
  123. Algeciras-Schimmich A, Peter ME. Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells. *FEBS Lett.* 2003;546:185-188.
  124. Lee KH, Feig C, Tchikov V, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* 2006;25:1009-1023.
  125. Matarrese P, Manganelli V, Garofalo T, et al. Endosomal compartment contributes to the propagation of CD95/Fas-mediated signals in type II cells. *Biochem J.* 2008;413:467-478.
  126. Kohlhaas SL, Craxton A, Sun XM, Pinkoski MJ, Cohen GM. Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2007;282:12831-12841.
  127. Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, et al. NF $\kappa$ B activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol.* 2004;166:369-380.
  128. Vempati UD, Diaz F, Barrientos A, et al. Role of cytochrome C in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor  $\alpha$  is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome C release. *Mol Cell Biol.* 2007;27:1771-1783.
  129. Strauss G, Knape I, Melzner I, Debatin KM. Constitutive caspase activation and impaired death-inducing signaling complex formation in CD95-resistant, long-term activated antigen-specific T cells. *J Immunol.* 2003;171:1172-1182.
  130. Müllbacher A, Lobigs M, Hla RT, Tran T, Stehle T, Simon MM. Antigen-dependent release of IFN- $\gamma$  by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. *J Immunol.* 2002;169:145-150.
  131. Cunningham TD, Jiang X, Shapiro DJ. Expression of high levels of human proteinase inhibitor 9 blocks both perforin/granzyme and Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* 2007;245:32-41.
  132. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214:149-160.
  133. Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res.* 2005;15:24-27.
  134. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF $\beta$  complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.* 1993;73:431-445.
  135. Naismith JH, Devine TQ, Kohno T, Sprang SR. Structures of the extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor. *Structure.* 1996;4:1251-1262.
  136. Kelley RF, Totpal K, Lindstrom SH, et al. Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem.* 2005;280:2205-2212.
  137. Zhang X, Vallabhaneni R, Loughran PA, et al. Changes in FADD levels, distribution, and phosphorylation in TNF $\alpha$ -induced apoptosis in hepatocytes is caspase-3, caspase-8 and BID dependent. *Apoptosis.* 2008;13:983-992.
  138. Chen H, Li M, Campbell RA, et al. Interference with nuclear factor  $\kappa$ B and c-Jun NH2-terminal kinase signaling by TRAF6C small interfering RNA inhibits myeloma cell proliferation and enhances apoptosis. *Oncogene.* 2006;25:6520-6527.
  139. Manna SK, Haridas V, Aggarwal BB. Bcl-x(L) suppresses TNF-mediated apoptosis and activation of nuclear factor- $\kappa$ B, activation protein-1, and c-Jun N-terminal kinase. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20:725-735.
  140. Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2001;276:42728-42736.
  141. Byun HS, Won M, Park KA, et al. Prevention of TNF-induced necrotic cell death by rottlerin through a Nox1 NADPH oxidase. *Exp Mol Med.* 2008;40:186-195.
  142. Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu ZG. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell.* 2007;26:675-687.

## Capítulo 3. RECEPTORES TIPO *TOLL* (TLRs) EN TUBERCULOSIS

### 3.1 Introducción

Las células presentadoras de antígeno expresan diversas moléculas para reconocer patrones conservados de patógenos, una familia de estas moléculas son los receptores tipo *Toll* (TLR, por sus siglas en inglés), éstos son proteínas transmembranales cuya función está relacionada principalmente a la secreción de citocinas (72).

En el contexto de la infección por *Mtb* se demostró la importancia del TLR2 que reconoce a LAM (Lipoarabinomanana), glicolípido abundante en la pared celular de las micobacterias (73) y TLR4 que, aunque se asocia a lipopolisacárido, también se ha descrito puede reconocer peptidoglicano, importante componente de la pared celular de las micobacterias (74,75).

En el caso de TLR4 existe controversia en cuanto a su participación, por un lado Branger J y colaboradores reportan que ratones deficientes de TLR4 son más susceptibles a enfermar de TB (76). Sin embargo, Shim TS y colaboradores informan que en modelo murino, TLR4 no tiene un papel relevante en la protección a *Mtb* (77). Evidencia experimental ha mostrado que TLR4 es inductor de autofagia, proceso que disminuye la viabilidad bacteriana intracelular, debido a la liberación de conjugados ubiquitinados a los lisosomas, lo que incrementa la capacidad bactericida en este compartimento celular (78,79).

La participación de TLR2 en infecciones micobacterianas es más consistente. En 2005, Roura-Mir C y colaboradores (80) describieron que lípidos polares de *Mtb*

inducen la sobreexpresión de moléculas de la familia CD1a través de TLR2, favoreciendo la presentación de antígenos de origen lipídico y activar células T específicas al antígeno (81). También se informó que TLR2 interacciona con la proteína PPE18 de Mtb que induce la producción de IL-10 en el macrófago, y así favorece una respuesta de tipo TH2 (82).

En los últimos años, en modelos in vitro, se ha demostrado que TLR2 puede inducir la muerte de macrófagos infectados por Mtb. Inicialmente se demostró que el lipopéptido sintético Pam3CSK4 induce apoptosis vía TLR2 en la línea de monocitos humanos THP-1 (83), y que en esta vía participan las moléculas MyD88 y los dominios de muerte asociados a Fas (FADD, por sus siglas en inglés), así como caspasa 8 y hay producción de IL-1- $\beta$  (84). En la infección por Mtb, se ha demostrado que cuando interacciona la fracción peptídica de la lipoproteína de 19kDa de Mtb con TLR2 induce apoptosis de macrófagos diferenciados de la línea celular THP-1. Esta vía es dependiente de caspasa 8 pero no de caspasa 9, implicando que la interacción 19kDa/TLR2 lleva a una muerte celular sin daño mitocondrial (85). Posteriormente, Ciaramella A y colaboradores (86) demuestran que la interacción 19kDa/TLR2 es la señal principal para iniciar apoptosis y liberación de IL-1  $\beta$  en estados tempranos de la infección de macrófagos derivados de monocitos humanos de individuos sanos. De manera más reciente, Sánchez A y colaboradores (87) mostraron que el antígeno lipoproteico de 38 kDa también induce apoptosis vía TLR2, en macrófagos derivados de monocitos de sujetos control, esta muerte es depende de caspasas (8 y 9), participa TNF- $\alpha$  y Fas. Cabe señalar que Esquivel-Solis H y colaboradores (88) reportaron que

macrófagos de enfermos de TBP tienen una disminución en la fosforilación del factor nuclear c-JUN (AP-1), molécula importante en la vía de señalización por TLRs (89); posiblemente esto tiene un impacto negativo en la funcionalidad de las células para controlar el crecimiento bacteriano. Con estos antecedentes consideramos que probablemente los monocitos de enfermos de TBP mueren vía TLR2 con estímulos provenientes de Mtb.

## **2.2 Antecedentes:**

En resultados previos mostramos que ocurre muerte del monocito al estar en cocultivo con linfocitos T CD8+ autólogos estimulados con Filtrado H37Rv. Esta muerte se inhibe al bloquear las moléculas HLA-ABC en células de individuos control. Sin embargo, en los monocitos de enfermos de TBP, la muerte se inhibe tanto con el bloqueo de las moléculas HLA-ABC como con el bloqueo de TLR2 (Figura 16, capítulo 2). Considerando que no hay antecedentes de que los linfocitos T CD8+ tengan un ligando para TLR2, es importante esclarecer quiénes participan en la muerte celular vía TLR2.

## **3.3 Hipótesis**

Los monocitos de enfermos de TBP mueren vía TLR2 al ser estimulados con antígenos de micobacteria en ausencia de linfocitos T CD8+

## **3.4 Objetivo general**

Evaluar la muerte de monocitos de enfermos de TBP vía TLR2

## **3.5 Objetivos particulares**

1. Identificar la expresión de las siguientes moléculas: TLR2, TLR4, Fas (CD95), CD1b, MIC-A y MIC-B, HLA-ABC, HLA-DR,DP,DQ+ a través de citometría de flujo (Inmunofluorescencia directa) en monocitos de enfermos de TBP y en sujetos control.
2. Evaluar la muerte de monocitos de enfermos de TBP y de sujetos control, mediante el bloqueo de:
  - a) Moléculas TLR2
  - b) Moléculas TLR4
3. Cuantificar la concentración de TNF- $\alpha$  mediante una técnica de ELISA en plasma de enfermos de TBP y sujetos control.
4. Identificar la presencia de pro caspasa y caspasa 8, pro caspasa y caspasa 9, citocromo c, ASK1, p38 fosforilado mediante la técnica de western blot en monocitos de enfermos de TBP y en sujetos control.

## **DISEÑO**

Se trató de un estudio de carácter prospectivo, transversal y comparativo.

## **ANALISIS ESTADISTICO**

Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5. Se analizó la distribución de las variables con la prueba Shapiro-Wilk para conocer el comportamiento de normalidad. Para comparar dos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos o una prueba *t*-student para datos paramétricos de dos muestras independientes. Para realizar la comparación de varios grupos se utilizó una prueba ANOVA seguida de una

Bonferroni. Se consideró la significancia estadística cuando la probabilidad fue menor a 5 centésimas ( $P < 0.05$ ).

## **Grupos**

Mismos que para el capítulo 2, así como los mismos criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

## **3.6 Material y métodos**

### **Obtención de células mononucleadas (CMN).**

Las CMN se obtuvieron a partir de una muestra de 30 mL de sangre periférica mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque de densidad de 1.077) provisto por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), fueron centrifugadas 350g 30 minutos a 15°C. Se recuperaron las células de la interface, 3 lavados con solución salina de fosfatos 1X a pH 7.2 (PBS), finalmente, las células se cuantificaron en una cámara de Neubauer. La viabilidad celular fue valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripan en PBS (0.4%).

### **Inmunofluorescencia directa.**

Para la inmunofluorescencia se utilizaron anticuerpos acoplados a un fluorocromo como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina con cianina 5 (PECy5), Alexa Fluor 488 y Allophycocyanin (APC). Los anticuerpos utilizados estaban dirigidos contra las siguientes moléculas y conjugados a los fluorocromos indicados: CD95-FITC, CD14-PE, CD14-FITC, TLR2-PE, TLR2-AlexaFlúor 488, TLR4-PE, CD1b-FITC, MICA/B-PE, CD80-PE, CD83-APC, CD86-PE, HLA-A,B,C-PECy5 y HLA-DR,DP,DQ-FITC. En cada experimento se utilizaron controles de

isotipo conjugados a los mismos fluorocromos FITC, PE, PECy5, Alexa Fluor 488 o APC. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD Bioscience Pharmingen (San diego, CA, USA).

Las CMN ( $2 \times 10^5$ ) se centrifugaron a 350g por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y el “botón” celular (en ~50  $\mu$ L de PBS) se resuspendió con la concentración óptima de los anticuerpos (previamente estandarizada). La células se incubaron 20 minutos a 4°C (para la reacción antígeno-anticuerpo) y se lavaron mediante la adición de 300  $\mu$ L de PBA (PBS con 0.2% Azida de Sodio y 0.2% Albúmina) y centrifugación por 5 minutos a 200g; cuando las células se analizaron horas después de la última incubación, fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de p-formaldehído al 1% en solución salina.

### **Análisis por citometría de flujo.**

Las muestras fueron analizadas en un citómetro FACS Calibur de Becton Dickinson con software Cell Quest. Se obtuvieron 10,000 células, en una gráfica de puntos de tamaño celular contra granularidad celular y se delimitó la región de monocitos. Los controles de isotipo se incluyeron para verificar que los fluorocromos utilizados no proporcionaban una fluorescencia inespecífica. Finalmente, se verificó que la región delimitada fuera positiva al menos en un 90% para la molécula CD14 (marcador fenotípico de monocitos) y así poder analizar la coexpresión de CD14 *versus* las diferentes moléculas antes mencionadas en nuestros objetivos particulares. Una vez que se analizaron las células en el citómetro, los datos fueron nuevamente analizados en el programa FlowJo (Tree

Star) versión 9.0.2 para evaluar los porcentajes de expresión de las moléculas identificadas por los anticuerpos.

### **Purificación de células CD14+.**

Como se describió previamente en material y métodos de capítulo 2.

### **Ensayos de muerte celular de monocitos**

Las células CD14+ ( $1 \times 10^5$ ) se incubaron en placas de baja adherencia de 96 pozos (Costar Inc. Lowell, MA, USA) y en medio de cultivo RPMI-160 suplementado (1 mM de piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina y 50  $\mu$ M 2-mercaptoetanol provistos por Gibco BRL, Rockville, MD; 100 IU/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml y estreptomina provistos por *In vitro*, México; y 10% de suero fetal bovino, provistos por Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, el cual fue inactivado por calor). En algunos experimentos las células CD14+ se incubaron sin presencia de estímulo antigénico durante 24 y 48 horas a 37°C en atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub>. Para evaluar la muerte celular inducida por antígeno, las células fueron estimuladas mediante 20  $\mu$ g de proteína de filtrado de sobrenadante de cultivo de 28 días, de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (Filtrado H37Rv) por 4 h a 37°C en atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> (63). En algunos pozos de la placa de cultivo se les adiciono individualmente anticuerpos bloqueadores anti-TLR2 (3 $\mu$ g), anti-TLR4 (1 $\mu$ g) o el control de isotipo 15 previos a la incubación con el Filtrado H37Rv. Para evaluar el mecanismo mediado por TLR2 se usaron ligandos sintéticos para esta molécula, provistos por InvivoGen, San Diego, CA: 5  $\mu$ g/mL de Pam3CSK4 (lipopeptido Tripalmitoylated-CysSerLys4), 5  $\mu$ g/mL de FSL-1



(dipalmitoylated-CGDPKHPKSF fibroblast-stimulating lipopeptide-1) o 5 ng/mL de LM-MS (lipomanana de *Mycobacterium smegmatis*); para estos ensayos no se bloqueo TLR2 pero se cultivaron bajo las mismas condiciones (4hs, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Al término del tiempo de cultivo, las células se recuperaron y lavaron con 300 µL de PBS centrifugando a 350g por 5 minutos a 15°C. Se descartó el sobrenadante y al “botón” celular se le agregó 3µl de 7-AAD 20 minutos a 4°C en oscuridad, se realizó un lavado con PBS, el “botón” celular fue resuspendido en 250 µL de FACS Flow para ser adquiridas mediante citometría de flujo (62). El análisis de porcentaje (%) de muerte específica a antígeno o específica a tiempo se obtuvo a través del cálculo previamente descrito en el capítulo 2.

### **Western blot**

Para el análisis por western blot realizamos el ensayo de muerte celular de monocitos en las condiciones previamente descritas y las variables fueron: monocitos sin estímulo, con estímulo de Filtrado H37Rv y con estímulo de Filtrado H37Rv bloqueando TLR2.

Después del cultivo, se recuperaron las células, el “botón” celular fue resuspendido en solución de Laemmli (Bio-Rad) con β-mercaptoetanol, las muestras fueron incubadas 10 minutos a 100°C, la proteína total fue separada en un gel SDS-PAGE. Según el peso molecular de las moléculas a identificar se realizaron geles de acrilamida-bis al 10% o al 15%. Posteriormente, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana Immobilon PVDF (Polyvinylidene fluoride, Millipore corporation). La membrana se incubó toda la noche con una solución al

1% Albúmina en PBS, posteriormente se lavó con PBS-TWEEN<sup>20</sup> 0.5% (3 veces de 10 minutos cada una), la membrana se incubó 2 horas con el anticuerpo primario, nuevamente se lavó con PBS-TWEEN 0.5%, se incubó el anticuerpo secundario acoplado a HRP (Horseradish peroxidase) 1 hora, se eliminó el exceso de anticuerpo secundario con 3 lavados de PBS-TWEEN<sup>20</sup> 0.5% (10 minutos cada lavado). La membrana se reveló mediante quimioluminiscencia (Thermo Scientific, Pierce Biotech. Rockford, IL, USA) utilizando películas Kodak Biomax MR Film (Carrestream Health Inc. Rochester, NY, USA). La densidad de las bandas de proteínas sobre la película se analizaron mediante una densitometría utilizando el software ImageJ 1.39c (<http://rsd.info.nih.gov/ij>) como fue descrito por Luke Miller (<http://www.lukemiller.or/journal/2007/08/quantifying-westernblots-without.html>).

Los anticuerpos primarios anti: caspasas 8, caspasa 9, citocromo c desnaturalizado, ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), p38 fosforilado (phospho-p38 $\alpha$ ) y MAP14-cinasa; así como los anticuerpos secundarios anti IgG conejo y anti IgG ratón acoplados a HRP (horseradish peroxidase) fueron adquiridos de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA). El anticuerpo anti GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) fue adquirido de Invitrogen Co. (Camarillo, CA, USA).

### **3.7 Estandarización**

#### **Región de células CD14+.**

A partir de una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad celular se delimitó la región de monocitos, en ésta se colocaron los cuadrantes basados en los

valores obtenidos previamente con controles de isotipo. Finalmente se confirmó que la región presentara al menos un 90 % de células CD14+.

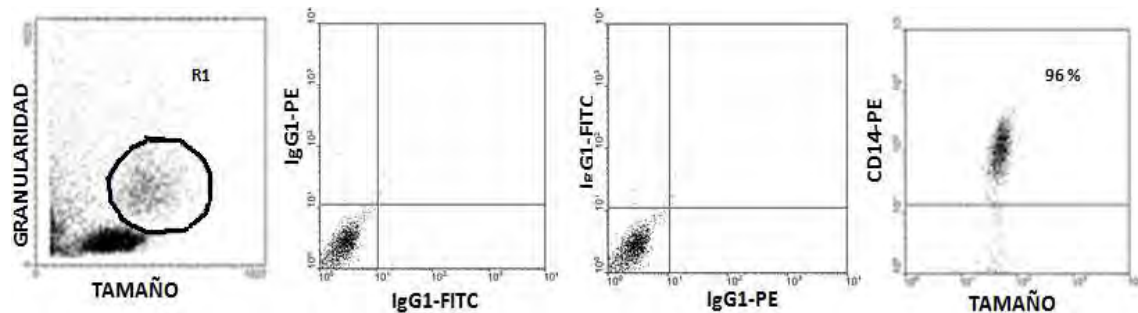


Figura 1: Región de células CD14+ con pureza mayor al 90%. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo, la región de monocitos se limita al sitio que muestre por lo menos 90% de positividad a la expresión de molécula CD14, posterior al adecuado uso de controles de isotipo.

### **Pureza de células CD14+ (monocitos).**

Después de separar las células CD14+ mediante selección positiva usando anticuerpos conjugados a perlas magnéticas, la pureza se verificó mediante citometría de flujo, tal y como se mostró en la figura 4 del capítulo 2.

### **Concentración óptima de antígenos del Filtrado H37Rv**

La concentración de antígeno, proveniente del Filtrado H37Rv, utilizada para los ensayos de muerte de células CD14+ fue 20 µg/mL, porque es la concentración que induce mayor porcentaje de muerte celular tal y como se muestra en la figura 8 del capítulo 2.

## Anticuerpos para bloquear TLR2

Para conocer la concentración óptima del anticuerpo para bloquear TLR2 primero se realizó una incubación con un anticuerpo anti-TLR2 unido a un fluorocromo (FITC), y así conocer el porcentaje basal de expresión de esta molécula en células CD14+ purificadas. Posteriormente,  $1 \times 10^5$  células CD14+ se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpo bloqueador anti-TLR2, transcurridos 15 minutos (para la reacción antígeno-anticuerpo) las células fueron lavadas con PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-TLR2 unido a un fluorocromo con lo que se identificó la concentración a la cual el anticuerpo bloqueador inhibió la mayor cantidad de expresión de estas moléculas.

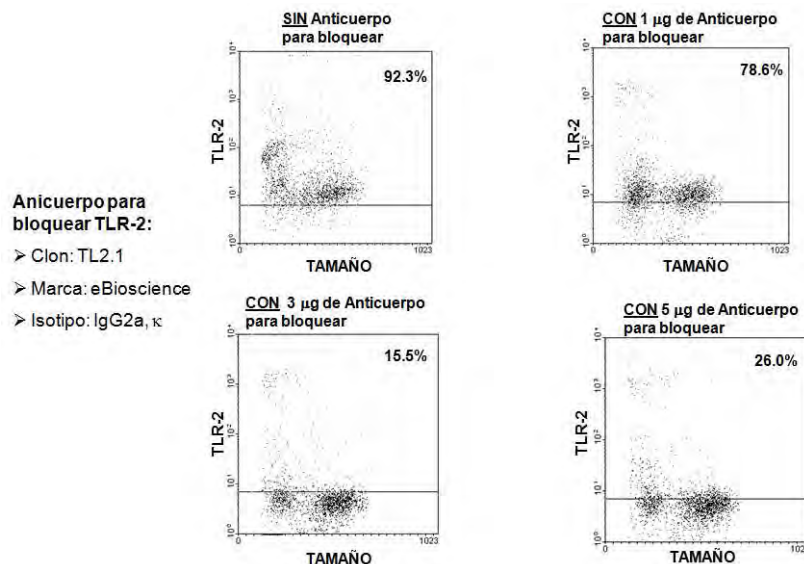


Figura 2: Con 3 µg/mL de anticuerpo bloqueador anti-TLR2 se evita en un 85% la expresión de TLR2 en células CD14+. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo, se evalúa la expresión de TLR2 unido a un fluorocromo posterior al uso de un anticuerpo para bloquear esta misma molécula.

## Anticuerpos para bloquear TLR4

Para estandarizar la concentración de anticuerpo bloqueador anti-TLR4 se siguió el mismo procedimiento que para TLR2, pero los anticuerpos utilizados eran anti-TLR4.

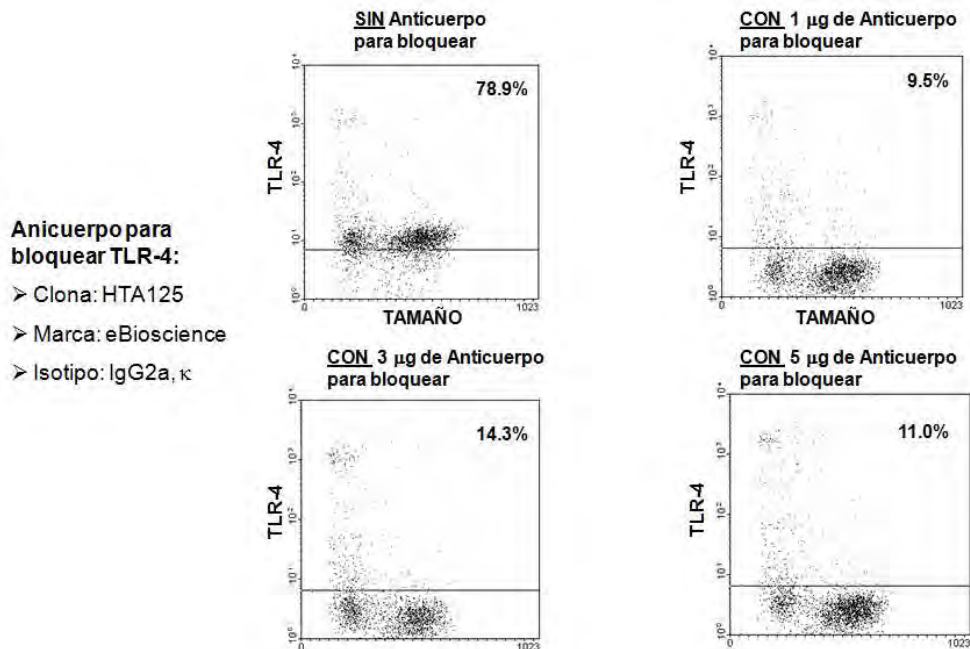


Figura 3: Con 1 µg/mL de anticuerpo bloqueador anti-TLR4 se evita en un 90% la expresión de TLR4 en células CD14+. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo, se evalúa la expresión de TLR4 unido a un fluorocromo posterior al uso de un anticuerpo para bloquear esta misma molécula.

## Ensayos con 7-AAD

El colorante 7-AAD utiliza el mismo fundamento que la mayoría de los colorantes para evaluar muerte celular. Esto es, unirse a DNA cuando la membrana celular está altamente permeable, fenómeno común en los procesos de muerte celular (90,91).

Para verificar que el colorante 7-AAD se une eficientemente al DNA de células dañadas se purificaron CMN como se describió en material y métodos;  $1 \times 10^6$  CMN se incubaron 20 minutos a  $60^\circ\text{C}$  y otra alícuota de CMN estuvo a temperatura ambiente, posteriormente se siguió el protocolo de tinción con 7-AAD como se describió en material y métodos. Nuestros datos muestran que el colorante 7-AAD se unió al DNA de células con dañadas por calor (Panel C) a diferencia de las que no fueron sometidas a calor (Panel B).

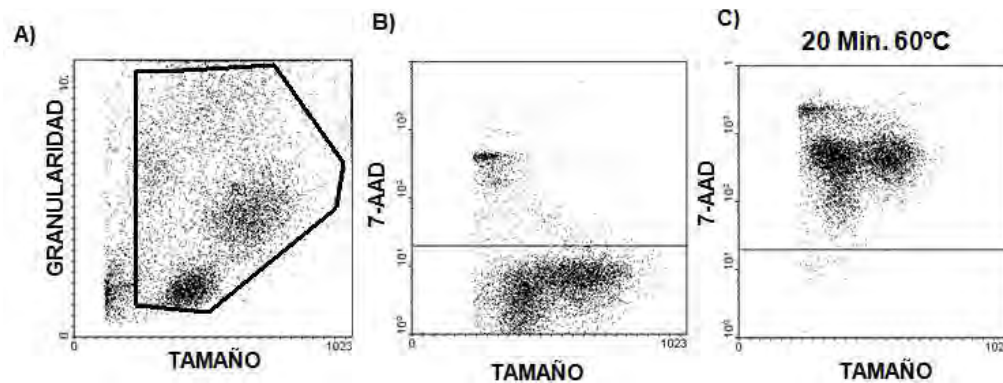


Figura 4: El 7-AAD solo tiñe el DNA cuando la célula está dañada. Gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo, las células fueron teñidas con 7-AAD sin ser sometidas a calor (panel A) y, sometidas a calor (panel C).

### 3.8 Resultados y discusión

Debido a que la expresión de la molécula CD14 es una característica de los monocitos de sangre periférica (92), decidimos evaluar en la región de células CD14+ la expresión de las moléculas mencionadas en los objetivos particulares (TLR2, TLR4, Fas (CD95), CD1b, MIC-A y MIC-B, HLA-ABC, HLA-DR, DP, DQ).

➤ **Frecuencia de células CD14+ en sangre periférica**

Los análisis fueron iniciados con la valoración de la frecuencia de células CD14+ presentes en sangre periférica.

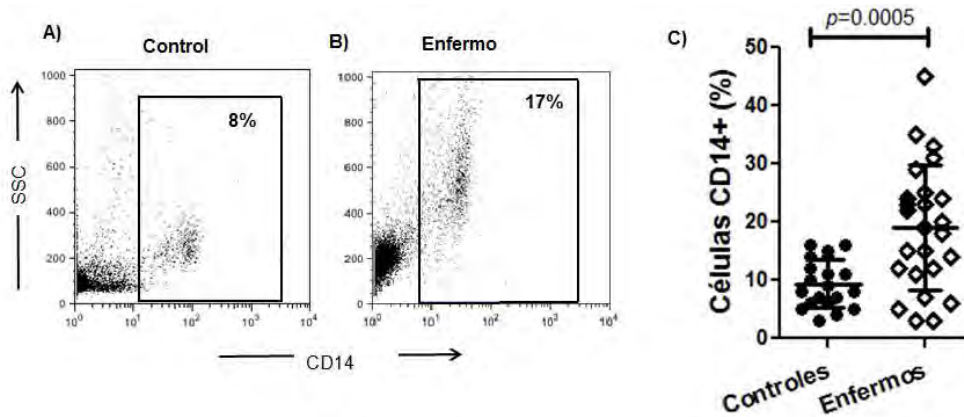


Figura 5. Enfermos de TBP tienen mayor frecuencia de células CD14+ en sangre periférica que los sujetos control. Panel A y B, gráfica de puntos representativa de un individuo sano y de un enfermo, respectivamente. Panel C muestra el porcentaje de monocitos en los grupos, de individuos control y enfermos con tuberculosis. Los datos representados son promedio  $\pm$  desviación estándar, el valor de *P* fue obtenido mediante la prueba *t* de student.

**Cuadro 1.** Frecuencia de células CD14+ en sangre periférica

Población	Sano (n=20)	Enfermo (n=26)	Valor de <i>P</i>
CD14+	9 $\pm$ 4	18 $\pm$ 11	0.0047

Nuestros datos muestran que existe un aumento significativo en la frecuencia de células CD14+ presentes en sangre periférica de los enfermos, lo que concuerda

con los datos publicados por Sánchez y colaboradores (93), ellos reportan un incremento en el porcentaje de células CD14+ en enfermos de TBP.

➤ **Expresión de TLR2 y CD14**

Debido a la importancia de TLR2 en infecciones por Mtb (80-82, 85-87) se continuó con la evaluación de la expresión de TLR2 en células CD14 provenientes de sangre periférica.

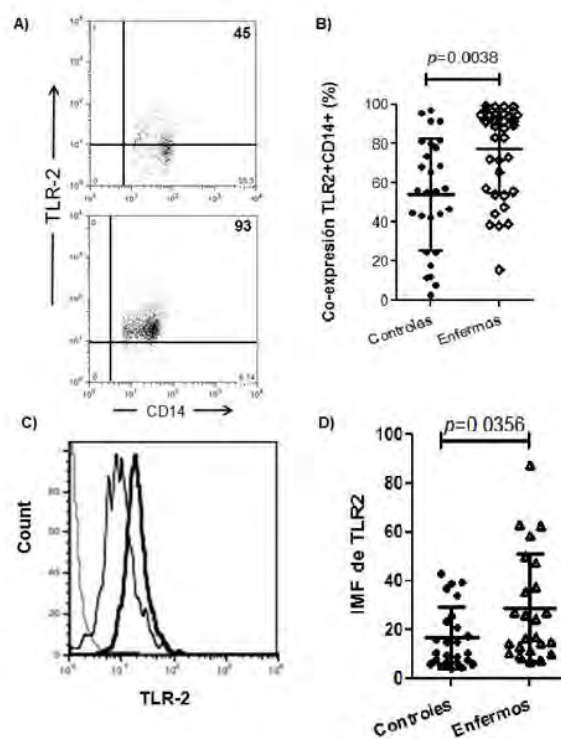


Figura 6. Monocitos de enfermos de TBP tienen mayor porcentaje y densidad de expresión TLR2. Panel A, gráfica de puntos representativa de un control (superior) y un enfermo (inferior) donde se grafica CD14 *versus* TLR2. Panel B, porcentaje de monocitos que expresan TLR2. Panel C, histograma representativo de un control (línea delgada) y un enfermo (línea gruesa). Panel D, IMF de la expresión



de TLR2 en células CD14+. Los datos representados son promedios  $\pm$  desviación estándar, el valor de  $P$  obtenido mediante la prueba *t de student*.

**Cuadro 2.** Expresión de la molécula TLR2 en células CD14+

Población	Sano (n=28)	Enfermo (n=37)	Valor de $P$
TLR2+ CD14+ (MFI)	16 $\pm$ 12	29 $\pm$ 21	0.0193
TLR2+ CD14+ (%)	54 $\pm$ 28	77 $\pm$ 22	0.0010

Nuestros resultados muestran que existe diferencia estadística significativa en el porcentaje de monocitos de sangre periférica que expresan TLR-2 ( $P < 0.05$ ), Prabha y colaboradores previamente reportaron que enfermos de tuberculosis pleural mostraban un incremento en el porcentaje de monocitos TLR2+ (94). Interesantemente, la diferencia no solo está en el porcentaje de expresión, también existe una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) en la intensidad media de fluorescencia (IMF), esto significa que los paciente con TBP tienen un mayor porcentaje de células TLR2+CD14+ y además cada monocito tiene una mayor cantidad de TLR2 en su superficie.

➤ **Expresión de TLR4 y CD14**

La participación de TLR4 en las infecciones por Mtb es menos concluyente que TLR-2 (76,77), sin embargo debido a que existen reportes que demuestran que a través de esta vía se pueden activar mecanismos de defensa frente a Mtb decidimos incluir ésta molécula en la evaluación de monocitos.

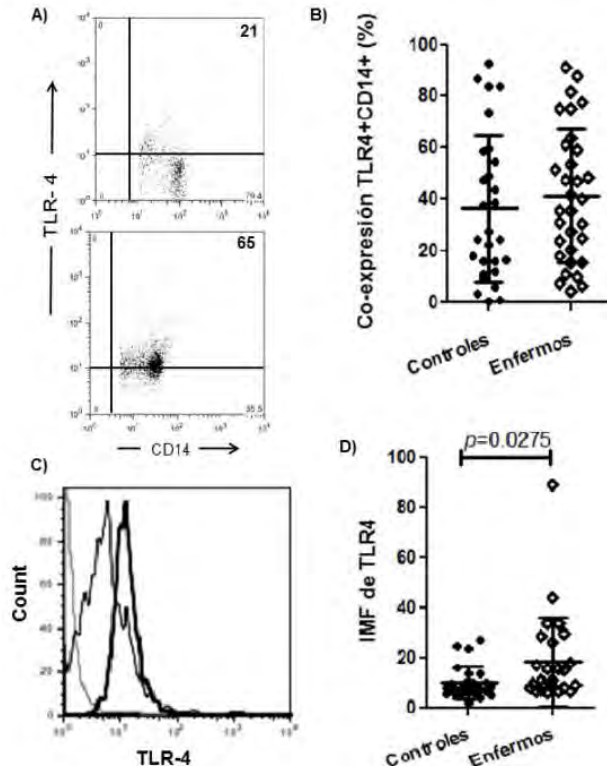


Figura 7. Monocitos de paciente con TBP tienen mayor densidad de expresión de TLR4. Panel A, gráfica de puntos representativa de un control (superior) y un enfermo (inferior) donde se grafica CD14 *versus* TLR4. Panel B, porcentaje de monocitos que expresan TLR4. Panel C, histograma representativo de un control (línea delgada) y un enfermo (línea gruesa). Panel D, IMF de la expresión de TLR4 en células CD14+. Los datos representados son promedios  $\pm$  desviación estándar, el valor de *P* obtenido mediante la prueba *t de student*.

**Cuadro 3.** Expresión de la molécula TLR4 en monocitos CD14+

Población	Sano (n=28)	Enfermo (n=32)	Valor de <i>P</i>
TLR4+CD14+ (MFI)	10 $\pm$ 6	19 $\pm$ 17	0.0128

TLR4+CD14+ (%)	36 ± 28	41 ± 25	0.4104
----------------	---------	---------	--------

Los resultados obtenidos, contrario a lo observado con la molécula TLR2, indican que existe una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) para la IMF pero no en el porcentaje ( $P > 0.05$ ) de células TLR4+CD14+. Esto significa que los enfermos de TBP al compararlo con sujetos control tienen el mismo porcentaje de células TLR4+ CD14+ en sangre periférica, pero los monocitos de paciente con TBP tienen mayor cantidad de esta molécula en su superficie.

➤ **Expresión de CD95 y CD14**

La molécula CD95 (Fas) está involucrada en la inducción de apoptosis por la vía que requiere su interacción con el ligando de Fas, este último expresado en los linfocitos T. En las infecciones por Mtb se ha descrito que el antígeno de 38 kDa induce apoptosis por una vía que es parcialmente dependiente de Fas (87).

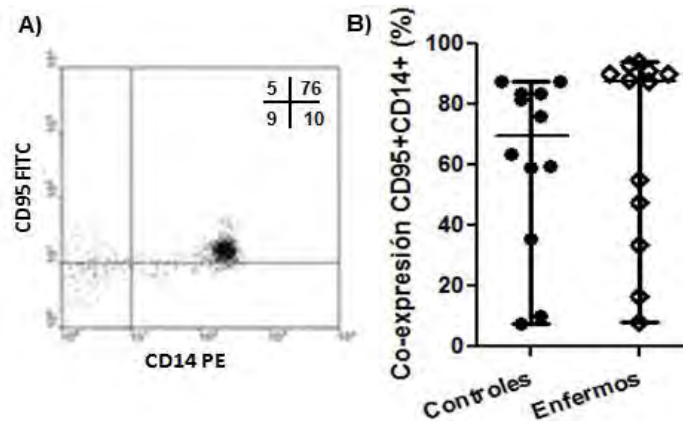


Figura 8. Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de monocitos CD95+ que los sujetos control. El panel A, gráfica de puntos representativa donde se grafica CD14 *versus* CD95. Panel B, porcentaje de monocitos que expresan CD95. Los

datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (25-75), el valor de *P* obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

**Cuadro 4.** Expresión de la molécula CD95 en monocitos CD14+

Población	Sano (n=12)	Enfermo (n=12)	Valor de <i>P</i>
CD95+CD14+	70 (41-83)	88 (37-91)	0.2364

Nuestros datos muestran que no existe diferencia estadística significativa en el porcentaje de células CD14+CD95+ en sangre periférica de enfermos de TBP cuando son comparados con sujetos control. Budak y colaboradores reportaron que enfermos de TB pleural tienen incrementados los niveles de ligando de Fas soluble pero no los niveles de Fas soluble (95), resultado que es semejante a lo que nosotros encontramos, porque ambos resultados indican que la molécula de Fas ni en su forma unida a la membrana o en su forma soluble están incrementadas.

➤ **Expresión de CD1B y CD14**

Los miembros de la familia de moléculas CD1 son importantes presentadoras de antígenos lipídicos, estos últimos son abundantes en la pared celular de las micobacterias. Algunos reportes sugieren que la expresión de la isoforma CD1B puede ser regulada por una vía de señalización dependiente de TLR2 (80), favoreciendo un mecanismo de presentación de antígeno independiente de las moléculas MHC.

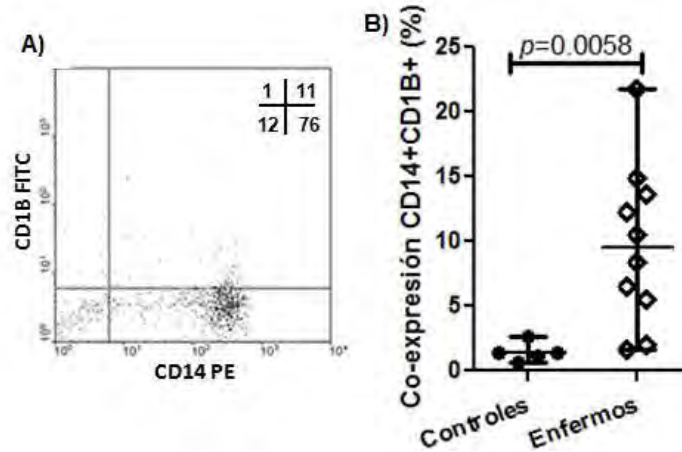


Figura 9. Enfermos de TBP tienen mayor porcentaje de monocitos CD1B+ que los sujetos control. Panel A, gráfica de puntos representativa donde se grafica CD14 *versus* CD1B. Panel B, porcentaje de monocitos que expresan CD1B. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (25-75), el valor de *P* obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

**Cuadro 5.** Expresión de la molécula CD1B en monocitos CD14+

Población	Sano (n=5)	Enfermo (n=10)	Valor de <i>P</i>
CD14+CD1B+	1 (1-2)	9 (5-14)	0.0058

Nuestros datos muestran que un pequeño porcentaje de monocitos de enfermos de TBP expresan la molécula CD1B, valor que al compararlo con los sujetos control es estadísticamente significativo. Previamente Tentori y colaboradores reportaron que la rifampicina induce un incremento de monocitos que expresan la molécula CD1B en sangre periférica (96), sin embargo nuestro resultado no se puede atribuir a dicho fármaco porque la mayoría de los enfermos aún no iniciaban el tratamiento, probablemente es simple consecuencia de la infección por Mtb

(Anexo al final del capítulo artículo publicado sobre la expresión de CD1 en enfermos de TBP).

➤ **Expresión de MIC A/B y CD14**

Las moléculas MIC A y B son importantes ligandos para la molécula NKG2D, se ha descrito que esta interacción favorece la función citotóxica por una vía independiente del TCR (30).

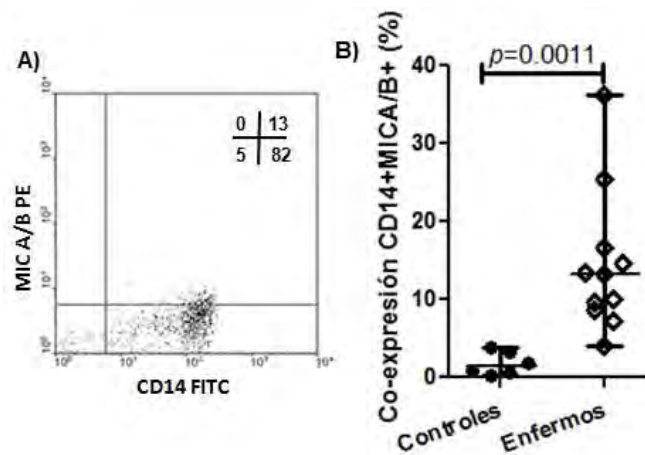


Figura 10. Enfermos de TBP tienen mayor porcentaje de monocitos MICA/B+ que los sujetos control. Panel A, gráfica de puntos representativa donde se grafica CD14 *versus* MIC A/B. Panel B, porcentaje de monocitos que expresan MIC A/B. Los datos representados son medianas ± intervalo intercuartílico (25-75), el valor de *P* obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

**Cuadro 6.** Expresión de la molécula MIC A/B en monocitos CD14+

Población	Sano (n=6)	Enfermo (n=11)	Valor de <i>P</i>
CD14+MIC A/B+	1 (1-3)	13 (9-17)	0.0011

Nuestros datos muestran que los enfermos de TBP tienen en sangre periférica un mayor porcentaje de monocitos MICA/B+, esto puede ser parcialmente consistente con lo publicado por Das y colaboradores quienes demuestran que en modelo de infección por Mtb in vitro induce la expresión de MICA en células dendríticas, las cuales interaccionan con la molécula NKG2D y así se establece una adecuada respuesta inmune innata (97).

➤ **Expresión de HLA-ABC y CD14**

La molécula HLA-I es la clásica molécula presentadora de antígeno a través de la cual reconocen los linfocitos T CD8+, las isoformas más abundantes de esta son la A, B y C. Considerando lo relevante que resulta conocer si existe alguna diferencia basal en la expresión de las moléculas HLA-I en monocitos decidimos incluir esta molécula en la caracterización de los monocitos de sangre periférica.

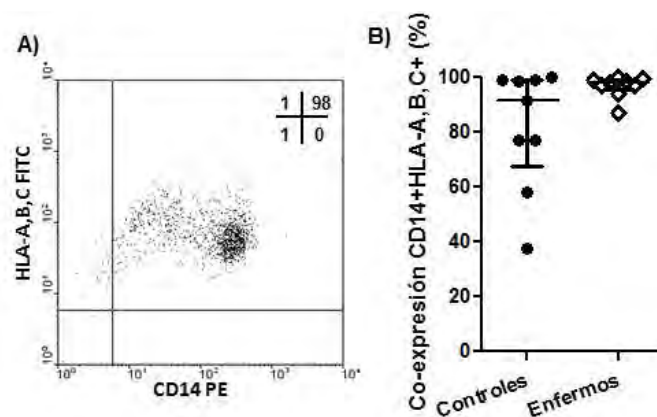


Figura 11. Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de monocitos HLA-A,B,C que los sujetos control. Panel A, gráfica de puntos representativa donde se grafica CD14 *versus* HLA-A,B,C. Panel B, porcentaje de monocitos que expresan HLA-

A,B,C. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (25-75), el valor de *P* obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

**Cuadro 7.** Expresión de la molécula HLA-A,B,C en monocitos CD14+

Población	Sano (n=9)	Enfermo (n=9)	Valor de <i>P</i>
CD14+HLA-A,B,C+	91 (68-99)	98 (95-99)	0.2973

Nuestros datos muestran que no existe diferencia en el porcentaje de células CD14+HLA-ABC+ que se encuentran en circulación en sangre periférica al comparar los enfermos de TBP *versus* sujetos control.

➤ **Expresión de HLA-DR,DP,DQ y CD14**

Las moléculas HLA-II son moléculas presentadoras de antígeno a través de las cuales reconocen los linfocitos T CD4+, los isoformas clásicas son DR, DP y DQ. Nosotros decidimos evaluar la expresión de esta molécula en los monocitos de sangre periférica porque también puede ser indicativo de que estas células se encuentren en un proceso de activación.

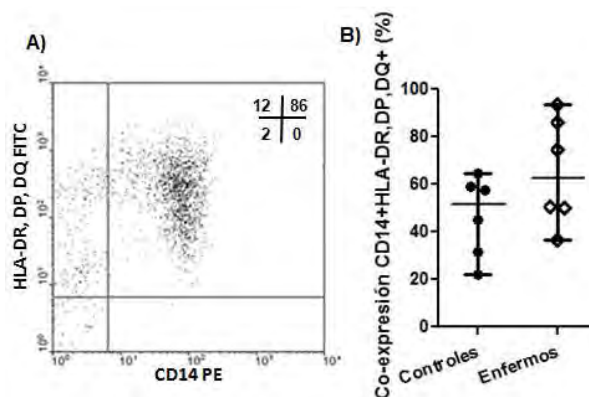




Figura 12. Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de monocitos HLA-DR,DP,DQ+ que los sujetos control. Panel A, gráfica de puntos representativa donde se grafica CD14 *versus* HLA-DP,DQ,DR. Panel B, porcentaje de monocitos que expresan HLA-DP,DQ,DR. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (25-75), el valor de *P* obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney.

**Cuadro 8.** Expresión de la molécula HLA-DP,DQ,DR en monocitos CD14+

Población	Sano (n=6)	Enfermo (n=6)	Valor de <i>P</i>
CD14+HLA-DR,DP,DQ+	51 (29-60)	62 (47-88)	0.2403

Aunque Sánchez y colaboradores publicaron que los monocitos de enfermos de TB tienen disminuida la expresión de la molécula HLA-DR (93), nuestros datos muestran que los enfermos de TBP y sujetos control tienen el mismo porcentaje de células CD14+HLA-DR,DP,DQ+ en sangre periférica, inferimos que esta disparidad de datos puede deberse a que el anticuerpo que nosotros utilizamos reconoce las 3 principales isoformas de HLA-II (DP,DR y DR) mientras que el grupo antes mencionado utilizó un anticuerpo que solo reconoce la isoforma DR.

➤ **Monocitos de enfermos de TBP muestran mayor tasa de muerte aún en ausencia de Filtrado H37Rv**

Para iniciar la evaluación de la muerte celular de los monocitos decidimos partir de la cuantificación del porcentaje de muerte celular que ocurre en los monocitos provenientes de sangre periférica sin presencia de estímulos antigénicos, dejando las células en cultivo celular durante 24 y 48 hrs en las condiciones previamente

se explica en material y métodos (37°C y 5%CO<sub>2</sub>). Para todos los ensayos de muerte celular de monocitos que realizamos en este capítulo, utilizamos el mismo cálculo que se utilizó para obtener la muerte celular específica al estímulo antigénico (capítulo 2). Así, la muerte basal no se grafica porque para realizar el cálculo del incremento de porcentaje de muerte celular, esta tiene un valor de cero (según la fórmula explicada en la sección de material y métodos).

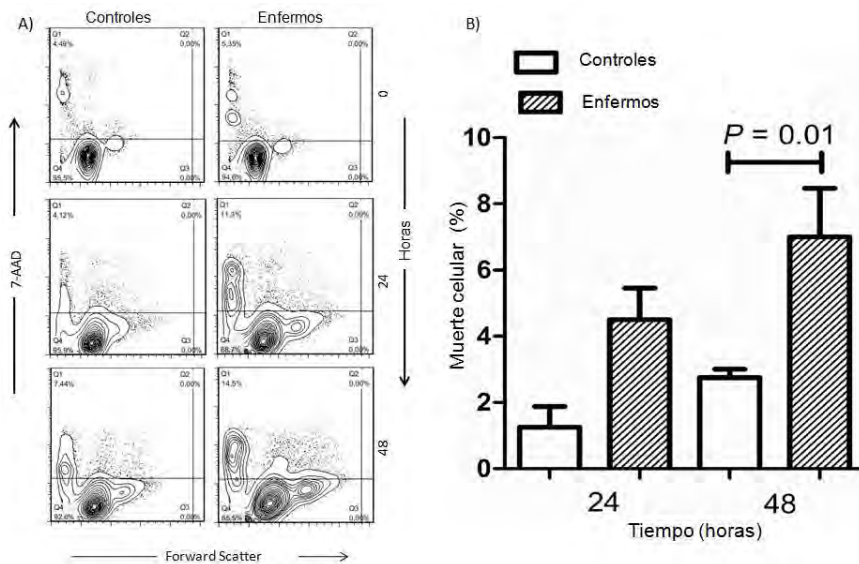


Figura 13. Monocitos de paciente con TBP mueren a mayor tasa que los de sujetos control, aún en ausencia de estímulo antigénico (n=4).

Nuestros datos indican que los monocitos de enfermos de TBP tienen un porcentaje de muerte basal de  $4.9 \pm 1.9\%$  mientras que los monocitos de sujetos control muestran  $3.4 \pm 1.0\%$ , después de 24 horas de cultivo sin presencia de estímulo la tasa de muerte celular incrementa en los enfermos de TBP, al hacer nuestro cálculo de muerte celular de 24 y 48 hrs, según nuestro cálculo explicado en material y métodos, obtenemos los porcentajes de muerte de  $4.5 \pm 1.9\%$  y  $1.2$

$\pm 1.2\%$  (enfermo y control, respectivamente) a las 24 horas. Este incremento es más evidente después de 48 horas de cultivo, obteniendo porcentajes de muerte celular de  $7.0 \pm 2.9\%$  y  $2.7 \pm 0.5\%$  (paciente y control, respectivamente), con un valor de  $P=0.01$  al comparar la tasa de muerte celular de los monocitos provenientes de controles contra la muerte de los monocitos provenientes de enfermos de TBP (Figura 13 panel B), lo que indica que los monocitos de estos enfermos mueren a mayor velocidad que los que provienen de sujetos control.

➤ **Los monocitos TLR2<sup>+</sup> TLR4<sup>+</sup> son más susceptibles a la muerte celular**

Para esclarecer si los monocitos que mueren expresan TLR2 realizamos nuevamente los cultivos de monocitos durante 24 y 48 horas, las células fueron incubadas con el colorante 7-AAD y con los anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4.

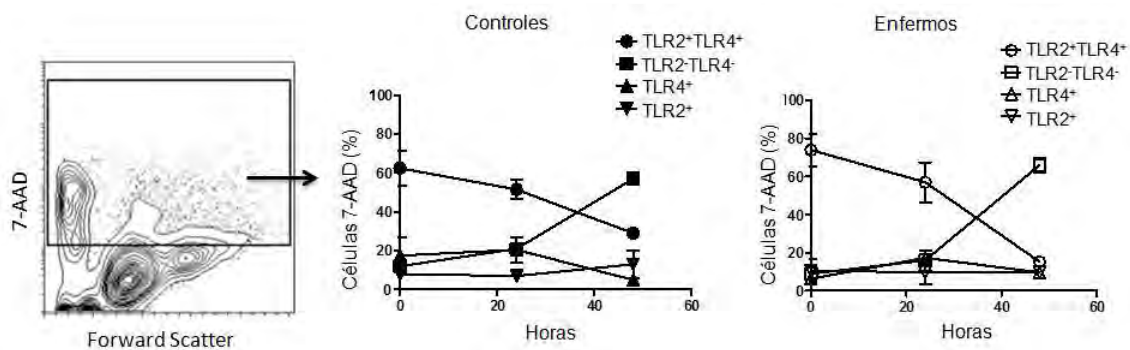


Figura 14. Monocitos TLR2<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> son más susceptibles a la muerte celular (n=3)

Estos resultados indican que los monocitos que mueren a las 0 y 24 horas son TLR<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>, mientras que los que mueren a las 48 horas son TLR2<sup>-</sup>TLR4<sup>-</sup>, la muerte celular de los monocitos simples positivos para alguna de estas moléculas se mantiene constante durante este tiempo. Estos datos también indican que son la misma población celular la que muere tanto en enfermos de TBP como en

controles, aunque cabe recordar que la cantidad de células que mueren es mayor en los enfermos que en los controles (Figura 13 panel B).

➤ **Monocitos de enfermos de TBP mueren con estímulos de Filtrado**

**H37Rv vía TLR2**

Considerando que en modelos *in vitro* se ha demostrado que antígenos de micobacterias inducen muerte de células presentadoras de antígeno y, como nuestros datos indican que los monocitos de enfermos de TBP son más susceptibles a la muerte y tienen incrementada la expresión de TLR2, decidimos evaluar si antígenos solubles de la cepa H37Rv pueden inducir muerte en monocitos de sangre periférica vía TLR2. Hemos incluido el bloqueo de las moléculas TLR2 y TLR4, porque aunque existe mayor evidencia experimental para proponer a TLR2 como molécula que activa procesos de muerte, la literatura aún es controversial en cuanto a la participación de TLR4 y considerando que el efecto de inducir muerte vía TLR se pudiera deber a alguna molécula que tuvieran en común los TLR, por ejemplo MyD88, decidimos incluir los 2 TLRs de superficie celular que bajo diferentes circunstancias han sido considerados importantes en la infección por Mtb (72, 76-78, 83-87).

Para evaluar la muerte celular dependiente de TLR2 se realizaron cultivos de monocitos, al igual que en la figura 13 la muerte basal no es graficada ya que el valor de la muerte basal sería cero. Cabe señalar que los valores de la muerte basal en estos experimentos fue de: Sujetos control 8 (intervalo intercuartílico 5-11), enfermos 11 (intervalo intercuartílico 3-12).

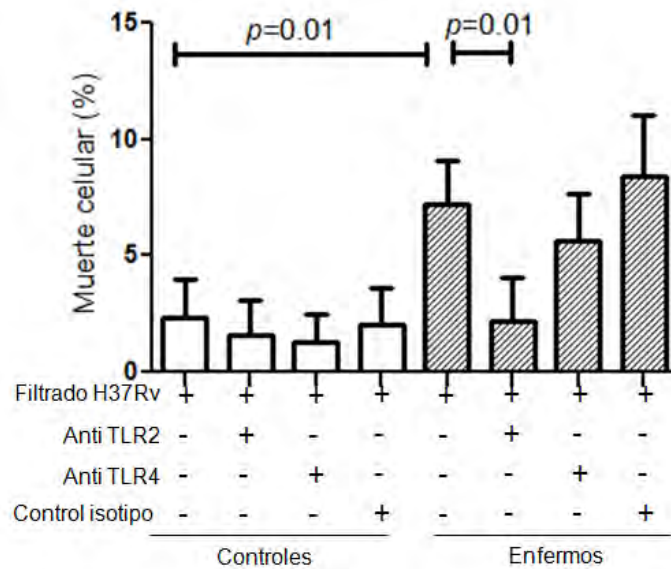


Figura 15. Monocitos de enfermos de TBP mueren vía TLR2 al ser estimulados con Filtrado H37Rv. Monocitos de enfermos de TBP mueren al ser estimulados 4 hrs con filtrado H37Rv, esta muerte se inhibe al bloquear TLR2 pero no TLR4 (n=5).

Como se observa en la figura 15, monocitos estimulados durante 4 hrs con Filtrado H37Rv, provenientes de sujetos control, no incrementa de manera significativa la muerte específica de antígeno (adicional a la muerte basal, incrementa 3 [1-4]), cuando bloqueamos TLR2 ó TLR4 prácticamente no hay ningún efecto (TLR2, 1[1-3]; TLR4, 1[0-3]). Contrario a los sujetos control, los monocitos de enfermos de TBP mostraron un incremento importante de la muerte específica de antígeno (adicional a la basal incrementa 7 [6-9]), al bloquear TLR2 la disminución de la muerte es estadísticamente significativa (2 [0-4]), mientras que al bloquear TLR4 básicamente se mantiene la muerte específica de antígeno (6 [4-7]). Nuestros resultados muestran que los monocitos de enfermos de TBP

son más sensibles a la muerte por estímulos de Mtb por una vía que depende de TLR2 de manera significativa ( $P=0.01$ ).

➤ **Evaluación de la participación de caspasa 8 y caspasa 9 en la muerte de monocitos de paciente con TBP**

Como ya mencionamos, es claro que la vía de TLR2 puede activar mecanismos de muerte celular en macrófagos derivados de monocitos humanos sanos, línea celular THP-1 o macrófagos de ratón. Sin embargo, existe discrepancia en la participación de caspasa 9 ó caspasa 8, nosotros decidimos evaluar la presencia de estas moléculas mediante western blot, y así esclarecer si la muerte celular que ocurre en los monocitos de enfermos de TBP y que es dependiente de TLR2 ocurre por la vía *extrínseca* (caspasa 8) o *intrínseca* (caspasa 9).

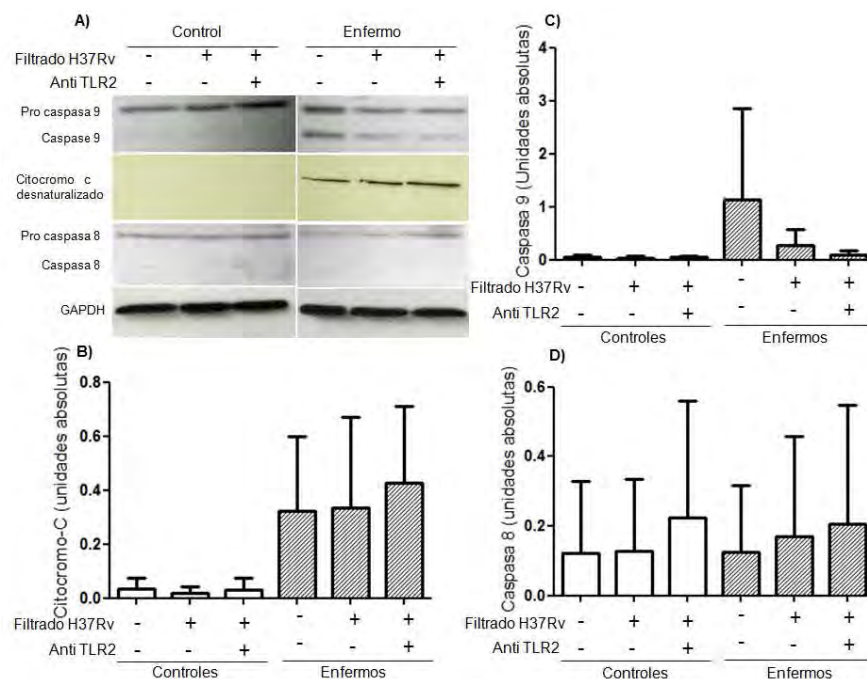


Figura 16. Monocitos de paciente con TBP son caspasa 9+, citocromo c desnaturalizado+ (n=3)

Nuestros resultados muestran que los monocitos de paciente con TBP tienen altas concentraciones de caspasa 9 y citocromo c, comparado con los provenientes de sujetos control, aún cuando estos no han sido estimulados con el filtrado de H37Rv. Aunque no hay diferencia estadística significativa, al bloquear TLR2 observamos una tendencia a disminuir la caspasa 9+ pero no disminuye el citocromo c (Figura 16 panel B y C), lo que sugiere que los monocitos de enfermos de TBP presentan daño mitocondrial. Este resultado concuerda con aquél obtenido en la figura 13, donde el porcentaje de muerte celular incrementa en los monocitos de enfermos de TBP aún en ausencia de estímulo antigénico. En relación a la caspasa 8, consideramos que esta molécula no participa en este proceso de muerte celular, al menos no en la muerte que es mediada por TLR2, porque las concentraciones de caspasa 8 son prácticamente iguales en los monocitos de enfermos de TBP *versus* sujetos control, así la presencia de esta molécula puede ser consecuencia de la muerte celular basal que ocurre en ambas poblaciones en estudio.

➤ **Evaluación de la participación de TNF- $\alpha$ , ASK1 y p-38 en la muerte de monocitos de enfermos de TBP**

Se ha demostrado en macrófagos murinos, que la infección por micobacterias induce la secreción de TNF- $\alpha$  de una manera dependiente de TLR2 y con ello se activa la vía de las MAPK cinasas (98). Posteriormente se esclareció, en modelo murino pero infectando con BCG (*Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin), las señales iniciadas por TLR2 activan la secreción de TNF- $\alpha$ , lo que a su vez incrementa los niveles de radicales libres y con ello la activación de la molécula

ASK1 (apoptosis-regulating signal kinase 1). ASK1, interacciona con la molécula TRAF6 (TNF receptor-associated factor), la cual promueve la muerte celular programada. Por lo que la vía de señalización de TLR/Radicales libres/ASK1 es importante para controlar el crecimiento intracelular de la micobacteria (99).

Con estos antecedentes, decidimos evaluar algunas de las principales moléculas de la vía de las MAPK cinasas, ASK1 y la fosforilación de p-38 (P-p38) mediante western blot, para identificar la vía de señalización que se lleva a cabo para la muerte de monocitos de enfermos de TBP.

Debido a que el TNF- $\alpha$  es una importante citocina que puede favorecer la activación de la vía de las MAPK cinasas y además se ha descrito que participa en la activación de procesos de muerte celular, también incluimos medir la concentración de ésta mediante la técnica de ELISA en el suero de nuestras poblaciones de estudio con la finalidad de esclarecer si se encuentra incrementada, lo que podría favorecer el alto grado de susceptibilidad a la muerte celular que presentan los monocitos de paciente con TBP, al parecer por un daño mitocondrial.



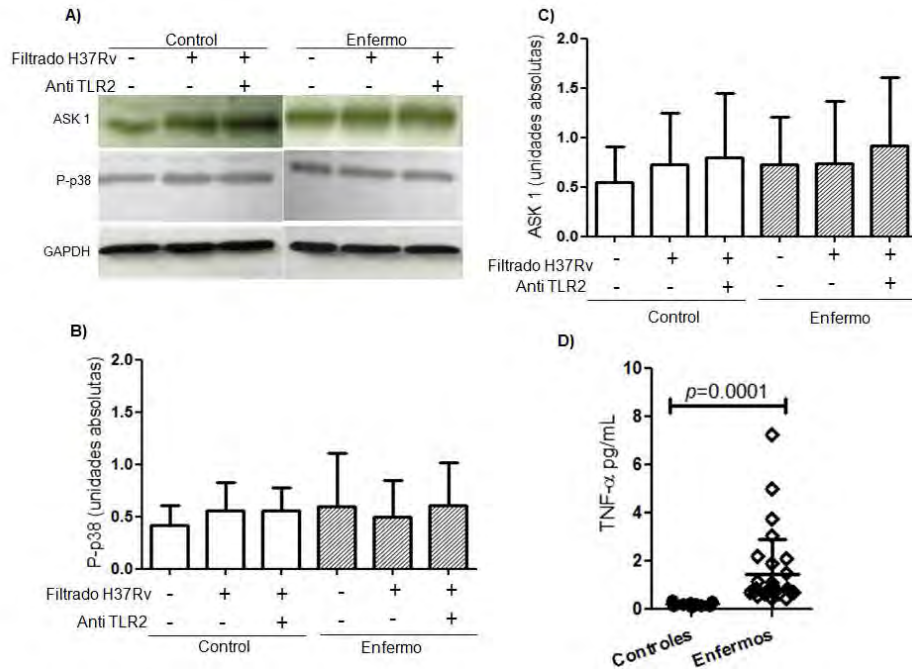


Figura 17. Monocitos de enfermos de TBP tienen altos niveles de TNF- $\alpha$  en suero pero no se incrementan molécula de la vía de las MAPK (n=3).

Nuestros datos muestran que los enfermos de TBP a diferencia de los sujetos control ( $p < 0.05$ ) tienen altas concentraciones de TNF- $\alpha$  en circulación sanguínea, lo que sugiere que sus monocitos están constantemente sometidos a estímulos mediados por esta citocina (Figura 17, panel D).

➤ **Evaluar la participación de los heterodímeros TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6 para inducir muerte celular**

Recientemente se ha demostrado que los heterodímeros que forma TLR2 son importantes porque activan diferentes mecanismos de control bacteriano, por un lado Palma C y colaboradores demostraron en macrófagos derivados de médula ósea de ratón que cuando se activa a la célula vía TLR2/TLR6 se lleva a cabo un eficiente mecanismo bactericida que depende de la vía de especies reactivas del

oxígeno (100). Por otro lado, Liu PT y colaboradores demostraron en monocitos de sujetos control que el heterodímero TLR2/TLR1 favorece un mecanismo microbicida en donde participa la defensina 4 y la citocina IL1- $\beta$ , este último importante activador del inflamosoma (101,102). Con esto, decidimos activar los heterodímeros con el uso de ligandos sintéticos para evaluar 1) si solo 1 heterodímero era el que favorecía la muerte celular o si este fenómeno era independiente de TLR1 y TLR6 y, 2) si al usar algún ligando sintético se incrementaba la presencia de caspasa 9 ya que cuando al cultivo se le adiciona Filtrado de cultivo de H37Rv éste disminuye, probablemente porque el filtrado tiene otro factor que afecta esta vía.

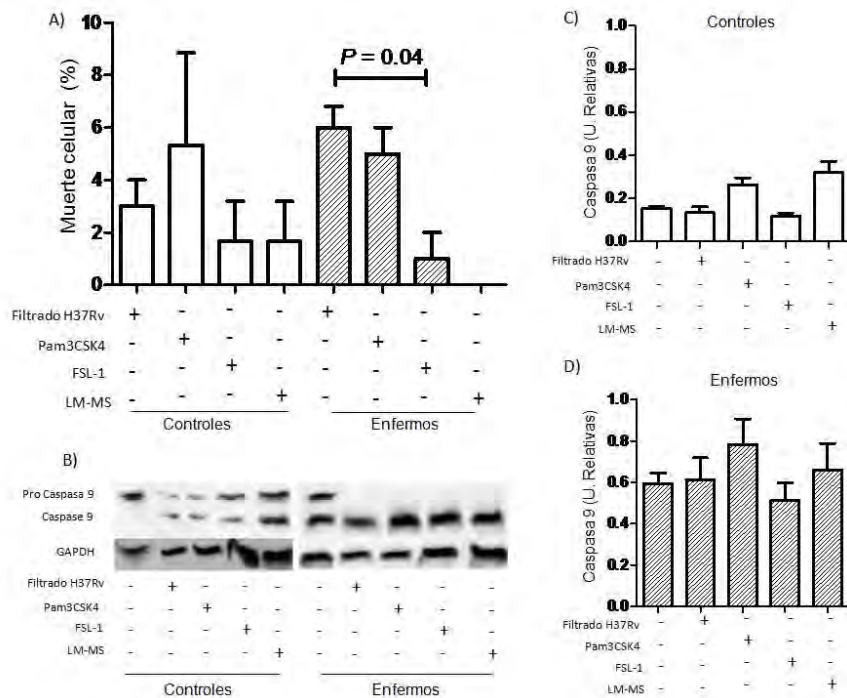


Figura 18. Ligandos sintéticos para el heterodímero TLR2/TLR1 induce muerte celular. (n=3).

Nuestros datos muestran que al activar el heterodímero TLR2/TLR1 (ligando Pam3CSK4c) se lleva a cabo el proceso de muerte celular tanto en enfermos de TBP como en los sujetos control. En el caso de los enfermos este porcentaje de muerte es prácticamente igual al inducido por el estímulo proveniente de micobacteria (Figura 18 Panel A). Aunque al parecer la muerte celular solo ocurre con el heterodímero TLR2/TLR1 los datos del western blot muestran que los controles aún presentan la pro caspasa 9 y dependiendo del ligando utilizado hay diferentes concentraciones de caspasa 9 (Figura 18 Panel B y C), pero los monocitos de enfermos de TBP muestran que el uso de cualquiera de los ligandos favorece que la procaspasa 9 se convierta su forma activa de caspasa 9 aunque el uso Pam3CSK4c incrementa ligeramente esta conversión (Figura 18 Panel B y D). Estos datos sugieren que al estimular el heterodímero TLR2/TLR1 se activa la muerte de los monocitos (Figura 18 D).

## **Conclusión**

En conjunto, nuestros datos muestran que los enfermos de TBP tienen en circulación mayor porcentaje de monocitos que expresan moléculas que pueden ayudar a la presentación de antígenos lipídicos (CD1B), quizá como un mecanismo alternativo para que linfocitos T específicos a lípidos, reconozcan células infectadas.

Los monocitos también expresan moléculas que se presentan cuando las células están bajo condiciones de estrés (MICA/B) y que son importantes para una adecuada respuesta inmune innata.

Los enfermos de TBP tienen altas concentraciones de TNF- $\alpha$  en plasma, lo que probablemente sea uno de los factores que favorece la presencia de monocitos con daño mitocondrial (caspasa 9+, citocromo c desnaturalizado+), haciéndolos más susceptibles a la muerte.

El ligando sintético para el heterodímero TLR2/TLR1 indujo la muerte celular, lo que sugiere que la muerte del monocito dependiente de la vía TLR2 es favorecida por la presencia de antígenos triacilados en el filtrado de H37Rv de Mtb.

# Monocytes from tuberculosis patients that exhibit cleaved caspase 9 and denaturalized cytochrome *c* are more susceptible to death mediated by Toll-like receptor 2

Leslie Chávez-Galán,<sup>1,2</sup> Isabel Sada-Ovalle,<sup>2</sup> Renata Baez-Saldaña,<sup>3</sup> Raúl Chávez<sup>4</sup> and Ricardo Lascurain<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Integrativa, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, <sup>3</sup>Clínica de Tuberculosis y Enfermedades Pleurales, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, and <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

## Summary

Experimental models have shown that lipoproteins from *Mycobacterium tuberculosis* induce apoptosis via Toll-like receptor 2 (TLR2) in the THP-1 cell line and in monocyte-derived macrophages from healthy volunteers. We found an increased percentage of circulating monocytes in patients with tuberculosis (TB) in comparison to healthy controls. Patients with TB showed a higher TLR2 and TLR4 expression density on monocytes, and a higher proportion of TLR2<sup>+</sup> monocytes, as well as increased serum tumour necrosis factor- $\alpha$  level. In culture, monocytes from TB patients were more susceptible to death than monocytes from healthy controls. Moreover, death-susceptible monocytes were positive to both TLR2 and TLR4 at the start of culture. Freshly obtained monocytes from TB patients exhibited cleaved caspase 9 and denaturalized cytochrome *c*. For levels of caspase 8, apoptosis-regulating signal kinase 1, and phospho-p38 mitogen-activated protein kinase there was no difference between samples from TB patients and from healthy controls. The culture filtrate antigen extract from *M. tuberculosis* H37Rv strain induced the death of monocytes from patient with TB after a 4-hr incubation, which was abrogated by neutralizing antibodies for TLR2 but not TLR4. Similarly, Pam3CSK4, a synthetic agonist triacylated ligand to TLR2, also induced the death of monocytes, although it did not increase levels of cleaved caspase 9. Our findings suggest that monocytes from TB patients are more susceptible to death, probably through mitochondrial damage, and that cell death increases in the presence of mycobacterial antigen by a TLR2-dependent pathway.

**Keywords:** apoptosis; monocytes; *Mycobacterium tuberculosis*; Toll-like receptor 2

doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03543.x

Received 22 June 2011; revised 24 November 2011; accepted 25 November 2011.

Correspondence: R. Lascurain, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 70159, 04510 Mexico City, Mexico.

Email: rlascurainl@yahoo.com.mx

Senior author: L. Chávez-Galán,

email: qclchagas@hotmail.com

## Introduction

Human tuberculosis (TB) is an infectious disease caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis*, a slow-growing pathogenic intracellular bacillus. The World Health Organization estimates 9.4 million new cases of clinical disease and 1.3 million deaths each year; consequently, TB represents a serious public health problem.<sup>1</sup> In the innate immune system response against *M. tuberculosis* infection, macrophages play an important role during the early interaction with mycobacteria.<sup>2</sup> Human and murine macrophages recognize mycobacteria via toll-like receptor (TLR) proteins, which bind different mycobacterial ligands such as lipoproteins.<sup>3</sup> The recognition of myco-

bacterial ligands by TLR2 or TLR4 causes activation of macrophages,<sup>3,4</sup> which can control intracellular growth of the bacilli by producing pro-inflammatory cytokines and activating antimicrobial effector pathways.<sup>5,6</sup> The interaction of TLR4 and TLR2 with diverse mycobacterial ligands triggers signalling that leads to activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), apoptosis-regulating signal kinase 1 (ASK1) and p47phox pathways, as well as production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes.<sup>7,8</sup> There is evidence that the synthetic bacterial lipopeptide Pam3CSK4 induces TLR2-mediated apoptosis in the human pro-monocytic THP-1 cell line.<sup>9</sup> Other studies have shown that a 19 000 molecular weight (MW) *M. tuberculosis* lipoprotein induces apoptosis in

differentiated cells of the THP-1 cell line and monocyte-derived macrophages mediated by TLR2.<sup>10,11</sup> The 19 000 MW lipoprotein-induced macrophage apoptosis is exerted through a pathway involving caspase 8, but not caspase 9.<sup>10</sup> Similarly, a 38 000 MW *M. tuberculosis* lipoprotein has been reported to be apoptogenic for human monocyte-derived macrophages through TLR2.<sup>12</sup> In that study, apoptosis was dependent on both caspase 8 and caspase 9, implicating tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and its receptors TNFR1 and TNFR2, as well as Fas ligand and its receptor Fas.<sup>12</sup> These data strongly suggest that mycobacterial antigens induce apoptosis via TLR2 in monocytes/macrophages from patients with TB. Our objective was to examine monocytes from patients with TB with respect to their percentage in peripheral blood, proportion of cell death in the absence of stimulus, percentage and density of TLR2 and TLR4 expression, evaluation of apoptosis-related molecules, and cell death through mycobacterial antigens via TLR2.

## Materials and methods

### Patients

The study population consisted of 54 patients with active TB, who were recruited from the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas in Mexico City. Diagnosis of TB was based on clinical history, physical examination, chest X-rays and identification of acid-fast bacilli in sputum. In all the cases, the diagnosis was confirmed by *M. tuberculosis* growth in sputum culture. Patients were classified as having TB class 3 category I disease, according to the American Thoracic Society.<sup>13</sup> The specific enrolment criteria were defined as adult individuals and absence of other diseases, such as multidrug-resistant TB, human immunodeficiency, pulmonary cancer or diabetes mellitus. The healthy control group consisted of 44 unrelated healthy volunteers, who had received the *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin vaccine during childhood. General data from TB patients and healthy controls are shown in Table 1. The institutional Medical Ethics Committee approved the

**Table 1.** General data from healthy controls and patients with tuberculosis

	Healthy controls ( <i>n</i> = 44)	Tuberculosis patients ( <i>n</i> = 54)
Age (years)	31 $\pm$ 7	41 $\pm$ 17
Gender		
Male	23 (52%)	29 (54%)
Female	21 (48%)	25 (46%)
Tuberculosis		
Pulmonary	–	51 (94%)
Pleural	–	3 (6%)

study and all study participants provided written informed consent.

### Antibodies and reagents

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled mouse monoclonal antibodies (mAbs) to human CD14 (clone M5E2) and HLA-DR, -DP, -DQ (clone Tü39); phycoerythrin (PE)-labelled mAbs to CD86 (clone 2331/FUN-1) and CD14 (clone M5E2); PE-Cy5-labelled mAb to HLA-A, -B, -C (clone G46-2.6); AlexaFluor 488-labelled mAb to TLR2 (TLR2/CD282) (clone 11G7); allophycocyanin-labelled mAb to CD83 (clone HB15e); FITC-, AlexaFluor 488-, allophycocyanin-labelled mAbs (clone MOPC-21), and PE-labelled mAb (clone MOPC-31C) isotype controls; purified mAb (clone G155-178) as functional assay isotype control; and 7-aminoactinomycin-D (7-AAD) staining solution were purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA). The PE-labelled mAb to TLR4 (CD284) (clone HTA125) and functional blocking purified mAbs to TLR2 (clone TL2.1) and TLR4 (clone HTA125) were acquired from eBioscience Inc. (San Diego, CA). The PE-labelled mAb to CD80 (clone 2D10) was from BioLegend (San Diego, CA). Tripalmitoylated-CysSerLys4 (Pam3CSK4) lipopeptide, dipalmitoylated-CGDPKHPKSF fibroblast-stimulating lipopeptide-1 (FSL-1), and lipomannan of *Mycobacterium smegmatis* (LM-MS) were obtained from a human and mouse TLR2 agonist kit from InvivoGen (San Diego, CA). Mouse mAbs to human caspase 8 (clone 84131.11), caspase 9 (clone LAP6) and denaturalized cytochrome *c* (clone 7H8.2C12); sheep polyclonal antibodies to human ASK1; rabbit polyclonal antibody to human phospho-p38 $\alpha$  MAP14-kinase; horseradish peroxidase-labelled goat anti-IgG rabbit and anti-IgG mouse polyclonal antibodies were acquired from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was acquired from Invitrogen Co. (Camarillo, CA). A CD14<sup>+</sup> cells positive isolation kit in a magnetic antibody cell sorting (MACS) system was acquired from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Lymphoprep (Ficoll 1.077 density) was from Axis-Shield PoC As (Oslo, Norway). RPMI-1640 culture medium, trypan blue dye, *p*-formaldehyde, BSA fraction V, SDS, Tween 20, glycine, and salt reagents were all obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Laemmli sample buffer for SDS-PAGE was acquired from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Sodium pyruvate, L-glutamine and 2-mercaptoethanol were from Gibco BRL (Rockville, MD) and penicillin/streptomycin solution was from *In Vitro* (Mexico City, Mexico). Fetal calf serum was from Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT). Culture filtrate antigen extract (CFAE) from *M. tuberculosis* H37Rv strain (ATCC 27294) was kindly provided by Dr Diana Aguilar, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubiran in Mexico City.



### Preparation of mycobacterial antigen

The CFAE from *M. tuberculosis* was obtained according to standard procedures. Briefly, bacteria were grown at 37° in Middlebrook 7H9 medium enriched with OADC (Difco Laboratories Inc., BD Diagnostic Systems, Detroit, MI) until the mid-logarithmic phase. Two rounds of filtration through 0.45-µm and 0.22-µm pore-size membranes (Millipore Corp., Billerica, MA) removed the bacillary material, the protein concentration was adjusted to 2 mg/ml and samples were stored at -20° until required.

### Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 30 ml heparinized whole blood by Ficoll density gradient centrifugation for 30 min at 500 g and 16°. After centrifugation, the interface cells were collected, washed three times in PBS (0.01 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2) and counted in a Neubauer chamber, determining cellular viability by trypan blue dye exclusion method.

### Cell surface marker staining

The percentage of CD14 expression versus CD80, CD83, CD86, HLA-A, -B, -C, HLA-DR, -DP, -DQ, TLR2, and TLR4 expression in PBMC was analysed by double or triple immunofluorescence. Briefly, PBMC were suspended in PBS containing 0.2% BSA and 0.2% sodium azide (PBS-BSA buffer) and stained with fluorescent mAbs against the respective molecules for 15 min at 4°. After incubation, cells were washed twice in PBS-BSA buffer, fixed in 1% *p*-formaldehyde in PBS, and acquired with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). In each case, 10 000 events were counted in linear mode for side scatter and log amplification for CD14 expression. Then, CD14<sup>+</sup> cells were gated and analysed by cell surface molecule expression as described above. Fluorochrome-labelled isotype-matched control mAbs were used to evaluate background staining.

### Purification of monocytes

The PBMC were suspended in PBS supplemented with 0.5% BSA and 2 mM EDTA at a concentration of 1 × 10<sup>7</sup> cells/0.1 ml and were incubated with microbeads coated with antibodies to CD14 in a MACS system. The purity percentage of CD14<sup>+</sup> cells isolated from PBMC was always ≥ 90%, as measured by flow cytometry using FITC-labelled or PE-labelled anti-human CD14 mAbs.

### Assessment of cell death

Purified CD14<sup>+</sup> cells (1 × 10<sup>5</sup>) were cultured without stimulus in 96-well flat-bottomed cell culture plates with

ultra-low attachment surface (Costar Inc., Lowell, MA) in 100 µl RPMI-1640 culture medium supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% heat-inactivated fetal calf serum for 24 and 48 hr at 37° in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Ending the culture, cells were harvested, washed in PBS, and incubated with 3 µl 7-AAD solution for 20 min at 4° in the dark. The percentage of dead cells was measured through 7-AAD staining by flow cytometry. The percentage of cell death was calculated as follows:<sup>15</sup>

$$\% \text{ death rate} = \frac{100 \times (\% \text{ cell death at 24 or 48 hr} - \% \text{ cell death at 0 hr})}{100 - \% \text{ cell death at 0 hr}}$$

In another analysis, monocytes were stimulated with either 20 µg/ml CFAE from *M. tuberculosis* strain H37Rv or agonist ligands to TLR2, 0.5 µg/ml FSL-1 or Pam3CSK4 synthetic lipopeptide, or 5 ng/ml LM-MS during 4 hr under the same conditions. To establish the optimal dose of mycobacterial protein, antigen-induced cell death experiments were also carried out over a 4-hr period using from 10 to 50 µg/ml CFAE from *M. tuberculosis*. The percentage of antigen-induced specific death was calculated in similar way to that indicated above; where % specific death = 100 × (% cell death in the presence of CFAE - % cell death in the absence of CFAE)/(100 - % cell death in the absence of CFAE).

To inhibit antigen-induced monocyte death, cells were incubated with 3 µg TLR2-blocking mAb or 1 µg TLR4-blocking mAb for 20 min before mycobacterial antigen. The optimal dose of mAb to block TLRs was obtained by staining cells with fluorescent mAb to TLR2 or TLR4 after incubating with different protein concentrations of TLR-blocking mAbs. The absence of staining on monocytes pointed out the optimal dose of TLR2 or TLR4 blocking mAb. Isotype-matched mAbs to unrelated molecules were used as experimental controls.

### Western blot

Purified CD14<sup>+</sup> cells (1 × 10<sup>5</sup>) were stimulated with mycobacterial antigen in the presence or absence of TLR2 blocking mAbs for 4 hr at 37° in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. In another analysis, cells were stimulated with agonist ligands to TLR2, Pam3CSK4, FSL-1 or LM-MS, under the same conditions. After stimulation, cells were washed once with ice-cold PBS and lysed in Laemmli sample buffer (Bio-Rad). All cellular protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred to 0.45-µm pore-size PVDF Immobilon-P membranes (Millipore Corp.) with 25 mM Tris-base (pH 8.0) containing 150 mM glycine and 20% (volume/volume)

methanol.<sup>16</sup> Membranes were blocked with 1% BSA in PBS and individually incubated with antibodies to caspase 8, caspase 9, denaturalized cytochrome *c*, ASK1 and phospho-p38 $\alpha$ . Membranes were then washed twice with 0.5% Tween-20 in PBS. Protein bands were detected by incubating with horseradish peroxidase-labelled antibodies and visualized with enhanced chemiluminescence reagent (Thermo Scientific, Pierce Biotech., Rockford, IL) using a Kodak Biomax MR Film (Carrestream Health Inc. Rochester, NY). Band densities in the film were analysed by densitometry using the IMAGEJ 1.39c software (<http://rsd.info.nih.gov/ij>) as described by Miller (<http://www.lukemiller.or/journal/2007/08/quantifying-western-blot-without.html>).

### Statistical analysis

Data were evaluated by GRAPHPAD PRISM 5 software (La Jolla, CA), using a Shapiro–Wilk test to discover population distributions. Student's *t*-test was performed for comparison of variables that were symmetrically distributed, and values are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD). To compare groups, an analysis of variance test followed by Bonferroni's multiple comparison test was performed. Differences between groups were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### Increased percentage of peripheral blood monocytes in TB patients

First, we assessed the proportion of CD14<sup>+</sup> cells in PBMC from patients with TB and in healthy control individuals. The percentage of circulating monocytes was found to be increased, there was a twofold increase in the number of

monocytes in TB patients (Fig. 1a), which showed a significant statistical difference compared with cells from healthy controls ( $18.9 \pm 10.6\%$  versus  $9.3 \pm 4.1\%$ , respectively,  $P = 0.0005$ ) (Fig. 1b). We also observed that monocytes from some TB patients exhibited a higher cell granularity than monocytes from healthy controls (Fig. 1a), which suggested a cell activation status. For this reason, we measured CD80, CD83, CD86, HLA-A, -B, -C, and HLA-DR, -DP, -DQ expression in freshly obtained monocytes, but no difference was found between study groups (Table 2). These data indicate that TB patients have an increased number of peripheral blood monocytes.

### Increased percentage and expression density of TLR2<sup>+</sup> monocytes in TB patients

We next analysed the phenotype of monocytes from TB patients, evaluating TLR2 and TLR4 expression, which has been associated with the immune response to *M. tuberculosis*.<sup>7,17</sup> An important dissimilarity was found in the TLR2 expression; the percentage of TLR2<sup>+</sup> cells in gated CD14<sup>+</sup> cells from TB patients was 1.4 times greater than in those cells from healthy controls

Table 2. Expression of activation molecules on monocytes

Molecule	Healthy controls	Tuberculosis patients
CD80	39 $\pm$ 23	27 $\pm$ 10
CD83	0.2 $\pm$ 0.005	0.3 $\pm$ 0.2
CD86	69 $\pm$ 16	71 $\pm$ 3
HLA-DR, DP, DQ	33 $\pm$ 11	46 $\pm$ 8
HLA-A, B, C	90 $\pm$ 12	91 $\pm$ 18

The numbers denote mean percentage  $\pm$  SD.

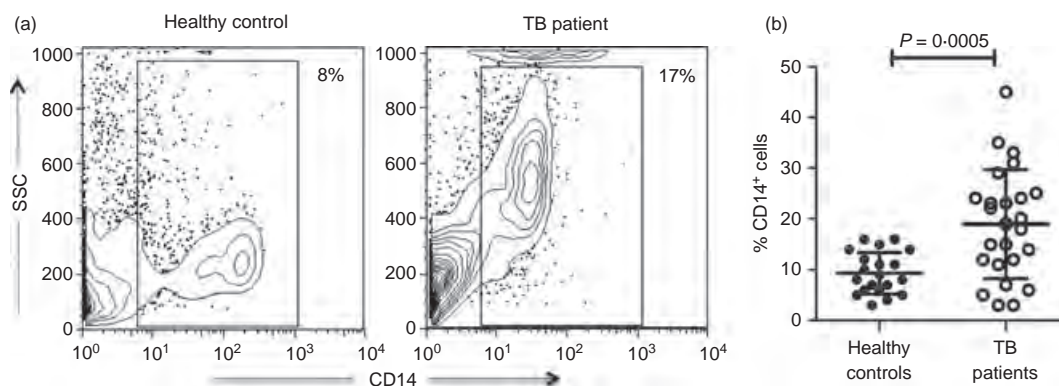
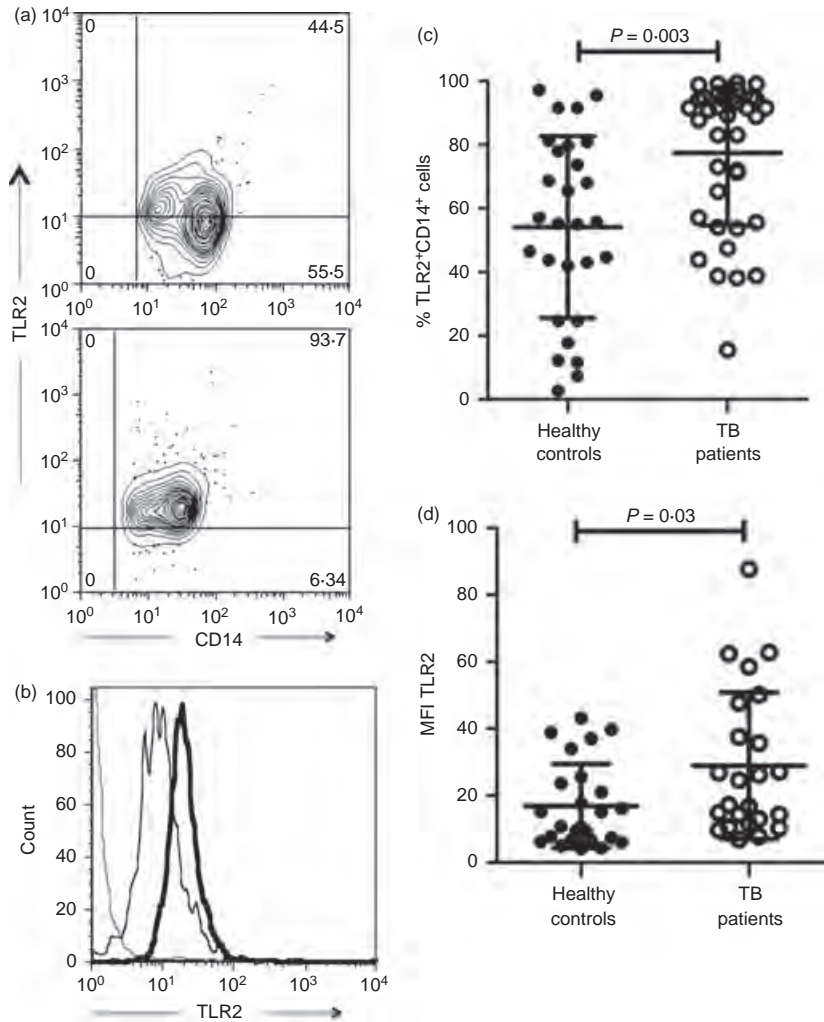


Figure 1. Cells from patients with tuberculosis (TB) show an increased percentage of monocytes. Freshly obtained peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were incubated with FITC-labelled antibodies to human CD14 and analysed by flow cytometry. (a) Representative contour plot for side scatter and CD14 expression in PBMC from healthy controls and TB patients. Percentage is shown in gated CD14<sup>+</sup> cells. (b) Proportion of CD14<sup>+</sup> cells from 41 healthy controls and 51 TB patients. The bars denote mean  $\pm$  standard deviation. The *P*-value of the difference between TB patients and healthy controls is shown.

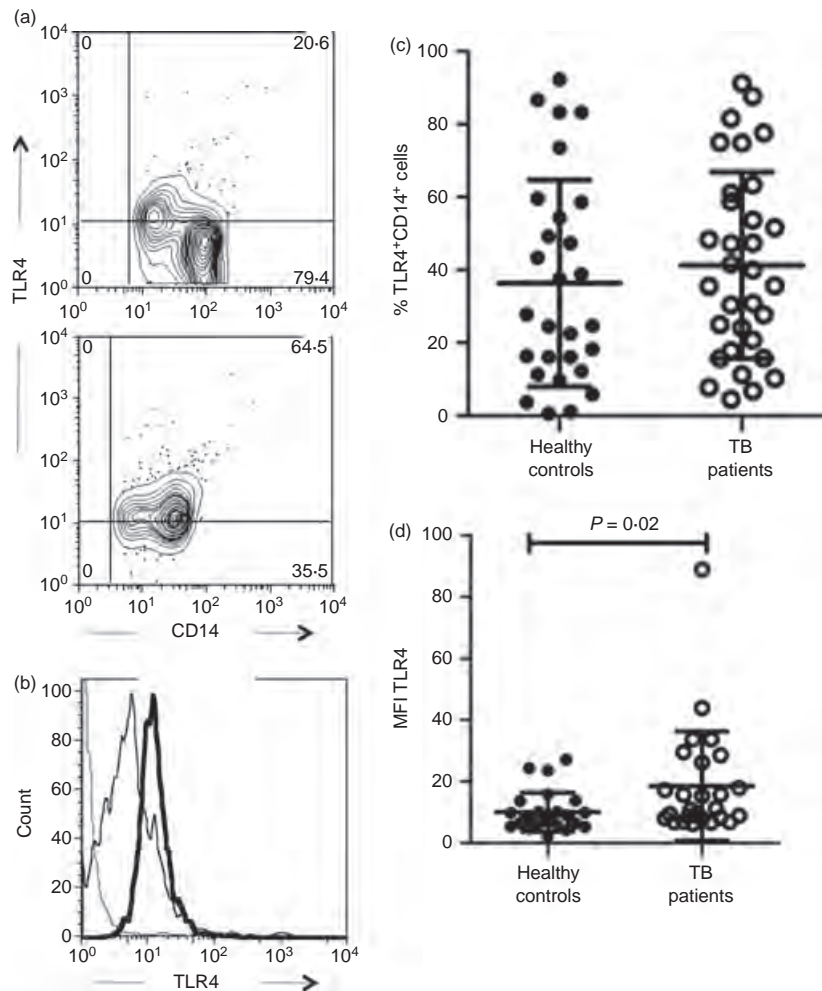




**Figure 2.** Monocytes from patients with tuberculosis (TB) display increased percentage and expression density to Toll-like receptor 2 (TLR2). Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic bead-labelled antibodies, incubated with AlexaFluor 488-labelled antibodies and analysed by flow cytometry. (a) Representative contour plot for TLR2 versus CD14 expression in cells from healthy controls (upper panel) and TB patients (lower panel). (b) Representative histogram for TLR2 expression in cells from healthy controls (thin line) and TB patients (thick line). Dotted line indicates the background level of cells incubated with isotype-matched control antibody. (c) Proportion of TLR2<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> cells from 41 healthy controls and 51 TB patients. (d) Mean fluorescence intensity (MFI) to TLR2 expression in cells from healthy control and TB patients. The bars denote mean  $\pm$  standard deviation. The *P*-value of the difference between TB patients and healthy controls is shown.

( $77.4 \pm 22.7\%$  versus  $54.1 \pm 28.5\%$ , respectively,  $P = 0.003$ ) (Fig. 2a,c). In addition, mean fluorescence intensity (MFI) to TLR2 was also higher in monocytes from TB patients in comparison to cells from healthy controls ( $28.9 \text{ MFI} \pm 21.8$  versus  $16.8 \text{ MFI} \pm 12.5$ , respectively,  $P = 0.03$ ) (Fig. 2b,d). However, there was no difference in the percentage of TLR4<sup>+</sup> monocytes between both study groups. Whereas  $41 \pm 25.6\%$  of monocytes were TLR4<sup>+</sup> in patients,  $36 \pm 28\%$  corresponded to those cells in healthy controls (Fig. 3a,c). On the contrary, as observed in Fig. 3(b,d), MFI to TLR4 exhibited an increase in monocytes from TB patients ( $19 \pm 17$ ) in comparison to cells from healthy controls ( $10 \pm 6$ ) that

was statistically significant ( $P = 0.02$ ). Interestingly, the percentage of TLR2<sup>+</sup> monocytes was 1.9-fold higher than that of TLR4<sup>+</sup> monocytes in TB patients ( $77.4 \pm 22.7\%$  versus  $41 \pm 25.6\%$ , respectively), showing a significant difference ( $P = 0.0001$ ) (Fig. 4a). Likewise, TLR2 expression was 1.5-fold higher than TLR4 expression in monocytes from TB patients ( $28.9 \text{ MFI} \pm 21.8$  versus  $19 \pm 17$ , respectively;  $P = 0.01$ ) (Fig. 4b). The data showed that patients with TB have a greater percentage of TLR2<sup>+</sup> monocytes and a greater expression density of TLR2 and TLR4 than healthy controls. In addition, TLR2 expression was higher than TLR4 expression in the cells from TB patients.



**Figure 3.** Monocytes from patients with tuberculosis (TB) show increased expression density to Toll-like receptor 4 (TLR4). Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic bead-labelled antibodies, incubated with AlexaFluor 488-labelled antibodies and analysed by flow cytometry. (a) Representative contour plot for TLR4 versus CD14 expression in cells from healthy controls (upper panel) and TB patients (lower panel). (b) Representative histogram for TLR4 expression in cells from healthy controls (thin line) and TB patients (thick line). Dotted line indicates the background level of cells incubated with isotype-matched control antibody. (c) Proportion of TLR4<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> cells from 41 healthy controls and 51 TB patients. (d) Mean fluorescence intensity (MFI) to TLR4 expression in cells from healthy controls and TB patients. The bars denote mean  $\pm$  standard deviation. The *P*-value of the difference between TB patients and healthy controls is shown.

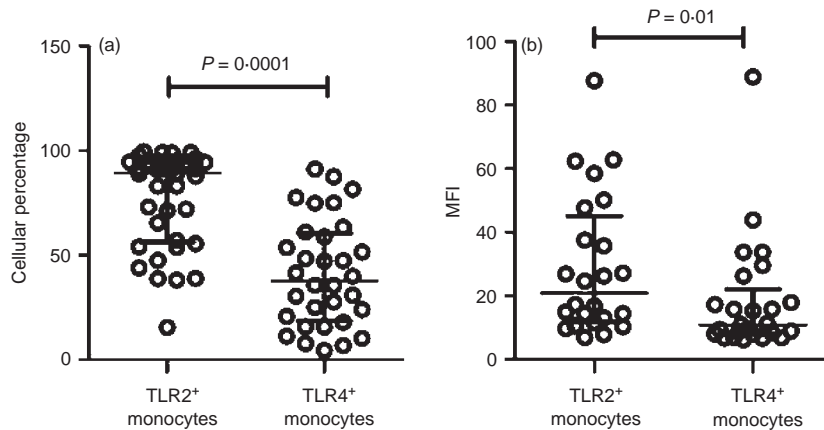
### Increased percentage of death in monocytes from TB patients

To obtain insights about the death of circulating monocytes in TB patients, we evaluated this in cell culture for 24 and 48 hr in the absence of stimulus. The percentage death of freshly purified monocytes at the beginning of culture was  $3.4 \pm 1.0\%$  in healthy controls and  $4.9 \pm 1.9\%$  in TB patients. Although, an increased death of monocytes from TB patients was observed at 24 hr, there was no significant difference in the comparison between TB patients and healthy controls ( $4.5 \pm 1.9\%$  versus  $1.2 \pm 1.2\%$ , respectively) (Fig. 5). This observed increase in cell death was only statistically significant until 48 hr of culture ( $P = 0.01$ ). The rate of monocyte death in patients with TB was 2.5-fold greater than that of cells from healthy controls

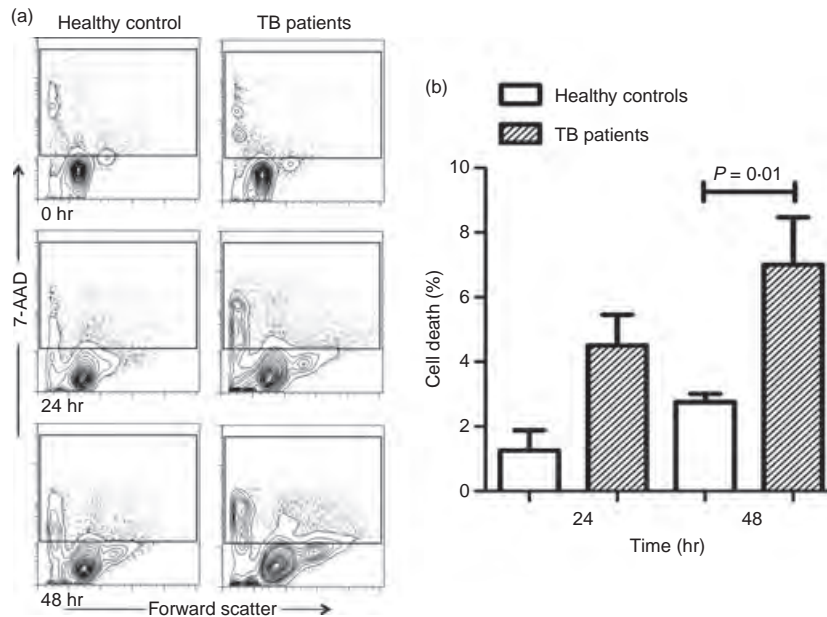
( $7.0 \pm 2.9\%$  versus  $2.7 \pm 0.5\%$ , respectively). Under the same conditions, dying cells were positive to both TLR2 and TLR4 at the beginning of culture; but after 48 hr, the damaged cells corresponded to TLR2<sup>-</sup> TLR4<sup>-</sup> cells (Fig. 6). Although, it was less in healthy controls than in TB patients (Fig. 5), the type of cells undergoing death was similar in both study groups. Interestingly, TLR2 or TLR4 single-positive cells survived throughout the culture (Fig. 6). These results point out that TLR2<sup>+</sup> TLR4<sup>+</sup> monocytes from TB patients were more susceptible to death.

### Monocyte death in TB patients because of mycobacterial antigen via TLR2

We evaluated the phenomenon of cell death induced by TLR2, because our results indicate that there is an



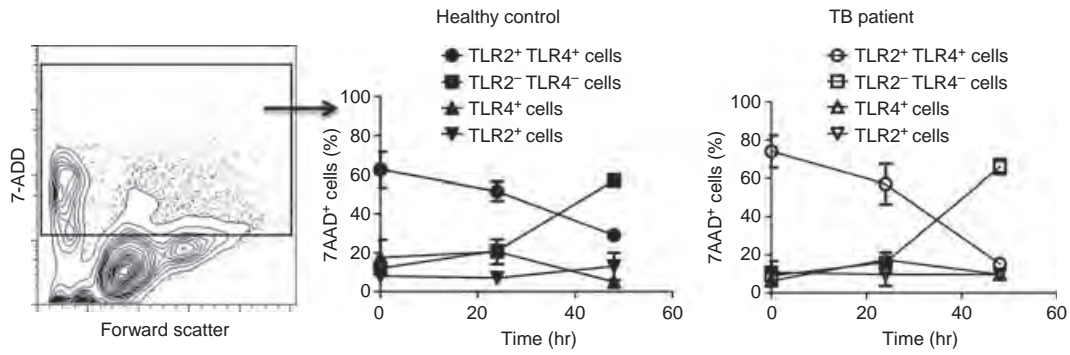
**Figure 4.** Percentage and expression density of Toll-like receptor 2 (TLR2) is higher than TLR4 in monocytes from patients with tuberculosis (TB). Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic bead-labelled antibodies, incubated with AlexaFluor 488-labelled antibodies and analysed by flow cytometry. (a) Proportion of TLR2<sup>+</sup> and TLR4<sup>+</sup> monocytes. (b) Mean fluorescence intensity (MFI) to TLR2 and TLR4 in monocytes. Circles represent the measure of TLR2 or TLR4 in monocytes from each TB patient. The bars denote mean ± standard deviation. The *P*-value of the difference between groups is indicated.



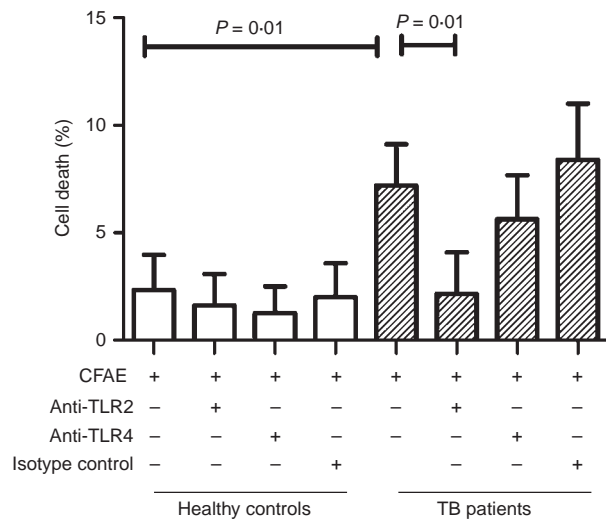
**Figure 5.** Monocytes from patients with tuberculosis (TB) show increased death rate in the absence of mycobacterial antigen. Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic beads-labelled antibodies, and incubated with culture medium alone for 24 or 48 hr at 37°. After the culture, cells were stained by 7-aminoactinomycin-D (7-AAD) and analysed through flow cytometry. (a) Representative contour plots for forward scatter versus 7-AAD-stained cells from healthy controls (right panels) or TB patients (left panels). (b) The bars denote cell death rate in cells from healthy control patients (open bars) or TB patients (hatched bars). The *P*-value of the difference between bars is shown, *n* = 3.

increase in TLR2 expression in monocytes from TB patients, and because other groups have demonstrated that TLR2 is linked to cell death induced by mycobacterial antigen in *in vitro* models.<sup>10–12,18</sup> Purified monocytes were incubated with CFAE in the presence or absence of either anti-TLR2 or anti-TLR4 mAbs. No difference was observed between the percentage of death affecting cells from TB patients and those from healthy controls, when

incubated with the medium alone (7.9 ± 3.5% versus 8.3 ± 5.3%, respectively). Hence, this cell death percentage was taken as the background rate when calculating the death rate caused specifically by stimulating CFAE. With this calculation, CFAE-incubated monocytes from TB patients showed a cell death rate 3.1-fold higher than from healthy controls (Fig. 7); the difference was statistically significant (7.2 ± 1.9% versus 2.3 ± 1.6%, respec-



**Figure 6.** Monocytes positive to both Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are cells in the death process. Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic bead-labelled antibodies and stained by triple fluorescence before and after being cultured without stimulus for 24 or 48 hr at 37°. Cells were stained by AlexaFluor 488-labelled monoclonal antibody to TLR2, phycoerythrin (PE)-labelled monoclonal antibody to TLR4, and 7-aminoactinomycin-D (7-AAD) followed by flow cytometry analysis. Cells positive to 7-AAD were gated from contour plot for forward scatter versus 7-AAD staining (left panel), and analysed by TLR2 and/or TLR4 expression in healthy controls (medium panels) and patients with tuberculosis (TB) (right panel). Symbols represent the mean and standard deviation of cell subsets,  $n = 3$ .



**Figure 7.** Monocytes from patients with tuberculosis (TB) undergo death induced through mycobacterial antigen via Toll-like receptor 2 (TLR2). Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic bead-labelled antibodies, and incubated with culture filtrate antigen extract (CFAE) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain in the presence or absence of anti-TLR2 or anti-TLR4 antibodies for 4 hr at 37°. The bars denote cell death rate in cells from healthy controls (open bars) or TB patients (hatched bars). The  $P$ -value of the difference between bars is shown,  $n = 5$ .

tively,  $P = 0.01$ ). As expected, when cells from TB patients were incubated with CFAE in the presence of anti-TLR2 mAb, the cell death rate diminished significantly, 3-4-fold ( $P = 0.01$ ), which was not observed in the presence of either anti-TLR4 mAb or isotype-matched control antibody (Fig. 7). Regarding healthy control cells no difference was observed under any of the conditions tested. These data indicate that mycobacterial antigens increase death of monocytes from patients with TB by a TLR2-dependent pathway, but not through TLR4.

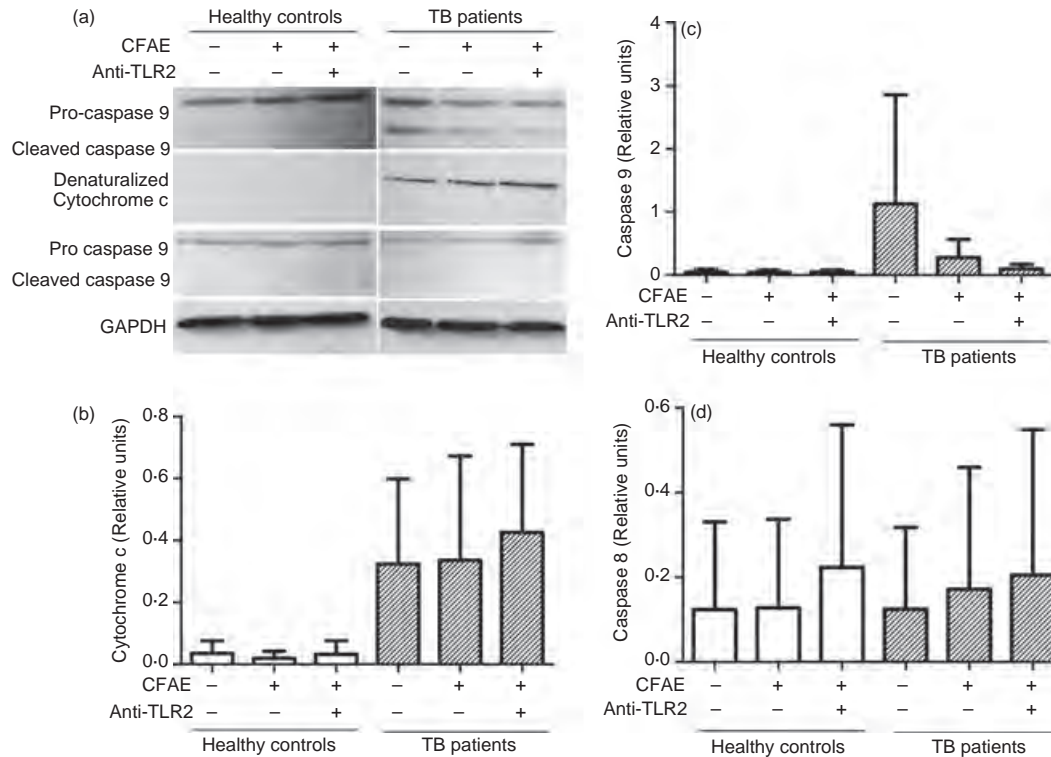
### Monocytes from TB patients were positive to cleaved caspase 9 and denaturalized cytochrome *c*

To clarify whether monocyte death occurred through extrinsic or intrinsic pathways, we evaluated, by Western blot, the intracellular level of caspase 8 and caspase 9 in monocytes incubated for 4 hr in the presence or absence of CFAE and/or anti-TLR2 mAbs. The results showed unexpectedly a thick band corresponding to cleaved caspase 9 in TB patient cells incubated with the medium alone (Fig. 8a), which apparently diminished in the presence of CFAE or CFAE plus anti-TLR2 mAb, but the statistical analysis did not show any difference (Fig. 8c). In contrast, the sample from healthy controls exhibited a very thin band for cleaved caspase 9, which did not change in any of the tested conditions (Fig. 8a,c). To confirm mitochondrial injury by the intrinsic pathway, cytochrome *c* was evaluated by using an antibody that recognizes the denaturalized shape. We found high levels of denaturalized cytochrome *c* in samples from TB patients, and, contrary to caspase 9, the use of anti-TLR2 mAb had no effect, suggesting persistence of mitochondrial damage (Fig. 8a,b). Although in Fig. 8(a), cleaved caspase 8 is not observed, the density analysis showed background levels of this protein, with no difference between samples from TB patients and from healthy controls (Fig. 8d).

### Monocytes from patients with TB are exposed to high levels of serum TNF- $\alpha$ but show levels of ASK1 and phospho-p38 MAPK similar to healthy control monocytes

Yuk *et al.* demonstrated that *M. bovis* BCG stimulation in macrophages results in secretion of TNF- $\alpha$  in a TLR2-dependent and TLR4-dependent manner, which leads to





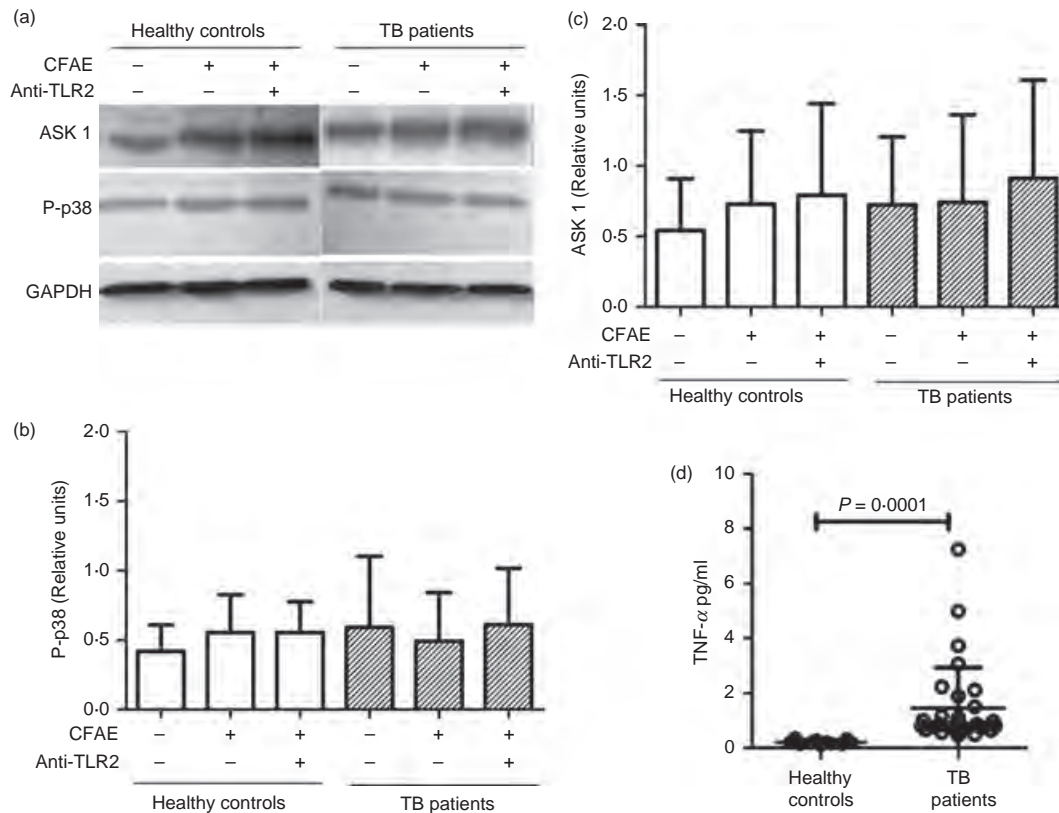
**Figure 8.** Monocytes from patients with tuberculosis (TB) exhibit cleaved caspase 9 and denaturalized cytochrome *c*. Monocytes from TB patients or healthy controls, were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic bead-labelled antibodies. (a) Western blot for pro-caspase 8, cleaved caspase 8, pro-caspase 9, cleaved caspase 9, and denaturalized cytochrome *c* of the supernatants of monocyte lysates after stimulation with medium alone or culture filtrate antigen extract (CFAE) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain in the presence or absence of anti-Toll-like receptor 2 (TLR2) antibodies for 4 hr at 37°. Total protein was determined and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. (b–d) Band densities of denatured cytochrome *c*, cleaved caspase 9, and cleaved caspase 8 in the Western blots were normalized against GAPDH by densitometry analysis. Results are shown in relative units of concentration using the IMAGEJ 1.39c software in samples from healthy controls (open bars) and TB patients (hatched bars). Each bar represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

activation of ASK1 upstream of the p38 MAPK.<sup>19</sup> Hence, we decided to assess whether this pathway is triggered in monocytes from TB patients after incubation for 4 hr in the presence or absence of CFAE and/or anti-TLR2 mAb. Although we found increased TNF- $\alpha$  levels in serum from TB patients ( $1.4 \pm 1.4$  pg/ml versus  $0.2 \pm 0.08$  pg/ml,  $P = 0.0001$ ) (Fig. 9d) no difference was observed in either ASK1 or phospho-p38 $\alpha$  levels (Fig. 9a–c). These observations suggest that even though monocytes from TB patients are exposed to high concentrations of serum TNF- $\alpha$ , this does not affect the levels of ASK1 and phospho-p38 MAPK in the cytoplasm.

#### Pam3CSK4 synthetic lipopeptide induces monocyte death but does not increase caspase 9 level

To examine whether agonist ligands to TLR2 increase the cleaved caspase 9 level, monocytes were stimulated with either Pam3CSK4 or FSL-1 or LM-MS for 4 hr. As shown in Fig. 10a, the Pam3CSK4 synthetic lipopeptide induced

a cell death comparable to that caused by CFAE on TB patient-monocytes. In contrast, the FSL-1 diacylated ligand induced a fivefold lower rate of cell death than the Pam3CSK4 triacylated ligand ( $1.0 \pm 1.0\%$  versus  $5.0 \pm 1.0\%$ , respectively), which was statistically significant ( $P = 0.04$ ). The LM-MS had no effect on TB patient monocytes, but, in monocytes from healthy controls the cell death rate was similar to that for FSL-1-induced death (Fig. 10a). On the other hand, the stimulation of monocytes by Pam3CSK4, FSL-1, or LM-MS showed pro-caspase 9 levels only in the group of healthy controls (Fig. 10b). Conversely, in unstimulated monocytes from healthy controls, the cleaved caspase 9 level was undetectable, whereas a thick band was observed in TB patients (Fig. 10b). Although to a minor extent for samples from healthy controls, the protein density analysis in Western blot revealed that cleaved caspase 9 levels were similar in any of the conditions tested in both study groups (Fig. 10c,d). Neither denaturalized cytochrome *c* levels nor cleaved caspase 8 levels showed differences after



**Figure 9.** Monocytes from patients with tuberculosis (TB) patients and healthy controls exhibit similar apoptosis-regulating signal kinase 1 (ASK1) and phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) levels in spite of exposure to high levels of serum tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Monocytes from TB patients or healthy controls were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic beads-labelled antibodies. (a) Western blot for ASK-1 and phospho-p38 MAPK of the supernatants of monocyte lysates after stimulation with medium alone or culture filtrate antigen extract (CFAE) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain in the presence or absence of anti-Toll-like receptor 2 (TLR2) antibodies for 4 hr at 37°. Total protein was determined and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. (b, c) Band densities of ASK-1 and phospho-p38 MAPK in the Western blots were normalized against GAPDH by densitometry analysis. Results are shown in relative units of concentration using the IMAGEJ 1.39c software in samples from healthy controls (open bars) and TB patients (hatched bars). Each bar represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (d) TNF- $\alpha$  concentration in sera from 41 healthy controls and 51 TB patients. The *P*-value of the difference between TB patients and healthy controls is shown.

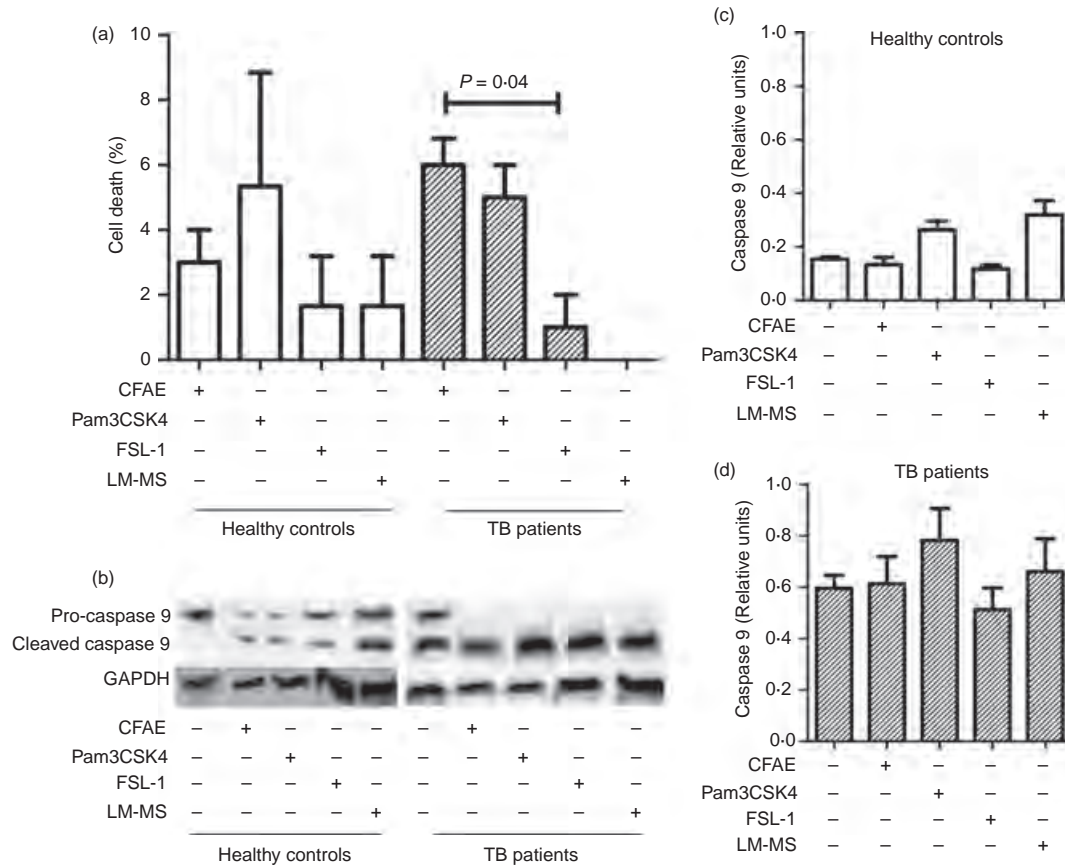
monocyte stimulation with any of the aforementioned ligands to TLR2 (data not shown). These findings indicate that monocyte death is augmented by addition of Pam3CSK4 triacylated lipopeptide, which did not cause modification in cleaved caspase 9 levels.

## Discussion

Innate immune defence mechanisms cooperate to eliminate infected cells but *M. tuberculosis* uses strategies to prevent macrophage apoptosis and the balance between survival and death in macrophages can determine the outcome of infection. However, these pathways still remain poorly understood in cells from TB patients. In this study we found a significant increase of peripheral blood monocytes in TB patients. This result is consistent with observations from Sánchez *et al.* and Janols *et al.*<sup>20,21</sup>, who reported an

increase of circulating monocytes in TB patients in both percentage and absolute numbers, respectively. However, Sánchez *et al.*<sup>20</sup> showed also a decreased expression of HLA-DR using an anti-HLA-DR mAb in monocytes from TB patients, which we did not find; perhaps, this difference is because we used an antibody recognizing the three major isoforms of HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ).

Concerning TLR2 in monocytes from TB patients, we found an increased proportion of TLR2<sup>+</sup> monocytes (77.4%) in patients with pulmonary tuberculosis. In contrast, another group reported approximately 50% of monocytes expressing TLR2 in patients with tuberculous pleuritis.<sup>22</sup> The percentage difference might be the result of factors such as tuberculosis type or *M. tuberculosis* virulence. In this regard, Rocha-Ramirez *et al.*<sup>23</sup> showed that lipid fractions can regulate TLR2 and TLR4 expression depending on the virulence grade of bacteria.



**Figure 10.** The synthetic lipopeptide Pam3CSK4 induces monocyte death but does not increase caspase 9 levels. Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by magnetic bead-labelled antibodies, and cultured in the presence or absence of mycobacterial antigen (using culture filtrate antigen extract; CFAE) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain or agonist ligand to Toll-like receptor 2 (TLR2) [Pam3CSK4, fibroblast-stimulating lipopeptide-1 (FSL-1), and lipomannan of *Mycobacterium smegmatis* (LM-MS)] for 4 hr at 37°. (a) Graphic showing death rate percentage in cells from healthy control (open bars) or patients with tuberculosis (TB) (hatched bars). The *P*-value of the difference between bars is shown, *n* = 3. (b) Western blot for pro-caspase 9, and cleaved caspase 9 of the supernatants of monocyte lysates after stimulation with medium alone, or CFAE, or ligands to TLR2. Total protein was determined and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. (c, d) Graphics representing band densities of cleaved caspase 9 in the Western blots normalized against GAPDH by densitometry analysis. Results are shown in relative units of concentration using the IMAGEJ 1.39c software in samples from healthy controls (open bars) and TB patients (hatched bars). Each bar represents the mean ± SD of three independent experiments.

When we compared density expression, both TLR2 and TLR4 were significantly higher in monocytes from TB patients than in those cells from healthy controls. Moreover, the proportion of TLR2<sup>+</sup> monocytes was higher than that of TLR4<sup>+</sup> monocytes in TB patients. These data suggest a strong association between TLR2 expression and tuberculosis disease. It has been shown that TLR2-deficient mice succumb to *M. tuberculosis* infection,<sup>24</sup> and that, human TLR2 polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis.<sup>25,26</sup> However, the role of TLR2 in the protective immune response to tuberculosis remains controversial, because other authors have shown a TLR2-independent immune response to *M. tuberculosis* infection models.<sup>27,28</sup> It has been demonstrated that TLR2 is required for the production of diverse cytokines, for example interleukin-12,

TNF-α and interleukin-6, in response to diverse mycobacterial antigens in human monocytes or murine macrophages.<sup>3,5,7,29</sup> However, different mycobacterial antigens can also induce apoptosis by TLR2 in either a human THP-1 monocytic line or monocyte-derived macrophages.<sup>10–12,30</sup> We found that the mycobacterial antigens from *M. tuberculosis* H37Rv strain caused a 7.2% death rate in circulating monocytes from TB patients, which was abrogated by neutralizing antibodies for TLR2 but not TLR4. Our results suggest that mycobacterial antigens to TLR4 are not involved in inducing cell death in human tuberculosis.

An interesting finding from our study is that freshly obtained monocytes from TB patients showed denaturalized cytochrome *c* and cleaved caspase 9 levels in the absence of mycobacterial antigens. In contrast, we did

not observe this difference when cleaved caspase 8 levels were analysed in the presence or absence of mycobacterial antigen and anti-TLR2 mAb, probably because the level of caspase 8 comes from background cell death. Caspases are cytoplasmic cysteine proteases synthesized as zymogens (pro-caspases), which turn into active enzymes (cleaved caspases) after a limited proteolysis.<sup>31</sup> Activated caspase 8 or caspase 9, in turn, cleaves effector pro-caspases propagating the death signalling cascade. The presence of cleaved caspase 8 corresponds to intracellular signalling from the apoptosis extrinsic pathway, whereas cleaved caspase 9 and cytochrome *c* levels are associated with mitochondrial injury (intrinsic pathway).<sup>31</sup> Hence, levels of activated caspase 9 and cytochrome *c* in monocytes from patients with TB suggest a pre-apoptotic primed status, which is also suggested by the percentage of cell death that occurs during the 24–48 hr of culture in the absence of antigen. Perhaps this pre-apoptotic status induces monocytes from TB patients to respond rapidly to TLR2 ligation with CFAE, leading to cell death that is avoided by neutralizing antibodies for TLR2. Moreover, the cleaved caspase 9 level in unstimulated monocytes from TB patients was similar to that obtained for cells stimulated with CFAE or distinct agonist ligands to TLR2 (Figs 8 and 10). Similar results were observed when we analysed the denaturalized cytochrome *c* levels, which persisted under the same conditions. In contrast, the denaturalized cytochrome *c* and cleaved caspase 9 values in samples from healthy controls indicated a minimal level, which supports our previous result of low percentage of cell death at 24 or 48 hr of culture. Taken together, our results suggest the persistence of mitochondrial damage and activated caspase 9 interactions with other apoptotic process molecules.<sup>32</sup>

An important point that should be considered in our results is the standard deviation, which, although minimal in healthy controls, reached high values in samples from TB patients and showed great dispersion, perhaps because of intrinsic factors in the immune response.

In addition, the majority of unstimulated cells that were damaged at the beginning of culture corresponded to TLR2<sup>+</sup> TLR4<sup>+</sup> monocytes in both patients and controls. Our results suggest that interaction between TLR2-mediated signalling pathways and TLR4-mediated signalling pathways are involved in monocyte death, perhaps in the same way as reported in an *M. tuberculosis* infection model of murine macrophage lines.<sup>33</sup>

Based on reports indicating that 19 000 MW and 38 000 MW *M. tuberculosis* lipoproteins cause activation of caspase 8 and caspase 9 in both THP-1 cells and monocyte-derived macrophages through TLR2,<sup>10,12</sup> we decided to evaluate whether a TLR2-dependent cell death pathway occurs in TB patient monocytes stimulated with

mycobacterial antigens. Our results regarding activated caspase 8 levels were equivalent in samples from both TB patients and healthy controls; hence, caspase 8 does not seem to be required initially for death by TLR2 in monocytes from TB patients. On the other hand, cell death is prevented by the anti-TLR2 mAb decreasing cleaved caspase 9 levels, which suggests that caspase 9 is associated with TLR2-dependent cell death induced by antigens from *M. tuberculosis*.

Several authors have reported activation of ASK1 and p38 MAPK through TLR2 signalling in human primary monocytes stimulated with purified protein derivative tuberculin or murine macrophages stimulated with *M. bovis* BCG.<sup>8,19</sup> Likewise, a previous report suggests that TNF- $\alpha$  plays an important role in the induction of macrophage apoptosis.<sup>34</sup> For this reason, we examined concentrations of phospho-p38 MAPK and ASK1 in monocytes from patients with TB. However, no difference was observed in any conditions tested in spite of high serum TNF- $\alpha$  levels in patients with TB (Fig. 9).

Finally, another finding was that both CFAE and Pam3CSK4 induced the death of monocytes from TB patients in a similar way, whereas FSL-1 showed only a slight effect. This outcome could be the result of the ability of the cytoplasmic TLR2 domain to form functional heterodimeric complexes with TLR6 or TLR1.<sup>35</sup> Previous reports have shown that Pam3CSK4 is a synthetic triacylated lipopeptide recognized by the TLR2/TLR1 heterodimer,<sup>36</sup> whereas FSL-1 (Pam2CGDPKHPKSF) is a synthetic diacylated lipopeptide recognized by the TLR2/TLR6 heterodimer.<sup>37</sup> These data suggest that triacylated lipopeptides from *M. tuberculosis* increase the death process in monocytes from TB patients.

Our report offers new insight into the cell death of monocytes from TB patients; probably, these cells have undergone mitochondrial injury, leading to a constant release of cytochrome *c* and production of cleaved caspase 9, thereby becoming more susceptible to death.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr Iris Estrada, Dr Gloria Soldevila and Dr Raul Mancilla for useful comments. This article is part of the requirements for the degree of PhD by Leslie Chávez-Galán in the program: *Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*, Mexico. This work was supported by grant 82434 and student scholarship 203164 from the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*, Mexico.

## Disclosures

The authors have no conflicts of interest to disclose.



## References

- World Health Organization. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO report 2008, WHO/HTM/TB/2008.393.
- Lee J, Hartman M, Kornfeld H. Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei Med J* 2009; **50**:1–11.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR *et al*. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; **285**:732–6.
- Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999; **163**:3920–7.
- Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**:14459–63.
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O *et al*. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 2001; **291**:1544–7.
- Jung SB, Yang CS, Lee JS *et al*. The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infect Immun* 2006; **74**:2686–96.
- Yang CS, Shin DM, Lee HM *et al*. ASK1-p38 MAPK-p47phox activation is essential for inflammatory responses during tuberculosis via TLR2-ROS signaling. *Cell Microbiol* 2008; **10**:741–54.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR *et al*. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999; **285**:736–9.
- López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol* 2003; **170**:2409–16.
- Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB *et al*. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. *J Infect Dis* 2004; **190**:1167–76.
- Sanchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scand J Immunol* 2009; **69**:20–8.
- American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention, Diagnosis Standards and Classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**:1376–95.
- Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 1976; **5**:9–15.
- Lecoœur H, Février M, Garcia S, Rivière Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001; **253**:177–87.
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. Chapter 8 Unit 8.10. Immunoblotting and immunodetection. In: Coligan JE, Bierer B, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, Coico R, eds. *Current Protocols in Immunology*. Somerset, NJ: Wiley Online Library, 2001:8.10.1–10.21.
- Means TK, Jones BW, Schromm AB *et al*. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol* 2001; **166**:4074–82.
- Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* 2000; **19**:3325–36.
- Yuk JM, Shin DM, Yang CS, Kim KH, Rho J, Park JK, JO EK. Role of apoptosis-regulating signal kinase 1 in innate immune responses by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Immunol Cell Biol* 2009; **87**:100–7.
- Sánchez MD, García Y, Montes C, París SC, Rojas M, Barrera LF, Arias MA, García LF. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. *Microbes Infect* 2006; **8**:2492–500.
- Janols H, Bredberg A, Thuveesson I, Janciauskiene S, Grip O, Wullt M. Lymphocyte and monocyte flow cytometry immunophenotyping as a diagnostic tool in uncharacteristic inflammatory disorders. *BMC Infect Dis* 2010; **10**:205.
- Prabha C, Rajashree P, Sulochana DD. TLR2 and TLR4 expression on the immune cells of tuberculous pleural fluid. *Immunol Lett* 2008; **117**:26–34.
- Rocha-Ramírez LM, Estrada-García I, López-Marín LM *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; **88**:212–20.
- Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ *et al*. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol* 2004; **164**:49–57.
- Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**:625–6.
- Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T *et al*. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004; **23**:219–23.
- Hölscher C, Reiling N, Schaible UE *et al*. Containment of aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice does not require MyD88 adaptor function for TLR2, -4 and -9. *Eur J Immunol* 2008; **38**:680–94.
- McBride A, Bhatt K, Salgame P. Development of a secondary immune response to *Mycobacterium tuberculosis* is independent of Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2011; **79**:1118–23.
- Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol* 2006; **177**:422–9.
- Dao DN, Kremer L, Guérardel Y, Molano A, Jacobs WR Jr, Porcelli SA, Briken V. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* 2004; **72**:2067–74.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, 6th edn. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM *et al*. Ordering the cytochrome C-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; **144**:281–92.
- Sánchez D, Rojas M, Hernández I, Radzioch D, García LF, Barrera LF. Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death. *Cell Immunol* 2010; **260**:128–36.
- Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, García LF. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol* 1999; **162**:6122–31.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:13766–71.
- Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of the TLR1–TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007; **130**:1071–82.
- Kang JK, Nan X, Jin MS *et al*. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2–Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 2009; **31**:873–84.

# Identificación de la expresión de moléculas CD1 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar

Leslie Chávez-Galán,<sup>\*,‡</sup> ✉ Kimmy D. Ramírez-Velásquez,<sup>§</sup> Isabel Sada-Ovalle,<sup>\*</sup> Ricardo Lascrain<sup>‡,||</sup>

Laboratorio de Inmunoquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER);<sup>\*</sup> Departamento de Bioquímica, INER;<sup>‡</sup> Departamento de Enseñanza, INER;<sup>§</sup> Laboratorio de Bioquímica, UNAM.<sup>||</sup>

Trabajo recibido: 13-XII-2010; aceptado: 27-I-2011

**RESUMEN. Antecedentes:** Las proteínas de la familia CD1 participan en la respuesta inmune celular, presentan antígenos glicolípidicos y activan linfocitos T-antígeno específicos. La identificación de antígenos lipídicos en la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, así como la presencia de linfocitos T restringidos a CD1 en pacientes con tuberculosis pulmonar sugiere que este sistema de reconocimiento participa activamente en la respuesta inmune celular en contra del bacilo. El objetivo de este trabajo fue identificar el perfil de expresión de las isoformas de CD1 en monocitos de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar.

**Material y métodos:** Se obtuvieron muestras sanguíneas de 20 pacientes con tuberculosis pulmonar y 20 individuos sanos. Aislamos células mononucleadas y se incubaron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD14, CD1a, CD1b, CD1d y HLA-ABC. Se analizaron mediante citometría de flujo.

**Resultados:** Los pacientes con tuberculosis pulmonar mostraron mayor porcentaje de células CD14+ (monocitos) que expresan CD1b (5, iqr 3-6) comparado con individuos sanos (2, iqr 1-3) ( $p = 0.0003$ ). Con respecto a CD1a, CD1d y HLA-ABC no se encontraron diferencias significativas.

**Conclusiones:** Los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen incrementada la frecuencia de monocitos CD1b+, lo que podría favorecer la activación de linfocitos T-antígeno específicos para mediar una respuesta inmune más eficiente.

**Palabras clave:** CD1a, CD1b, CD1d, monocitos, tuberculosis.

**ABSTRACT. Background:** Proteins of the CD1 family participate in the cellular immune response and present glycolipid antigens to activate antigen specific T lymphocytes. The identification of lipids antigens in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, as well, as the presence of CD1-restricted T lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis; suggests that this system participates actively in the cellular immune response against the bacillus. Our aim in this study was to identify the expression profile of CD1 isoforms in peripheral blood monocytes from pulmonary tuberculosis patients.

**Methods:** Peripheral blood was obtained from 20 tuberculosis patients and 20 healthy individuals. Mononuclear cells were isolated and incubated with monoclonal antibodies against to CD14, CD1a, CD1b, CD1d and HLA-ABC. Cells were analyzed by flow cytometry.

**Results:** Tuberculosis patients showed a greater percentage of cells CD14 + (monocytes) expressing CD1b (5, iqr 3-6) when compared with healthy individuals (2, iqr 1-3) ( $p = 0.0003$ ). Regard to CD1a, CD1d and HLA-ABC expression we did not find statistical significant differences.

**Conclusions:** Patients with pulmonary tuberculosis have high frequency of CD14+ CD1b+ monocytes, which would be able to activate antigen specific T lymphocytes to induce a more efficient immune response.

**Key words:** Tuberculosis, monocytes, CD1a, CD1b, CD1d.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis pulmonar (TBp) es una enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico es el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el año 2008 se identificaron 9.4 millones de casos nuevos y 1.3 millones de decesos, por lo que la TBp continúa siendo un problema de salud pública.<sup>1</sup> La identificación de cepas micobacterianas resistentes a múltiples fármacos y la

coinfeción con el virus de la inmunodeficiencia humana son factores que agravan la situación de la tuberculosis a nivel mundial.<sup>2</sup> El desarrollo de la respuesta inmune celular es fundamental para el control adecuado de la infección por *M. tuberculosis*, en ella participan diversas poblaciones de células T, cada una con propiedades únicas y funciones especializadas.<sup>3</sup> Previo al descubrimiento de la familia CD1, se consideraba que todos los linfocitos T reconocían antígenos de naturaleza proteica, los cuales eran presentados por las moléculas HLA (del

inglés *human leukocyte antigen*) clase I y clase II. En la actualidad, sabemos que existen linfocitos T que reconocen antígenos de naturaleza lipídica y glicolipídica que pueden ser presentados a través de las moléculas de la familia CD1.<sup>4</sup>

La familia CD1 está conformada por un grupo de proteínas integrales de membrana tipo I, que estructuralmente están constituidas por una cadena pesada que forma tres dominios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ); la cual está asociada de manera no covalente a la  $\beta 2$ -microglobulina.<sup>5</sup> La familia CD1 está integrada por 5 isoformas denominadas: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d y CD1e. Estas proteínas se expresan en todas las especies de mamíferos estudiadas; sin embargo, el perfil de expresión de cada isoforma varía entre las especies.<sup>6,7</sup> El humano expresa las 5 isoformas de las proteínas CD1, mientras que los roedores sólo expresan CD1d.<sup>8</sup> A excepción de CD1e que tiene una localización intracelular, las otras isoformas se encuentran en constante reciclaje entre la membrana celular y los diferentes compartimentos endosomales.<sup>5</sup> Las proteínas CD1 se clasifican en dos grupos: el grupo 1, incluye a las isoformas CD1a, CD1b y CD1c, las cuales se expresan preferencialmente en las células presentadoras de antígeno profesionales, tales como las células dendríticas. El grupo 2, incluye solamente a CD1d y se expresa en varias células de origen no hematopoyético.<sup>9</sup> Los principales antígenos lipídicos presentados por las moléculas del grupo 1 incluye ácidos micólicos y otros componentes de la pared de *M. tuberculosis*.<sup>10</sup> Para la molécula CD1d se ha identificado a la alfa-galactosilceramida, glicolípido que deriva de la esponja marina así como algunos glicolípidos derivados de *Borrelia burgdorferi* y *Leishmania donovani*.<sup>11,12</sup>

Previamente se describió que las poblaciones de linfocitos T que reconocen antígenos glicolipídicos presentados por las isoformas CD1a, CD1b y CD1c pueden ser CD4+, CD8+ o dobles negativos (CD4- CD8-), y su participación en la inmunidad antimicobacteriana es relevante debido a su capacidad para lisar células infectadas.<sup>10,13</sup> Los antígenos glicolipídicos presentados por la isoforma CD1d son reconocidos por una subpoblación de linfocitos T llamados linfocitos NKT invariantes, estas células participan en la respuesta inmune frente a bacterias, virus y hongos debido a que secretan grandes cantidades de citocinas como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).<sup>14,15</sup>

En diversos estudios previamente publicados, se ha descrito que si los monocitos de sangre periférica provenientes de individuos sanos están en contacto con antígenos micobacterianos se modifica su capacidad de diferenciación y disminuyen su capacidad funcional, lo cual podría limitar el desarrollo de una adecuada

respuesta inmune celular.<sup>16,17</sup> Por otro lado, Tentori *et al* describieron en 1998 que cuando los monocitos eran incubados con interleucina 4, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos, y rifampicina se incrementaba la expresión de la molécula CD1b. Los autores proponen que este antibiótico ayuda, al menos teóricamente, al desarrollo de una respuesta inmune más eficiente al favorecer la inmunidad celular mediada por linfocitos T CD1b-restringidos.<sup>18</sup>

Es posible que cambios en la expresión de estas moléculas presentadoras de antígeno sea secundario a un proceso infeccioso como la TBp, lo cual podría tener como consecuencia modificaciones en la activación de linfocitos T y NKT y por lo tanto, en la respuesta inmune celular. Hasta la fecha, no se ha descrito si los pacientes con TBp cambian la expresión de las moléculas CD1 en monocitos de sangre periférica como una consecuencia del proceso infeccioso. Por este motivo, en este estudio nos propusimos analizar la expresión de estas proteínas en pacientes con diagnóstico de TBp y compararlo con individuos sanos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Pacientes*

Se incluyeron 20 pacientes con diagnóstico de TBp y 20 individuos sanos, durante el período de enero de 2008 a marzo de 2009. El diagnóstico de TBp se sustentó con base en la sintomatología y corroboró mediante los siguientes criterios diagnósticos: baciloscopía positiva, radiografía de tórax con datos sugestivos de TBp y cultivo positivo para *M. tuberculosis*. Todos los pacientes fueron casos nuevos y vírgenes a tratamiento (clase 3 categoría I de acuerdo con los lineamientos de la Sociedad Americana del Tórax), y no presentaban alguna otra comorbilidad.<sup>19</sup> El grupo control estuvo conformado por sujetos clínicamente sanos, con antecedentes de haber recibido la vacuna de Calmette y Guérin (BCG) al nacimiento y por ser PPD+. Todos los participantes firmaron una hoja de consentimiento informado. Los pacientes fueron evaluados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), ciudad de México. Este protocolo fue autorizado por el comité de bioética del INER, No. B32-08.

### *Reactivos*

Ficoll-hypaque (densidad 1.07), azul tripano, albúmina sérica bovina fracción IV, p-formaldehído, azida de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato monopotásico y fosfato disódico anhidro fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos

monoclonales contra las moléculas CD14 (clona M5E2), CD1a (clona HI149), CD1b (clona M-T101), CD1d (clona CD1d42) y HLA-ABC (clona G46-2.6) conjugados a distintos fluorocromos como isotiocianado de fluoresceína, ficoeritrina o ficoeritrina Cy5 fueron provistos por BD Biosciencias (San José, CA, USA).

#### *Obtención de células mononucleadas e inmunofenotipificación*

A partir de una muestra de 10 mL de sangre periférica se obtuvieron las células mononucleadas (CMN) por centrifugación (Ficoll hypaque, densidad 1.07). Posteriormente, se resuspendieron en medio de cultivo suplementado (RPMI 1640, HEPES 10 mM, L-glutamina 200 mM, antibiótico 100 mM, aminoácidos esenciales 50X, amoniácidos no esenciales 100X, piruvato de sodio 100 mM) y se evaluó la viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul tripano. Para la inmunofenotipificación, las células se tiñeron durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las siguientes moléculas: CD14, CD1a, CD1b, CD1d y HLA-ABC (HLA clase I). Para cada una de las tinciones se incluyeron los respectivos controles de isotipo y FMO (del inglés *fluorescence minus one*). Posteriormente, las células se lavaron con buffer salino-fosfato (PBS) y se fijaron en paraformaldehído al 1%. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACSAria (BD Biosciencias) y se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star). Para el análisis se realizó un gráfico de puntos de dispersión frontal (FSC, forward scatter) vs dispersión lateral (SSC, side scatter), a partir del cual se seleccionaron las células positivas para el marcador CD14 y así delimitar una ventana que presentara al menos 90% de células CD14+ (monocitos). A partir de esta

región se analizó el porcentaje de células positivas para HLA clase I, CD1a, CD1b y CD1d, mediante una gráfica de tamaño celular contra expresión de las moléculas mencionadas. Para el análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) se realizó un histograma desde la región de células CD14+, posteriormente se obtuvo la mediana de expresión y finalmente se calculó la IMF de expresión.

#### *Análisis estadístico*

Las variables continuas se expresan como mediana e intervalo intercuartil. Las proporciones se expresan como porcentaje. Las diferencias entre dos grupos fueron exploradas mediante una prueba U de Mann Whitney. Se consideró como significativo a un valor de  $p < 0.05$  a dos colas. Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad (versión 5.3) y Stata (versión 9).

## RESULTADOS

Se incluyeron a 20 pacientes con diagnóstico de TBp (12 hombres) y 20 individuos sanos (9 hombres). La media de edad en el grupo de pacientes con TBp fue de  $40 \pm 20$  años, mientras que en el grupo control fue de  $32 \pm 7$  años ( $p = 0.09$ ) (tabla 1).

#### *Expresión de HLA clase I en células CD14+*

La expresión de CD14 y HLA-ABC se evaluó en CMN totales. Las CMN fueron identificadas a partir de una ventana hecha en un gráfico de puntos de dispersión frontal (FSC, forward scatter) vs dispersión lateral (SSC, side scatter), a partir de la cual se seleccionaron las células positivas para el marcador CD14. Se documentó

**Tabla 1.** Características demográficas. El número (n) total de individuos que formaron parte del estudio es indicado. La edad se muestra en promedio  $\pm$  desviación estándar para cada grupo. El valor de la probabilidad (p) se obtuvo con el análisis estadístico U de *Mann-Whitney*. En el género se muestra el número de individuos y entre paréntesis el porcentaje del total, para obtener el valor de p se realizó una prueba ANOVA.

Variable	Sano (n = 20)	Enfermo (n = 20)	Valor de p
Edad (años)	$32 \pm 7$	$40 \pm 20$	0.0995
Genero			
Hombre	9 (45%)	12 (60%)	0.6838
Mujer	11 (55%)	8 (40%)	
Tuberculosis	No	Pulmonar (75%) pleural (25)	
Tratamiento anti tuberculoso	No	No (90%) 1er. Semana de tratamiento (10%)	
Tratamiento con esteroides	No	No	
VIH+	No	No	
Diabetes mellitus+	No	No	

la frecuencia de expresión de la molécula HLA-ABC en células CD14+ en pacientes con TBp comparado con el grupo control (99%, 90-100 vs 99%, 80-100) ( $p = 0.9137$ ) [figura 1A, C]. Posteriormente, mediante un histograma comparamos la intensidad media de fluorescencia para la misma molécula y no identificamos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.7972$ ) [figura 1B, D].

#### Expresión de las isoformas de CD1 en células CD14+

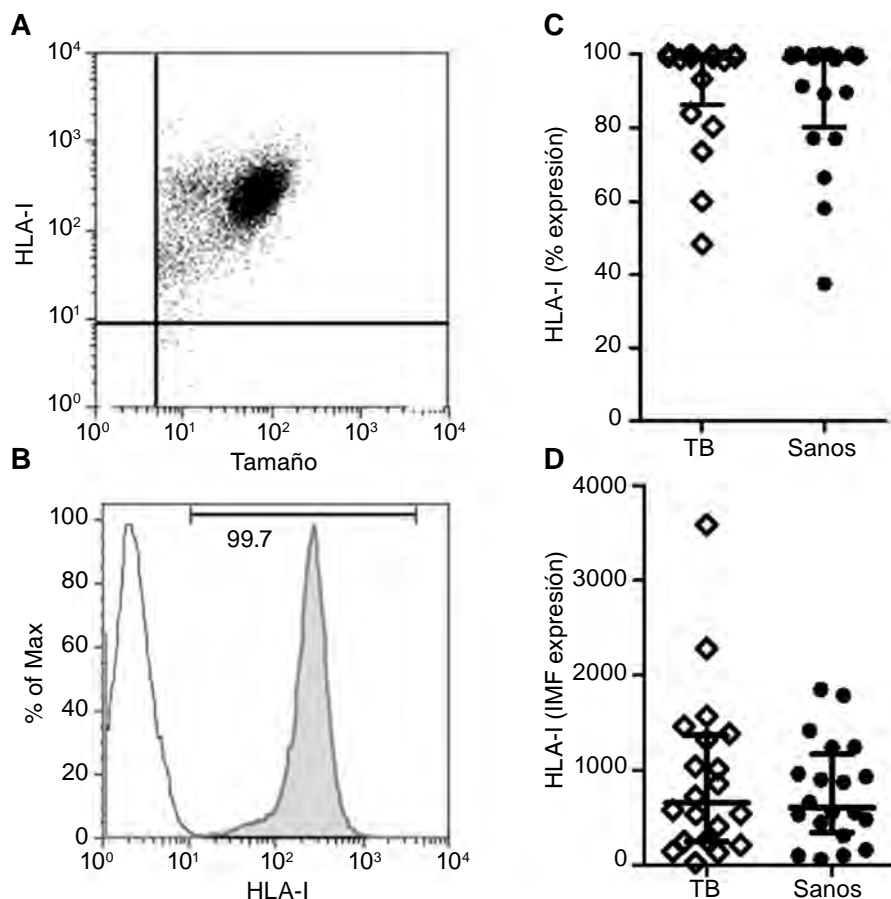
La expresión de las moléculas CD1a, CD1b y CD1d se evaluó en CMN totales. Las CMN fueron identificadas a partir de una ventana hecha en un gráfico de puntos de dispersión frontal (FSC, forward scatter) vs dispersión lateral (SSC, side scatter), a partir de la cual se seleccionaron las células positivas para el marcador CD14. Posteriormente, se realizó el análisis de la coexpresión de los marcadores CD14 vs CD1a, CD1b y CD1d. Comparado con el grupo control, los monocitos CD14+ provenientes de pacientes con TBp tuvieron una mayor expresión de la isoforma CD1b (5%, 3-6 vs 2%, 1-3) ( $p = 0.0003$ ) [figura 2]. Sin embargo, no se identificaron diferencias estadísticas significativas al comparar los

valores obtenidos de pacientes con TBp vs individuos sanos en la expresión de las moléculas CD1a (1, 0.7-2 vs 0.8, 0.3-2,  $p = 0.3158$ ) y CD1d (1, 0.5-2 vs 1, 0.8-2,  $p = 8495$ ) [figura 3].

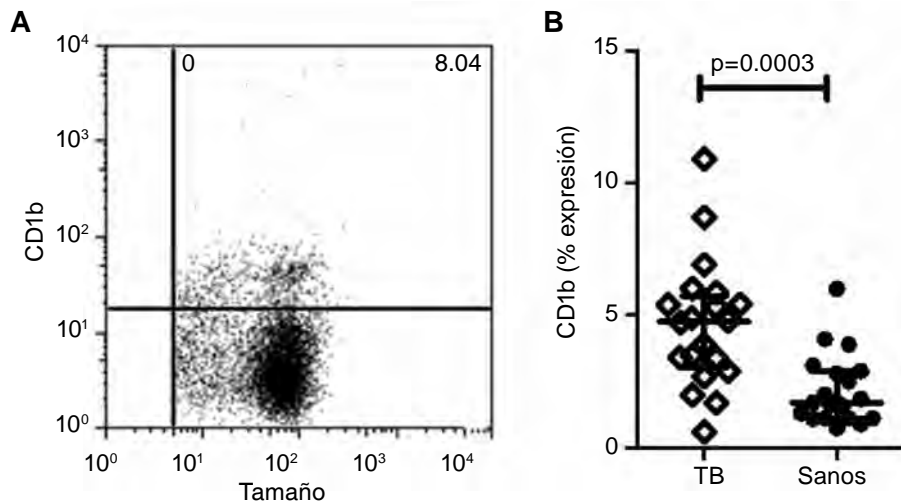
## DISCUSIÓN

Los principales resultados de este trabajo son: 1) los pacientes con TBp tienen una mayor expresión de la molécula CD1b, y 2) los pacientes con TBp muestran los mismos niveles de expresión de las moléculas HLA-ABC, CD1a y CD1d cuando se comparan con individuos sanos.

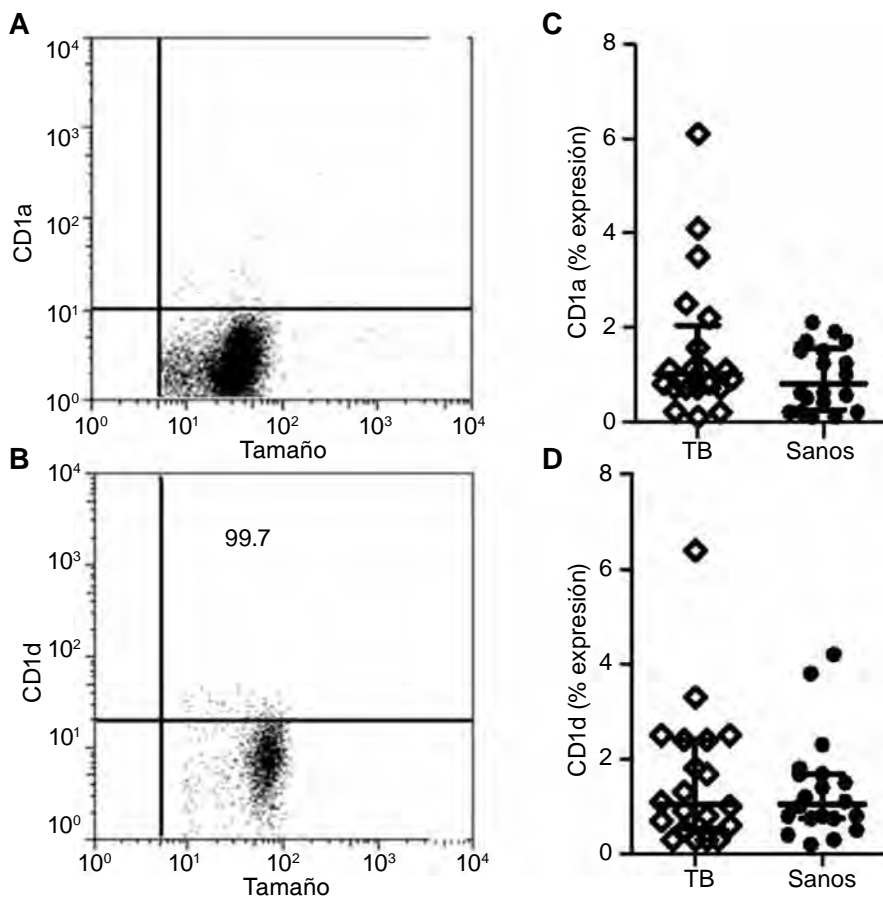
Previo al descubrimiento del sistema de presentación de antígenos vía CD1, se consideraba que todo el reconocimiento de los linfocitos T estaba dirigido contra pequeños péptidos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y clase II (MHC por sus siglas en inglés). La identificación de moléculas capaces de presentar antígenos lipídicos y de linfocitos T capaces de reconocerlos ha sido un hallazgo que ha modificado nuestra comprensión sobre la complejidad de la respuesta inmune celular. La na-



**Figura 1.** Monocitos de pacientes con TBp y sujetos sanos tienen los mismos porcentajes de expresión de HLA-I. **A)** dot plot representativa de tamaño celular contra expresión de moléculas HLA-I; **B)** histograma representativo de la densidad de expresión de HLA-I (línea con relleno); **C)** porcentaje de expresión de HLA-I en pacientes con TB e individuos sanos, la comparación entre grupos mostró un valor de  $p = 0.9137$ ; y **D)** gráfica para la densidad de expresión de HLA-I en pacientes con TB o en individuos sanos, mostrando un valor de  $p = 0.7972$ . En C y D los datos se presentan en medianas y rangos intercuantiles.



**Figura 2.** Monocitos de paciente con TBp expresan CD1b. **A)** dot plot representativo de tamaño celular contra expresión de CD1b en células CD14+; y **B)** porcentaje de expresión de CD1b en monocitos de pacientes con TBp e individuos sanos p = 0.0003. Los datos se presentan en mediana y rangos intercuantiles.



**Figura 3.** Monocitos de paciente con TBp y sujetos sanos expresan los mismos porcentajes de CD1a y CD1d. **A y B)** dot plot representativo de la expresión de CD1a y CD1d, respectivamente, en células CD14+; y **C y D)** porcentajes de expresión de CD1a y CD1d, respectivamente, en monocitos de pacientes con TB e individuos sanos (p = 0.3158 y p = 0.8495, respectivamente). Los datos se presentan en medianas y rangos intercuantiles.

turalidad de las moléculas presentadas por las distintas isoformas CD1 va desde ácidos grasos simples hasta glicolípidos más complejos, incluyendo micolatos y lipopéptidos.<sup>10</sup> Varios estudios previos demuestran que las moléculas del grupo 1 (CD1a, CD1b y CD1c) son pobremente expresadas en monocitos provenientes de

individuos sanos; sin embargo, en este estudio hemos identificado que los pacientes con TBp cursan con una mayor frecuencia de monocitos CD14+ CD1b+.<sup>20</sup> Este es un hallazgo relevante ya que los linfocitos T, que reconocen antígenos lipídicos presentados por esta isoforma tienen la capacidad de secretar citocinas de tipo TH1

que son fundamentales para favorecer la eliminación del bacilo.<sup>21,22</sup> En el caso de los pacientes con TBp descartamos el efecto de la rifampicina sobre la expresión de la molécula CD1 debido a que el grupo de pacientes incluido se encontraba sin tratamiento antifímico o en la primera semana del mismo.

Es posible que algunos pacientes con TBp presenten una frecuencia incrementada de linfocitos T específicos para antígenos lipídicos provenientes de *M. tuberculosis* y que de esta manera participen en el desarrollo de una adecuada respuesta inmune celular contra el bacilo. Otra posible explicación para este resultado es que la expresión de CD1b sea parte de los mecanismos de defensa del hospedero para eliminar a *M. tuberculosis*, ya que el reconocimiento de células infectadas, vía CD1b, por parte de linfocitos T CD8+ activaría mecanismos citotóxicos que serían eficientes para limitar el proceso infeccioso. Estas poblaciones de linfocitos T restringidos a CD1 (grupo 1) ya han sido descritas con anterioridad como importantes mediadoras de la respuesta inmune innata ante diversos patógenos.<sup>23,24</sup> No es sorprendente identificar que los monocitos CD14+ de pacientes con TBp no muestren una mayor expresión de la molécula HLA clase I y las isoformas CD1a o CD1d ya que previamente se había descrito que algunos patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*, *Leishmania donovani* o *Leishmania major*, pueden regular de manera negativa la expresión de moléculas de la familia CD1, lo que limita el proceso de diferenciación y maduración de monocitos hacia células dendríticas como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune.<sup>25-27</sup> Es importante recordar que *M. tuberculosis* ha desarrollado diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune, uno de ellos es interferir con la presentación de antígenos vía MHC clase II,<sup>28</sup> moléculas que se expresan preferencialmente en células presentadoras de antígeno profesionales y su expresión se incrementa gracias a la producción de IFN- $\gamma$ .<sup>29</sup> En la infección crónica de los macrófagos por *M. tuberculosis* se inhibe la presentación de antígenos restringidos a las moléculas clase II, este fenómeno puede ser consecuencia de: 1) secuestro intracelular de moléculas clase II; 2) disminución en la expresión del transactivador clase II (CIITA, por sus siglas en inglés); y 3) inhibición en la señalización intracelular dependiente de IFN- $\gamma$ .<sup>30,31</sup> En infecciones por *M. tuberculosis*, a diferencia de lo observado para MHC-II, se ha demostrado que la expresión basal de moléculas MHC de clase I en monocitos de sangre periférica provenientes de pacientes con TBp no tiene valores diferentes a los que provienen de sujetos sanos,<sup>32</sup> resultado que concuerda con nuestro hallazgo.

En cuanto a la expresión de la isoforma CD1b los estudios *in vitro* no son concluyentes, en el año 2001

Giuliani *et ál* describieron que *Mycobacterium bovis* BCG regula de manera negativa la expresión de CD1b en macrófagos derivados de monocitos de individuos sanos.<sup>33</sup> Estudios posteriores sugieren que los lípidos provenientes de *M. tuberculosis* sí pueden incrementar la expresión de la molécula CD1b por un mecanismo dependiente del receptor tipo Toll TLR2.<sup>34</sup> En este estudio, nosotros hemos identificado *ex vivo* que la isoforma CD1b es expresada en monocitos de sangre periférica de pacientes con TBp, probablemente en consecuencia a la exposición de estímulos microbianos. Aunque desconocemos cuál es el estímulo antigénico micobacteriano que en pacientes con tuberculosis induce la expresión de CD1b, es posible que estos monocitos activen linfocitos T antígeno específicos para que participen en la respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis* lisando a las células infectadas y, por lo tanto, controlando el crecimiento micobacteriano.

Son necesarios más estudios para identificar el comportamiento temporal de la expresión de las moléculas CD1 en los monocitos, así como su impacto en la activación de la respuesta inmune celular una vez que los pacientes con TBp han iniciado su tratamiento.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CONACYT, número de proyecto 82434.

## REFERENCIAS

1. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008*. WHO/HTM/TB/2008.393.
2. *Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing*. WHO report 2009. Accesible en: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/pdf/key\\_points\\_es.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/key_points_es.pdf)
3. Russell DG. *Who puts the tubercle in tuberculosis?* Nat Rev Microbiol 2007;5: 39-47.
4. Bendelac A. *CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes*. Science 1995;269:185-186.
5. Barral DC, Brenner MB. *CD1 antigen presentation: how it works*. Nat Rev Immunol 2007;7:929-941.
6. Van Rhijn I, Koets AP, Im JS, *et ál*. *The bovine CD1 family contains group 1 CD1 proteins, but no functional CD1d*. J Immunol 2006;176:4888-4893.
7. Dascher CC, Hiromatsu K, Xiong X, *et ál*. *Conservation of CD1 intracellular trafficking patterns between mammalian species*. J Immunol 2002;169:6951-6958.
8. Bradbury A, Calabi F, Milstein C. *Expression of CD1 in the mouse thymus*. Eur J Immunol 1990;20:1831-1836.
9. Dougan SK, Kaser A, Blumberg RS. *CD1 expression on antigen-presenting cells*. Curr Top Microbiol Immunol 2007;314:113-141.



10. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. *Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells.* Nature 1994;372:691-694.
11. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, et ál. *Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria.* Nat Immunol 2006;7:978-986.
12. Naderer T, McConville MJ. *The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective.* Cell Microbiol 2008;10:301-308.
13. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. *Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes.* Nature 1989;341:447-450.
14. Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, Brenner MB, Behar SM. *Innate invariant NKT cells recognize Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria.* PLoS Pathog 2008;4:e1000239.
15. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. *The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms.* Nat Rev Microbiol 2007;5:405-417.
16. Mariotti S, Teloni R, Iona E, et ál. *Mycobacterium tuberculosis diverts alpha interferon-induced monocyte differentiation from dendritic cells into immunoprivileged macrophage-like host cells.* Infect Immun 2004;72:4385-4392.
17. Rajashree P, Krishnan G, Das SD. *Impaired phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in pulmonary tuberculosis.* Tuberculosis (Edinb) 2009;89:77-83.
18. Tentori L, Graziani G, Porcelli SA, et ál. *Rifampin increases cytokine-induced expression of the CD1b molecule in human peripheral blood monocytes.* Antimicrob Agents Chemother 1998;42:550-554.
19. *Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children.* This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. Am J Respir Crit Care Med 2000;161(4 Pt 1):1376-1395.
20. Brigl M, Brenner MB. *CD1: antigen presentation and T cell function.* Annu Rev Immunol 2004;22:817-890.
21. Kawashima T, Norose Y, Watanabe Y, et ál. *Cutting edge: major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guérin is mediated by CD1 molecules.* J Immunol 2003;170:5345-5348.
22. Rosat JP, Grant EP, Beckman EM, et ál. *CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T cell pool.* J Immunol 1999;162:366-371.
23. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et ál. *Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity.* J Exp Med 2000;191:937-948.
24. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, et ál. *Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection.* Science 1997;276:1684-1687.
25. Amprey JL, Späth GF, Porcelli SA. *Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with Leishmania donovani.* Infect Immun 2004;72:589-592.
26. Donovan MJ, Jayakumar A, McDowell MA. *Inhibition of groups 1 and 2 CD1 molecules on human dendritic cells by Leishmania species.* Parasite Immunol 2007;29:515-524.
27. Mariotti S, Teloni R, Iona E, et ál. *Mycobacterium tuberculosis subverts the differentiation of human monocytes into dendritic cells.* Eur J Immunol 2002;32:3050-3058.
28. Flynn JL, Chan J. *Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: living with the enemy.* Curr Opin Immunol 2003;15:450-455.
29. Noss EH, Harding CV, Boom WH. *Mycobacterium tuberculosis inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages.* Cell Immunol 2000;201:63-74.
30. Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies WA, de Jong G, Reiner NE. *Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium tuberculosis is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers.* J Immunol 1998;161:4882-4893.
31. Wojciechowski W, DeSanctis J, Skamene E, Radzioch D. *Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene.* J Immunol 1999;163:2688-2696.
32. Garibay-Escobar A, Estrada-García I, Estrada-Parra S, Santos-Argumedo L. *Integrated measurements by flow cytometry of the cytokines IL-2, IFN-gamma, IL-12, TNF-alpha and functional evaluation of their receptors in human blood.* J Immunol Methods 2003;280:73-88.
33. Giuliani A, Prete SP, Graziani G, et ál. *Influence of Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guérin on in vitro induction of CD1 molecules in human adherent mononuclear cells.* Infect Immun 2001;69:7461-7470.
34. Roura-Mir C, Wang L, Cheng TY, et ál. *Mycobacterium tuberculosis regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2.* J Immunol 2005;175: 1758-1766.

✉ **Correspondencia:**

Dra. Leslie Chávez-Galán,  
Laboratorio de Inmunoquímica. Instituto Nacional de  
Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.  
Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI,  
Delegación Tlalpan. México, D.F., 14080  
Teléfono (+52)55-54871700, extensión 5270  
Correo electrónico: qclchagas@hotmail.com

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.



## Bibliografía

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008. "WHO/HTM/TB/2008.393".
2. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
3. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(1):39-47.
4. Palomino-Leão-Ritacco. Tuberculosis 2007, from basic science to patient care. Tuberculosis textbook.com first edition. Chapter 3
5. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998; 393(6685):537-44.
6. Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, et al. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(12):5157-62.
7. Russell DG, Barry CE 3rd, Flynn JL. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science.* 2010. 328(5980):852-6.
8. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Winter N, Sher A, Germain RN. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity.* 2008. 28(2):271-84.
9. Lefford MJ. Transfer of adoptive immunity to tuberculosis in mice. *Infect Immun.* 1975. 11(6):1174-81.
10. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009. 27:393-422.

11. Fathman CG, Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol.* 2007. 7(8):599-609.
12. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000. 343(10):702-9.
13. Forbes EK, Sander C, Ronan EO, McShane H, Hill AV, Beverley PC, Tchilian EZ. Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge in mice. *J Immunol.* 2008. 181(7):4955-64.
14. Antas PR, Sales JS, Pereira KC, Oliveira EB, Cunha KS, Sarno EN, Sampaio EP. Patterns of intracellular cytokines in CD4+ and CD8+ T cells from patients with *Mycobacterial* infections. *Braz J Med Biol Res.* 2004, 37(8); 1119-1129.
15. Bastian M, Braun T, Bruns H, Röllinghoff M, Stenger S. *Mycobacterial* lipopeptides elicit CD4+ CTLs in *Mycobacterium tuberculosis*-infected humans. *J Immunol.* 2008. 180(5):3436-46.
16. Giri PK, Schorey JS. Exosomes derived from *M. Bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE.* 2008. 3(6):e2461.
17. Lewinsohn DA, Winata E, Swarbrick GM, Tanner KE, Cook MS, Null MD, Cansler ME, Sette A, Sidney J, Lewinsohn DM. Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLoS Pathog.* 2007 Sep 21;3(9):1240-9.
18. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2008. 8(2):107-19.

- 19.** Silva CL, Lowrie DB. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2000. 68(6):3269-74.
- 20.** Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med*. 2003. (8):1039-46.
- 21.** Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol*. 2004. 172(9):5277-86.
- 22.** Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, Sandhoff K, Brinkmann V, Kaufmann SH, Schaible UE. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*. 2006. 24(1):105-17.
- 23.** González-Amaro R, Portales-Pérez DP, Baranda L, Moncada B, Toro C, López-Briones S, Espitia C, Mancilla R. Co-stimulatory signals increase the reactivity of gammadelta T cells towards mycobacterial antigens. *Clin Exp Immunol*. 2000. 120(3):468-75.
- 24.** Chen ZW. Immune regulation of gammadelta T cell responses in mycobacterial infections. *Clin Immunol*. 2005. 116(3):202-7.
- 25.** Poupot M, Fournié JJ. Non-peptides antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol Lett*. 2004. 95(2):129-38.

- 26.** Russano AM, Bassotti G, Agea E, Bistoni O, Mazzocchi A, Morelli A, Porcelli SA, Spinozzi F. CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal  $\gamma\delta$  T lymphocytes. *J Immunol.* 2007. 178(6):3620-6.
- 27.** Martino A, Casetti R, Sacchi A, Poccia F. Central memory V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T lymphocytes primed and expanded by Bacillus Calmette-Guérin-Infected Dendritic cells kill Mycobacterial-infected Monocytes. *J Immunol.* 2007. 179 (5); 3057- 3064.
- 28.** Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Krensky AM, Bonneville M, Peyrat MA, Caccamo N, Sireci G, Salerno A. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T lymphocytes. *J Infect Dis.* 2001. 184 (8): 1082-5.
- 29.** De La Barrera SS, Finiasz M, Frias A, Alemán M, Barrionuevo P, Fink S, Franco MC, Abbate E, del C Sasiain M. Specific lytic activity mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2003; 132:450-461.
- 30.** Wrobel P, Shojaei H, Schitteck B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, Kabelitz D, Wesch D. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human  $\gamma\delta$  T cells: Involvement of NKG2D ligands and T-cells receptor-versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol.* 2007. 66 (2-3); 320-8.
- 31.** Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by  $\gamma\delta$  T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol.* 2006, 177; 4662-4669.

- 32.** Peng MY, Wang ZH, Yao CY, Jiang LN, Jin QL, Wang J, Li BQ. Interleukin 17-producing gamma delta T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cell Mol Immunol*. 2008. 5(3):203-8.
- 33.** Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*. 2007. 178(6):3786-96.
- 34.** Caccamo N, Sireci G, Meraviglia S, Dieli F, Ivanyi J, Salerno A. gammadelta T cells condition dendritic cells in vivo for priming pulmonary CD8 T cell responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*. 2006. 36(10):2681-90.
- 35.** Harris J, Hope JC, Keane J. Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2008. 198(12):1842-50.
- 36.** Chan J, Flynn J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol*. 2004. 110(1):2-12.
- 37.** Ehart S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M, Gunzburg S, Nathan C, et al. A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997;186:1885-96.
- 38.** Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR Jr. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2003;48:453-64.

- 39.** 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.
- 40.** Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 1999. 97:435-47.
- 41.** Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, et al. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 2007. 130:37-50.
- 42.** Hayakawa E, Tokumasu F, Nardone GA, Jin AJ, Hackley VA, Dvorak JA. A Mycobacterium tuberculosis-derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains. *Biophys J* 2007. 93:4018-30.
- 43.** Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies WA, de Jong G, Reiner NE. Attenuation of HLA-DR Expression by Mononuclear Phagocytes Infected with Mycobacterium tuberculosis Is Related to Intracellular Sequestration of Immature Class II Heterodimers. *J Immunol* 1998. 161:4882-93.
- 44.** Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nuñez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, et al. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol* 2007. 179:2509-19.
- 45.** Chen M, Gan H, Remold HG. A mechanism of virulence: virulent Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J Immunol* 2006. 176:3707-16.

46. Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, McMaster WR. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* 2003. 170:430-7.
47. Zhang J, Jiang R, Takayama H, Tanaka Y. Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. *Microbiol Immunol* 2005. 49:845-52.
48. Liu K. Role of apoptosis resistance in immune evasion and metastasis of colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2010. 2(11):399-406.
49. Andersson J, Samarina A, Fink J, Rahman S, Grundström S. Impaired expression of perforin and granulysin in CD8+ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 2007; 75(11):5210-22.
50. Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U. Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes. *BMC Immunol*. 2007;8:9.
51. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today*. 1995 Apr; 16 (4) 194-201.
52. Takata H, Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J Immunol*. 2006;177(7):4330-40.
53. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, Jaju M, Lieberman J. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated

caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem.* 2001;276(46):43285-93.

- 54.** Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee YJ, Raja SM, Froelich CJ. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol.* 2003;160(6):875-85.
- 55.** Chan KS, Kaur A. Flow cytometric detection of degranulation reveals phenotypic heterogeneity of degranulating CMV-specific CD8+ T lymphocytes in rhesus macaques. *J Immunol Methods.* 2007;325(1-2):20-34.
- 56.** Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, Gavathiotis E, Wei Y, Werner MH. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell.* 2006;22(5):599-610.
- 57.** Gross A. Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle? *J Bioenerg Biomembr.* 2005;37(3):113-9.
- 58.** Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Häcker G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H. NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol.* 2004;166(3):369-80.
- 59.** Caccamo N, Guggino G, Meraviglia S, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, Bocchino M, Galati D, Matarese A, Nouta J, Klein MR, Salerno A, Sanduzzi A, Dieli F, Ottenhoff TH. Analysis of Mycobacterium tuberculosis-specific CD8 T-cells in patients with active tuberculosis and in individuals with latent infection. *PLoS One.* 2009;4(5):e5528.
- 60.** Chen CY, Huang D, Wang RC, Shen L, Zeng G, Yao S, Shen Y, Halliday L, Fortman J, McAllister M, Estep J, Hunt R, Vasconcelos D, Du G, Porcelli SA,



Larsen MH, Jacobs WR Jr, Haynes BF, Letvin NL, Chen ZW. A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000392.

61. Murphy SJ, Watt DJ, Jones GE. An evaluation of cell separation techniques in a model mixed cell population. *J Cell Sci.* 1992 Aug;102 ( Pt 4):789-98.
62. Lecoœur H, Février M, Garcia S, Rivière Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 2001 Jul 1;253(1-2):177-87.
63. Aguilar LD, Infante E, Bianco MV, Cataldi A, Bigi F, Pando RH. Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis* mce-2 and mce-3 mutants in a Balb/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Vaccine.* 2006. 24 (13): 2333-2342.
64. Boquest AC, Day BN, Prather RS. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod.* 1999 Apr;60(4):1013-9.
65. Jacobsen M, Detjen AK, Mueller H, Gutschmidt A, Leitner S, Wahn U, Magdorf K, Kaufmann SH. Clonal expansion of CD8+ effector T cells in childhood tuberculosis. *J Immunol* 2007, 179: 1331-1339.
66. Shen Y, Zhou D, Qiu L, Lai X, Simon M, Shen L, Kou Z, Wang Q, Jiang L, Estep J, Hunt R, Clagett M, Sehgal PK, Li Y, Zeng X, Morita CT, Brenner MB, Letvin NL, Chen ZW. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science.* 2002;295(5563):2255-8.

- 67.** Spencer CT, Abate G, Blazevic A, Hoft DF. Only a subset of phosphoantigen-responsive gamma9delta2 T cells mediate protective tuberculosis immunity. *J Immunol.* 2008;181(7):4471-84.
- 68.** Ibegbu C, Brodie-Hill A, Kourtis AP, Carter A, McClure H, Chen ZW, Nahmias AJ. Use of human CD3 monoclonal antibody for accurate CD4+ and CD8+ lymphocyte determinations in macaques: phenotypic characterization of the CD3- CD8+ cell subset. *J Med Primatol.* 2001;30(6):291-8.
- 69.** Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285(5428):727-9.
- 70.** Antas PR, Oliveira EB, Milagres AS, Franken KC, Ottenhoff TH, Klatser P, Sarno EN, Sampaio EP. Kinetics of T cell-activation molecules in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(8):1097-9.
- 71.** Ashtekar MD, Samuel AM, Kadival GV, Sakhalkar V, Rajadhyaksha S, Viridi SS. T lymphocytes in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res.* 1993;97:14-7.
- 72.** Kenny EF, O'Neill LA. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine.* 2008 Sep;43(3):342-9.
- 73.** Tapping RI, Tobias PS. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *J Endotoxin Res.* 2003;9(4):264-8.

- 74.** Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009. 458(7242):1191-5.
- 75.** Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, et al. Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin peptidoglycan. *Infect Immun*. 2003. 71(8):4238-49.
- 76.** Branger J, Leemans JC, Florquin S, Weijer S, Speelman P, Van Der Poll T. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice. *Int Immunol*. 2004. 16(3):509-16.
- 77.** Shim TS, Turner OC, Orme IM. Toll-like receptor 4 plays no role in susceptibility of mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003. 83(6):367-71.
- 78.** Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*. 2007. 27(1):135-44.
- 79.** Alonso S, Pethe K, Russell DG, Purdy GE. Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104 (14); 6031- 6.
- 80.** Roura-Mir C, Wang L, Cheng TY, Matsunaga I, Dascher CC, Peng SL, Fenton MJ, Kirschning C, Moody DB. *Mycobacterium tuberculosis* regulated CD1 antigens presentation pathways through TLR-2. *J Immunol*. 2005. 175 (3):1758-1766.

- 81.** De Libero G, Mori L. How T cells get grip on lipid antigens. *Curr Opin Immunol.* 2008. 20(1):96-104.
- 82.** Nair S, Ramaswamy PA, Ghosh S, Joshi DC, Pathak N, Siddiqui I, Sharma P, Hasnain SE, Mande SC, Mukhopadhyay S. The PPE18 of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage. *J Immunol.* 2009. 183(10):6269-81.
- 83.** Aliprantis A.O, Yang R.B, Mark M.R, Suggett S, Devaux B, Radolf J.D, Klimpel G.R, Godowski P, Zychlinsky A, Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2, *Science* 285 (1999) 736-739.
- 84.** Aliprantis A.O, Yang R.B, Weiss D.S, Godowski P, Zychlinsky A, The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2, *EMBO J.* 19 (2000) 3325-3336.
- 85.** López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol.* 2003. 170(5):2409-16.
- 86.** Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB, et al. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2004. 190(6):1167-76.
- 87.** Sanchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scand J Immunol.* 2009. 69(1):20-8.
- 88.** Esquivel-Solís H, Quiñones-Falconi F, Zarain-Herzberg A, Amieva-Fernández RI, López-Vidal Y. Impaired activation of Stat1 and c-Jun as a

possible defect in macrophages of patients with active tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2009 Oct;158(1):45-54.

- 89.** Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:141-65.
- 90.** Wlodkovic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Rapid quantification of cell viability and apoptosis in B-cell lymphoma cultures using cyanine SYTO probes. *Methods Mol Biol.* 2011;740:81-9.
- 91.** Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3-11.
- 92.** Ziegler-Heitbrock L. The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007. 81(3):584-92.
- 93.** Sánchez M.D, García Y, Montes C, París S.C, Rojas M, Barrera L.F, Arias M.A, García L.F, Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment, *Microbes Infect.* 8 (2006) 2492-2500.
- 94.** Prabha C, Rajashree P, Sulochana D.D, TLR2 and TLR4 expression on the immune cells of tuberculous pleural fluid, *Immunol. Lett.* 117 (2008) 26-34.

- 95.** Budak F, Uzaslan EK, Cangür S, Göral G, Oral HB. Increased pleural soluble fas ligand (sFasL) levels in tuberculosis pleurisy and its relation with T-helper type 1 cytokines. *Lung*. 2008;186(5):337-43.
- 96.** Tentori L, Graziani G, Porcelli SA, Sugita M, Brenner MB, Madaio R, Bonmassar E, Giuliani A, Aquino A. Rifampin increases cytokine-induced expression of the CD1b molecule in human peripheral blood monocytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(3):550-4.
- 97.** Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, Bukowski JF. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. 2001;15(1):83-93.
- 98.** Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 2006;108(9):3168-75.
- 99.** Yuk JM, Shin DM, Yang CS, Kim KH, An SJ, Rho J, Park JK, Jo EK. Role of apoptosis-regulating signal kinase 1 in innate immune responses by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(1):100-7.
- 100.** Palma C, Iona E, Ebensen T, Guzman CA, Cassone A. The Toll-like Receptor 2/6 Ligand MALP-2 Reduces the Viability of *Mycobacterium tuberculosis* in Murine Macrophages. *Open Microbiol J*. 2009;3:47-52.
- 101.** Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright M, Vazirnia A, Zhang X, Steinmeyer A, Zügel U, Hollis BW, Cheng G, Modlin RL. Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways

in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. PLoS One. 2009;4(6):e5810.

- 102.** Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. PLoS Pathog. 2010 Feb 26;6(2):e1000661.

### Lista de figuras

#### ➤ Capitulo 1

Figura 1: Respuesta inmune inicial a Mtb. Tomado de Science. 2010;328(5980):852-6, modificado.

Figura 2: Participación de linfocitos T en la respuesta inmune a Mtb. Tomado de Annu Rev Immunol. 2009;27:393-422, modificado.

#### ➤ Capitulo 2

Figura 1: La citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ es independiente de la molécula MHC-I.

Figura 2: Uso de controles de isotipo y delimitación de la región e linfocitos.

Figura 3: Identificación de la concentración óptima de anticuerpo.

Figura 4: Pureza de células CD8+ y CD14+ para ensayos de citotoxicidad.

Figura 5: Las células CD8+ se tiñen eficientemente con 200 nM de CFSE.

Figura 6: La concentración óptima de CFSE es 200 nM.

Figura 7: Células en misma fase del ciclo celular son homogéneas a la tinción por CFSE.

Figura 8: Con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína antigénica se observa el mayor porcentaje de citotoxicidad.

Figura 9: Con 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del anticuerpo bloqueador anti HLA-ABC se bloquea el 98% de las moléculas HLA-ABC.

Figura 10: Enfermos de TBP tienen mayor porcentaje de linfocitos TCD8+ TCR  $\alpha\beta$ .

Figura 11: Expresión de CD16, CD56 y CD161 en células CD8+.

Figura 12: Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de linfocitos TCD8+NKG2D+ y TCD8+NKG2A+ que los sujetos control.

Figura 13: Gráfica de puntos representativa del porcentaje de co-expresión de CD25 o CD69 en células CD8+.

Figura 14: Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de linfocitos TCD8+ CD25+ y TCD8+CD69+ que los sujetos control.

Figura 15: Porcentaje de muerte celular al utilizar diferentes concentraciones de Filtrado H37Rv.

Figura 16: La citotoxicidad de los monocitos de paciente con TBP es dependiente de HLA-I y de TLR2.



➤ Capítulo 3

Figura 1: La región de células CD14+ presenta al menos 90% de positividad a esta molécula.

Figura 2: Con 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo bloqueador anti-TLR2 se evita en un 85% la expresión de TLR2 en células CD14+.

Figura 3: Con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo bloqueador anti-TLR4 se evita en un 90% la expresión de TLR4 en células CD14+.

Figura 4: El 7-AAD solo tiñe el DNA cuando la célula esta dañada.

Figura 5: Enfermos de TBP tienen mayor frecuencia de células CD14+ en sangre periférica que los sujetos control.

Figura 6: Monocitos de enfermos de TBP tienen mayor porcentaje y densidad de expresión TLR2.

Figura 7: Monocitos de enfermos de TBP tienen mayor densidad de expresión de TR4.

Figura 8: Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de monocitos CD95+ que los sujetos control.

Figura 9: Enfermos de TBP tienen mayor porcentaje de monocitos CD1B+ que los sujetos control.

Figura 10: Enfermos de TBP tienen mayor porcentaje de monocitos MICA/B+ que los sujetos control.

Figura 11: Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de monocitos HLA-A,B,C que los sujetos control.

Figura 12: Enfermos de TBP tienen el mismo porcentaje de monocitos HLA-DR,DP,DQ que los sujetos control.

Figura 13: Monocitos de enfermos de TBP mueren a mayor tasa que los de sujetos control, aún en ausencia de estímulo antigénico.

Figura 14: Monocitos TLR2<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> son más susceptibles a la muerte celular.

Figura 15: Monocitos de enfermos de TBP mueren vía TLR2 al ser estimulados con Filtrado H37Rv.

Figura 16: Monocitos de paciente con TBP son caspasa 9+, citocromo c desnaturalizado+.

Figura 17: Monocitos de enfermos de TBP tienen altos niveles de TNF- $\alpha$  en suero pero no se incrementan moléculas de la vía de las MAPK.

Figura 18: Ligandos sintéticos para el heterodímero TLR2/TLR1 induce muerte celular.

#### Lista de cuadros

##### ➤ Capitulo 2

Cuadro 1: Expresión de TCR en células CD8+

Cuadro 2: Expresión de moléculas de la familia NKG2 en linfocitos T CD8+.

Cuadro 3: Expresión de moléculas de activación en linfocitos T CD8+.

Cuadro 4: Porcentaje de actividad citotóxica a diferentes concentraciones de antígeno.

➤ Capítulo 3

Cuadro 1: Frecuencia de células CD14+ en sangre periférica

Cuadro 2: Expresión de la molécula TLR-2 en células CD14+

Cuadro 3: Expresión de la molécula TLR4 en monocitos CD14+

Cuadro 4: Expresión de la molécula CD95 en monocitos CD14+

Cuadro 5: Expresión de la molécula CD1B en monocitos CD14+

Cuadro 6: Expresión de la molécula MIC A/B en monocitos CD14+

Cuadro 7: Expresión de la molécula HLA-A,B,C en monocitos CD14+

Cuadro 8: Expresión de la molécula HLA-DP,DQ,DR en monocitos CD14+