



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EL SISTEMA FIBRINOLITICO EN LA INFECCION POR  
*Mycobacterium tuberculosis***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Eden Marcela Rodríguez Flores

TUTOR

*Dra. Clara Inés Espitia Pinzón*  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

COMITÉ TUTOR

*Dr. Rogelio Hernández Pando*  
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
*Dra. Bertha González Pedrajo*  
[Insituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MÉXICO, D. F., Marzo, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



---

*"Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él"*

*Louis Pasteur*

*Más maravillosa es la ciencia que mi capacidad; alta es, no puedo comprenderla.*

*Salmo 136:6*

---

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.

Durante la realización de este proyecto de investigación se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 81214 y el apoyo DGPA IN221107 de la Universidad Nacional Autónoma de México. Además del estímulo a investigaciones médicas de la Fundación “Miguel Alemán Valdés”.

---

# *Agradecimientos*

---

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, a quien agradezco inmensamente su asesoría, el tiempo e interés que dedicó a este trabajo. Muchas gracias por que me ha permitido aprender, crecer y formarme. Gracias por confiar en mí y por la paciencia en todos esos años.

Agradezco al Dr. Rogelio Hernández Pando, y al departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, por su contribución en el desarrollo de este proyecto. Sin todo su apoyo este trabajo tampoco hubiera sido posible.

Agradezco además la asistencia técnica de la M. en C. Cristina Parada Colín del Instituto de Investigaciones Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México, muchas gracias por tu apoyo.

Este trabajo se desarrolló además en la Unidad de Bioseguridad (BSL-3) del Instituto de Investigaciones Biomédicas con el apoyo técnico de la M. en C. Erika Segura Salinas. Agradezco tu ayuda y por tu disposición para trabajar y enseñarnos.

Agradezco también al Dr. Riccardo Manganeli del departamento de Medicina Molecular de la Universidad de Padova, Italia. Muchas gracias por permitirme hacer una estancia en su laboratorio. Asi mismo, al Dr. Stefano Casonato por su dedicación y apoyo durante esta estancia, muchas gracias por todo lo que me enseñaste. Vi ringrazio per il tempo che avete preso da insegnarmi. Grazie per la sua disponibilità e comprensione durante tutti i mesi ho trascorso nel suo laboratorio. Ho imparato molto.

Al Dr. Jaime Campuzano Granados del departamento de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Gracias por enseñarme a trabajar con el modelo murino, y por tu ayuda para los análisis histológicos. Muchas gracias, este trabajo también es tuyo.

---

Mi reconocimiento también a la Dra. Diana Aguilar León, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición por su ayuda y apoyo técnico, especialmente en el análisis por PCR cuantitativo. Gracias por que pude contar siempre contigo.

Un reconocimiento especial para Leticia García Gutierrez, asistente del posgrado en ciencias Bioquímicas. Gracias Lety por tu ayuda invaluable en todos nuestros trámites. Gracias por tu dedicación y por que hemos sido más que un número de cuenta para ti.

Durante la realización de este proyecto de investigación se contó con el apoyo No. 81214 de CONACyT y el apoyo DGPA IN221107. Además agradecemos a la Fundación “Miguel Alemán Valdés” por el donativo otorgado para este proyecto.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por brindarme una beca para mis estudios de doctorado con número de registro: CVU 166901. Además, gracias por haberme otorgado una beca mixta para realizar una estancia como parte de este trabajo en la Universidad de Padova, Italia. Finalmente, agradezco por haberme otorgado un apoyo complementario para finalizar satisfactoriamente este proyecto.

Agradezco a mi comité tutor que siempre me mostró su apoyo para el desarrollo de este proyecto. El comité tutor estuvo conformado por:

-  Dra. Clara Ines Espitia Pinzón, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
-  Dra. Bertha González Pedraja, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
-  Dr. Rogelio Hernández Pando, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Mi gratitud para el jurado que me brindo su tiempo y apoyo para la revisión de esta tesis. Agradezco sus comentarios y sus valiosas observaciones. El jurado que examinó este trabajo estuvo conformado por:

-  Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
-  Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán
-  Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez
-  Dra. Yolanda López Vidal
-  Dra. Gloria Soldevilla Melgarejo

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México en primer lugar por permitirme formarme como Bióloga y por darme además la oportunidad de cursar mi posgrado en esta Maxima Casa de Estudios.

---

# Dedicatoria

---

*En primer lugar, dedico esta tesis a ti, quien me permitido finalizar este ciclo de mi vida. Para ti, que tienes tu tiempo, y es perfecto. Para ti, que tienes pensamientos de bien y no de mal para mí. Para ti, que conoces lo más profundo de mi corazón. Para ti quien me ha dado sabiduría... A mi Padre y creador, a Jesus, Salvador mio, a mi Consolador y guía... Jehová cumplirá su propósito en mí...*

*A mis padres, que siempre me han apoyado. Gracias a ambos por su apoyo y amor en todos estos años. Gracias por permitirme seguir en este camino que tanto disfruto. Gracias Mamá por que siempre has sido un ejemplo de fortaleza, dedicación y entrega. Gracias Papá, por que has sido mi ejemplo de tenacidad, trabajo y carácter. Gracias a ambos por enseñarme todo y amarme desde que era un tumor.*

*Los amo y agradezco a Dios por permitime ser su hija.*

*A mis hermanas, mis dos personas favoritas en el mundo. Gracias por ser mis mejores amigas y confidentes. Por que me han acompañado en cada momento. Por que he aprendido tantas cosas de ustedes. Por cada momento en que nos hemos escuchado, por cada palabra de apoyo, aliento y amor que hemos compartido. También por los momentos inolvidables que hemos pasado juntas. Dios me ha regalado dos joyas en esta tierra, y me permitió crecer y ser hermana de mujeres inteligentes, esforzadas, valientes y tan simpáticas. Las amo Renata y Daniela.*

*A mis abuelos, que aunque ya no están aquí sé que ahora me cuidan desde el cielo. Esta tesis la dedico en especial a mi abuelo Guillermo, que siempre tuvo confianza en esta futura doctora. Gracias a mi enorme y grandiosa familia, gracias a todos mis tios, primos y sobrinos por su apoyo y amor. Gracias por que siempre me han demostrado su confianza.*

---

# Contenido

---

CONTENIDO.....	8
INDICES.....	11
• Lista de abreviaturas.....	11
• Índice de figuras.....	12
• Índice de tablas.....	13
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	16
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.....	18
1.1. La tuberculosis.....	18
1.1.1. Epidemiología de la tuberculosis.....	19
1.1.2. Agente causal.....	22
1.1.3. Inmunología de la tuberculosis.....	24
1.1.4. Mecanismos de evasión de M. tuberculosis.....	28
1.1.5. Diseminación de la tuberculosis.....	30
1.1.6. Tuberculosis extrapulmonar.....	31
1.2. Mecanismos de invasividad bacteriana.....	34
1.3. El sistema fibrinolítico.....	36
1.3.1. Plasminógeno.....	37
1.3.2. Plasmina.....	39
1.3.3. Activador de Plg tipo tisular.....	40
1.3.4. Activador de Plg tipo uroquinasa.....	41
1.3.5. Alfa 2- anti-Plasmina.....	42
1.3.6. Inhibidores del sistema fibrinolítico.....	42
1.3.7. Función fisiológica del sistema fibrinolítico.....	43
1.4. Interacción del Sistema Fibrinolítico con microorganismos.....	44
1.4.1. Receptores bacterianos para Plg.....	47
1.4.2. Activadores de Plg bacterianos.....	49
1.5. El sistema fibrinolítico en la infección.....	52

CAPITULO 2: ANTECEDENTES.....	56
2.1. El sistema fibrinolítico en la tuberculosis.....	56
CAPITULO 3: JUSTIFICACION.....	61
CAPITULO 4: HIPOTESIS.....	62
CAPITULO 5: OBJETIVOS.....	63
5.1. Objetivo general.....	63
5.2. Objetivos particulares.....	64
CAPITULO 6: MATERIAL Y METODOS.....	65
6.1. Estrategia Metodológica.....	65
6.2. Cultivo de micobacterias.....	66
6.3. Conteo de bacterias por UFC.....	66
6.4. Unión y activación de Plasminógeno.....	67
6.5. Modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva.....	68
6.6. Expresion e identificación de activadores de Plasminogeno en respuesta a micobacterias.....	73
6.7. Participación del Plasminógeno en la diseminación de las Micobacterias.....	74
6.8. Análisis estadístico.....	75
CAPITULO 7: RESULTADOS.....	77
7.1. Unión y Activación de Plasminógeno por <i>Mycobacterium</i> <i>bovis</i> BCG.....	77
7.2. Expresión de las moléculas del sistema fibrinolítico en un modelo de tuberculosis pulmonar en el ratón. ....	80
7.3. Expresión e identificación de activadores de Plasminógeno en respuesta a micobacterias. ....	90
7.4. Participación del Plasminógeno en la diseminación de las micobacterias.....	93
CAPITULO 8: DISCUSION.....	95
CAPITULO 9: CONCLUSIONES.....	108

---

CAPITULO 10: BIBLIOGRAFIA.....	109
CAPITULO 11: ANEXO.....	132
11.1. ARTICULO PUBLICADO.....	133

---

# Lista de Abreviaturas

---

	Abreviatura
Activador de Plasminógeno tipo-uroquinasa	uPA
Activador tisular de Plasminógeno	tPA
Activadores de Plasminógeno	PA
Aminoácidos	Aa
Arginina	Arg-
Arginina	Arg
Bacilo de Calmette-Guerin	BCG
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Densidad óptica	D.O.
Diaminobencidina	DAB
Días post infección	d.p.i.
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sodio	SDS-PAGE
Estafiloquinasa	Sth
Estreptoquinasa	Stk
Inhibidores específicos de Activadores de Plasminógeno	PAIs
Inhibidores tisulares de metaloproteinasas	TIMPs
Lisina	Lys
Matriz extracelular	MEC
Membrana basal	MB
Metaloproteinasas de la matriz	MMPs
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tb</i>
Organización Mundial de la Salud	OMS
Plasmina	Plm
Plasminógeno	Plg
Receptor para uPA	uPAr
Sitios de unión a lisina (lysine binding sites)	LBS
Valina	Val
Virus de la Inmunodeficiencia Humana	VIH

---

---

# Índice de Figuras

---

1.1. Tendencias mundiales de las tasas estimadas de incidencia, prevalencia y mortalidad de la tuberculosis .....	11
1.2. Tasa de incidencia mundial de la tuberculosis .....	20
1.3. Resultados del tratamiento de pacientes con diagnóstico de MDR-TB .....	21
1.4. Micrografía electrónica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
1.5. Formación del granuloma. ....	27
1.6. Esquema de la estructura del Plasminógeno humano.....	38
7.1.1. Detección de Plasminógeno unido a la superficie micobacteriana.....	77
7.1.2. Inhibición de la unión del Plasminógeno a la superficie micobacteriana por EACA. ....	78
7.1.3. Activación del Plasminógeno unido a la superficie micobacteriana.....	79
7.2.1. Detección de Plasminógeno en pulmones de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> .....	80
7.2.2. Detección de tPA en pulmones de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> .....	81
7.2.3. Detección de Plasminógeno en homogeneizados pulmones por ELISA.....	82
7.2.4. Detección de tPA en homogeneizados pulmones por ELISA.....	83
7.2.5. Actividad enzimática de Plasmina (A) y tPA (B).....	84
7.2.6. Características histológicas e inmunohistoquímicas en los pulmones de los ratones BALB/c no infectados (A) y a 1 (B), 3 (C) y 7 (D) días.....	86
7.2.7. Características histológicas e inmunohistoquímicas en los pulmones de los ratones BALB/c a los 14 (A), 21 (B), 28 (C) y 60 (D) días.....	87

---

7.2.8. Representación de las características histológicas e inmunohistoquímicas de los pulmones de los ratones BALB/c.....	88
7.2.9. Expresión del Plasminógeno (A), tPA (B) y uPA (C) en pulmones de ratones infectados determinada por RT-PCR en cuantitativo.....	89
7.3.1. Producción de Plasmina inducida después de la inmunización con BCG.....	90
7.3.2. Detección de tPA y uPA por ELISA (A) y Western blot (B) en células de bazo al ser estimuladas con Filtrado de Cultivo (CF) .....	91
7.3.3. Expresión genética de tPA (A) y uPA (B) determinados por RT-PCR en cuantitativo en células de bazo de ratones inmunizados con BCG o PBS.....	92
7.4.1. Unidades formadoras de colonias (CFU) obtenidas de pulmones infectados con BCG a diferentes h después de la infección.....	93
7.4.2. Representación de las características histológicas en los pulmones de ratones BALB/c después de la infección con BCG.....	94

## *Índice de tablas*

---

1.3.1. Receptores de Plasminógeno reportados en Bacterias.....	49
1.3.2. Activadores de Plasminógeno reportados en Bacterias.....	51

---

---

---

# Resumen

---

El patógeno humano *Mycobacterium tuberculosis* tiene la capacidad de interactuar con una gran variedad de moléculas de su célula hospedadora, dentro de las cuales se encuentran proteínas del sistema fibrinolítico. En el presente trabajo demostramos que algunas micobacterias del complejo tuberculosis son capaces de activar la proenzima Plasminógeno *in vitro*, cuando este se encuentra unido a su superficie; lo cual sugiere que el bacilo podría poseer un activador para Plasminógeno como se ha descrito para *Yersinia pestis*. Estas observaciones, nos llevaron a estudiar la expresión de los componentes del sistema fibrinolítico en un modelo animal de tuberculosis pulmonar progresiva. Se analizaron los homogeneizados de pulmón de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv a fin de determinar la expresión y la actividad enzimática de la Plasmina y el activador del Plasminógeno tisular, así como determinar los niveles de RNAm para este último. El Plasminógeno también se detectó por Inmunohistoquímica en los pulmones de los animales infectados.

Los resultados muestran que la expresión de moléculas del sistema fibrinolítico aumentó gradualmente durante el curso de la infección, alcanzando su máxima expresión durante la fase crónica de la enfermedad.

Al mismo tiempo, los experimentos *in vitro* mostraron que ambos activadores se indujeron específicamente después de la estimulación de las células del bazo de ratones inmunizados con *Mycobacterium bovis* BCG con proteínas de *M. tuberculosis*.

---

En conjunto, estas observaciones muestran que las moléculas del sistema fibrinolítico están presentes en la fase crónica de la tuberculosis experimental y sugieren que la propia micobacteria podría desempeñar un papel importante en la expresión de las mismas, lo cual podría contribuir a la inflamación crónica en la tuberculosis.

Además, demostramos que *Mycobacterium bovis* BCG expresa un activador de Plasminógeno, mismo que podría ser importante en invasividad. En animales infectados por vía subcutánea con BCG previamente recubiertas con Plasminógeno, las bacterias migraron más rápido a los pulmones comparadas con las bacterias no recubiertas o aquellas inoculadas en presencia del análogo de lisina  $\epsilon$ -aminocaproico. Estos resultados sugieren que el sistema fibrinolítico podría ser utilizado por *M. tuberculosis* como un mecanismo para producir daño e invasividad ó bien para no ser reconocidas por el sistema inmunológico. En conjunto, estos resultados sugieren una posible contribución del sistema fibrinolítico a la invasión y el daño tisular en las infecciones de tuberculosis.

Palabras clave: *Mycobacterium*, Plasminógeno, Infección crónica.

---

---

# Abstract

---

The human pathogen *Mycobacterium tuberculosis* binds to a variety of host cell proteins, including those of the fibrinolytic system. In this work we first demonstrated that mycobacteria was able to activate Plasminogen bound to its surface *in vitro* suggesting that mycobacteria could possess an activator as has been described for *Yersinia pestis*. These observations prompted us to study the expression of components of this system in an animal model of progressive pulmonary tuberculosis. Lung homogenates from BALB/c mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv were analyzed to determine the expression and enzymatic activity of Plasmin and tissue Plasminogen activator, as well as the mRNA levels for Plasminogen, tissue and urokinase Plasminogen activators. Plasminogen was also detected in infected lungs by immunohistochemistry.

The results show that the expression of molecules of the fibrinolytic system increased gradually over the course of the infection, peaking during the chronic phase of the disease. Furthermore, *in vitro* experiments showed that both Plasminogen activators were specifically induced after the stimulation of spleen cells from BCG-immunized mice with *M. tuberculosis* proteins.

Together, these results show that molecules of the fibrinolytic system are up-regulated in the chronic phase of experimental tuberculosis and suggest that the mycobacterium itself could play an important role in the expression of molecules of the fibrinolytic system, contributing to chronic inflammation in tuberculosis.

---

Furthermore, it was demonstrated *in vivo* that the expression of a mycobacteria activator could be important in invasion since in animals subcutaneously infected with *Mycobacterium bovis* BCG, previously coated with plasminogen, bacteria migrate faster to the lungs when compare with non-coated bacteria or bacteria inoculated in the presence of the lysine analogue  $\epsilon$ -aminocaproic acid. These results suggest that the fibrinolytic system could be exploited by *M. tuberculosis* as mechanism to produce damage and invasivity. Together these results suggest a possible contribution of the fibrinolytic system to invasion and tissue damage in tuberculosis infections.

Keywords: *Mycobacterium*, Plasminogen, chronic infection.

---

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) es una de las aflicciones humanas más antiguas y representa la enfermedad infecciosa que causa más muertes en el mundo. Se ha encontrado evidencia morfológica y molecular de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) en restos fósiles del pleistoceno que datan de hace 18000 años (Rothschild et al., 2001). También se han observado deformidades óseas en restos humanos de 4000 años de antigüedad. La frecuencia de esqueletos con estas deformidades sugiere que la enfermedad fue común entre la población de este tiempo (Daniel et al., 1994).

La TB se incrementó considerablemente en Europa en la primera mitad del siglo XIX y causó la muerte de un cuarto de la población europea (Haas y Haas, 1996). La mortalidad debido a la TB, disminuyó debido al mejoramiento de las condiciones sanitarias y de urbanización y a la aparición de la vacuna BCG y al desarrollo de antibióticos durante el siglo XX (Frieden et al., 1995).

No obstante, la TB sigue siendo un importante problema de salud mundial. Esta enfermedad se ubica como la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la TB una emergencia mundial de salud pública en 1993. Durante el 2012, se registraron casi 9 millones de casos nuevos y 1,4 millones de muertes por TB en el mundo (Informe de la OMS, 2013).

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que durante el periodo 2000 a 2020 habrán 1 000 millones de infectados por *M. tb*, 200 de los cuales enfermarán y 35 morirán si no se mejora el control de la enfermedad (Schlossberg D, 2000). De acuerdo al reporte de la OMS del 2013, la incidencia y la tasa de mortalidad mundial de la TB ha disminuido en los últimos años (Figura 1.1).

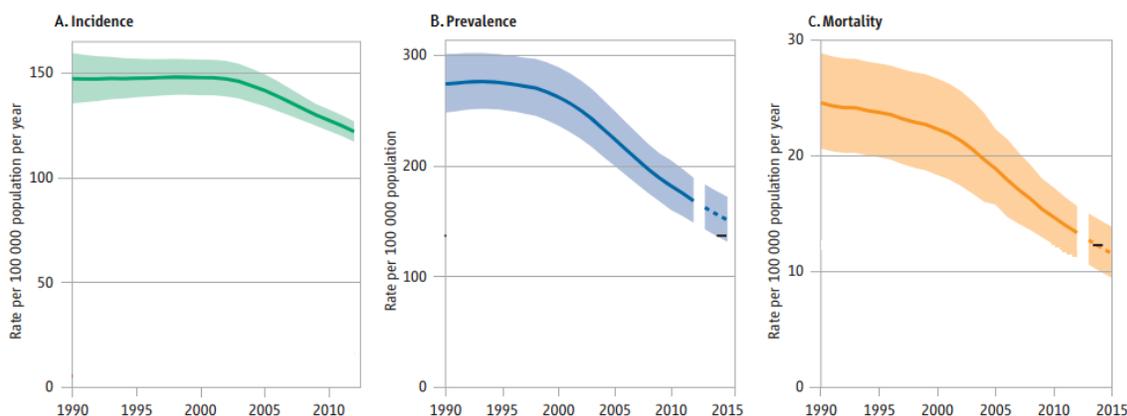


Figura 1.1. Tendencias mundiales de las tasas estimadas de incidencia, prevalencia y mortalidad de la tuberculosis. Tendencias mundiales de la tasa de incidencia (A), tasa de mortalidad (B) y prevalencia (C) estimada de tuberculosis durante 2013-2015. Tomado de Informe de la OMS, 2013

En 2012, se reportaron 8.6 millones de casos nuevos a nivel mundial, lo que equivale a 125 casos por 100 000 habitantes. De estos casos nuevos, se estima que 0.5 millones eran niños y 2.9 millones eran mujeres. La mayor parte del número estimado de casos se produjeron en Asia (59%) y África (26%); una menor proporción de casos en la Región del Mediterráneo Oriental (7.7%), Europa (4.3%) y en América (3%) (Figura 1.2). Los cinco países con el mayor número de casos en 2011 fueron: India (2.5 millones), China (0.9-1.1 millones), Sudáfrica (0.4-0.6 millones), Indonesia (0.4- 0.5 millones) y Pakistán (0.3-0.5 millones). La tasa de mortalidad fue de 14 muertes por 100 000 habitantes. Es importante notar que aunque la mayoría de dichas muertes fueron de pacientes coinfectados con VIH, 990 000 fueron de personas no infectadas por VIH. (Informe de la OMS, 2013).

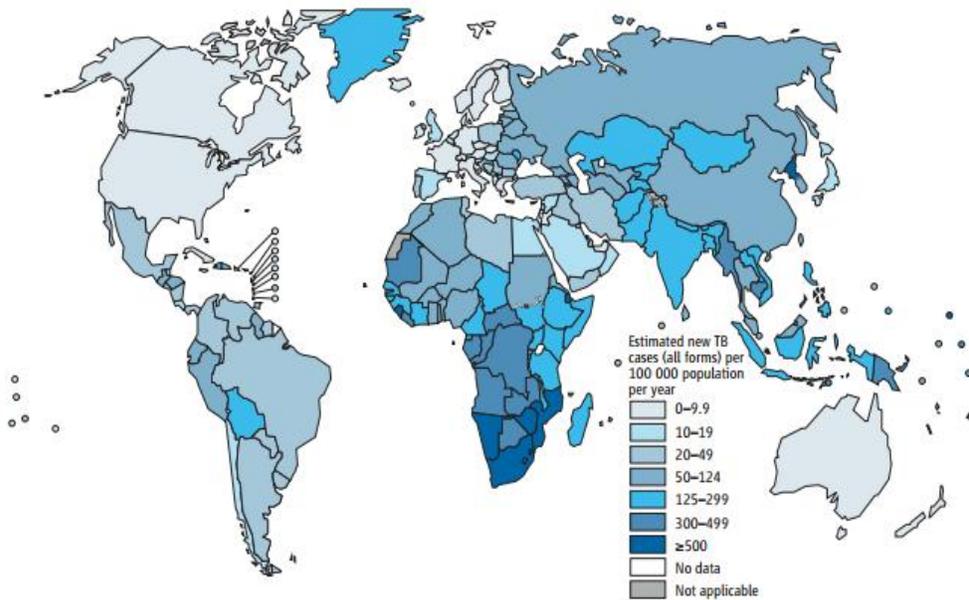


Figura 1.2. Tasa de incidencia mundial de la tuberculosis. En este mapa se representa el número de nuevos casos por 100 000 habitantes reportado en 2012. Tomado del Informe de la OMS, 2013.

De acuerdo a la OMS, en los últimos años ha incrementado el número de casos en adultos jóvenes, lo que afecta a la población en edad productiva. Durante el análisis de la incidencia del 2000 al 2010, el mayor número de casos se encontró en personas de 20 a 29 años de edad (18.12%) seguido por el grupo de 31 a 40 años, quienes representaban un 16.85% de todos los casos registrados. La Secretaria de Salud reporta casos nuevos de TB en todas sus formas: 81.5% pulmonar, 1.6% meníngea, 5.6% ganglionar y 11.4% otras formas (Castellanos, 2012).

En México, la TB es también considerada un problema importante, de acuerdo con el Sistema de Vigilancia Epidemiológico de Tuberculosis, el número de casos se ha mantenido. La incidencia es de 18 casos por 100, 000 habitantes, y durante el año 2011 fueron diagnosticados 15.384 casos nuevos, aunque según los datos oficiales, la tuberculosis es un padecimiento sobre el cual existe un importante subregistro (Tapia et al; Reporte Secretaria Salud, 2011).

Adicionalmente, la tuberculosis tiene importantes asociaciones con la diabetes mellitus, la desnutrición y las adicciones, fundamentalmente el alcohol, el cual genera un promedio de 36 decesos diarios por enfermedad hepática alcohólica. (Reporte Secretaria Salud, 2011). Por otra parte, la co-infección con HIV incrementa la morbilidad y mortalidad de los pacientes con TB activa (Saathoff et al., 2011).

Aunado a esto, la aparición de cepas de *M. tb* resistentes a los medicamentos (MDR-TB), es otro aspecto importante a considerar. El número de casos de MDR-TB notificados llegó a casi 60 000 en todo el mundo en 2011. Sin embargo, se calcula que el número es mayor por todos aquellos casos que no son reportados. Conjuntamente, de los casos existentes en las diferentes regiones, menos de la mitad son tratados exitosamente, como se observa en la Figura 1.3, que en diferentes continentes el índice de éxito para tratar este tipo de micobacterias oscila entre el 40 y el 60%, sin embargo al observar el resultado global (última barra) se observa que menos de la mitad se resuelven exitosamente (Informe de la OMS, 2013).

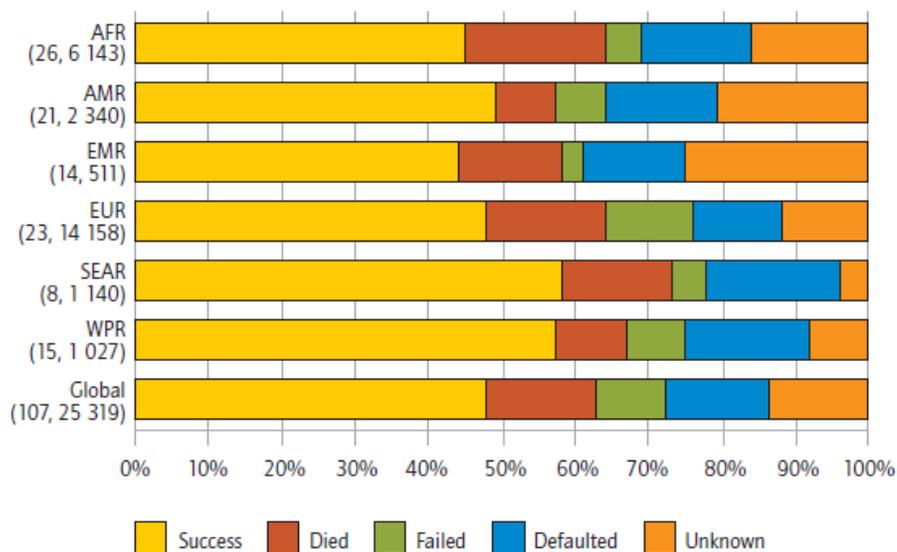


Figura 1.3. Resultados del tratamiento de pacientes con diagnóstico de MDR-TB por región de la OMS. Tomado de Informe de la OMS, 2013

---

Los individuos inmunodeprimidos son altamente susceptibles. Durante el 2011 se reportaron 15,843 casos nuevos de TB pulmonar. Además 20.8% de casos los nuevos de TB fueron asociados a Diabetes y en 7.8 % de relación TB/SIDA (Castellanos, 2012). Se ha visto que enfermedades como el cáncer en el tracto aero-digestivo incrementan el riesgo de presentar TB (Wu et al., 2011). También se han sugerido factores genéticos y ambientales como causa del desarrollo de la enfermedad. (Informe de la OMS, 2013).

### 1.1.2 AGENTE CAUSAL

La naturaleza contagiosa de la TB fue descrita por primera vez por Hipócrates. A mediados del siglo XVII, François de la Boe y René Laennec describieron la infección y postularon que la enfermedad tenía rasgos en común detectadas en todas las formas de la enfermedad (Sakula, 1882). A pesar de que el agente etiológico de la enfermedad no había sido identificado, el término "tuberculosis" fue utilizado por primera vez por Shönlein en 1830 (Ligon, 2002). Cincuenta y dos años más tarde, en marzo de 1882, Robert Koch anunció el descubrimiento del agente etiológico, la bacteria *M. tuberculosis* (Sakula, 1882).



Figura 1.4. Micrografía electrónica de *Mycobacterium tuberculosis* ampliado a 15549x. Janice Carr, CDC. <http://www.cbc.ca/health/story/2006/03/17/tb-who060317.html?ref=rss>

---

La TB es causada por micobacterias del género *Mycobacterium*. El ser humano puede infectarse por tres especies distintas de *Mycobacterium*: *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*. *M. tb* es el patógeno que más comúnmente se asocia al desarrollo de la enfermedad en el hombre. *M. tb* es un bacilo aerobio, inmóvil, no esporulado, no encapsulado, que precisa de un tiempo muy prolongado (15-20 h) para su multiplicación y requiere de 2 a 6 semanas para crecer en medios sólidos. La temperatura corporal (35-37°) y una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> estimula su desarrollo. Microscópicamente es un bacilo alargado de aproximadamente 0.4 x 3 µm y de forma arrozada como se muestra en la Figura 1.4. (Daniel et al., 1994).

Una de las características distintivas del género *Mycobacterium* es la resistencia a la decoloración por alcohol- ácido en la tinción de Zhiel-Neelsen debido al alto contenido de lípidos en la pared celular. Las micobacterias, se caracterizan por tener una cubierta lipídica constituida por ácidos micólicos y una capa adicional que es muy rica en lípidos poco usuales, glicolípidos y peptidoglicanos. Como consecuencia, esta pared será la responsable de una tinción difícil, de la relativa resistencia a las defensas fagocitarias del organismo hospedero y posiblemente, de los acontecimientos inmunológicos que contribuyen a la patología de la enfermedad causada por esta micobacteria. Incluso este alto contenido lipidico permite a los organismos sobrevivir en un clima seco durante largos periodos, aunque son eliminados por ejemplo, mediante rayos de sol directos o la radiación ultravioleta (Daniel et al., 1994).

---

### 1.1.3. INMUNOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS

La TB es una enfermedad que se localiza principalmente en el pulmón, sobre todo en los lóbulos inferiores; aunque afecta a otros órganos, enfermedad que se denomina tuberculosis extrapulmonar. La TB se caracteriza por la formación de estructuras histológicas características denominadas granulomas donde los bacilos quedan atrapados. Los bacilos son inhalados como gotitas suspendidas en la atmósfera, las cuales son lo suficientemente pequeñas para permanecer en el aire durante varias horas después de ser expulsadas. Las bacterias interactúan con los macrófagos residentes a través de receptores celulares, lo que lleva a su internalización e induce la producción de citocinas proinflamatorias (Kaufmann y Dorhoi, 2013)

El ambiente inflamatorio local induce el reclutamiento de varios tipos de células, incluyendo monocitos, neutrófilos, y células dendríticas hacia el sitio de la infección. El reclutamiento de células mononucleares de los vasos sanguíneos vecinos, proporciona células frescas donde las bacterias pueden refugiarse para la expansión de la población bacteriana (Russell et al. 2009)

Los bacilos engullidos por los macrófagos alveolares, son eliminados por diferentes mecanismos celulares bactericidas como la generación de intermediarios reactivos de nitrógeno y de oxígeno. Las células proinflamatorias son activadas y diferenciadas para producir sustancias microbicidas (Blomgran y Ernst, 2011). La eficiencia de estos mecanismos depende de la capacidad microbicida de los macrófagos alveolares, las características patogénicas de la cepa inhalada y el microambiente en el sitio de la infección. Algunos bacilos podrán ser destruidos y otros, con mayor capacidad agresiva, tendrán la facultad de resistir los mecanismos defensivos (Kaufmann, 2001).

---

Cuando el bacilo sobrevive prolifera logarítmicamente en los macrófagos alveolares y las células dendríticas, lo que induce la producción de mediadores inmunes como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p80, IL-1a y IL-1b que activan macrófagos para inducir la eliminación de las micobacterias (Schaible et al, 1998). El INF- $\gamma$  es una citocina proinflamatoria producida por Linfocitos T CD4+, CD8+ y por células Natural Killer (NK) en respuesta a IL-12 y IL-18 (Herrera et al., 2009). Por otra parte, el TNF- $\alpha$ , contribuye al control del crecimiento bacteriano y a la formación del granuloma (Takeda y Akira, 2005).

Como resultado de la estimulación por citocinas, los macrófagos se diferencian a células epiteloides y se convierten en células gigantes (Saunders y Britton, 2007). La arquitectura del granuloma está caracterizada por la agregación de células T y macrófagos infectados que contienen al bacilo previniendo que se disperse (Tsai et al., 2006). Además la presencia de quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 y CXCL10 es crucial para el reclutamiento de células inflamatorias en la formación del granuloma (Khader et al., 2007; Peters and Ernest, 2003). Estos mecanismos permiten el desarrollo de una infección primaria localizada, que eventualmente se transforma en una infección latente (Cardona et al, 2009).

Con el desarrollo de una respuesta inmune adquirida y la llegada de los linfocitos, el granuloma adquiere una forma más organizada y una estructura estratificada. Esta estructura, compuesta de macrófagos rodeados por linfocitos es cubierta por células fibrosas que marca la periferia de la estructura. Después de tres semanas de iniciada la infección comienza un estado de "contención" donde el número de bacterias es relativamente estable. En este momento, el granuloma está vascularizado y las células

---

se reclutan hacia el sitio de la infección y al mismo tiempo, disminuye el número de vasos sanguíneos que penetran a la estructura (Brighenti y Andersson, 2012). Esto induce la formación de células espumosas, que son responsables del crecimiento del centro caseoso (D'Avila et al., 2006).

Estas células son el producto del metabolismo de los lípidos mal regulada mediante el cual se esterifica el colesterol y es secuestrado en gotas intracelulares que se forman y se acumulan en el citosol de la célula (Russell et al., 2010). *M. tb* al tener acceso físico a las gotas de lípidos dentro de la célula, y utilizarlas para su crecimiento y persistencia (Bhowruth et al., Peyron et al, 2008; Zahrt et al., 2003), lo que permite que *M. tb* se replique rápidamente (Kaplan et al., 2003; Dedieu et al, 2013). Estas condiciones llevan a un estado de persistencia no replicativa de la micobacteria. En algunas ocasiones, los granulomas sufren ruptura permitiendo la liberación de bacilos viables (Russel et al., 2009) (Figura 1.5).

Como resultado de la persistencia de la micobacteria, asociado con un fallo en el sistema inmune, esta infección latente es reactivada, induciendo el daño en bronquios y permitiendo la diseminación del bacilo a otras aéreas (Van Crevel et al., 2002). La fibrosis representa el último recurso de los mecanismo de defensa del hospedero, ya que se produce una capa rodeando el área central de la necrosis para intentar contener a la bacteria, a pesar de que los otros mecanismos hayan fallado (Raja et al., 2004). Así, los granulomas son las estructuras histopatológicas que cuyo papel es contener la invasión de micobacterias. Sin embargo, recientemente, ha surgido evidencia de que la micobacteria explota el ambiente granulomatoso en su beneficio (Huynh et al., 2011).

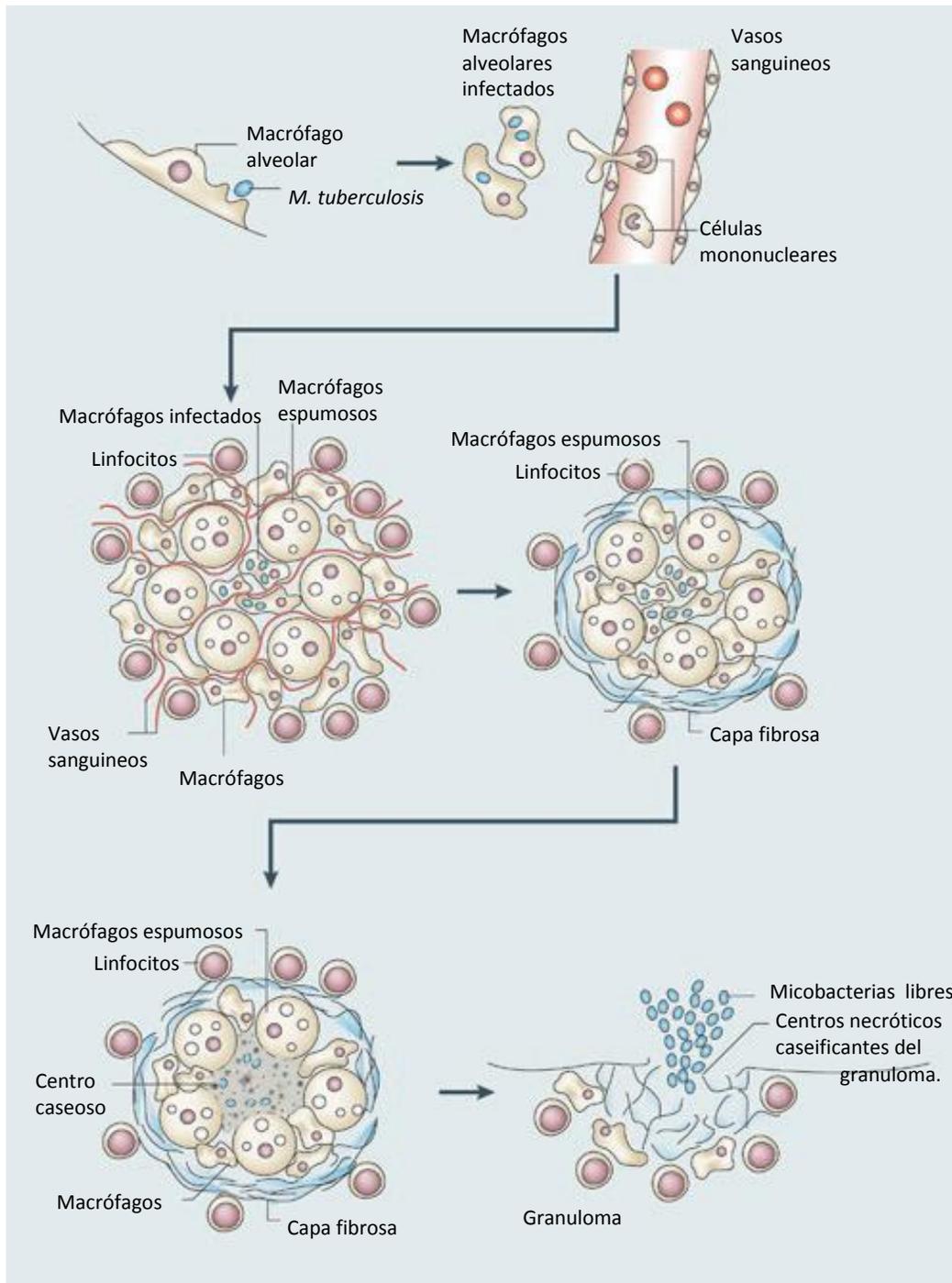


Figura 1.5. **Progresión del granuloma.** La infección inicia después de la inhalación de bacilos al pulmón, donde los bacilos son fagocitados por macrófagos alveolares generando una respuesta pro-inflamatoria que favorece el reclutamiento de células mononucleares. En esta etapa el granuloma tiene un centro de macrófagos infectados rodeado por macrófagos espumosos y otros fagocitos mononucleares rodeados por linfocitos. Posteriormente el granuloma madura y se desarrolla una capsula fibrosa que encierra el núcleo. Al mismo tiempo, se reduce el número de vasos sanguíneos dentro del granuloma, por lo que se forma un centro caseoso. En personas inmunocompetentes, esta estructura madura delimita y contiene la infección. Sin embargo, en algunos casos ocurre el desarrollo de una infección progresiva, donde el centro de granuloma sufre necrosis, licuefacción y cavitación, permitiendo la liberación de miles de micobacterias en la vía respiratoria. Tomado de Russell DG., et al. 2009, Nat Immunol. 10(9):943-8

---

En general la infección con *M. tb* tiene una repercusión sobre el pulmón que puede traducirse en dos situaciones patológicas distintas. La primoinfección tuberculosa subclínica se caracteriza por la ausencia de síntomas y signos clínicos, radiológicos y bacteriológicos, sólo la prueba de tuberculina es positiva. La enfermedad tuberculosa donde se presentan las manifestaciones clínicas, radiológicas, bacteriológicas e inmunológicas (Milburn, 2001). Cada persona enferma sin tratamiento infectará en promedio entre 10 y 15 personas cada año. Solamente del 5 al 10% de las personas infectadas desarrollaran la enfermedad. Los bacilos tuberculosos permanecen latentes en el organismo durante un largo periodo, hasta que una disminución de las defensas le da la oportunidad de multiplicarse y producir los síntomas de la enfermedad (Schlossberg, 2000).

La patogénesis de la tuberculosis es impulsada por una compleja interacción entre el sistema inmune del hospedero y las estrategias de supervivencia de la bacteria. La respuesta inflamatoria a la infección por *M. tb* está estrechamente regulada por el hospedero y por la bacteria. *M. tb* ha desarrollado varios mecanismos para sobrevivir y evadir la respuesta inmune del hospedero. Estos mecanismos de supervivencia incluyen la activación de una respuesta anti-inflamatoria, la producción de intermediarios de Oxígeno (ROIs) y Nitrógeno (RNI), y la reducción de la acidificación del fagosoma que contiene a *M. tb* (Sasindran y Torrelles, 2011).

#### **1.1.4. MECANISMOS DE EVASION DE *M. tuberculosis***

*M. tb* ha desarrollado mecanismos complejos para evadir, desviar o desvirtuar la respuesta inmune. A diferencia de otros agentes patógenos, la infección por *M. tb* persiste en el hospedero durante largos períodos en un estado inactivo o latente,

---

incluso en un sistema inmune en pleno funcionamiento. Esta bacteria está equipada con numerosas estrategias de evasión inmune, por lo que, aparentemente la respuesta inmune por parte del hospedero es insuficiente para erradicar definitivamente la infección crónica ni los bacilos latentes (Houben et al., 2006; Gupta et al., 2012).

Entre los mecanismos usados por *M. tb* para evadir o subvertir la respuesta inmune, están los que evitan la eliminación de los bacilos dentro de los macrófagos y los que interfieren con una presentación de antígenos adecuada para la activación de células T. Los macrófagos son el tipo principal de células infectadas por *M. tb in vivo*, y son el sitio de la replicación intracelular de las micobacterias (Kaufmann et al., 1993). Está bien documentado que *M. tb* inhibe la maduración del fagosoma y su fusión con los lisosomas de los macrófagos infectados. Además, se ha descrito que la micobacteria es capaz de disminuir la expresión de la molécula MHC-II. Se ha propuesto también, que *M. tb* promueve una función efectora subóptima de las células T CD4<sup>+</sup> (Cooper et al., 2009<sup>a,b</sup>)

Investigaciones recientes sugieren que las micobacterias combaten la falta de nutrientes, utilizando el colesterol del hospedero y emplean el proteasoma micobacteriano para ayudar a combatir el estrés por nitrógeno y oxidativo. Dentro de los granulomas, los macrófagos espumosos son células ricas en lípidos, cuyo contenido puede ser liberado para formar el centro del granuloma caseoso (Peyron et al., 2008). Las micobacterias estimulan el desarrollo de los macrófagos en células espumosas cargadas de colesterol (Cáceres et al., 2009).

---

Otras estrategias incluyen la secreción de proteínas como la superóxido dismutasa y la catalasa o algunos componentes de las micobacterias como sulfátidos y Lipoarabinomanano (LAM). ESX-1, un factor de virulencia importante, que se requiere para la formación de granulomas, ya que activa MMP-9, una metaloproteinasa que promueve la expansión del granuloma y el crecimiento de micobacterias. Estudios recientes, han demostrado que las micobacterias se acoplan a un gran número de mecanismos de inmunidad innata citosólicas, como la autofagia, y la ubiquitinación (Huynh et al., 2011).

En pacientes inmunocomprometidos, la replicación bacteriana conduce a una respuesta inflamatoria granulomatosa que daña las vías respiratorias, lo que ayuda a las bacterias a migrar a otros órganos. Así, la inflamación es un "arma de doble filo". Por una parte, se requiere para el control inicial de la infección, pero por otro lado, las bacterias utilizan la respuesta inflamatoria para favorecer su diseminación.

### **1.1.5. DISEMINACION DE LA TUBERCULOSIS**

El bacilo de la tuberculosis se transmite mediante pequeñas partículas de menos de 10 mm emitidas al estornudar, hablar o toser. La mayoría de los pacientes tuberculosos excretan pocos bacilos, por lo que generalmente se requiere un contacto continuo para infectarse aunque una sola bacteria es teóricamente capaz de producir la enfermedad en un individuo susceptible. Desde el foco inicial de infección el bacilo tuberculoso diseminarse, fundamentalmente por vía hematógena, aunque también por vía linfática y broncógena, a otras áreas del pulmón y a los demás órganos. Solamente las partículas inhaladas que contienen entre 1-3 bacilos, van a ser capaces de llegar al alveolo y ser fagocitados por los macrófagos alveolares (Leung et al., 1999).

---

Dentro del lumen de los alveólos, los bacilos se multiplican y posteriormente ganan acceso al torrente sanguíneo debido al daño en el tejido. La diseminación extrapulmonar ocurre por el transporte de las bacterias vía el sistema linfático o por el pase directo al lumen alveolar hacia los capilares. El proceso de diseminación permite al bacilo alcanzar regiones vulnerables como el sistema nervioso central, el tracto genital, el intestino, la piel, los huesos, etc. En los pulmones las micobacterias causan cavitación y a partir de estas lesiones que posteriormente le permiten diseminarse y convertirse en una tuberculosis extrapulmonar (Clark-Curtiss et al., 2003).

En un estudio donde infectan con *M. tb* ratones susceptibles y resistentes a la tuberculosis, la diseminación del bacilo fue idéntica en los dos fenotipos. La capacidad de diseminación parece estar determinada más por factores bacterianos que del hospedero (Mischenko et al., 2004).

#### **1.1.6. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR**

La forma más grave de la tuberculosis extrapulmonar es la infección del sistema nervioso central donde principalmente es causa de meningitis. Sin embargo, el bacilo afecta también el tracto urogenital, digestivo y el sistema tegumentario. La incidencia de la tuberculosis extrapulmonar varía entre 5 y 20% de los casos registrados. Interesantemente, en un estudio en Estados Unidos se encontró una incidencia de 68% de tuberculosis extrapulmonar en personas infectadas con HIV (Vijayan, 2000). Mundialmente, existen numerosos reportes que indican una alta prevalencia de cepas multidrogo-resistentes (MDR-TB) (Chang y Nuernberger, 2012) Qui *et al.*, encontraron que el 6% de los nuevos casos y 32% de los casos previamente tratados fueron MDR-TB (Qi et al., 2011).

---

La enfermedad se desarrolla en cuatro etapas, la primera se da entre 3 y 8 semanas después de que la bacteria fue inhalada y se implanta en los alvéolos, la bacteria se disemina por circulación linfática a los ganglios linfáticos regionales del pulmón (Garay, 1996<sup>a</sup>). La segunda etapa, dura cerca de 3 meses y es caracterizada por la circulación hematológica de la bacteria dentro de diferentes puntos en el pulmón y hacia otros órganos.

En la tercera etapa origina una inflamación en la superficie pleural. El último estado es la resolución del complejo primario donde la enfermedad ya no progresa (Garay, 1996<sup>b</sup>). Generalmente en las personas inmunocompetentes la enfermedad queda latente, sólo un 5% de los infectados desarrollarán la enfermedad. En personas coinfectadas con HIV y *M. tb* la posibilidad de desarrollar la infección es del 50% (Elder, 1992; Haenselt, 1982).

La infección con *M. tb* generalmente es causada por una sola cepa, sin embargo se han encontrado infecciones con diferentes cepas (infecciones mixtas). Interesantemente, en un trabajo en el cual se estudió en ratones el comportamiento de cepas pulmonares y extrapulmonares aisladas de individuos enfermos, se demostró que algunas de las cepas de *M. tb* extrapulmonares, presentaron una mayor habilidad para la diseminación sugiriendo estas observaciones que posiblemente estas cepas se adaptan mejor a un ambiente extrapulmonar (García de Viedma et al, 2003).

Posteriormente, los mismos autores demostraron que las micobacterias extrapulmonares fueron más eficientes para la invasión ya que causan con mayor frecuencia bacteremia, daño y diseminación en ratones cuando se comparan con las

---

cepas de origen pulmonar. Esto demuestra que existen factores bacterianos que determinan la invasión. Sin embargo aún no se han dilucidado el o los mecanismos que subyacen atrás del “tropismo” pulmonar o extrarrespiratorio (García de Viedma et al., 2005)

La ingestión de bacterias a través de receptores Fc induce un estallido respiratorio y una respuesta inflamatoria, en contraste con la internalización a través de receptores CR3 que impide la activación de los macrófagos (Caron y Hall, 1998, Peyron et al., 2000). También se requiere la presencia de colesterol en el fagosoma micobacteriano para la prevención de la fusión fagosoma-lisosoma (Gatfield y Pieters, 2000; Jayachandran et al., 2007). Curiosamente, las micobacterias utilizan colesterol para sobrevivir dentro de los macrófagos infectados de forma crónica (Pandey et al., 2008).

Tanto los macrófagos no activados y activados coexisten dentro de los granulomas, siendo en los macrófagos activados donde ocurre el procesamiento y la presentación de antígenos de micobacterias a los linfocitos T circundantes (Chan y Flynn, 2004). Tras la presentación de los antígenos, las células T se activan (Kaufmann, 1993; Pieters, 1997).

Las células T activadas secretan citocinas y quimiocinas lo cual mantiene los macrófagos en un estado activado y asegura el reclutamiento de otras células del sistema inmune al sitio de la infección (Pieters, 2008). Por lo tanto, la estructura granuloma probablemente representa un equilibrio entre un patógeno potencialmente peligroso, y el sistema inmune del hospedero (Bartlett, 2007).

---

En los seres humanos existe evidencia de que la infección por *M. tb* retrasa la aparición de la respuesta inmune adaptativa en comparación con otras infecciones. Estudios recientes en ratones confirman, que *M. tb* retrasa excepcionalmente el inicio de la inmunidad mediada por células T (Ottenhoff, 2012)

Dado que la supervivencia del patógeno, implica la manipulación de los procesos celulares a través de interacciones con las proteínas del hospedero, la identificación de estas moléculas, es importante para un mejor entendimiento de la enfermedad y por ende el diseño de nuevas estrategias en el control de la TB (Ehlers y Daffé, 1998; Kumar y Rao, 2011).

## 1.2. MECANISMOS DE INVASIVIDAD BACTERIANA

Los factores que regulan el curso y el desarrollo de la infección por *M. tb* son multifacéticos e involucran una interacción compleja entre el sistema inmune del huésped y las estrategias de supervivencia empleada por los bacilos (Mischenko et al., 2004). Durante el proceso de infección y el desarrollo patológico de la tuberculosis humana, *M. tb* expresa un gran número de moléculas y recluta moléculas del hospedero. Entre estas moléculas se encuentran proteínas involucradas en la interacción con el sistema inmune innato, y con las proteínas de las membranas (Espitia et al., 1998; van Crevel et al., 2002).

Las interacciones entre las células y su entorno son fundamentales para el buen funcionamiento e integridad de los tejidos, ya que éstos no solo están conformados por células sino que además contienen una red proteica denominada matriz extracelular

---

(MEC). La MEC es una estructura dinámica que está en constante remodelación (síntesis de nuevos componentes y degradación). Algunas alteraciones en la regulación de este sistema se asocian a diversos procesos patológicos como fibrosis, trombosis y aterosclerosis, entre otras (Nolasco et al., 2007). Así mismo, en respuesta a situaciones de estrés celular, como son las infecciones, cambios bruscos de temperaturas o daño oxidativo, se expresan proteínas, que llevan a la degradación proteosómica (Modlin y Rickinson, 2000).

En la patogénesis de las infecciones bacterianas, la actividad proteolítica es un factor importante en la invasividad a sitios de infección secundaria. Las proteasas bacterianas ocasionan la degradación de los tejidos del hospedero mediante la degradación de proteínas de MEC lo cual conduce a la ruptura de las barreras tisulares y facilita la propagación de los microorganismos (Lijnen, 2002).

La activación de la coagulación y el depósito de fibrina son procesos que se presentan como consecuencia de la inflamación y acompañan a diferentes enfermedades vasculares (Degen et al., 1997). Aunado a esto, existen enzimas como las serina proteasas que se encargan de la remodelación de la fibrina y otras proteínas de la MEC (Streuli, 1999). La interacción entre los procesos hemostáticos tales como la coagulación, la fibrinólisis y la respuesta inflamatoria constituyen componentes esenciales de defensa del hospedero a la invasión bacteriana. Dentro de estos procesos, el sistema fibrinolítico, juega un papel central; debido a su abundancia en los líquidos tisulares ofrece un sistema rentable a los patógenos bacterianos para provocar daño tisular y favorecer su migración a sitios de infección secundaria (Espitia et al., 2012).

---

### 1.3. EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

El sistema fibrinolítico comprende una cascada de proteasas anticoagulantes que se activa en el proceso de cicatrización. Está formado por una glicoproteína de 92 kDa llamada Plasminógeno (Plg), que está presente en altas concentraciones en el plasma humano como precursor de la serina proteasa Plasmina (Plm). Fue caracterizado inicialmente por su papel en la degradación en los depósitos de fibrina intravascular. En 1941, Milstone demostró que la lisis de la fibrina, descrita en 1933 por Tillet y Garner, dependía de un factor lítico presente en el suero humano; el precursor fue llamado Plg y la enzima Plm (Milstone, 1941).

En 1947, Astrup demostró que los tejidos animales contenían un agente capaz de activar el Plg, al que llamaron activador tisular del plasminogeno, tPA (tissue-Plg activator). En ese mismo año, MacFarlane y Pilling encontraron actividad fibrinolítica en la orina e identificaron el activador tipo urocinasa, uPA (urokinase-Plg activator). Ambos activadores del Plg (PAs), efectúan una proteólisis parcial de la proteína para convertirla en Plm (Collen, 1999).

Las enzimas del sistema fibrinolítico son todas proteasas de serina. El sitio activo de este tipo de enzimas consiste en una triada catalítica compuesta por los aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina. El sitio activo está localizado en la región carboxi-terminal de las moléculas; la región amino-terminal contiene uno o más dominios estructurales/ funcionales. La activación en cascada del Plg a Plm está muy regulada por activadores e inhibidores. La actividad de la Plm, está regulada por la  $\alpha$ 2-antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP) y  $\alpha$ 2 macroglobulina (Lähteenmäki et al., 2001).

---

La inhibición a nivel de los activadores, se da por inhibidores de Plasminogeno (Plasminogen Activator Inhibitors: PAIs). La actividad de tPA y uPA está regulada por los inhibidores 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2) (Robbins y Summaria, 1976). Los inhibidores del sistema fibrinolítico, son miembros de la superfamilia de las serpinas (inhibidores de proteasas de serina), y todos ellos poseen en su región carboxi-terminal, un sitio de unión específico al dipéptido Arg-X ó Lys-X, resultando en la formación de un complejo enzima-inhibidor inactivo.

### 1.3.1. Plasminógeno (Plg).

El Plg es una glicoproteína monocatenaria que se sintetiza en el hígado, es abundante en el plasma humano y en los fluidos extracelulares. Su concentración en el plasma es de 180-200  $\mu\text{g/mL}$  (2mM). Está compuesta por 791 aminoácidos (aa) y 24 puentes disulfuro con un contenido en carbohidratos del 2% y una masa molecular de 92.000 daltons. Esta proteína está organizada en siete dominios estructurales, denominados kringles, que comprenden un péptido de pre-activación (residuos 1- 77). En la región amino-terminal contiene cinco dominios kringle homólogos secuenciales (estructuras de triple vuelta unidas por puentes disulfuro de cerca de 80 residuos) y del dominio proteinasa (residuos 562-791) (Markus et al., 1979).

El Plg es la forma zimógeno inactiva de la enzima Plm. La forma madura de circulación del Plg se conoce como Glu-Plg como consecuencia del residuo de ácido glutámico en la región amino terminal. El Glu-Plg consiste en los cinco dominios kringle característicos, seguidos por el péptido de activación de la proteasa. Los residuos de aminoácidos His603, Asp646 y Ser741, forman la tríada catalítica del dominio de

serina proteasa. Los dominios kringle del Plg median las interacciones con múltiples ligandos, incluyendo fibrina (fibrinógeno) y receptores en las células (Ponting et al., 1992). Los Kringles 1, 2, 4, y 5 (K1-K5) contienen sitios de unión a lisina (LBS, “lysine binding sites”) que juegan un papel crucial en el reconocimiento específico del Plg a sus ligandos. Estas estructuras se aprecian en la Figura 1.6.

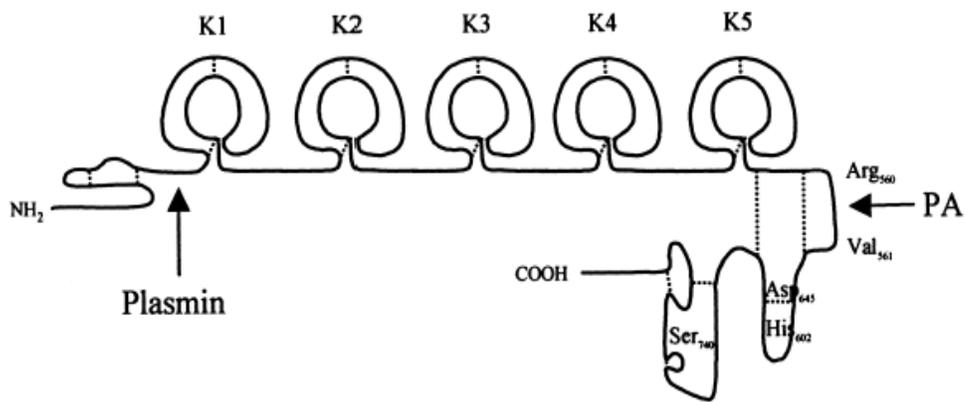


Figura 1.6. Esquema de la estructura del Plg/ Plm humano mostrando los anillos Kringle (K1-K5) y el sitio de activación (PA). Tomado de Lähteenmäki L. et al. 2001. FEMS Microbiol Rev. 25: 531-552.

Además, la unión intramolecular entre los residuos de lisina y los LBS de estos kringles mantiene al Glu-Plg en una conformación cerrada que es menos susceptible a la activación (Law, 2012). Las interacciones de unión competitiva con fibrina (fibrinógeno) o receptores de Plg permiten al Glu-Plg adoptar una conformación abierta, exponiendo el bucle de activación (Arg561-Val562) a la escisión por activadores específicos del Plg de mamífero, formando así Glu-Plm (Gong et al., 2001). El Plg también se une a través de los LBS a células endoteliales lo que favorece su activación a nivel local (Ranson y Andronicos, 2003). El gen que codifica esta proteína está localizado en el cromosoma 6 humano en la banda q26 o q27. Cada uno de los cinco dominios es codificado por dos exones separados por un intrón en medio de cada estructura (Castellino y Powell, 1981).

---

La activación de Plg está regulada herméticamente. Esto se da por activadores específicos, y por su inmovilización a los receptores celulares o a las moléculas designadas. La degradación de fibrina, durante los procesos de remoción de coágulos sanguíneos es llevada a cabo principalmente por la Plm generada a partir de la activación del Plg por tPA, mientras que la resultante de la activación por uPA degrada a componentes de la MEC en tejidos sólidos (Andreasen et al., 1997). La unión de Plg a receptores celulares es usualmente inhibida por lisina o análogos de lisina, indicando que esta unión es mediada por los LBS (Bass y Ellis, 2002).

### 1.3.2. Plasmina (Plm).

La activación del Plg a Plm tiene lugar por escisión del enlace peptídico Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub> en la molécula del Glu-Plg por acción de los diferentes activadores. La Plm así formada, es una serina proteasa bicatenaria compuesta por una cadena pesada derivada de la porción amino-terminal, que contiene 560 aa, y las 5 regiones “kringles” en donde se localizan los LBS. Contiene además una cadena ligera derivada de la posición carboxiterminal compuesta por 241 aa, que contiene el centro activo formado por los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico. Ambas cadenas están unidas por puentes disulfuro (Bass, 2002).

La Plm degrada laminina, fibronectina, fibrina, proteoglicanos y otras proteínas de la MEC. También se ha observado que activa procollagenasas y metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que a su vez, degradan componentes de la MEC (Quiding-Jarbrink et

---

al-. 2001; Muttucumaru et al, 2011). La Plm es una proteasa de amplio espectro que preferentemente se une a residuos de arginina o lisina (Edwards y Murphy, 1998). La vida media de la Plm libre en la sangre está estimada en aproximadamente 0.1 segundos. La Plm con un LBS ocupado es inactivada 50 veces más lentamente por la  $\alpha$ 2-antiplasmina. El bloqueo reversible del sitio activo de la Plm con su sustrato reduce marcadamente el rango de inactivación (Medved y Niewenhuizen, 2003).

La generación de Plm es fundamental para la solubilización de trombos, así como en otros procesos biológicos como la degradación de coágulos sanguíneos, movimiento y migración celular, cicatrización, remodelación de tejidos, embriogénesis. También participa en procesos como en invasión y propagación de productos que afectan la permeabilidad de vasos sanguíneos y lleva a cabo la acumulación de células inflamatorias. (Carmeliet y Collen, 1998)

### **1.3.3. Activador de Plg tipo tisular (tPA: Tissue-type PA).**

El tPA es el principal activador de Plg endógeno en la sangre. Es producido por las células endoteliales vasculares como una molécula de una sola cadena de 530 aa y está compuesta de algunos dominios homólogos con otras proteínas. Contiene un dominio "finger" que comprende los residuos 4-50, un dominio de un factor de crecimiento que incluye residuos del 50-87, dos anillos kringles que comprenden los residuos 87-176 y 176-262, y un dominio proteasa constituido por los residuos 276-527, que comprenden la triada catalítica (Lijnen, 2001). La actividad de tPA es aumentada hasta 100 veces por fibrina, cuando esta interactúa con el kringle 2 y con los dominios tipo EGF (epidermal growth factor) de las células (Hoylaerts et al., 1982).

---

El gen humano para el tPA está localizado en el cromosoma 8 (bandas 8.p.12->q.11.2) (Berg et al., 1993). En el plasma humano, el tPA se produce principalmente como un complejo junto con su inhibidor principal PAI-1. La concentración del complejo es de aproximadamente 5 mg/mL, mientras que la concentración de tPA libre es de 1 mg/L (intervalo de actividad específica de 500.000 a 700.000 Unidades/mg). Se pueden observar fluctuaciones rápidas en la concentración de tPA en respuesta al ejercicio, oclusión venosa, el alcohol y las drogas, como la desmopresina y los esteroides anabólicos (Henkin et al., 1991). La activación de Plg mediada por tPA está involucrada principalmente en la homeostasis de la fibrina y la vía mediada por uPA está involucrada principalmente en los fenómenos, como migración celular y remodelación de tejidos. (Hoylaerts et al., 1982)

#### **1.3.4. Activador de Plg tipo uroquinasa (uPA: urokinase-type PA).**

El uPA o pro-uroquinasa está compuesto de un dominio tipo factor de crecimiento, un dominio “kringle”, y un dominio tipo proteasa que contiene la triada catalítica. El dominio con el factor de crecimiento es responsable de la unión del uPA a su receptor, que está en la superficie de una variedad de células. El uPA de cadena sencilla (sc-uPA) es convertido a un uPA de doble cadena (tc-uPA) por un corte proteolítico de la unión peptídica entre Lys<sub>158</sub>-Ile<sub>159</sub>. El gen humano del uPA está localizado en el cromosoma 10. La activación mediada por tPA se da principalmente en la disolución de fibrina en la circulación, mientras que uPA se une a un receptor celular específico (uPAR), la mediación de la activación Plg principalmente implicado en la proteólisis pericelular (Sisson et al., 2002).

---

### 1.3.5. Alfa 2- anti-Plasmina ( $\alpha$ 2- AP).

Fue aislada del plasma humano, como una glicoproteína de 464 aa. Es única entre las serpinas debido a su región carboxiterminal de 51 residuos de aa, que contiene un sitio de unión secundario que reacciona con los LBS de los kringles 1 y 3 del Plg y la Plm. El residuo Gln<sub>14</sub> de la región amino-terminal de la  $\alpha$ 2-AP entrecruza las cadenas de fibrina, en un proceso dependiente de Ca<sup>2+</sup> y es catalizado por el factor de coagulación XIII. El gen humano para  $\alpha$ 2-AP está localizado en el cromosoma 18, banda p11.1-q11.2 (Lijnen et al, 2001).

### 1.3.6. Inhibidores del sistema fibrinolítico

La degradación de la MEC mediada por Plm tiene dos puntos de control, uno es la inactivación de Plm mediante la unión de las proteínas  $\alpha$ 2-AP o TAIF (inhibidor de la fibrinólisis activada por trombina) que bloquean la actividad proteolítica de esta proteína. El otro punto de control son los inhibidores: PAI- 1, PAI-2 y PAI-3 (Inhibidor del activador del Plg 1, 2 y 3 respectivamente) y la proteasa anexina. En particular se ha descrito que PAI-1 juega un papel muy importante en la célula, ya que mantiene la homeostasis, participando en la regulación de la fibrinólisis, angiogénesis y metástasis (Potempa et al., 1994). Esta proteína es el Inhibidor del PA Tipo 1 y es el principal inhibidor de uPA y tPA. La interacción PAI-1-uPA provoca la inhibición de la actividad de proteasa de uPA, por lo tanto no transforma el Plg en Plm y se inhibe la fibrinólisis o la degradación de MEC (Rao et al., 1995).

---

### 1.3.7. Función fisiológica del sistema fibrinolítico

Durante el desarrollo embrionario o en procesos de migración celular, la remodelación se da de acuerdo a los requerimientos celulares. En tejidos adultos dicha remodelación ocurre en la neovascularización, así como en los cambios que sufren las glándulas mamarias y el tejido uterino durante el ciclo menstrual. El sistema fibrinolítico participa en la degradación de la MEC tanto en tejidos, como en el sistema sanguíneo. Este sistema también interviene en algunos otros procesos biológicos como la regeneración tisular, menstruación e implantación embrionaria así como en la invasión tumoral (Liu, 1999). La generación de Plm es fundamental para la solubilización de trombos que contienen fibrina, así como en otros procesos biológicos, tales como la degradación de coágulos sanguíneos, movimiento y migración celular, cicatrización, remodelación de tejidos, embriogénesis. También participa en procesos como en invasión y propagación de productos que afectan la permeabilidad de vasos sanguíneos y llevar a la acumulación de células inflamatorias (Carmeliet y Collen, 1998).

Estudios recientes han demostrado que el sistema fibrinolítico y las MMP participan en la formación de la neointima arterial, la arterosclerosis, en la formación de aneurisma y de isquemia miocárdial, angiogénesis, crecimiento de tumores, metástasis e infección. La expresión de uPA-uPAR es crítica para la habilidad de leucocitos para degradar proteínas de matriz y atravesar tejidos durante el reclutamiento en sitios inflamatorios (Ploplis y Castellino, 2000).

---

## 1.4. Interacción del sistema fibrinolítico con microorganismos

Durante los últimos años, ha surgido evidencia que muestra que muchos microorganismos interactúan con el sistema fibrinolítico, dando lugar a diferentes procesos biológicos y patológicos. El Plg es unido e inmovilizado en la superficie de los microorganismos y activado, lo que aumenta su potencial invasivo. Las bacterias también utilizan las moléculas del sistema fibrinolítico para evitar la respuesta inmune innata ó modular la respuesta inflamatoria inducida por el patógeno (Natarajan et al., 2011). El hallazgo de receptores o activadores en algunas bacterias patógenas ha sugerido que la formación de Plm además tiene un papel en el daño a tejidos asociado con infecciones invasivas (Lottenberg et al., 1994).

La interacción de las bacterias con el Plg se produce, en general, a través de dos mecanismos. Algunas bacterias reclutan Plg en su superficie por receptores bacterianos para el Plg. La forma inmovilizada se convierte en Plm por los activadores del hospedero. La otra estrategia es la producción de moléculas que interactúan con el Plg, activándolo por la formación de complejos o por proteólisis. En cualquiera de los casos, la Plm unida a la superficie de la célula, es explotada por las bacterias para la degradación proteolítica de los componentes de la MEC, membrana basal (MB), y tejidos; facilitando la translocación bacteriana y la difusión en el hospedero. (Sanderson-Smith ML et al., 2012)

La capacidad de reclutar Plg se considera un aspecto importante en la interacción entre el hospedero y las bacterias. Se han hecho muchos estudios sobre la capacidad de las bacterias altamente patógenas para interactuar con el Plg, incluyendo

---

*Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *M. tuberculosis*, *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae* (Magalhães et al., 2007; Ullberg et al, 1992; Kuusela y Saksela, 1990). Para algunos microorganismos está demostrado que la capacidad de fijar y activar el Plg a Plm. Esto es importante ya que la Plm unida a un sustrato es resistente a la inhibición por  $\alpha$ 2-AP, su principal inhibidor, lo que constituye un factor importante para la proteólisis por las bacterias.

Hay muchos ejemplos de cómo bacterias patógenas interactúan con este sistema. *Streptococcus pneumoniae* interactúa con el Plg via enolasa promoviendo la migración del pneumococo a través de barreras celulares (Siemens et al, 2001; Attali et al., 2008). *Staphylococcus aureus* utiliza el sistema fibrinolítico humano para su invasión y propagación (Beaufort et al., 2008). *Borrelia burgdorferi* y *Cryptococcus neoformans* unen Plg (Coleman et al., 1997) e invadir el sistema nervioso central mediante la Plm (Stie y Fox, 2012). *H. pylori* estimula la expresión de uroquinasa (uPA) y su receptor (uPAR) en las células gástricas para favorecer su proliferación en células epiteliales (Kenny et al., 2008). *Mycoplasma fermentans* une Plg mejorando la adherencia y la invasión a células HeLa (Yavlovich y Rottem, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* (Kunert et al., 2007), utiliza Plm para promover la producción de citoquinas inflamatorias que causar la destrucción del tejido, disminución de la función de los neutrófilos, y una alteración en la capacidad para matar las bacterias que finalmente provoca la muerte en ratones (Guo et al., 2011). *Leptospira* y *Bacillus anthracis* utilizan el sistema del Plg para evadir la inmunidad innata regulando la opsonización del complemento (Vieira et al., 2011; Chung et al., 2011)

---

La interacción con el sistema fibrinolítico no se limita a las bacterias. Receptores para Plg, se han detectado en virus (Chaipan et al., 2009), hongos (Crowe et al., 2003) y parásitos (Avilán et al., 2011). En la levadura *Candida albicans* invasiva GAPDH y homólogos  $\alpha$ -enolasa funcionan como receptores de Plg. Además, la unión de Plg para enolasa potencia la transcitosis de *C. albicans* a través de una monocapa de células endoteliales microvasculares del cerebro humano (Jong et al., 2003). Por otra parte, *Leishmania mexicana* une componentes del sistema fibrinolítico y esta unión ha sido implicada a la virulencia del parásito (Avilán et al., 2000)

Las interacciones del Plg con microorganismos tampoco se da únicamente con organismos patógenos, hay un número de especies comensales capaces de unir Plg con alta afinidad y especificidad. Estas incluyen a varias especies de estreptococos orales (Itzek et al., 2010), bifidobacterias (Candela et al., 2009), y lactobacilos (Antikainen et al., 2007).

En el caso de *Bifidobacterium*, se une a Plg por medio de las proteínas DnaK, glutamina sintetasa, enolasa y otras (Candela et al., 2007, 2008), lo cual tiene un efecto en la colonización del tracto gastrointestinal, la adhesión a los tejidos del hospedero y la modulación del sistema inmune del hospedero (Gilad et al., 2011). Estos estudios indican que las bacterias tienen un papel multifacético en la interacción con el hospedero, lo que puede ser la base de la diversidad de receptores de Plg expresadas por las bacterias y los diferentes mecanismos de interacción que se han descrito hasta la fecha (Zorio et al., 2008).

---

Un hallazgo importante, es que las bacterias invasivas comparten dos propiedades: la expresión de los receptores de Plg y / o activadores, así como la adhesividad a la MEC y membranas basales (MB), por lo que a continuación describiremos con detalle lo referente a este tipo de moléculas en bacterias.

#### 1.4.1. Receptores bacterianos para Plg

Los procesos hemostáticos tales como la coagulación y el depósito de fibrina, como resultado de la inflamación, son una parte esencial del sistema de defensa del hospedero. Algunas bacterias patógenas invasoras, han desarrollado una serie de estrategias para eludir la línea de defensa y entrar en el tejido circundante. El reclutamiento de proteasas del hospedero a la superficie bacteriana representa un mecanismo particularmente eficaz para mejorar la invasividad. Los microorganismos interactúan con el sistema fibrinolítico de diferentes maneras. Una de ellas es la inmovilización de Plg en su superficie mediante receptores para Plg (PlgR), lo que lleva a la activación de Plg por activadores del hospedero para generar Plm enzimáticamente activa. Se han detectado receptores para Plg diferentes microorganismos: virus (Chaipan et al, 2009), hongos (Crowe et al., 2003), parásitos (Avilán et al., 2011) y bacterias.

Un número considerable de bacterias que inmovilizan el Plg en su superficie se han encontrado, esta unión aumenta la activación de Plg por los PAs del hospedero. El reclutamiento de Plg a la superficie de la célula bacteriana está mediado directamente por cualquiera de los receptores de superficie, por proteínas citoplasmáticas localizadas en la superficie de la célula bacteriana ó indirectamente a través de las

---

interacciones con proteínas plasmáticas del hospedero, tales como el fibrinógeno (Sanderson-Smith et al., 2012).

La capacidad de reclutar Plg, es común para bacterias Gram positivas y Gramnegativas. Se han encontrado receptores en bacterias como *Streptococcus* (Kuusela et al., 1992), *Salmonella sp.* (Korhonen et al., 1997), *Borrelia sp.* (Hu et al., 1997; Fuchs et al., 1994, Coleman et al., 2001), *Haemophilus influenzae* (Ullberg et al., 1990, Sjöström et al., 1997), *Escherichia coli* (Kukkonen et al., 1998), *Helicobacter pylori* (Ljungh, 2000), *Mycobacterium tuberculosis* (Xolalpa et al., 2007), *Neisseria meningitidis* (Ullberg et al., 1992) entre otras.

En algunas bacterias, la expresión de PlgRs bacterianos son factores de virulencia esenciales (Bhattacharya et al., 2012). Por ejemplo, *Streptococcus pyogenes* la capacidad de unir Plg y acumularlo en su superficie a través de una proteína llamada M y esta unión es esencial para la virulencia de toda esta gama de bacterias (GAS) (Sanderson-Smith ML et al., 2008).

Aunque existen varios microorganismos que poseen PlgR, muchos de los receptores identificados pertenecen a un grupo de enzimas “housekeeping” localizadas en la superficie, lo que mejora la virulencia de estas bacterias (Pancholi y Chhatwal, 2003). Algunos receptores bacterianos además de unir Plg, son capaces de unir a las proteínas de MEC. Estas observaciones sugieren que la degradación de fibrina mediada por Plm podría ser un mecanismo que permite la propagación de las bacterias invasivas dentro del hospedero (Sun et al., 2004). Algunos ejemplos de receptores bacterianos que se han identificado recientemente se encuentran en la Tabla 1.3.1

**Tabla 1.3.1. Receptores para plasminógeno identificados en bacterias.**

<b>Receptor</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Enolasa</b>	<i>Streptococcus</i>
<b>GAPDH/SDH/Pir</b>	<i>Streptococcus</i>
<b>Proteína M, PAM</b>	<i>Streptococcus</i>
<b>OspA, OspC</b>	<i>Borrelia</i>
<b>HP-NAP</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>PgbA/PgbB</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>DnaK</b>	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i>
<b>Flagelos</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Fimbrias</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i>

Modificada de: Bhattacharya S, Ploplis VA, Castellino FJ. 2012. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. J Biomed Biotechnol. 2012:482096.

#### **1.4.2. Activadores de Plg bacterianos.**

Son pocos los patógenos humanos que poseen activadores de Plg. La observación inicial de la interacción entre los microbios y el sistema fibrinolítico se hizo en la década de 1930. Tillet y Garner observaron que los estreptococos de muestras humanas poseían una capacidad fibrinolítica (Johnson et al, 1992). Años después se identificó a una proteína, que se llamó Estreptoquinasa (SK), como el activador del Plg de esta bacteria. La SK es una proteína monocatenaria de 414 aa con un único dominio que exhibe una considerable especificidad para la activación del Plg. Es

---

producida por los miembros de los grupos A, C y G de estreptococos (Reddy et al, 1972) Esta proteína convierte el Plg a Plm sin cortarla mediante la formación de un complejo SK/Plg donde se induce un cambio conformacional que expone el sitio activo de la Plm. Además, este complejo es resistente a inhibidores de Plm como la  $\alpha$ 2 -AP (Sun, 2006).

De una manera similar a *Streptococcus*, la bacteria *Staphylococcus aureus* produce una proteína llamada Estafiloquinasa (SAK), que es también un activador de Plg. Es un polipéptido de cadena simple de 136 aa sin puentes disulfuro, con un único dominio de alta especificidad para Plg. Tal como en el caso anterior, la SAK activa el Plg a través de su unión a Plg. El complejo SAK/Plm es sensible a  $\alpha$ 2-AP (Parry et al, 2000).

Se ha estudiado el papel de estos activadores en la patogenicidad de diferentes organismos. En el caso de los estreptococos del grupo A (GAS), la SK es vital para la patogénesis de las bacterias en la infección en ratones (Sun et al., 2004).

Otro activador que ha sido identificado en bacterias, es la proteasa Pla de *Yersinia pestis*. Pla es una proteasa aspártica que activa al Plg en el mismo enlace peptídico que el tPA y el uPA. Es además una adhesina con afinidad por proteínas de la MEC y laminina (Singh B et al, 20012; Kukkonen et al., 2001; Lähteenmäki et al, 2001a; Lähteenmäki et al., 2001b). Pertenece a la clase de omptinas, una familia de proteasas/ adhesinas de superficie que exhiben diferentes funciones asociados con la virulencia (Vranckx et al, 2007). En experimentos de manipulación de su expresión

temporal se mostró que Pla permite que *Y. pestis* se replique rápidamente en las vías respiratorias (Koo et al., 2011).

Hace algunos años, se identificó una proteína también en *Legionella pneumophila*, homóloga a Pla. En este trabajo se encontró que *L. pneumophila* tenía la capacidad de convertir Plg a Plm por la acción de una proteína de membrana llamada Lpa (Vranckc et al, 2007). En *Streptococcus uberis* se encontró una proteína homóloga a SK, de 251 aa la cual fue nombrada PauA (Rosey et al., 1999).

Por otra parte, se detectó un PA en bacterias causantes de enfermedades periodontales. Se identificó una proteasa de 80-kDa tipo tripsina de *P. gingivalis* que activa Plg (Grenier et al., 1996). En la siguiente tabla se muestran los activadores de Plg encontrados en bacterias.

**Tabla 1.3.2. Activadores de Plasminógeno identificados en bacterias.**

Proteína bacteriana	Actividad fisiológica
<b>Estreptoquinasa</b>	Activación de Plg, Actividad Fibrinolítica, Inhibición de $\alpha$ 2-AP, determinante de virulencia
<b>Estafiloquinasa</b>	Activación de Plg, actividad fibrinolítica, neutralización de defensas bactericidas, inducción de la respuesta de anticuerpos específicos, proliferación de los linfocitos T específicos de estafiloquinasa
<b>Pla</b>	Activación del Plg, actividad fibrinolítica, inhibición de la $\alpha$ 2-AP, degradación de los factores del complemento, reducción de opsonofagocitosis, inducción de la fosforilación de la tirosina, inducción de la peste bubónica
<b>OmpT, PgtE</b>	adherencia a las proteínas MEC, activación de Plg, degradación de péptidos bactericidas

Modificado de Bergmann S, Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost.* 2007 Sep;98(3):512-20.

---

La adherencia a la MEC y la activación en la superficie de la bacteria, ya sea por activadores bacterianos, o por activadores del hospedero; puede ser utilizada por las bacterias como un mecanismo para colonizar e invadir los tejidos del hospedero. Debido a que mecanismos similares pueden ser utilizados en la migración e invasión de células tumorales (Mignatti y Rifkin, 1993), el término "metástasis bacteriana" se ha utilizado como analogía (Plow et al., 1999; Läteenmäki et al., 2000, 2005; Bergmann y Hammerschmidt, 2007).

## **1.5. El sistema fibrinolítico en la infección por microorganismos.**

El Plg se encuentra principalmente en circulación a una concentración regulada, y su principal fuente es el hígado. Sin embargo, está también presente en otros tejidos; se ha encontrado en cerebelo, riñón, cerebro, testículos, corazón, pulmón, útero, bazo, timo y el intestino (Zhang et al., 2002). Debido a su función fisiológica, los PA y los inhibidores fisiológicos también son expresados de forma controlada en los tejidos, bajo condiciones normales. Existen algunas enfermedades donde el Plg es expresado en menor o en mayor concentración de la normal. Se han reportado niveles elevados durante el embarazo (alrededor de 140% en el segundo y tercer trimestre) (Hellgren et al., 1981), durante el uso de anticonceptivos hormonales (Tait et al., 1992), por obesidad (Grace et al., 1968), por el uso de esteroides anabólicos (Preston et al., 1981), en el hipotiroidismo (Rennie et al., 1978), y en casos de trasplante de hígado ó riñón (Schader et al., 1988).

---

Por otra parte, la disminución de los niveles se ha demostrado en varias condiciones clínicas, incluyendo la coagulación intravascular diseminada (DIC) (Chesterman et al, 1978), sepsis (Gallimore et al., 1980; Smith et al., 1982), leucemia (Sutor et al., 1979), enfermedad de la membrana hialina (Markarion et al., 1967), enfermedades del hígado (Biland et al., 1978), fiebre hemorrágica argentina (Molinas et al., 1984), hipertiroidismo, y después de la terapia trombolítica (Rennie et al., 1978). La disminución ó el aumento del Plg pueden ser indicadores de una condición patológica y en algunos casos pueden ser indicadores del pronóstico de una enfermedad.

La sobreexpresión de moléculas del sistema fibrinolítico ha sido asociada a la respuesta inflamatoria en varias enfermedades (Nolasco et al., 2007), tales como cáncer (Kim et al., 2007, Lu et al., 2007), arteriosclerosis (Ross, 1999; Fuhrman et al., 2012; Parry et al., 1999) o infecciones por *Staphylococcus aureus* (Zavizion et al., 1997), *Streptococcus pneumoniae* (Mölkänen et al., 2011), malaria (Perch et al, 2004) entre otros. Se han asociado alteraciones en el PAI-1 con enfermedades de arterias coronarias, ictus isquémico, artritis reumatoides, arterioesclerosis, tumores, nefropatías, enfermedades renales crónicas, trasplantes renales, e incluso en infecciones bacterianas (Małgorzewicz et al., 2013). El receptor suPAR también ha sido relacionado con sepsis y bacteremia (Backes et al., 2012; Wittenhagen et al, 2004).

Algunas bacterias han desarrollado una variedad de tácticas para interferir con procesos homeostáticos del hospedero, como la cascada de coagulación y su contraparte la fibrinólisis, explotando las proteasas involucradas en estos procesos (Levi et al., 2004). Durante las enfermedades infecciosas, debido a procesos como la

---

inflamación, el sistema fibrinolítico puede sufrir alteraciones en su expresión, favoreciéndose así, la interacción de algunas moléculas de los patógenos con los componentes de este sistema. Estas interacciones son complejas y en algunos casos indirectas, de algunas incluso aún se desconocen sus funciones y mecanismos patogénicos.

Muchos estudios, sin embargo, han demostrado una fuerte participación del sistema fibrinolítico en la patogénesis bacteriana; al unir y activar el Plg, las bacterias pueden usar la Plm formada para mediar directa o indirectamente la degradación de la matriz extracelular y facilitar la migración a través de los tejidos (Sun et al., 2006).

Aunado a esto, los estudios anteriores han mostrado también que las infecciones bacterianas influyen en la producción de los activadores e inhibidores de PA (PAIs) del hospedero. Cada bacteria modula su interacción con el sistema; por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* y *Yersinia pestis* inactivan a los inhibidores  $\alpha$ 2-AP y  $\alpha$ 2-macroglobulina durante la infección (Grenier et al., 1996; Kukkonen et al., 2001; Lathem et al., 2007). En caso de la infección por *Leptospira* se han detectado mayores niveles de activadores de Plg en las muestras del suero de pacientes con leptospirosis comparadas con los sueros de pacientes sanos (Vieira et al, 2013).

La forma soluble de uroquinasa-activador del Plg tipo receptor (suPAR) es un marcador inflamatorio. La concentración en suero de suPAR, predice la mortalidad en la bacteremia por *Staphylococcus aureus* (Mölkänen et al., 2011). Se han detectado niveles altos de suPAR asociados con la mortalidad en cáncer y en otras infecciones

---

crónicas como el VIH y la tuberculosis (Munuwwar et al., 2012). En el caso de enfermedades crónicas como la tuberculosis, el sistema fibrinolítico puede jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria a las infecciones bacterianas debido a que podría participar en la degradación y remodelación de proteínas de la matriz extracelular. En nuestro grupo de trabajo se ha detectado, que *M. tb* expresa algunos PlgRs. Sin embargo, el papel del sistema fibrinolítico no es claro. A continuación revisaremos la relación entre tuberculosis y este sistema.

---

## 2. ANTECEDENTES

---

Algunas bacterias han desarrollado mecanismos para explotar las moléculas del hospedero y presentan una amplia gama de moléculas con este fin (Henderson et al., 2011). Las especies bacterianas interactúan con diferentes células del hospedero mediante moléculas secretadas o presentes en su superficie (Sun H, 2006).

### 2.1. El sistema Fibrinolítico en la tuberculosis

La TB, afecta comúnmente el pulmón pero se dispersa principalmente a través de la sangre a otras áreas del pulmón y otros órganos. Se ha observado que las micobacterias interaccionan con células del hospedero causando necrosis y la destrucción de las barreras celulares, lo que podría facilitar su paso en el torrente sanguíneo y permitir la invasión (Leung et al., 1999).

La actividad fibrinolítica en infecciones por micobacterias se ha demostrado. La primera publicación sobre este tema fue realizada por Smokovitis *et al* en 1976, quienes demostraron que la inoculación intradérmica de *M. bovis BCG* en conejos provocaba lesiones en la dermis y un incremento en la actividad fibrinolítica (Smokovitis et al., 1976). Años más tarde, Gordon *et. al.*, observaron que los macrófagos activados por la infección con micobacterias son capaces de producir un activador de Plg (Gordon et al., 1978; Ezekowitz et al., 1982; Schuyler et al., 1984). La secreción de este activador se da específicamente en respuesta a la infección por

---

micobacterias y no así en respuesta a la presencia de otras bacterias pulmonares como *Bordetella bronchiseptica* (Widström et al, 1983). El activador de Plg, también se ha asociado con el desarrollo de granulomas en un modelo murino de lepra (Izaki et al., 1983; Izaki et al, 1984, Satoh et al.,, 1983).

Se ha encontrado también la presencia de moléculas del sistema fibrinolítico en pacientes con tuberculosis activa, en los cuales se detecta una alta expresión de uPAR en los monocitos (Juffermans et al., 2001). Por otra parte, se han encontrado también en estos pacientes altos niveles del receptor del uPA (uPAR) cuyo incremento fue asociado con los niveles de mortalidad (Eugen-Olsen et al., 2002). Incluso se demostró que la medición de suPAR proporciona información pronóstica en la mortalidad entre las personas sin diagnóstico (Rabna et al., 2009).

Los niveles séricos de suPAR fueron analizados en pacientes con tuberculosis, los resultados mostraron un elevado nivel de suPAR en la tuberculosis activa. Se encontró que altos niveles de suPAR estaban asociados con la extensión de la enfermedad alveolar (Djoba Siawaya et al., 2008), además una disminución en los niveles de suPAR cuando los pacientes recibían tratamiento (Eugen-Olsen et al., 2002).

En otro reporte se encontró que los pacientes con tuberculosis mostraron un incremento en los niveles del inhibidor del activador del Plg (PAI) (Lilja et al. 2007) Además, se ha reportado que la expresión de uPAR se incrementó a más del doble en pacientes con tuberculosis extrapulmonar en comparación con los niveles durante la enfermedad pulmonar (Ostrowski et al., 2006). En derrames pleurales de pacientes

---

con tuberculosis se encontraron niveles elevados de TNF- $\alpha$ , así como niveles más altos de PAI-1 en pacientes con tuberculosis comparados con los niveles encontrados en individuos con otras patologías como cáncer (Alemán et al., 2003).

Lu *et al.*, compararon la concentración de los componentes del sistema fibrinolítico en el líquido pleural de pacientes con cirrosis, tuberculosis, y cáncer. Los resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de uPA y uPAR en pacientes con tuberculosis y cáncer con respecto a los pacientes con cirrosis. Los niveles de PAI-1, fueron estadísticamente más altos en los pacientes con tuberculosis que en los enfermos con cirrosis y cáncer (Lu et al, 2007).

En un estudio *in vivo* se demostró que el Plg es importante en la remodelación de la matriz extracelular. En el mismo estudio, los autores demuestran que la deposición de fibrina y Fn se incrementó en ratones deficientes en Plg durante la infección en comparación con ratones de tipo silvestre (Sato et al., 2003).

Recientemente se ha encontrado una sobrerregulación de PAI-1 en los pulmones durante la tuberculosis murina, PAI-1 contribuye a cambios transitorios, no específicos de la inmunidad durante la fase temprana de la tuberculosis murina (Kager et al 2012)

La primera evidencia de la presencia de receptores para Plg en *M. tb*, fue reportado por Monroy et al., quienes detectaron proteínas en los extractos proteicos de la micobacteria capaces de unir al Plg. Esta unión fue dependiente de los sitios de lisina. Por otra parte, se encontró que tanto la proteína soluble, como los extractos proteicos podrían activar al Plg, únicamente en presencia de matrices de fibrina, lo que sugiere,

---

que la activación del Plg por *M. tuberculosis* requiere la unión de Plg a una molécula diana. Por otra parte, esta actividad fue resistente al inhibidor  $\alpha$ 2-AP (Monroy et al, 2000).

Posteriormente, un estudio reciente reveló la identidad de varias proteínas de unión a Plg presentes en *M. tb*. Mediante el análisis proteómico, se identificaron quince diferentes proteínas de unión a Plg: DnaK (Rv0350), GroES (Rv3418c), GlnA1 (Rv2220), antígeno 85 (Rv3804c, Rv1886c, Rv0129c), Mpt51 (Rv3803c), MPT64 (Rv1980c), metK (Rv1392), SAHH (Rv3248c), LPD (Rv0462), Icl (Rv0467), Fba (Rv0363c) y EF-Tu (Rv0685). La interacción de Plg con estas proteínas fue inhibida por el análogo de lisina EACA, lo que indica que la unión fue mediada por los residuos de lisina (Xolalpa et al., 2007).

Otros análisis proteómicos identificaron a la 1, 6-fructosa aldolasa bisfosfato como una proteína de filtrado de cultivo capaz de unir Plg (De la Paz Santangelo et al., 2011). Hasta ahora, los estudios muestran que *M. tb* posee moléculas de unión y activación de Plg presentes en los extractos de proteínas solubles, las cuales están siendo estudiadas en nuestro grupo de trabajo, para identificar el potencial PA en micobacterias. Teniendo en cuenta que la interacción con el sistema de Plg promueve el daño de las matrices extracelulares, así como la propagación bacteriana y la invasión de órganos durante la infección, esto sugiere un mecanismo común en la migración de las células eucariotas y procariotas que pueden ser utilizados por *M. tb* en el proceso de invasión a su hospedero.

---

Todas estas observaciones proporcionan evidencias de que la micobacteria podría interactuar con el sistema fibrinolítico; sin embargo, poco se conoce acerca de la importancia biológica de esta interacción en la infección por *M. tb*. No obstante que la TB es una enfermedad que presenta uno de los más altos índices de mortalidad y morbilidad en el mundo, se conoce relativamente poco de los factores que permiten a *M. tb* invadir y diseminarse en el hospedero, a pesar del papel predominante que juegan estos eventos en el establecimiento y la progresión de la enfermedad. Esclarecer estos mecanismos facilitaría el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad.

---

# 3. JUSTIFICACIÓN

---

La actividad proteolítica es un factor importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, que favorece la invasión bacteriana a sitios de infección secundaria en el hospedero. El pulmón es considerado como el principal punto de entrada para las micobacterias patógenas, sin embargo éstas pueden diseminarse a otros órganos, como el riñón, el sistema nervioso central, el tejido óseo, entre otros.

Durante las enfermedades infecciosas, el sistema fibrinolítico sufre una alteración en su expresión, favoreciendo la interacción de algunas moléculas de patógenos con los componentes de este sistema. Esta interacción promueve la propagación bacteriana y la invasión de órganos durante la infección (Espitia et al., 2012). *M. tuberculosis* posee proteínas que pueden interactuar con el Plg, lo que sugiere un mecanismo que sea utilizado por *M. tuberculosis* durante el proceso de la enfermedad. El esclarecimiento de los mecanismos usados por *M. tuberculosis* para facilitarse el acceso a tejidos vulnerables proporcionará acercamientos racionales para un mejor entendimiento del proceso de infección e inflamación; y de los determinantes específicos de virulencia que utiliza esta bacteria para diseminarse y causar enfermedad en diferentes órganos.

---

---

## 4. HIPÓTESIS

---

La interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con el sistema fibrinolítico, contribuye al proceso que se desarrolla durante la infección.

---

# 5. OBJETIVOS

---

## 5.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la interacción de *M. tuberculosis* con las moléculas del sistema fibrinolítico *in vitro* e *in vivo*, en un modelo murino de tuberculosis pulmonar y establecer su relación en el desarrollo del proceso infeccioso.

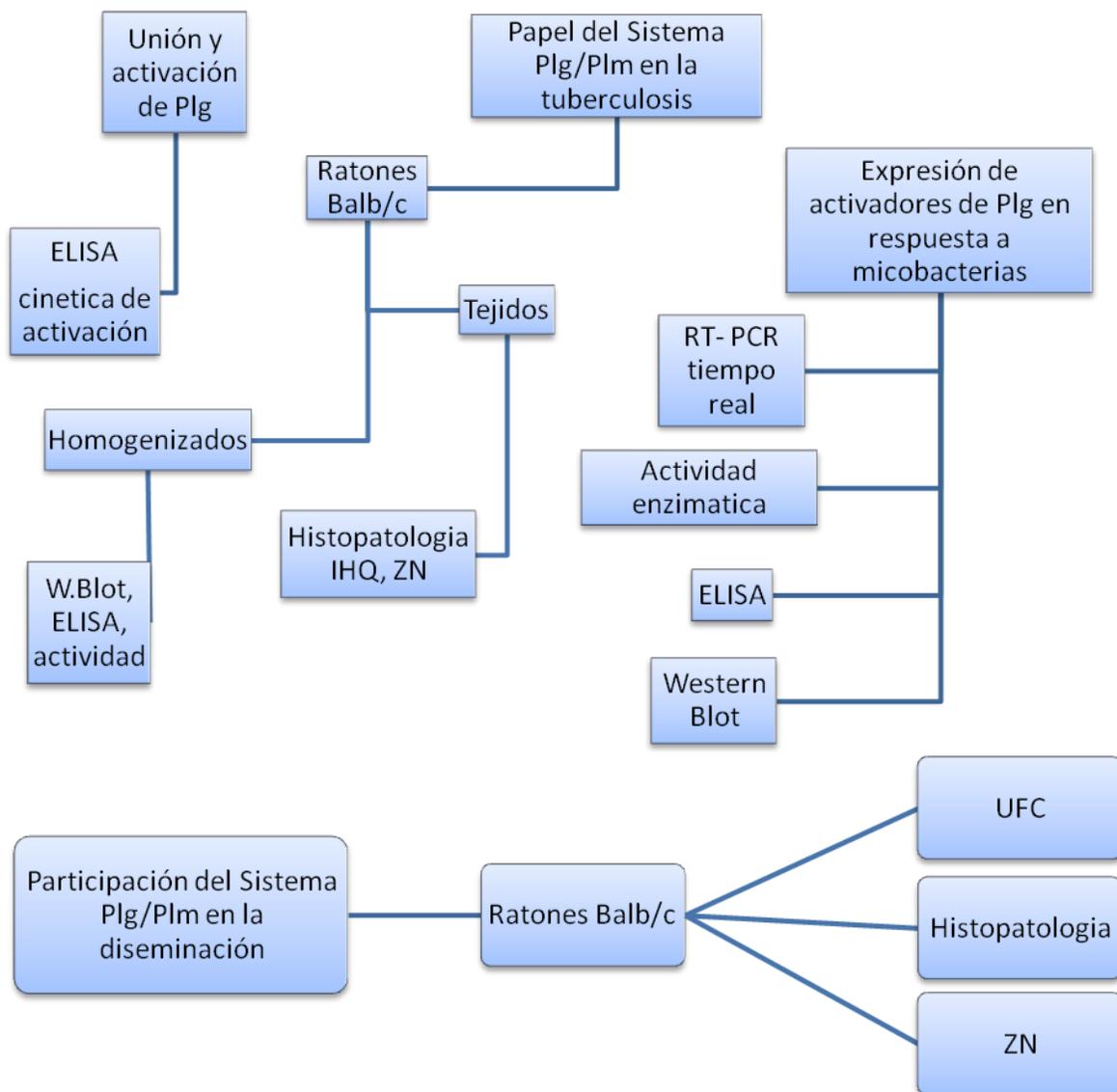
---

## **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- ◇ Determinar la capacidad de las micobacterias de unir y activar Plg.
- ◇ Determinar la presencia de moléculas del sistema fibrinolítico en los pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis* mediante la expresión de Plg/Plm
- ◇ Determinar la expresión de los activadores de Plg, tPA y uPA en el modelo murino.
- ◇ Determinar la participación del Plg en la diseminación de *Mycobacterium*.

# 6. Material y Métodos

## 6. 1. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



---

## 6.2. CULTIVO DE MICOBACTERIAS

Se llevaron a cabo cultivos primarios para *M. tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium bovis* BCG cepa Phipps (BCG) y *Mycobacterium smegmatis* cepa mc<sup>2</sup>155. Las cepas fueron sembradas en 50 mL de medio 7H9 (Middlebrook, Difco) enriquecido con ADC (albumina, dextrosa, catalasa; Difco) al 10% e incubadas a 37 °C a 600 rpm hasta que alcanzaron una DO<sub>600nm</sub> de 0.4. A partir de este cultivo primario se inocularon 200 mL de medio 7H9 con 10% de ADC a una dilución del 7% y se crecieron a 37°C en agitación hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 (600nm). Se obtuvo la pastilla centrifugando a 3600 rpm durante 10 min. Las bacterias fueron lavadas dos veces con PBS-0.05% tween 80 (PBS-T) (Monroy et al., 2000). Finalmente se calculó el número de bacterias presentes en la suspensión como se describe abajo.

## 6.3. CONTEO DE BACTERIAS POR UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

A la pastilla bacteriana obtenida de un cultivo de micobacterias se le agregaron 5 mL de perlas de vidrio de 0.5 cm y fueron agitadas en el vórtex. Posteriormente, se incubaron en hielo durante 1 minuto. Se agitaron nuevamente por un minuto en el vórtex. Este procedimiento se repitió 10 veces para disgregar las bacterias. Una vez que las bacterias fueron separadas se realizaron diluciones seriales 1:10 en un volumen de 5 mL. Se sembraron 100 µl de las diluciones 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> en medio 7H11 (Middlebrook, Difco) enriquecido con OADC (ácido oléico-albumina, dextrosa, catalasa; Difco Laboratories) al 10%. Las placas fueron incubadas durante 4 semanas a 37 °C. Consecutivamente, se observaron las colonias bacterianas y se contaron para obtener el número de unidades formadoras de bacterias (UFC) por mL de cultivo.

---

## 6.4. UNIÓN Y ACTIVACIÓN DE PLG

### 6.4. 1. Determinación de la unión del Plg sobre la superficie de *Mycobacterium*

A partir de cultivos en fase logarítmica de *BCG* y *M. smegmatis*,  $2.5 \times 10^5$  UFC fueron inmovilizadas en pozos de una placa de ELISA (Nunc Maxisorp) adsorbiéndolas en amortiguador de carbonatos 100 mM, pH 9.6 durante toda la noche (ON) a 37 °C. Cada pozo fue incubado con 1 µg de Plg humano (Roche) durante 2 horas (h) a 37 °C y después se lavó la placa 3 veces con PBS para eliminar el Plg no unido a las bacterias. Cualquier unión inespecífica fue bloqueada por incubación con PBS-T / 3% de BSA durante 1 h a 37 °C (BSA-PBS-T). El Plg unido a las bacterias fue detectado con un anticuerpo policlonal contra Plg humano (antiPlg) (Dako) diluido 1:1000 durante 2 h. Se lavó de nuevo con PBS-T y posteriormente se incubó durante 1 h a 37 °C con Proteína A conjugada a peroxidasa (Zymed) diluida 1:2000. Después de extenso lavado, la actividad de la peroxidasa se reveló con 1 mg/mL de o-fenilendiamina (Sigma P6662) y 0.4% de peróxido de hidrógeno en PBS. La reacción se detuvo con HCl 3 N, y la OD<sub>492nm</sub> se midió con un lector automático de placas de microtitulación (Thermo Labsystems). La unión del Plg a la superficie de la bacteria BCG se evaluó además en presencia del competidor ε-Ácido aminocaproico (Epsilon-aminocaproic acid, EACA) a una concentración 50 mM y 100 mM.

### 6.4.2. Determinación de la activación del Plg sobre la superficie de *M. tuberculosis*.

$2.5 \times 10^5$  UFC de *M. bovis* y *M. smegmatis* fueron colocadas en pozos de placas de microtitulación (Thermo Labsystems) y fueron incubadas con 1 µg de Plg humano (Roche) durante 2 h a 37 °C. Posteriormente las bacterias fueron lavadas con PBS-T para eliminar el Plg no unido. A continuación se colocaron 10ng de tPA para activar el

---

PIg unido a las bacterias como control positivo y en el resto de los pozos se adicionó únicamente 0.25mM de un sustrato cromogénico específico para Plm (Chormozym Plm) (tosylglycyl-prolil-lisina-4-acetato de nitránilide; Roche Diagnostic). Todo esto en un volumen final de 200  $\mu$ L en amortiguador Tris 50mM pH 7.4. La actividad de Plm generada por la conversión del PIg por el tPA o por la bacteria, se monitoreo mediante la degradación del sustrato colorimétrico a D.O.  $_{405Nm}$  incubando la placa a 37 °C durante 24h. Se realizó este mismo ensayo usando un sustrato cromogénico para tPA (Chromozym tPA).

## **6.5. MODELO EXPERIMENTAL DE TB PULMONAR PROGRESIVA**

### **6.5.1. Infección de ratones**

Grupos de 3 ratones machos BALB/c de 6 a 8 semanas de edad libres de patógenos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de 56 mg/kg de pentotal. La tráquea se expuso con una pequeña incisión en la línea media, y  $2.5 \times 10^5$  UFC de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC, Rockville MD, EE.UU.) suspendidas en 100  $\mu$ l de solución de amortiguador de fosfatos (PBS) se inocularon por vía intratraqueal. Los ratones fueron sacrificados a los 1, 3, 14, 21, 28, y 60 días después de la infección (dpi). Se realizaron tres experimentos, y todos los procedimientos se realizaron en una cabina de flujo laminar en una instalación de Bioseguridad Nivel III. Los ratones se mantuvieron en jaulas equipadas con microaisladores. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación en Animales del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México (Hernández Pando., et al 1996).

---

### 6.5.2 Detección de Plg y tPA en sobrenadantes pulmonares por Western blot (WB)

Los pulmones derechos de los animales descritos anteriormente se homogeneizaron con un Polytron (Kinematica, Luzern, Suiza) en tubos estériles que contenían 1 mL de solución salina isotónica. Después de eliminar los restos celulares por centrifugación, el sobrenadante fue pasado por un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . La concentración de proteína total fue determinada por un ensayo de Lowry y 20  $\mu\text{g}$  de proteína de cada sobrenadante de pulmón homogeneizado se separó en un gel de poliacrilamida al 12% mediante electroforesis. Después de transferir las proteínas a membranas de PDVF, se bloquearon con PBS-T / 3% de BSA, se lavó con PBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con una dilución 1/500 de un anticuerpo policlonal anti-Plg hecho en cabra (Santa Cruz Sc -15036). Después de lavar con PBS-T, los anticuerpos unidos se detectaron con una dilución 1/2000 de un anticuerpo anti- IgG de cabra conjugado con HRP hecho en conejo (Zymed 81-1620) incubando durante media hora a TA. Las mismas muestras fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-tPA hecho en conejo (Santa Cruz Sc-5239) a una dilución de 1/1000. Los anticuerpos unidos fueron detectados con proteína A conjugado con HRP a una dilución 1/2000 (Zymed 10-1123) durante 30 min a TA. Para detectar la actividad de peroxidasa, las membranas fueron incubadas con una solución de revelado que contenía 1 mg/mL de 3,3- diaminobenedina (Sigma D563) y 0.4% de peróxido de hidrógeno al 30% en PBS. (Monroy et al., 2000)

### 6.5.3. Detección del sistema fibrinolítico en sobrenadantes pulmonares por ELISA.

10  $\mu\text{g}$  de proteína de los sobrenadantes de homogeneizados de pulmón fueron inmovilizadas en placas de ELISA (Nunc 439454) adsorbiéndolas en amortiguador de carbonatos, pH 9.6 a 37 °C por 16 h. Después de 3 lavados con PBS-T, cualquier

---

unión inespecífica fue bloqueada con PBS-T-BSA 3%. Las proteínas fueron incubadas con anticuerpos anti-Plg ó anti-tPA. Posteriormente, los pozos se incubaron durante 30 min con un anticuerpo anti-cabra-HRP ó Proteína A-HRP como se describió anteriormente. Después de lavar extensivamente, la actividad de la peroxidasa se reveló con o-fenilendiamina y la D.O. se midió a 492nm (Xolalpa et al., 2007).

#### 6.5.4. Detección de la actividad de Plm y tPA en homogenizados pulmonares.

Las actividades de Plm y tPA se determinaron por un ensayo cromogénico en placas de microtitulación (Costar 3590). 20 µg de proteína de los sobrenadantes de homogenizados de pulmón se mezclaron con 1.5 mM de Chromozym PL (Roche Diagnostic) o Chromozym tPA (N-metilsulfonil-D-Phe-Gly-Arg-4 - nitranilide acetato, Roche Diagnostic) en 200 µL de amortiguador Tris 50mM pH 7.4. El ensayo se realizó por triplicado, y la actividad de la proteína se detectó mediante la medición de la OD<sub>405nm</sub> inmediatamente después de la adición del colorante y luego otra vez cada hora durante 24 h a 37 °C. La concentración de Plm en los pulmones se determinó por comparación con una curva estándar establecida con Plm comercial (Roche10 602 361 001) a concentraciones que oscilaban desde 6.25 hasta 1.25 µg / mL de Plm en las condiciones descritas anteriormente (Rodríguez et al., 2012).

#### 6.5.5. Detección de Plg por Inmunohistoquímica

Para el estudio histológico, los pulmones izquierdos se perfundieron durante 24 h con 100% de etanol y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron secciones de criostato (5 mm de espesor) y se montaron en portaobjetos recubiertos de silano. Los tejidos se desparafinaron, y la peroxidasa endógena se inactivó con 0,03% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto. Después de dos lavados con PBS-T, cualquier unión

---

inespecífica fue bloqueada por incubación de los portaobjetos con solución de bloqueo Universal (Valaner DOIX090980) diluida 1/50 en PBS-T con 3% de BSA. Después de dos lavados con PBS-T, se incubaron con un anticuerpo policlonal producido en cabra anti-Plg (Santa Cruz Sc-15036) diluido 1/100 en PBS-T/3% de BSA durante 12 h a TA. Después de lavar con PBS-T, los anticuerpos unidos se detectaron con una dilución 1:200 de un anticuerpo anticabra conjugado HRP (Zymed 81-1620) por incubación durante 30 min a TA. Después de la incubación, se detectó la actividad de la peroxidasa mediante la adición de 1 mg / mL de 3,3-diaminobencidina (Sigma D563) y 0,4% de peróxido de hidrógeno en PBS. Finalmente se contratiñeron con Hematoxilina de Harris (HE). Las laminillas fueron sometidas además a tinción con Ziehl-Nielsen para detectar a las micobacterias en los tejidos. Para la cuantificación de las células positivas, cinco campos aleatorios de cada lóbulo pulmonar se evaluaron a un aumento de 200X. Las células fueron localizadas y se contaron mediante un analizador de imágenes computarizado (Q Win Leica). Los datos se expresan como el promedio del porcentaje de células positivas (Campuzano et al., 2007).

#### 6.5.6. Análisis de la expresión del sistema fibrinolítico por RT-PCR cuantitativo.

Grupos de 3 ratones machos BALB/c de 6 a 8 semanas de edad y libres de patógenos fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. Los animales se sacrificaron al mismo tiempo y en la misma manera descrita anteriormente. Ambos lóbulos pulmonares se utilizaron para aislar el RNA mensajero (RNAm) usando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN México, Colima, México) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La calidad y la cantidad de RNA fueron evaluadas con espectrofotometría (260/280 nm) y mediante electroforesis en geles de agarosa. El RNA fue tratado con DNAsa 1 (Gibco BRL). La transcripción inversa de los RNAm fue realizada utilizando 5 µg de RNA y el

---

kit Omniscript con oligo-dT (QIAGEN México). La PCR en tiempo real se realizó con el sistema de PCR- tiempo real 7500 (Applied Biosystems) y el Quantitative SYBR Green Mastermix kit (Qiagen). Se realizaron curvas estándar para cuantificar los productos de PCR. Estas curvas, así como controles negativos, se incluyeron en cada corrida del PCR (Rodríguez et al., 2012). Se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems) para los siguientes genes:

- gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH):

50-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-30,

50-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-30

- Plg

50-GGATTCTGGCTTAGAGGCGTTCAG-30,

50-GTTCACCCACTAATAGGGACGTGA-30

- tPA:

50-CTACAGAGCGACCTGCAGAGAT-30,

50-AATACAGGGCCTGCTGACACGT-30

- UPA:

50-ATGCAGCCCCACTACTATGGC-30,

50-GGTCCTCCA GAATCGCCCT-30.

Las cantidades de los RNAm específico en la muestra se midieron de acuerdo con el estándar correspondiente específico para cada gen. El número de copias de RNAm de cada gen se normalizó para el RNAm que codifica al gen GAPDH. El RNAm del tejido no infectado se utilizó como control para todos los experimentos en nuestro modelo.

---

## 6.6. EXPRESIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ACTIVADORES DE PLG EN RESPUESTA A MICOBACTERIAS.

### 6.6.1. Inmunización de ratones BALB/c con BCG

Seis ratones machos BALB / c de 6 a 8 semanas de edad se inmunizaron por vía subcutánea con  $10^5$  UFC de *M. bovis* BCG, y un grupo control fue inoculado con PBS. Después de 14 días, los animales fueron sacrificados por desangrado, y se retiraron los bazos asépticamente. Las células esplénicas totales se purificaron y se contaron, y  $1,5 \times 10^6$  células se añadieron a pozos de placas de cultivo celular y se incubaron durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera humidificada que contenía 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células fueron incubadas durante 24 h con  $10\ \mu\text{g}$  de proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (CF). Posteriormente, las células fueron centrifugadas, el sobrenadante se separó y se determinó la concentración de proteína (Gordon et al, 1978)

### 6.6.2. Determinación de la actividad de Plm en sobrenadantes de células de bazo

La actividad de Plm en los sobrenadantes de las células totales del bazo se determinó en un ensayo cromogénico en placas de microtitulación (Costar 3590).  $100\ \mu\text{g}$  de proteínas del sobrenadante se mezclaron con  $1.5\ \text{mM}$  de Chromozym Plm (tosylglycyl-prolil-lisina-4-acetato de nitránilide; Roche Diagnostic) en un volumen final de  $200\ \mu\text{l}$  de PBS. Los ensayos fueron realizados por triplicado, y la actividad de la proteína se detectó mediante la  $\text{DO}_{405\text{nm}}$  con un lector de placas de microtitulación automático (Labsystems). Las lecturas fueron tomadas durante un período de 24 h a  $37^\circ\text{C}$ .

### 6.6.3. Detección de activadores de Plg en extractos de bazo por ELISA y WB.

Se inmovilizaron  $20\ \mu\text{g}$  de proteína de extracto de células de bazo en pozos de placas de ELISA (Nunc 439454), y los activadores de Plg fueron detectados con el anticuerpo

---

policlonal anti-uPA producido en cabra (M-20, Santa Cruz Biotech sc-4831) y el anticuerpo anti-tPA como se describió en la sección 7.5.2. Además, 50 µg de sobrenadante de células de bazo fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 12% mediante electroforesis. Después de transferir las proteínas a membranas de PDVF, se detectaron los activadores tPA y uPA con anticuerpos específicos tal como se describió anteriormente (Rodríguez et al, 2012).

#### 6.6.4. Análisis por PCR en tiempo real de la expresión de genes del sistema fibrinolítico en células de bazo.

Se obtuvieron las células totales de bazo de 6 ratones diferentes en tres diferentes experimentos se utilizaron para aislar el RNAm utilizando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN México) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La calidad y la cantidad de RNA se evaluaron por espectrofotometría (260/280) y en geles de agarosa. La transcripción inversa de los mRNA se realizó utilizando 5 µg de RNA y el kit Omniscript con oligo-dT (QIAGEN México). La PCR en tiempo real se realizó utilizando el 7500 en tiempo real PCR (Applied Biosystems) y el QuantiTect SYBR Green Mastermix kit (Qiagen) como se describió anteriormente (Rodríguez et al, 2012).

### 6.7. PARTICIPACION DEL PLG EN LA DISEMINACION DE LAS MICOBACTERIAS.

#### 6.7.1. Unión de Plg de ratón a la superficie de *Mycobacterium tuberculosis*

Se preparó una solución en PBS que contenía  $6 \times 10^6$  UFC/mL y se incubaron con 50 µM de Plg de ratón (Haemtech, MCPG-5130) durante 2 h a 37°C. Posteriormente fue lavado dos veces con PBS para remover el Plg no pegado. Se realizó el mismo procedimiento con una solución con 50 µM de Plg de ratón y 50 µM de EACA. Además

---

una tercera solución que contenía solo bacterias y PBS fue tratada con el mismo procedimiento. Finalmente las bacterias fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de PBS que contenían  $2.5 \times 10^5$  UFC (Rodríguez et al, 2012).

#### 6.7.2. Infección de ratones con *M.bovis* BCG vía intradérmica.

Grupos de 3 ratones machos BALB/c de 6 a 8 semanas fueron infectados vía intradérmica en la base de la cola con  $2.5 \times 10^5$  UFC suspendidas en 100  $\mu$ l de PBS mediante una jeringa con una aguja de longitud 13mm, calibre 27g. Se realizaron sacrificios a las 3, 6, 12, y 24 h post infección. Dentro de la campana de bioseguridad, los animales fueron expuestos al anestésico general inhalatorio Sevorane. Posteriormente los animales fueron sacrificados por exsanguinación. A continuación se extrajeron quirúrgicamente los pulmones. La mitad de los órganos fue colocada en crioviales de 2.0 mL y posteriormente homogenizados en PBS. La otra mitad de los órganos fue fijada y embebida en parafina. En último lugar, se realizaron cortes de 5- $\mu$ m (Rodríguez et al, 2012).

#### 6.7.3. Conteo de Unidades Formadoras de colonias en tejidos.

Dentro de la campana de bioseguridad se homogenizaron las muestras de tejido con un Polytron (Kinematica, Luzern, Suiza) en tubos estériles que contenían 1 mL de solución salina isotónica. A continuación se realizaron diluciones seriales 1:10 en microtubos de 1.5 mL. Enseguida se colocaron por duplicado 10  $\mu$ l de cada dilución en cajas de medio 7H11 (Middlebrook, Difco) enriquecido con OADC (ácido oléico-albumina, dextrosa, catalasa; Difco Laboratories) al 10%. . Las placas fueron incubadas durante 4 semanas a 37 °C. Consecutivamente, se contaron las colonias

---

bacterianas y se obtuvo el número de unidades formadoras de bacterias (UFC) por mL de cultivo de acuerdo al factor de dilución correspondiente (López et al., 2003).

### **6.8. ANALISIS ESTADISTICO**

El análisis estadístico se realizó usando el análisis múltiple de ANOVA. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado y los datos se presentaron como las medias, mas menos la desviación estándar. Los asteriscos indican que existe significación estadística ( $p < 0.05$ ).

# 7. Resultados

## 7.1. Unión y Activación de Plg por *M.bovis* BCG

En estudios anteriores se han identificado proteínas micobacterianas, capaces de unir al Plg. Para comprobar que las micobacterias viables eran capaces de unir Plg, *M. bovis* BCG y *M. smegmatis* fueron incubadas con 1 µg de esta proteína. El Plg unido a la superficie bacteriana fue detectado con un anticuerpo policlonal (Figura 7.1.1).

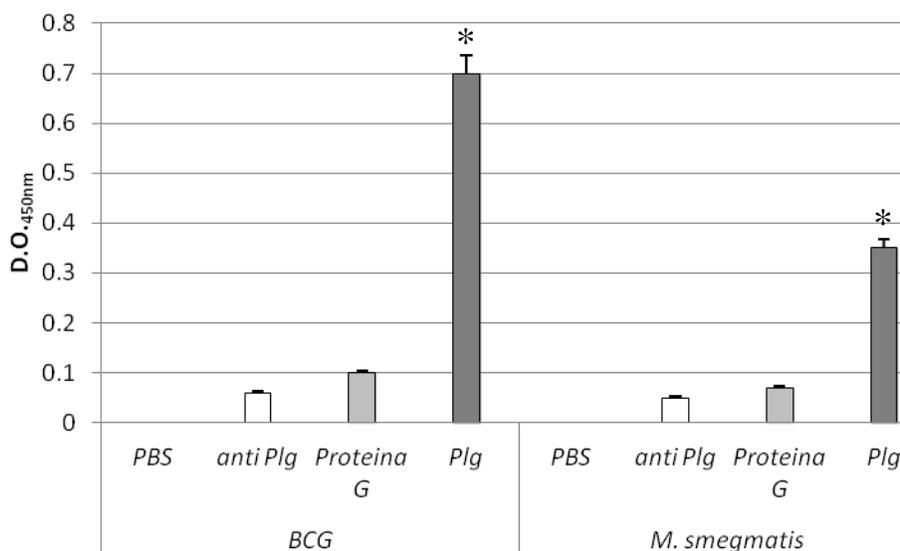


Figura 7.1.1. Detección de Plg unido a la superficie micobacteriana.  $2.5 \times 10^5$  UFC fueron inmovilizadas en placas de ELISA e incubadas con Plg. El Plg unido fue detectado con un anticuerpo policlonal. El Plg unido a las bacterias fue detectado después de la incubación con PBS, el anticuerpo  $\alpha$ -Plg (blanca), proteína G, HRP (gris claro) ó con Plg y todos los reactivos anteriores (gris oscuro).

En la gráfica anterior se observa que ambas micobacterias son capaces de unir Plg en su superficie, sin embargo la detección del Plg en la superficie de *M. bovis* BCG fue mayor que para *M. smegmatis*. Actualmente se están realizando pruebas con micobacterias patógenas en nuestro laboratorio. La unión del Plg a la superficie de la

bacteria BCG se evaluó además en presencia del competidor  $\epsilon$ -Ácido aminocaproico (Epsilon-aminocaproic acid, EACA). La unión por EACA fue inhibida como se ha reportado en la literatura, lo que indica que la interacción en la superficie de la bacteria también involucra residuos de lisina, ya que que al ser un análogo de lisina inhibe parcialmente al competir por los sitios de unión. Al usar una concentración similar de Plg y EACA la inhibición fue parcial, sin embargo la inhibición fue significativa de acuerdo a la prueba Z (Figura 7.1. 2).

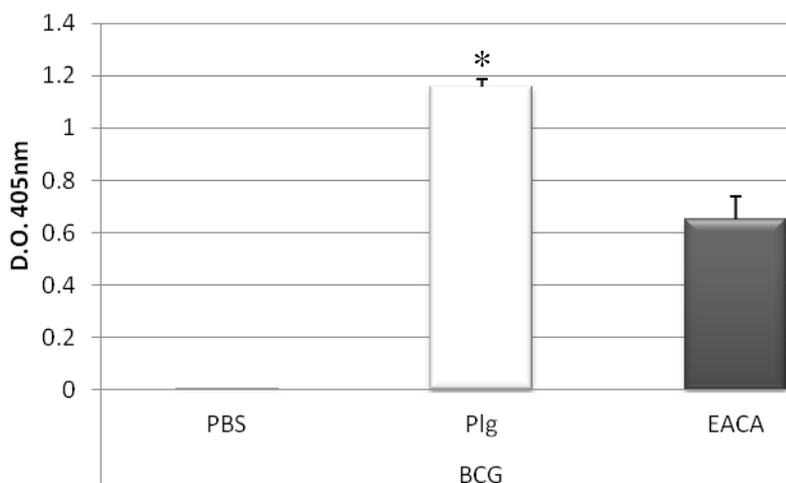


Figura 7.1.2. Inhibición de la unión del Plg a la superficie micobacteriana por EACA. BCG fue incubada con PBS, Plg 50mM (blanco) ó Plg 50 mM en presencia del EACA 50 mM (gris). El Plg unido fue detectado con un anticuerpo policlonal. La prueba se llevó a cabo por triplicado y los datos se presentan como la media  $\pm$  SD. Los asteriscos representan la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) mediante Prueba Z.

Anteriormente se encontró que las proteínas del extracto soluble de *M. tuberculosis* incrementaban la activación de Plg mediada por tPA (Xolalpa W, 2007). Para determinar la capacidad de las bacterias para activar el Plg, *M. bovis* fue cubierta con Plg e incubada en presencia o ausencia del activador tPA. La actividad de Plm generada por la conversión del Plg por el tPA o por la bacteria, se monitoreo mediante la degradación de un sustrato cromogenico para Plm y se midió a las 24 h.

Como podemos observar en la figura 7.1.3, la bacteria fue capaz de activar al Plg unido a su superficie aún en ausencia de tPA, lo que indica la presencia de un activador micobacteriano. Además, el efecto del activador bacteriano fue sinérgico, ya que la activación de Plg es mayor en presencia de la bacteria y tPA comparado con la activación del Plg únicamente en presencia de tPA, lo que indica la presencia de una(s) molécula(s) que incrementa la activación del Plg a Plm (Figura 7.1.3).

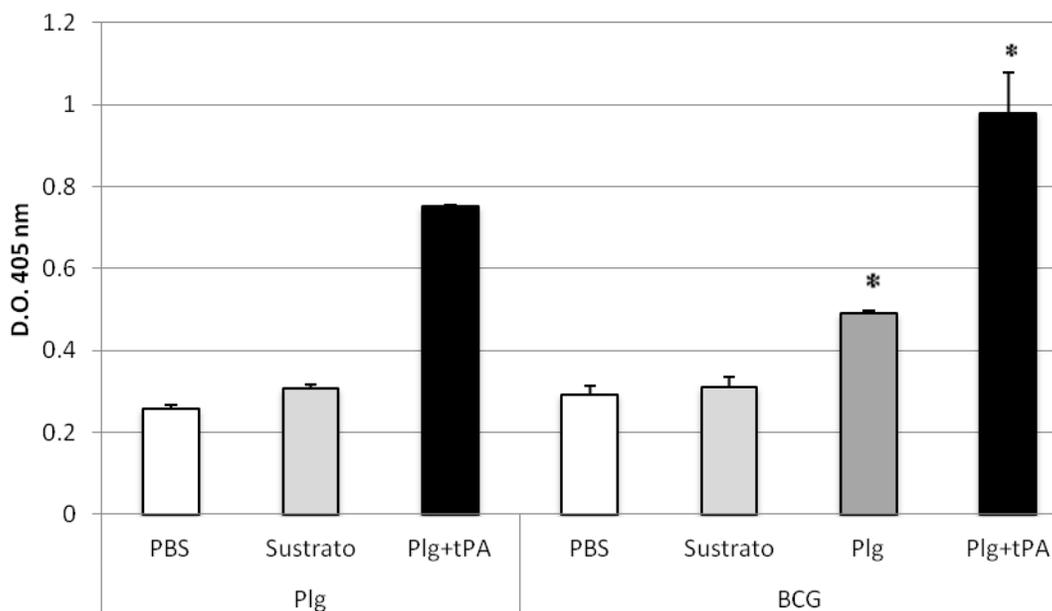


Figura 7.1.3. Activación del Plg unido a la superficie micobacteriana. Se realizó un ensayo con bacterias vivas para determinar la capacidad para activar el Plg unido a su superficie. Las micobacterias fueron cubiertas con Plg y se incubaron en presencia o ausencia de un activador (tPA). La activación a Plm fue determinada a las 24 h por la degradación de un sustrato cromogénico en presencia de PBS (blanco), del sustrato solo (gris claro), de Plg (gris oscuro) ó con tPA y todos los reactivos anteriores (negro). La prueba se llevó a cabo por triplicado y los datos se presentan como la media  $\pm$  SD. Los asteriscos representan la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

## **7.2. Expresión de las moléculas del sistema fibrinolítico en un modelo de tuberculosis pulmonar en el ratón.**

Para inducir enfermedad en un modelo murino, se infectaron ratones BALB/c con la cepa patógena *M. tuberculosis* H37Rv y fueron sacrificados a los 1, 3, 14, 21, 28, y 60 días. Los pulmones derechos se homogeneizaron y el Plg/Plm fue detectado con un anticuerpo policlonal anti-Plg en los extractos proteicos pulmonares por Western Blot. La presencia del Plg se hace evidente a partir de día 21 y aumenta en los días subsiguientes. En la Figura 7.2.1 podemos observar en el carril donde se encuentra la muestra de 21 días una banda reconocida por el anticuerpo anti-Plg. Esta banda se hace evidente en el día 28 post infección y es aún mayor a los 60 días, a pesar de que en este último carril se ve que la proteína está degradada.

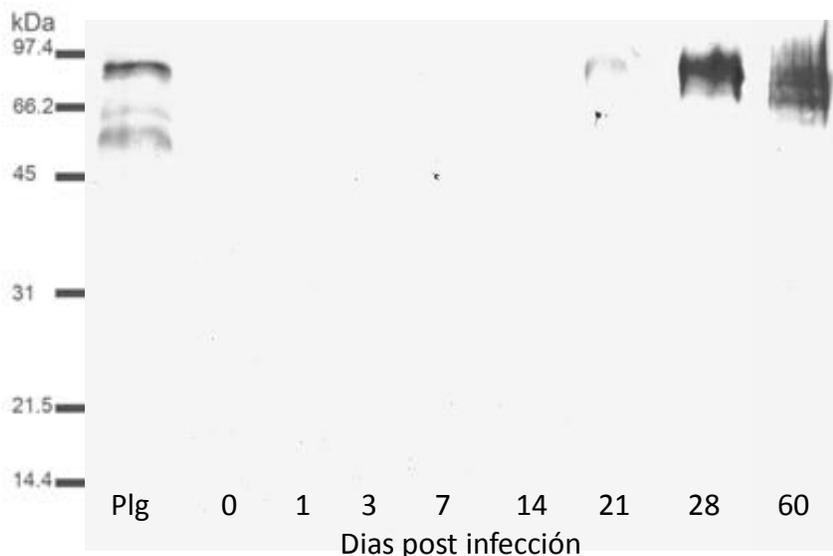


Figura 7.2.1. Detección de Plg en pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis*. Los pulmones derechos fueron homogeneizados y se determinó la cantidad de proteína total en cada muestra. 20  $\mu\text{g}$  de proteína de cada sobrenadante se separó por electroforesis. Las proteínas fueron inmobilizadas en membranas de PVDF y el Plg fue detectado por western blot mediante un anticuerpo policlonal anti-Plg. El primer carril corresponde a 1  $\mu\text{g}$  de Plg y en los carriles siguientes se encuentran las muestras de 0 a 60 días post infección.

Las mismas muestras fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-tPA. La presencia del tPA fue evidente a partir de día 14 e incrementa hasta el día 60 como se observa en la Figura 7.2.2.

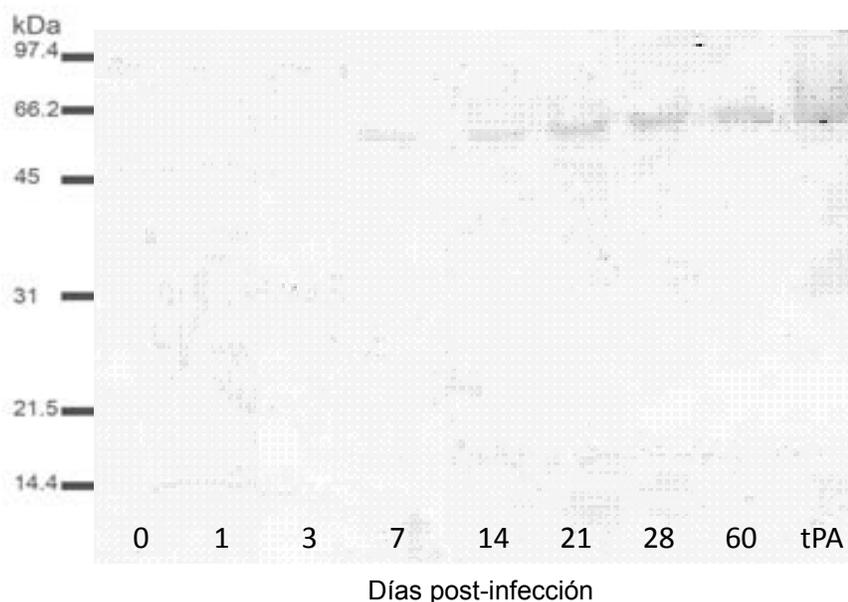


Figura 7.2.2. Detección de tPA en pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis*. Los pulmones derechos fueron homogenizados y 20  $\mu\text{g}$  de proteína de cada sobrenadante se separó por electroforesis.

Las proteínas fueron inmovilizadas en membranas de PVDF y el tPA fue detectado por western blot mediante un anticuerpo policlonal anti-Plg. En los primeros carriles se encuentran las muestras de 0 a 60 días post infección y el último carril corresponde a 1  $\mu\text{g}$  de tPA.

La presencia de Plg también fue evaluada por ELISA. Encontramos Plg desde los primeros días, sin embargo se observó un incremento estadísticamente significativo en los días 21 y 28 en comparación de los días anteriores. El aumento del Plg fue notable para el día 28, con un aumento de aproximadamente 1.7 veces en comparación con el día 21 (Figura 7.2.3). Estos datos concuerdan con los resultados del wester blot.

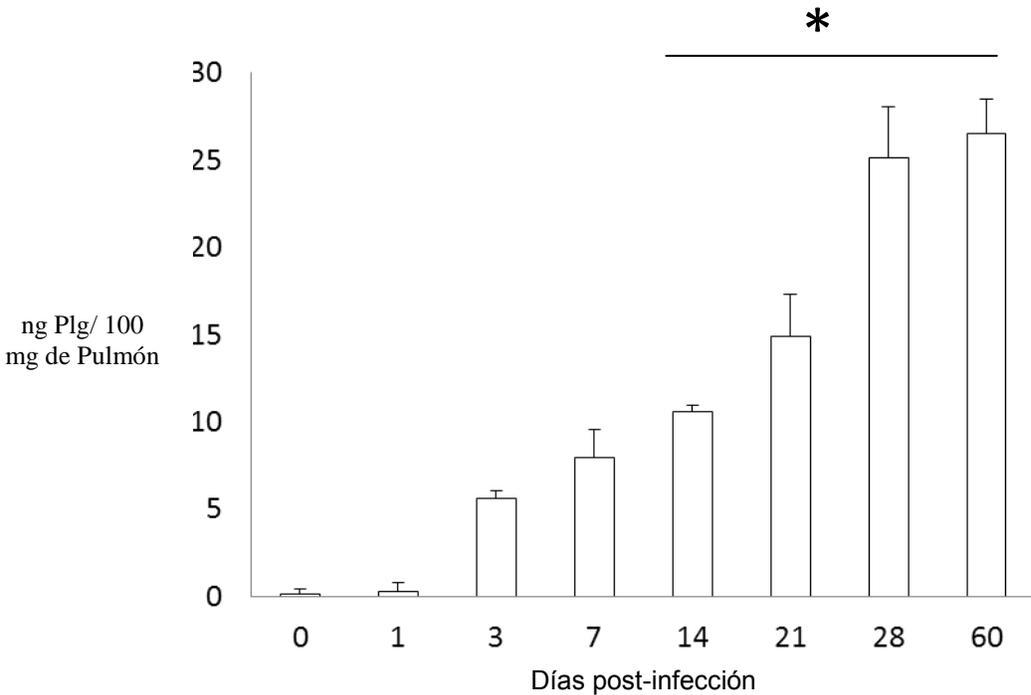


Figura 7.2.3. Detección de Plg en homogeneizados pulmones por ELISA. 10  $\mu$ g de proteína de los sobrenadantes de homogeneizados de pulmón fueron inmovilizadas en placas de ELISA. El Plg/Plm fue detectado mediante un anticuerpo policlonal. El ELISA se llevó a cabo por triplicado y los datos se presentan como la media  $\pm$  SD. Los asteriscos representan la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en comparación con los ratones no infectados.

En el caso del tPA, no encontramos la presencia de este activador en los primeros días, este resultado puede deberse a una baja concentración en estas muestras. Debido al papel que juega el sistema fibrinolítico en la homeostasis del hospedero, en condiciones normales los niveles de los activadores están fuertemente regulados. Sin embargo, se observó un aumento considerable en el nivel de proteínas a partir del día 14. El pico máximo de tPA se observó en el día 28, donde la concentración de tPA fue 12 veces mayor en comparación con la de los animales control (Figura 7.2.4).

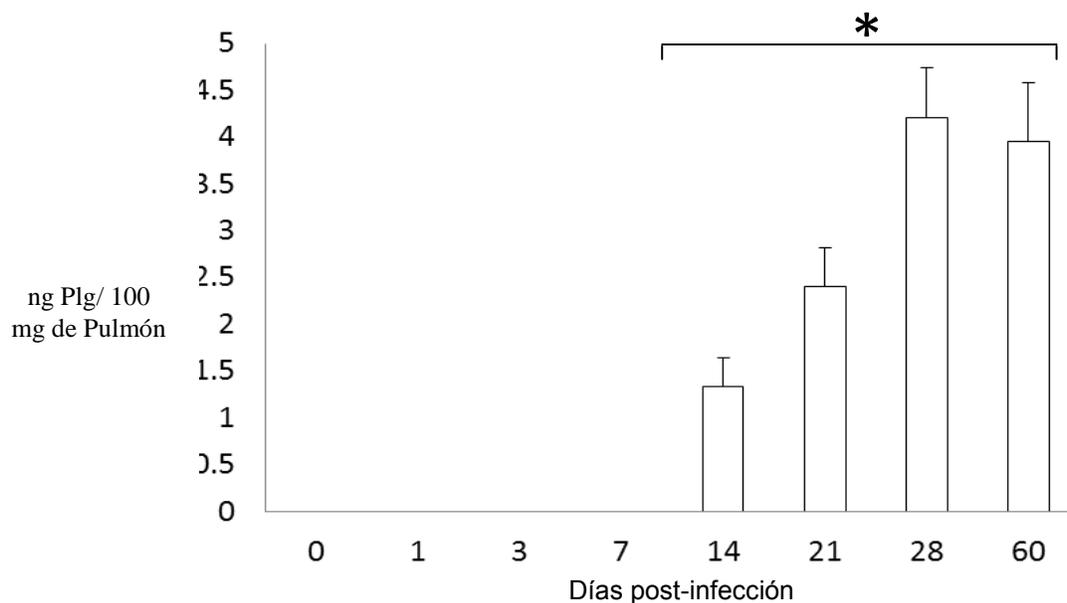


Figura 7.2.4. Detección de tPA en homogeneizados pulmones por ELISA. 10  $\mu$ g de proteína de los sobrenadantes de homogeneizados de pulmón fueron inmobilizadas en placas de ELISA. El tPA fue detectado mediante un anticuerpo policlonal. El ELISA se llevó a cabo por triplicado y los datos se presentan como la media  $\pm$  SD. Los asteriscos representan la diferencia estadística determinada por ANOVA ( $p < 0.05$ ) en comparación con los ratones no infectados.

Se midió además la actividad enzimática para Plm y tPA mediante un ensayo cromogénico. Los resultados anteriores concuerdan con los de las actividades enzimáticas encontradas, donde en los primeros días no hay un incremento significativo, sin embargo el nivel de expresión aumenta conforme la infección progresa. Ambas moléculas incrementan significativamente a partir del día 14. La actividad de ambas proteasas alcanza su punto máximo el día 28 (Figura 7.2.5). Como control positivo que utilizaron 1  $\mu$ g de Plm o tPA (en cada caso) y como control negativo se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína total de homogeneizados pulmonares de un raton sin infectar. Estos resultados son significativos, ya que indican un incremento de las moléculas del sistema fibrinolítico disponibles para ser unidos y activados por la micobacteria.

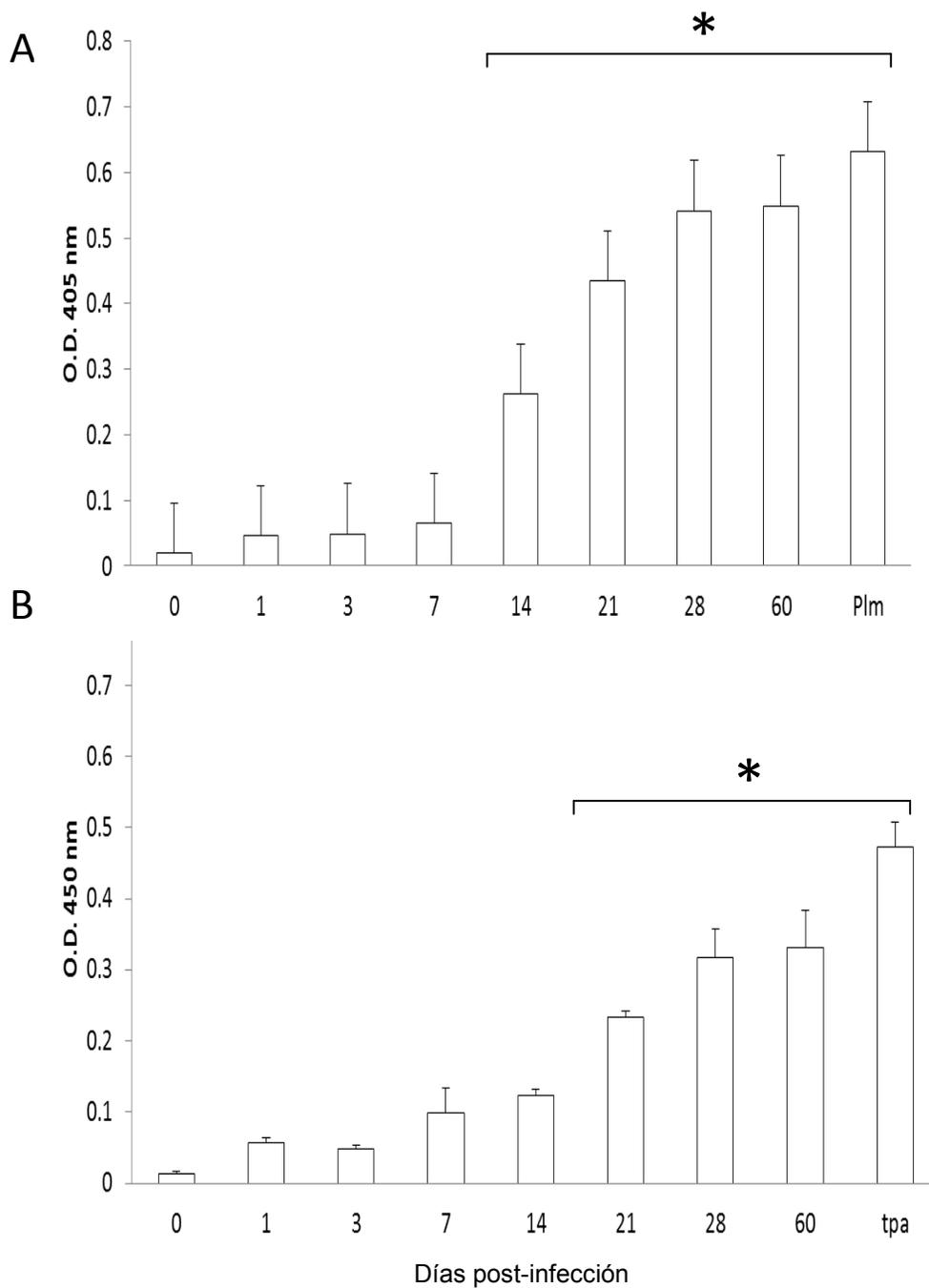


Figura 7.2.5. Actividad enzimática de Plm (A) y tPA (B), medido por los respectivos sustratos cromogénicos. 20  $\mu$ g de proteína de los sobrenadantes de homogenizados de pulmón se mezclaron con 1.5 mM de Chromozym PL ó Chromozym tPA. El ensayo se realizó por triplicado, y la actividad de la proteína se detectó mediante la medición de la OD<sub>405nm</sub>. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con los no-ratones infectados identificadas por ANOVA.

---

La presencia de Plg / Plm en los tejidos también fue confirmada por inmunohistoquímica. Los tejidos fueron sometidos además a tinción Zhiel- Nielseen para detectar a las micobacterias. Tanto en el control como en los 7 primeros días de infección los tejidos no muestran presencia de Plg. Durante los primeros días después de la infección, un leve infiltrado inflamatorio se observó en el pulmón. A partir del día 7 se observa la aparición de un infiltrado celular compuesto principalmente por macrófagos, el cual aumenta y muestra una distribución más amplia haciéndose evidente las lesiones a lo largo del tejido. Durante los primeros 7 días de infección no se encontró presencia de micobacterias en los tejidos (Figura 7.2.6). A partir del día 14 se empiezan a detectar, y su número va aumentando a medida que aumenta la infección. El Plg se detectó a partir del día 14, tiempo en el cual el tejido pulmonar mostró granulomas pequeños y se detectaron además bacilos.

En el día 21 y 28, los granulomas aumentan de tamaño (Figura 7.2.7). Dos meses después de la infección, se observa la presencia de granulomas extensos y áreas con neumonía (Figura 7.2.7.D). Interesantemente, se observó que la reactividad a Plg se limitó principalmente a los sitios donde se presentan las lesiones. La mayor reactividad encontrada mediante el anticuerpo fue observa en sitios donde encontramos además la presencia de macrófagos que contenían micobacterias. La presencia del Plg en los sitios donde se encuentra la micobacteria es importante debido a que como observamos en los estudios *in vitro*, las micobacterias son capaces de unir y activar Plg. Al estar disponible en cantidades superiores a lo normal, incrementa la posibilidad de que la micobacteria una el Plg; este sea activado y finalmente pueda usarlo en su favor.

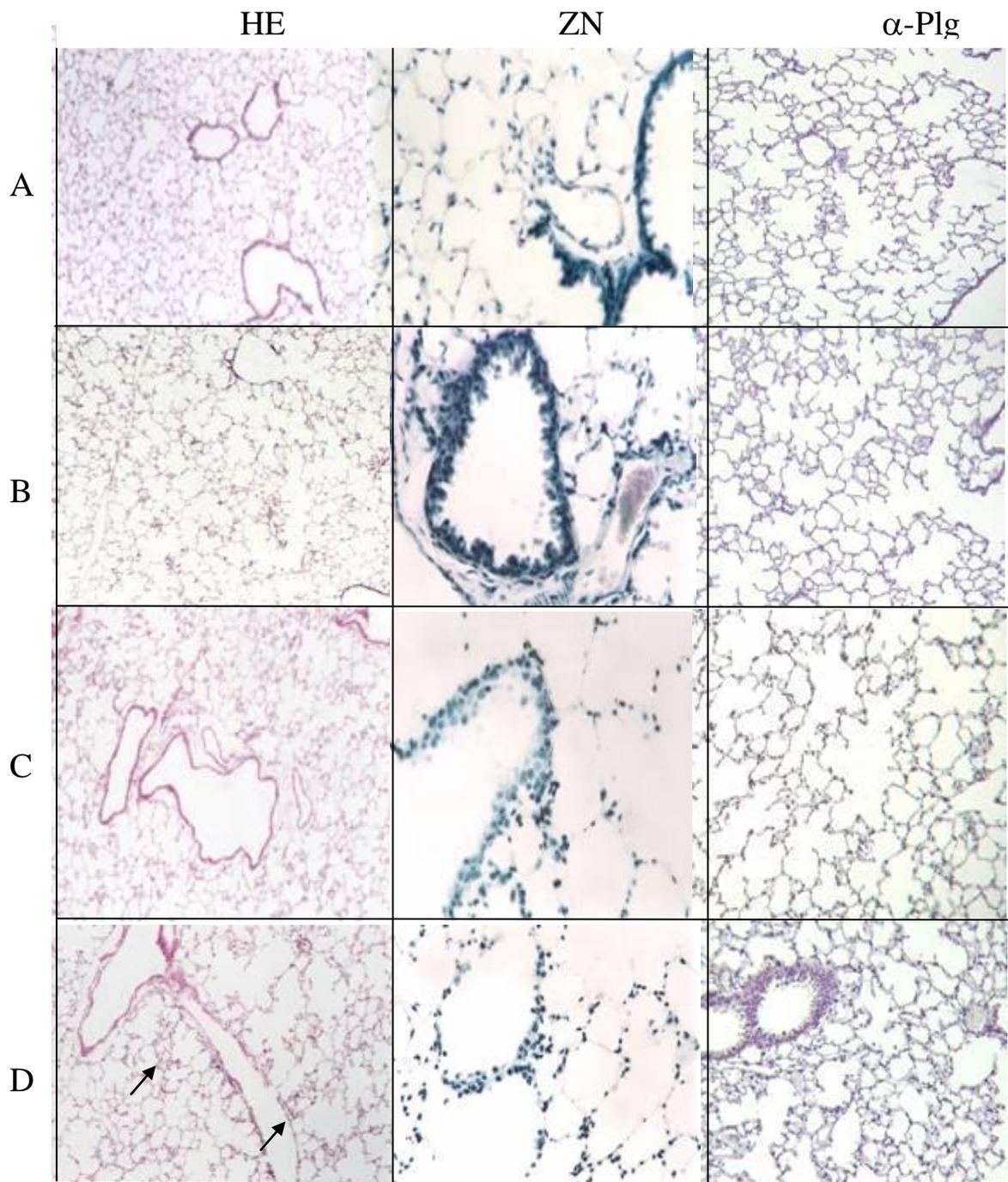


Figura 7.2.6. Características histológicas e inmunohistoquímicas en los pulmones de los ratones BALB / c no infectados (A) y a 1 (B), 3 (C) y 7 (D) días después de la infección intratraqueal con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Se muestran fotografías de tejidos teñidos con Hematoxilina- Eosina (HE), Zhiel Nielsen (ZN) ó al detectar la presencia de Plg con un anticuerpo policlonal anti-Plg ( $\alpha$ -Plg). En esta figura se muestra que unicamente a los 7 días se ven ligeras reacciones inflamatorias (flechas), y no se encuentra la presencia de bacterias ni la proteína Plg.

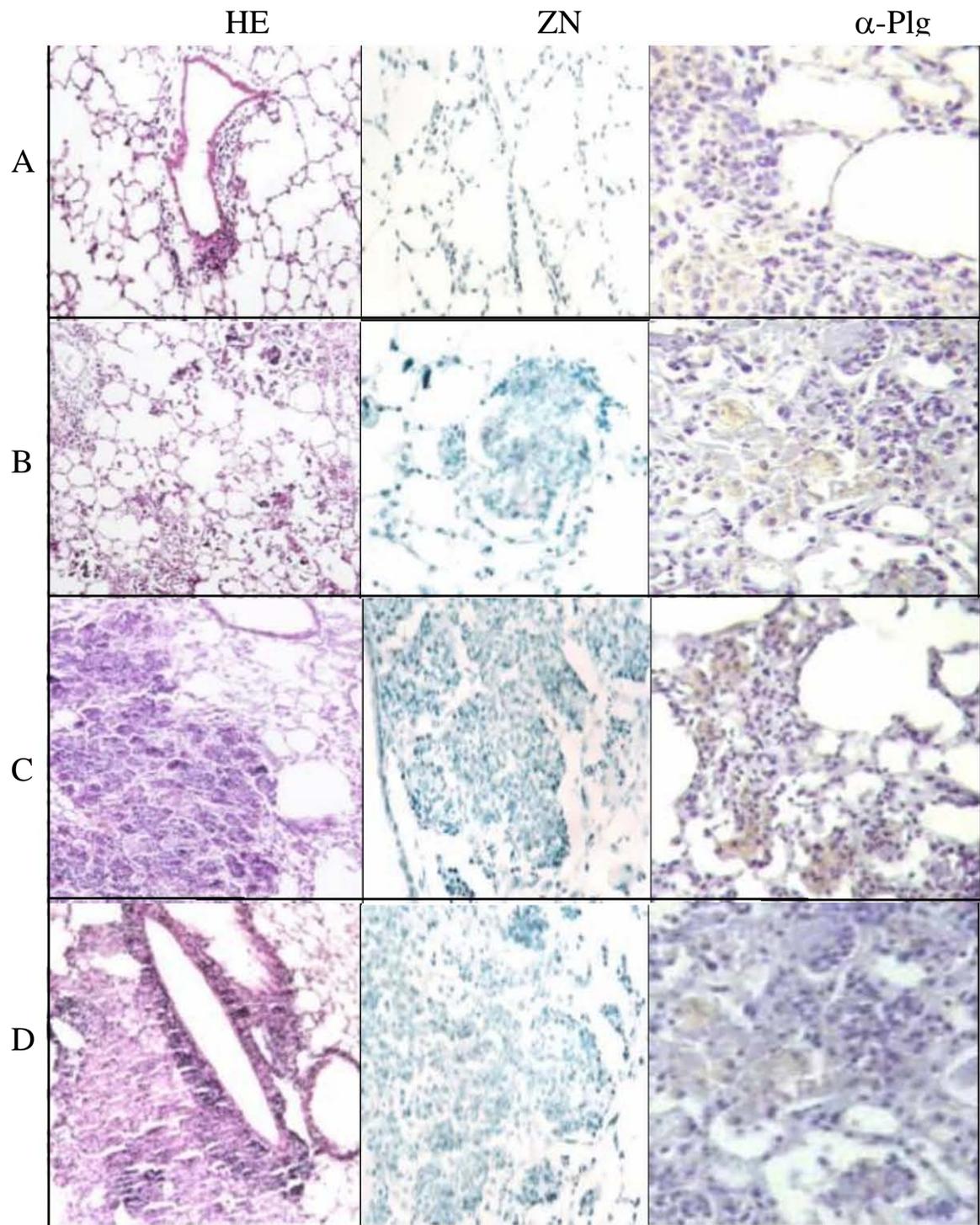


Figura 7.2.7. Características histológicas e inmunohistoquímicas en los pulmones de los ratones BALB / c a los 14 (A), 21 (B), 28 (C) y 60 (D) días después de la infección intratraqueal con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Se muestran fotografías de tejidos teñidos con Hematoxilina- Eosina (HE), Zhiel Nielsen (ZN) ó al detectar la presencia de Plg con un anticuerpo policlonal anti-Plg ( $\alpha$ -Plg)

Finalmente, se tomaron campos al azar y se determinó el porcentaje de células positivas, el cual aumentó en el día 14. El número máximo se alcanzó después de los 28 días (Figura 7.2.8.E). Las áreas con neumonía y numerosas células inflamatorias (Figura 7.2.8.A), mostraron una fuerte inmunotinción contra Plg al día 60 (Figura 7.2.8.B). Curiosamente, la marca del Plg se encuentra principalmente en los macrófagos espumosos asociados con los bacilos ácido-alcohol resistentes (Figura 7.2.8D). Estos resultados indican una localización similar de la proteína Plg con las micobacterias. Se necesitarán más estudios para realizar la colocalización de las micobacterias con las proteínas del sistema fibrinolítico.

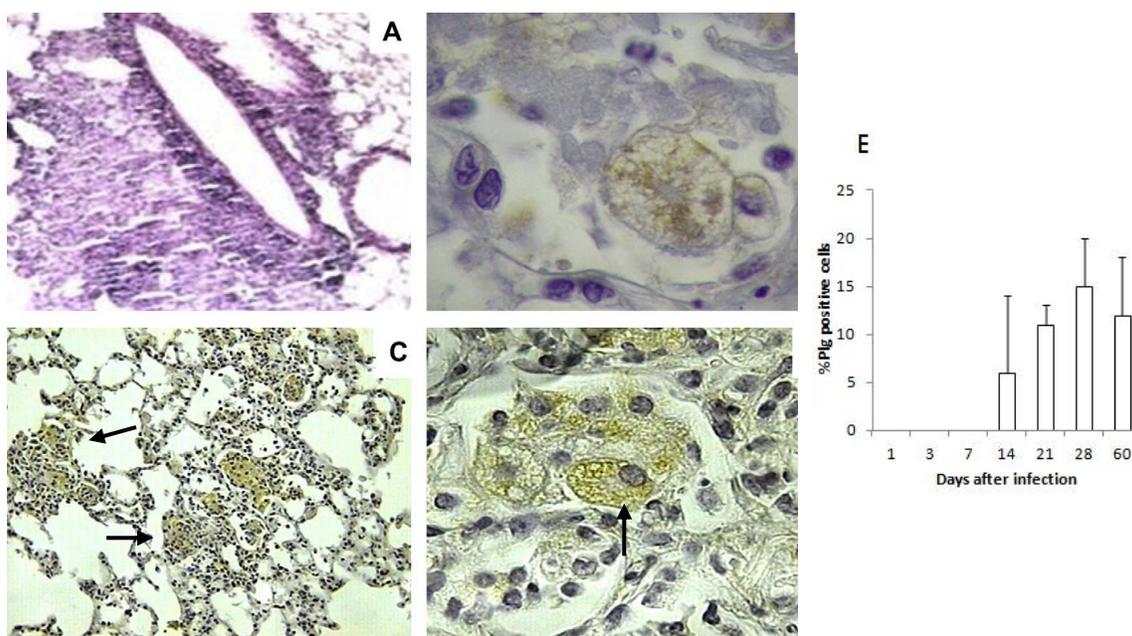


Figura 7.2.8. Representación de las características histológicas e inmunohistoquímicas de los pulmones de los ratones Balb / c, 60 días después de la infección intratraqueal con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv. (A) Extensas áreas con neumonía (10X). (B) Macrófagos vacuolados con bacilos (200X). (C) Células inflamatorias en las zonas neumónicas muestran fuerte inmunotinción (10X, flecha). (D) Macrófagos vacuolados con una fuerte inmunotinción Plg específica (100X). Se contaron las células positivas de campos aleatorios de cada lóbulo pulmonar y los datos se expresan como el porcentaje de células positivas (E) La cuantificación de células fue realizada a un aumento de 200X.

También se midió la expresión de mRNA para Plg, uPA y tPA. Se encontró que el RNAm de Plg y tPA aumentó a partir del día 21, siendo además el pico de expresión máxima para tPA (Figura 7.2.9.A). En contraste, el Plg alcanzó la máxima expresión en el día 60 (Figura 7.2.9.B). La expresión de mRNA de uPA se inició el día 14 y alcanzó el nivel más alto en el día 60 (Figura 7.2.9.C). Es importante hacer notar que en todos los casos, el nivel de mRNA de los activadores, aumentó de acuerdo con la gravedad de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos anteriormente, mediante ELISA y Western Blot.

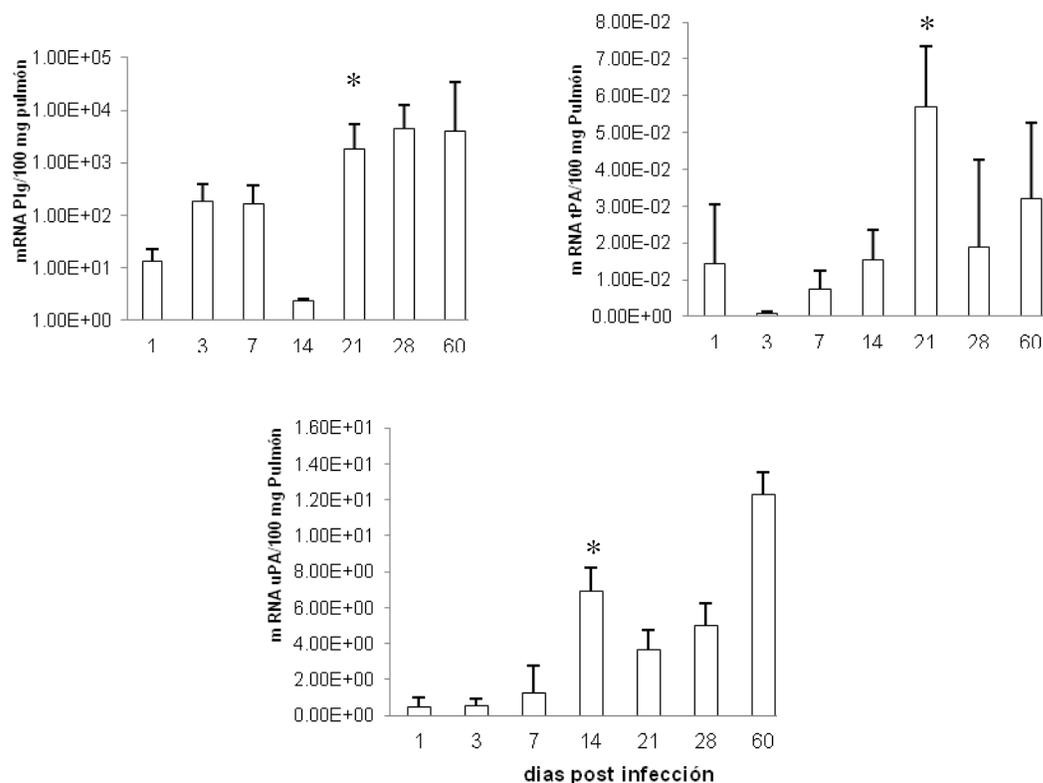


Figura 7.2.9. Expresión del Plg (A), tPA (B) y uPA (C) en pulmones de ratones infectados determinada por RT-PCR en tiempo real. Ratones BALB/c fueron infectados con *M. tuberculosis* y los pulmones de tres diferentes animales de cada tiempo fueron usados para extraer el RNA. El número de copias de RNAm de cada gen se normalizó para el RNAm que codifica al gen GAPDH. El RNAm del tejido no infectado se utilizó como control para todos los experimentos en nuestro modelo. La expresión se midió por triplicado, y se muestra la media de estos experimentos  $\pm$  SD. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

### 7.3. Expresión e identificación de activadores de Plg en respuesta a micobacterias.

Para comprobar que la Plm encontrada en los experimentos anteriores, podría ser generada en respuesta a la micobacterias, las células del bazo totales procedentes de ratones inmunizados con BCG fueron estimulados con proteínas del filtrado de cultivo (CF) de *M. tuberculosis*. La actividad de Plm en los sobrenadantes de las células totales del bazo se determinó en un ensayo cromogénico. Se adicionó Plg a los sobrenadantes de cultivo y se encontró la presencia de activadores de Plg (Figura 7.3.1) en los sobrenadantes de las células de los animales inmunizados en donde, además, aumentó significativamente la actividad de Plm, en contraste con los sobrenadantes provenientes de los animales no inmunizados. Estos resultados mostraron claramente la presencia de un activador que induce la conversión de Plg a Plm. El resultado de este experimento concuerda con el incremento en la formación de plasmina encontrada en ratones infectados con *M. tuberculosis*, lo que indica que el incremento en los activadores y el aumento en la concentración de Plg, podría deberse a la presencia de la micobacteria.

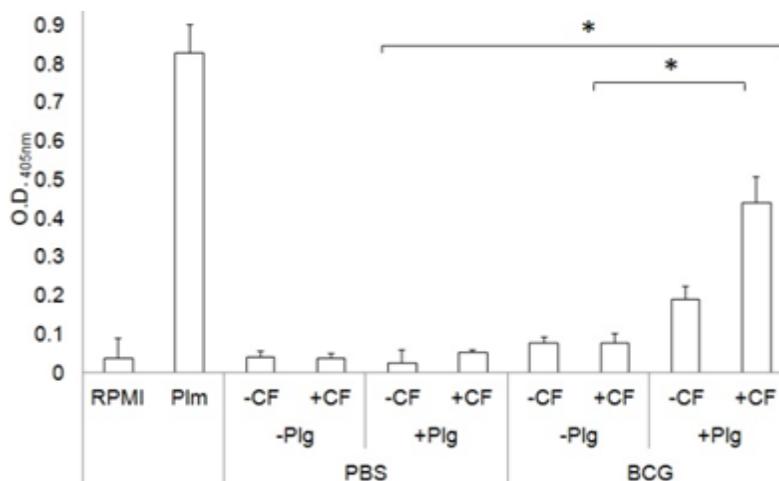


Figura 7.3.1. Producción de Plm inducida después de la inmunización con BCG. Se midió la actividad de Plm en los sobrenadantes de células totales de bazo de ratones pre-inmunizados con BCG o PBS, los cuales fueron estimulados o no con proteínas del Filtrado de Cultivo (CF) de *M. tb*. El experimento fue realizado 3 veces y los asteriscos representan significancia estadística ( $p < 0.05$ )

A continuación se detectaron los activadores de Plg en los extractos de las células de bazo. Los activadores de Plg fueron detectados con anticuerpos policlonales. Ambas pruebas ELISA Y Western blot mostraron resultados positivos con los anticuerpos para uPA y tPA. Sin embargo, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en extractos de células estimuladas con el Filtrado de cultivo (CF) de *M. tuberculosis*. Además, se detectó una banda positiva de 28 kDa con el anticuerpo anti-uPA, y una banda de 70 kDa con el anticuerpo tPA que corresponden a los pesos moleculares de ambas proteínas (Figura 7.3.2.). Esto indica la presencia de proteínas del sistema fibrinolítico en respuesta a los antígenos micobacterianos, lo que permite suponer que podrían producirse también durante la enfermedad tuberculosa.

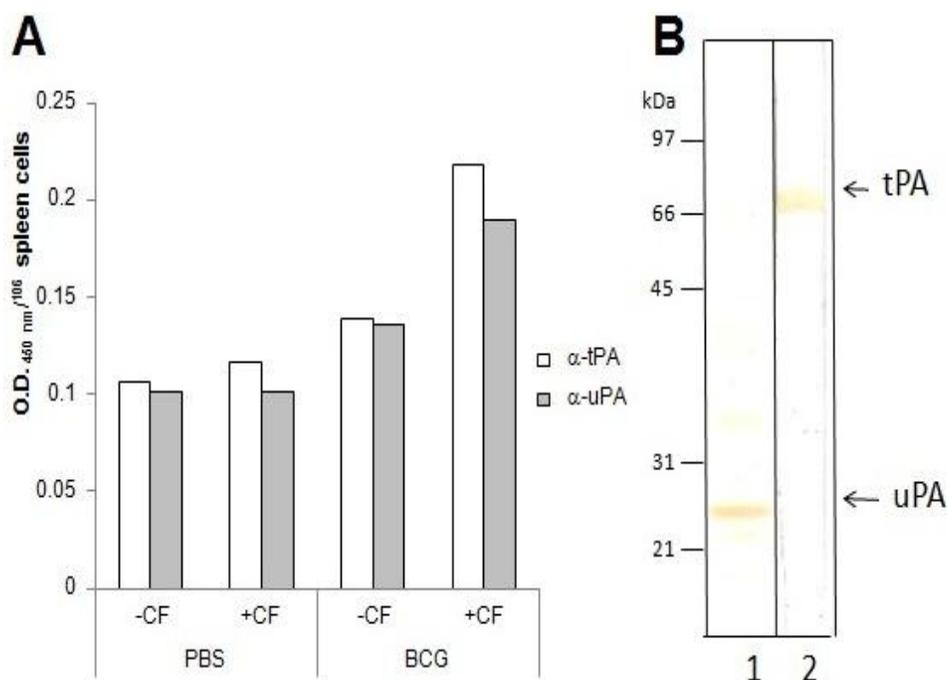


Figura 7.3.2. Detección de tPA y uPA por ELISA (A) y Western blot (B) en células de bazo. Se midió la presencia de estas proteínas en los sobrenadantes de células totales de bazo de ratones pre-inmunizados con BCG o PBS obtenidas después de la estimulación con proteínas de Filtrado de Cultivo (CF) ó en ausencia del CF (CF-). Los ensayos fueron realizados con anticuerpos policlonales. El ELISA fue llevado a cabo por triplicado y se presenta la media  $\pm$  SDE. El western blot fue llevado a cabo con proteínas de células de bazo y los activadores uPA (línea 1) y tPA (línea 2) fueron detectados con los anticuerpos correspondientes.

Finalmente, las células de bazo de ratones sensibilizados con BCG y el control, se utilizaron para medir la expresión de mRNA-uPA y mRNA-tPA por PCR cuantitativo. Se obtuvieron las células totales de bazo de los ratones y se aisló el RNAm. Se observó un aumento en la producción de mRNA para ambos activadores cuando las células fueron estimuladas con las proteínas de la micobacteria tal como se describe en materiales y métodos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación de las células que fueron pre-inmunizadas con PBS (Figura 7.3.3.). Este resultado es consistente con el experimento anterior, lo que indica que ambos activadores (tPA y uPA) fueron encontrados únicamente en presencia de proteínas del filtrado de cultivo de la micobacteria (CF)

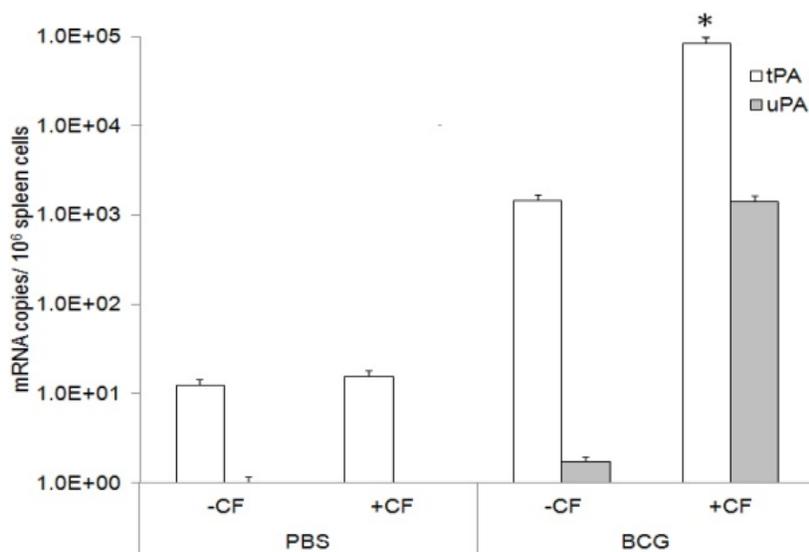


Figura 7.3.3. Expresión genética de tPA (A) y uPA (B) determinados por RT-PCR cuantitativo en células de bazo de ratones inmunizados con BCG o PBS. Las células fueron estimuladas con filtrados de cultivo (CF) de *M. tuberculosis* o con PBS como control negativo. Se obtuvieron las células totales de bazo de 6 ratones para aislar el RNA. Se realizó la transcripción inversa utilizando 5 µg de RNA. El número de copias de RNAm de cada gen se normalizó para el RNAm que codifica al gen GAPDH. El RNAm del tejido no infectado se utilizó como control para todos los experimentos en nuestro modelo. La expresión se midió por triplicado, y se muestra la media de estos experimentos ± SD

#### **7.4. Participación del Plg en la diseminación de las micobacterias.**

Adicionalmente, la participación del sistema fibrinolítico en la invasión fue evaluada en animales infectados en la base de la cola con BCG, BCG cubierta de Plg o BCG cubierta con un inhibidor de la unión de Plg llamado EACA. Ratones BALB/c fueron infectados vía subcutánea en la base de la cola con BCG. Se realizaron sacrificios a las 3, 6, 12, y 24 h post infección. Al determinar el número de unidades formadoras de colonias en pulmón, encontramos que existe una diferencia significativa en la capacidad de las bacterias cubiertas con Plg para migrar al pulmón con respecto a los otros grupos. Además, encontramos interesante que al inhibir la unión de Plg con EACA, las bacterias no fueron capaces de alcanzar el pulmón (Figura 7.4.1).

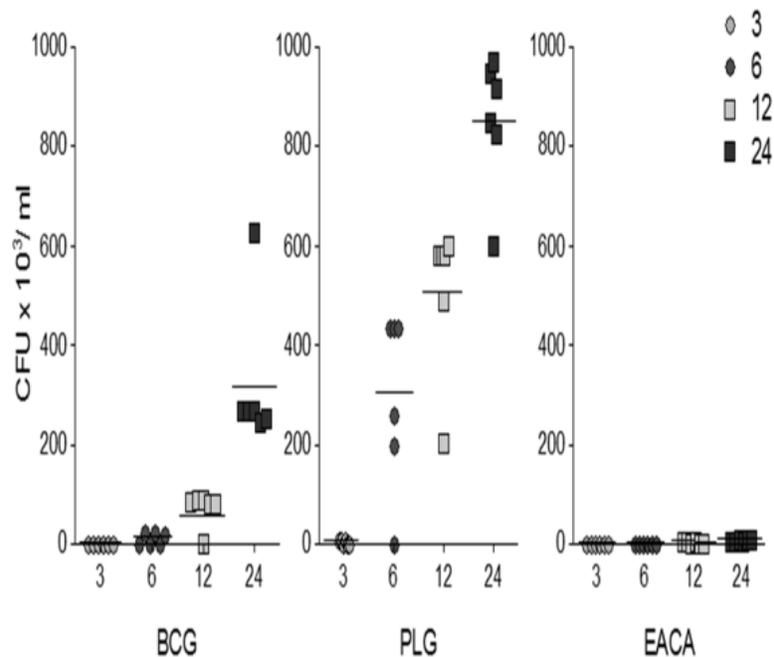


Figura 7.4.1. Unidades formadoras de colonias (CFU) obtenidas de pulmones infectados con BCG a diferentes h después de la infección. Ratones BALB/c fueron inoculados con *M.bovis* BCG (BCG) en presencia o no de Plg o del análogo de lisina EACA. El experimento se realizó de forma independiente en seis ocasiones, y el significado se evaluó mediante la prueba de ANOVA. \*, P <0,001.

En el análisis histológico encontramos que los pulmones de ratones infectados con las bacterias cubiertas con Plg inducen un infiltrado inflamatorio desde las 6 h post infección. Esta respuesta inflamatoria se dio en coexistencia de pequeños parches de alveolitis después de 24 h post infección. En estas aéreas, encontramos macrófagos activados con presencia de bacilos ácidos alcohales resistentes intracelulares. En contraste, no encontramos anomalías histológicas en los otros grupos (Figura 7.4.2.)

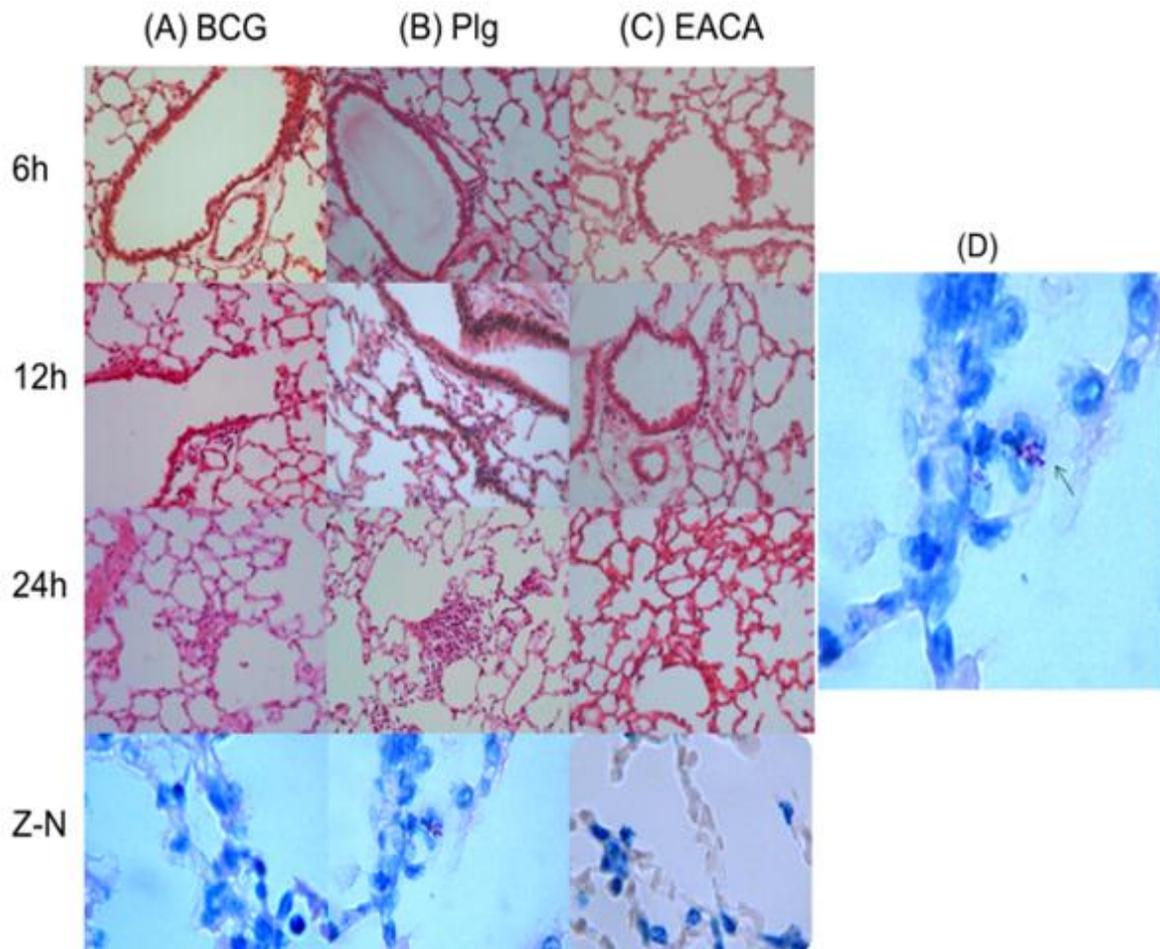


Figura 7.4.2. Representación de las características histológicas en los pulmones de ratones BALB /c después de la infección con BCG. (A) ligera inflamación perivascular (flecha) en el pulmón de ratones infectados con BCG. (B) Se encontró un ligero parche de alveolitis en los ratones infectados con BCG recubierta con Plg. (C) No hay alteraciones histológicas en ratones infectados con BCG más EACA. (D) Presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes solo en los ratones infectados con BCG recubierta con Plg.

---

## 8. *Discusión*

---

En respuesta a una infección microbiana, se activa una respuesta transcripcional pro-inflamatoria que desencadena el reclutamiento de células fagocíticas y otros componentes de la respuesta inmune en el sitio de infección, en donde se genera una respuesta vigorosa vascular, que conduce a una trombosis vascular local. Esto sirve para blindar el sitio de la infección, atrapar a los patógenos y a su vez, actuar como una barrera para prevenir la invasión bacteriana y la propagación sistémica (Bhattacharya et al., 2012).

Existen múltiples factores bacterianos que provocan la inflamación. Por una parte, el hospedero utiliza todos los recursos necesarios para restringir el crecimiento de los microorganismos, mientras el patógeno exhibe todo lo que necesita para replicarse y sobrevivir. Como resultado de esta interacción se inducen factores tisulares que generan una inflamación sistémica y la activación de la coagulación. Las citocinas pro-inflamatorias juegan un papel central en este proceso ya que pueden inducir la producción de mediadores en las células endoteliales. La inflamación generada se caracteriza por la deposición de fibrina intravascular, lo que incrementa los niveles circulantes de ciertas proteasas para restablecer la homeostasis del organismo (Baxt et al., 2013).

---

Durante una infección, el endotelio puede activarse por patógenos ó indirectamente vía mediadores inflamatorios, lo que puede inducir una alteración del sistema fibrinolítico (Keller et al., 2003). La coagulación induce la expresión de algunas proteasas que además interactúan con receptores celulares específicos para inducir vías de señalización. En particular, las interacciones con estas proteasas afectan el proceso inflamatorio. En modelos experimentales de infección severa, la fibrinólisis se activa mediante el complejo fibrinolítico, seguido por la liberación en la sangre del inhibidor PAI-1. Este último inhibe fuertemente la fibrinólisis generando un estado procoagulante. Esta activación es mediada por las citoquinas de las células endoteliales vasculares que liberan  $TNF\alpha$  e IL-1. El  $TNF\alpha$  estimula la producción de PAI-1 en el hígado, el riñón, el pulmón y las glándulas suprarrenales de los ratones (Levi et al., 2003).

Los procesos anteriormente descritos se dan como resultado de la inflamación, y son parte esencial de la respuesta de defensa del organismo. Sin embargo, las bacterias patógenas, han desarrollado una variedad de estrategias para eludir las líneas de defensa del hospedero y ganar acceso al tejido circundante. Las bacterias interactúan con el sistema fibrinolítico mediante la secreción de activadores (PAs) y receptores (PIgRs) que expresan en su superficie. El interactuar con este sistema les da la habilidad de degradar barreras tisulares, lo que aumenta la invasividad de la bacteria (Sanderson-Smith et al, 2012; Parry y Zhang, 2000).

---

En este trabajo, encontramos que *M. tb* es capaz de unir y activar el Plg en su superficie. Se utilizaron dos micobacterias (*M. bovis BCG* y *M. smegmatis*) y se encontró que ambas fueron capaces de inmovilizar Plg en su superficie. Además encontramos que la micobacteria fue capaz de activar al Plg unido a su superficie, lo que indica la presencia de un activador micobacteriano. Además, el efecto de este activador fue sinérgico, ya que la activación del Plg por tPA fue mayor en presencia de la bacteria.

Este es un hallazgo importante, ya que hay pocas bacterias capaces de activar el Plg a Plm por sí mismas. Tal como otras bacterias (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Yersina*) las micobacterias han desarrollado un mecanismo eficaz, para eludir la defensa del huésped mediante la producción de un activador de Plg y/o proteínas de unión para disolver la trombosis local (Sun, 2006) Actualmente, se está caracterizando la molécula que es capaz de activar el Plg en las micobacterias.

La formación de Plm activa en la superficie bacteriana puede ser utilizada a diferentes niveles, por una parte facilita la degradación de la capa de fibrina depositada por el hospedero alrededor del sitio de la infección local facilitando de este modo la difusión bacteriana en los tejidos más profundos. Además, se ha visto que la interacción de las bacterias con el Plg, es importante para la supervivencia bacteriana en el hospedero, ya que al parecer juega un papel importante en la evasión del sistema inmune y en la colonización del hospedero.

---

La Plm confiere la capacidad a las bacterias de degradar inmunoglobulinas y proteínas de la cascada del complemento, inhibiendo así la respuesta inmune del hospedero además de participar en el reclutamiento de células del sistema inmune a los sitios de infección (Sanderson-Smith et al, 2012). Así la Plm en la superficie celular bacteriana por lo tanto, proporciona organismos la capacidad para de inhibir de este modo la respuesta inmune del huésped.

Específicamente, la activación de Plg por estafiloquinasa, un activador bacteriano resulta en la degradación de C3b, evitando de este modo la fagocitosis (Rooijackers et al., 2005). De la misma manera, el activador uPA impide la deposición de IgG y C3b en la superficie bacteriana de *Bacillus anthracis* (Vieira et al., 2011) y conduce a una disminución posterior en la fagocitosis de macrófagos (Chung et al., 2011). El complemento es un sistema de defensa contra los intrusos microbianos, actúa como un sensor de patógenos, pero también reconoce las células huésped enfermas o dañadas y que colabora estrechamente con otros sistemas de defensa inmune y para eliminar el peligro potencial. Sin embargo, insuficiente, excesiva o mal controlada la activación del complemento puede inclinar la balanza entre la salud y la enfermedad y conducir a la auto-ataque de las células huésped (Ricklin y Lambris, 2013).

Por otra parte, se ha visto que la interacción de la bacteria con Plg es importante para la colonización, ya que les permite interactuar con integrinas, lo que puede influenciar el proceso patogénico de muchas especies bacterianas (Law et al., 2012). La mayoría de los PlgRs bacterianos identificados y caracterizados, son proteínas multifuncionales que

---

participan en funciones importantes como la adhesión, la actividad enzimática, el movimiento, la interacción con el sistema inmune y la miogénesis, e incluso inhibiendo la fagocitosis (Bhattacharya et al., 2012). Además diversos patógenos se han adaptado para utilizar las proteínas de la MEC como potenciadores de adhesión a los tejidos del huésped ó bien degradan los componentes de misma, “secuestrando” proteasas del hospedero generadas durante la respuesta inflamatoria (Vanlaere y Libert, 2009).

Los factores que regulan el curso y desarrollo de la infección por *M. tb* son multifacéticos e involucran una compleja interacción entre el sistema inmune del hospedero y las estrategias de supervivencia empleadas por los bacilos. La TB es una enfermedad pulmonar donde se afecta el tejido del pulmón (cavitación, fibrosis, necrosis, licuefacción, etc.) lo cual facilita además la transmisión de la enfermedad a personas sanas, ya que el material caseoso se puede descargar dentro de los vasos sanguíneos circundantes y las vías respiratorias, facilitando de ese modo la diseminación a través de la tos (Schoeman et al., 2007).

*M. tb* ha evolucionado moléculas que le permiten explotar las respuestas protectoras y dañar el tejido del huésped. Un ejemplo de esto es, la necrosis por licuefacción que se presenta como consecuencia de una exagerada respuesta Th2 que puede llevar a necrosis en casos graves de TB pulmonar. Este microambiente, constituye un medio ideal para las micobacterias, ya que mientras ellas pueden multiplicarse extracelularmente, los macrófagos que podrían eliminarlas, son incapaces de sobrevivir en el tejido necrótico (Dannenburg y Rook, 1994).

---

La TB, se caracteriza por la formación de un granuloma que intenta contener la infección. Sin embargo, las bacterias pueden inducir la producción ó acción de enzimas proteolíticas que comprometen la integridad del granuloma, lo cual se genera debido a una proteólisis desregulada, por medio de toxicidad directa de las micobacterias, y por la producción de citocinas por parte del hospedero. Las citocinas como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 pueden generar un incremento en la producción de algunas proteasas (Gyetko et al., 1993) generando necrosis en la parte central del granuloma (Dheda et al., 2005, North y Jung, 2004). El granuloma se caracteriza por un número relativamente pequeño de los fagocitos infectados, rodeado de linfocitos de monocitos / macrófagos activados (Dietrich y Doherty, 2009, Ra y Parks, 2007). Los macrófagos y otros tipos de células, tales como fibroblastos, las células endoteliales y los neutrófilos, también pueden activar cascadas de proteasas como: metaloproteinasas, proteinasas lisosomales (catepsinas), y el sistema fibrinolítico (Munger y Chapman, 2004).

A pesar de que estas cascadas están fuertemente reguladas se ha encontrado que la micobacteria puede interaccionar con todos estos sistemas, interfiriendo con su expresión (Mauviel, 1993). En el caso del sistema fibrinolítico se ha encontrado una relación directa entre la enfermedad y la producción al menos del activador uPA y de su receptor uPAR. Anteriormente se ha reportado un incremento en ambas moléculas, lo que sugiere que los componentes del sistema fibrinolítico podrían estar disponibles para la micobacteria.

---

Por otra parte, las micobacterias expresan receptores de Plg en su superficie celular, entre estas proteínas se encuentran, la  $\alpha$ -enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), DnaK, y el factor de elongación Tu (EFTu) (Xolalpa et al., 2012). Estas enzimas identificadas como PlgR en micobacterias pertenecen al grupo de enzimas housekeeping, que son omnipresentes en casi todos los seres vivos para realizar funciones metabólicas esenciales para el propósito de la supervivencia. En el caso de algunos patógenos, estas enzimas además juegan un papel importante en la virulencia (Pancholi y Chhatwal, 2003; Sanderson-Smith et al., 2012). Sin embargo, se conoce poco acerca del significado biológico de esta interacción con la infección por *M. tb*.

El principal objetivo de este trabajo, fue analizar la expresión de las moléculas del sistema fibrinolítico en un modelo de TB progresivo en ratones. En este modelo, se pueden detectar dos fases. En la etapa inicial, se presenta una fase aguada caracterizada por una infiltración inflamatoria en el intersticio capilar alveolar, vasos sanguíneos y paredes celulares. Durante este periodo se da la formación de granulomas, un incremento de IL-2 y un incremento gradual de INF- $\gamma$ . A partir del día 28, empieza la fase crónica o avanzada caracterizada por neumonía, necrosis focal y fibrosis. Durante este periodo hay un aumento en la producción de IL-4. En este trabajo, encontramos la mayor expresión de algunas de las moléculas del sistema fibrinolítico durante esta segunda fase.

---

En el modelo utilizado se generan altos niveles de  $\text{INF-}\gamma$  en la primera fase de la infección, sin embargo en la fase crónica, se da un aumento de IL-4 que se caracteriza por fibrosis progresiva y necrosis (Hernández-Pando et al., 1996). En esa fase,  $\text{TGF-}\beta$  y  $\text{TNF-}\alpha$ , desempeñan un papel clave en la formación de la pared fibrosa que encapsula el granuloma. (Dheda et al., 2005) El  $\text{TNF-}\alpha$  es crucial para la defensa del huésped, y le da integridad del granuloma (Lukacs et al, 1994), junto con el factor de crecimiento transformante  $\text{TGF-}\beta$  (Aung et al., 2000). Sin embargo, la respuesta de Th2 puede exacerbar el daño tisular (Hernández-Pando et al., 1994). Las proteasas pueden degradar componentes afectando la integridad del granuloma (Chapman, 1991).

Durante este proceso se da además, infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación, lo que producen especies reactivas de oxígeno, citocinas proinflamatorias, y proteasas, promoviendo así la progresión de la enfermedad y la lesión tisular (Nourshargh, 2010; Weber y Noels, 2011). En este sentido, el uPA esta críticamente involucrado en el proceso de reclutamiento de leucocitos (Reichel et al., 2012). La activación de Plg a Plm mediada por uPA unida a células favorece la liberación de mediadores pro-inflamatorios, como IL-1B; además de activar MMP, lo que amplifica la reacción inflamatoria aguda (Mondino y Blasi, 2004). Se ha reportado un aumento en la expresión de MMP-1, MMP-7 y el uPA en respuesta a la expresión de  $\text{TNF-}\alpha$  (Elkington y Friedland, 2005, Teles et al., 2010), por lo que la infección puede inducir diferentes cascadas en búsqueda de la erradicación exitosa de la infección por el hospedero (Chang et al., 2009).

---

El Lipoarabinomanan (LAM), un importante componente micobacteriano de la pared celular antigénica, aumenta la expresión de MMP-1 y MMP-9 en la línea THP-1 y en pacientes con TB pulmonar activa. También se ha visto un aumento en los niveles de MMP-2 y MMP-9 en los tejidos infectados en respuesta a la infección (Hrabec et al., 2002). Este hallazgo es importante ya que las MMP pueden activar al sistema fibrinolítico. La MMP-3 es capaz de hidrolizar uPA y al mismo tiempo  $\alpha$ 2-AP y PAI-1; desempeñando un papel en la regulación de la fibrinólisis (Lijnen, 2002). La degradación de compuestos de la MEC puede tener un impacto en el proceso inflamatorio, ya que los péptidos derivados de la fibronectina son quimiotácticas para monocitos humanos (Norris et al., 1982) y contribuyen a la producción de MMP (Yasuda y Poole, 2002).

Durante la fase crónica de la infección además se da la acumulación de macrófagos espumosos, que son las células que muestran una fuerte acumulación de Plg el día 60 de la infección. Curiosamente, los estudios sobre estos macrófagos han demostrado que los cuerpos lipídicos están presentes en los macrófagos en el comienzo de la infección y se acumulan en la fase crónica. La acumulación de cuerpos lipídicos en este caso se define por su capacidad progresiva para generar cristales de colesterol, una característica en procesos inflamatorios crónicos. En este proceso inflamatorio se activa la expresión de citoquinas en los macrófagos humanos, incluyendo el TNF- $\alpha$  e IL-6. La activación de estas moléculas depende de la actividad proteolítica de la Plm, que escinde la subunidad A2 de la anexina A2 (Gan y Lee, 2008). Además, uPA estimula la biosíntesis del colesterol en los macrófagos, lo que contribuye a la progresión.

---

Tomando estas observaciones en conjunto, puede ser hipotetizado que el sistema fibrinolítico puede desempeñar un papel fundamental en la respuesta inflamatoria crónica observada en la TB. En un trabajo reciente se estudió la expresión de diversas moléculas que podrían estar involucradas en este proceso. Es interesante el hallazgo de un inhibidor de proteasas de serina (PI-9) en macrófagos alveolares humanos infectados (AMS) por *M. tb*. Esta molécula participa en la inducción de la apoptosis y en la supervivencia de la bacteria dentro de los macrófagos. La micobacteria puede manipular la expresión de este inhibidor con el fin de mantener su nicho intracelular. Estos hallazgos sugieren que, en combinación con sus otros efectos como la inhibición de la inflamación y la resistencia a la citotoxicidad, la inducción de la PI-9 dentro de los fagocitos del huésped puede desempeñar un papel multidimensional en la patogénesis de la infección por *M. tb* (Toossi et al., 2012).

De acuerdo con nuestros resultados en el presente trabajo, *M. tb* induce altos niveles de expresión de Plg / Plm, uPA y tPA en los pulmones de los animales infectados y la expresión de las dos últimas moléculas podría ser inducida específicamente por los antígenos de las micobacterias. Esta observación se demostró indirectamente por estudios *in vitro* ya que los esplenocitos derivados de los animales sensibilizados con BCG produjeron específicamente ambas moléculas en respuesta a antígenos micobacterianos. En conjunto, estos datos sugieren que la micobacteria sesga la respuesta inmune hacia la destrucción del tejido favoreciendo su diseminación (Elkington et al., 2005<sup>a</sup>, Elkington et al., 2005<sup>c</sup>)

---

El incremento de la expresión de estos factores durante la infección experimental puede ser multifactorial, sin embargo, es importante establecer el papel que juega la micobacteria durante la infección. Además se ha encontrado que el Plg puede ser expresado en riñón, cerebro, testículos, corazón, pulmón, útero, bazo, timo y el intestino (Zhang et al., 2002). Al ser una molécula ampliamente distribuida, los componentes del sistema fibrinolítico pueden estar altamente disponibles, lo cual propicia que puedan ser utilizados por la micobacteria para degradar los tejidos, favorecer su diseminación y modular la respuesta inmune u otros mecanismos que favorezcan su permanencia.

Tal como otras bacterias, la micobacteria podría utilizar la Plm para la degradación directa o indirecta de la MEC, y para facilitar la migración a través de los tejidos del hospedero (Herren et al., 2011). En este trabajo, hemos encontrado un incremento en la concentración de Plg, Plm, uPA y tPA durante la infección por *M. tb*, coincidiendo con cambios inflamatorios en el pulmón y con daño tisular. En su conjunto estas observaciones indican que el sistema fibrinolítico podría desempeñar un papel integral en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, cómo y dónde el Plm unido a la superficie de micobacterias modula la respuesta inflamatoria es desconocido. Una posibilidad que se describe para otros microorganismos es que Plg reclutado en la superficie celular bacteriana por los receptores de Plg se convierte en Plm por activadores derivadas del hospedero. La Plm unida a la superficie celular es explotada por las bacterias para la degradación proteolítica de los componentes de la MEC, membrana basal facilitar la

---

destrucción del tejido, la translocación bacteriana y la difusión dentro del huésped (Bergmann S y Hammerschmidt, 2007).

La difusión de las bacterias de los sitios de infección primaria en los pulmones, a otros órganos es uno de los eventos clave en la patogénesis de la tuberculosis. La interacción de la micobacteria con el sistema fibrinolítico beneficia al patógeno, no solo permitiendo que la bacteria se propague a nuevos nichos y establecer sitios alternativos de la infección; sino también, participa en la evasión de la bacteria al sistema inmune. Se necesitan más estudios para determinar los eventos inmunológicos y moleculares que regulan la capacidad de las micobacterias para activar y utilizar el sistema fibrinolítico, así como identificar los puntos clave en esta interacción.

Se necesitan más estudios para entender la interacción de la micobacteria con el sistema fibrinolítico. Se han reportado una variedad de bacterias interactúan con Plg, ya sea activándolo con proteasas como Pla en *Y.pestis* facilitando la diseminación y sobrevivencia en las células del hospedero (Korhonen et al., 2013) o inhibiendo su eliminación por las células fagocíticas como en *Streptococcus* (Fulde et al., 2013). Si bien la micobacteria podría seguir alguno de estos mecanismos, podría tener un mecanismo diferente.

Finalmente, este trabajo proporciona evidencia de que la Plm podría conferir un potencial invasivo a las micobacterias, ya que los bacilos recubiertos con Plg fueron capaces de alcanzar el pulmón más rápido que las bacterias no recubiertas o las

---

bacterias inoculadas en presencia de EACA. Este último hallazgo, es muy importante ya que al inocular bacterias en presencia de EACA, se inhibe por competencia de sitios de lisina la unión del Plg del hospedero con las bacterias. El hecho de que en presencia de EACA, las micobacterias fueran incapaces de migrar al pulmón indica un papel importante del sistema fibrinolítico en la capacidad de diseminación de las micobacterias. El mecanismo podría ser similar al descrito para otros agentes patógenos, capaces de penetrar las barreras epiteliales o endoteliales debido a la escisión proteolítica de uniones de las células por medio de Plm, sin embargo, se necesitan más estudios para identificar el mecanismo específico usado por las micobacterias (Attali et al., 2008).

Por otra parte, el hecho de que la bacteria tenga capacidad de unir Plg en su superficie celular y que esta pueda ser convertida a Plm *in vivo*, ya sea por un activador del hospedero o por un activador propio, abre una nueva ventana para investigar a detalle la interacción de las micobacterias con el Plg y su impacto durante la infección. Estos hallazgos permitirán entender el papel del patógeno por sí mismo, para la inducción de estas moléculas durante la respuesta inflamatoria y su utilización durante el daño tisular provocado en esta enfermedad. Todos estos hallazgos nos permiten sugerir que la interacción de la micobacteria con el Plg podría ser esencial para la patogénesis de la TB.

---

## 9. Conclusiones

---

- *M. tuberculosis* es capaz de unir el Plasminogeno en su superficie celular.
- *M. tuberculosis* es capaz de activar el Plg a Plm sin necesidad de un activador del hospedero en un modelo *in vitro*.
- Las moléculas del sistema fibrinolítico: Plg, Plm, tPA, uPA, incrementan su expresión en los pulmones de animales infectados con *M. tuberculosis*.
- El papel importante para sistema de plasminogeno en la patogénesis de la tuberculosis se evidenció por la co-localización de *M. tuberculosis* y plasminogeno coincidió con la respuesta inflamatoria y el daño a los tejidos en el modelo murino.
- La Plasmina confiere un potencial invasivo a las micobacterias.

---

# 10. Bibliografía

---

# 10. Bibliografía

---

- Alemán C, Alegre J, Monasterio J, Segura RM, Armadans L, Anglés A, Varela E, Ruiz E, Fernández de Sevilla T. 2003. Association between inflammatory mediators and the fibrinolysis system in infectious pleural effusions. *Clin Sci (Lond)*. 105(5):601-7
- Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*. 72(1):1-22.
- Antikainen J, Kuparinen V, Lähteenmäki K, Korhonen TK. 2007. Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 51(3):526-34.
- Attali C, Durmort C, Vernet T and Di Guilmi AM. 2008. The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect. Immun*. 76:5350-56
- Aung H, Toossi Z, McKenna SM. 2000. Expression of transforming growth factor- $\beta$  but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , and interleukin-4 in granulomatous lung lesions in tuberculosis. *Tuber Lung Dis*. 80:61-7.
- Aung H, Wu M, Johnson JL, Hirsch CS, Toossi Z. 2005. Bioactivation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1 by *Mycobacterium tuberculosis* in human mononuclear phagocytes. *Scand J Immunol*. 61(6):558-65

- 
- Avilan L, Calcagno M, Figuera M, Lemus L, Puig J, Rodriguez AM. 2000. Interaction of *Leishmania mexicana* promastigotes with the plasminogen-plasmin system. *Mol Biochem Parasitol.* 110(2):183-93.
  - Avilán L, Gualdrón-López M, Quiñones W, González-González L, Hannaert V, Michels PA, Concepción JL. 2011. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Res.* 2011;2011:932549.
  - Backes Y, van der Sluijs KF, Mackie DP, Tacke F, Koch A, Tenhunen JJ, Schultz MJ. 2012. Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review. *Intensive Care Med.* 38(9):1418-28.
  - Bartlett, J.G. 2007. Tuberculosis and HIV infection: partners in human tragedy. *J. Infect. Dis.* 196 (Suppl 1) : S124–S125.
  - Bass R, Ellis V. 2002. Cellular mechanisms regulating non-haemostatic plasmin generation. *Biochem Soc Trans.* 30(2): 189-194
  - Baxt LA, Garza-Mayers AC, Goldberg MB. 2013. Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science.* 340(6133):697-701.
  - Beaufort N, Wojciechowski P, Sommerhoff CP, Szmyd G, Dubin G, Eick S, Kellermann J, Schmitt M, Potempa J, Magdolen V. 2008. The human fibrinolytic system is a target for the staphylococcal metalloprotease aureolysin. *Biochem J.* 410(1):157-65.
  - Berg DT, Burck PJ, Berg DH, Grinnell BW. 1993. Kringle glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator. *Blood.* 81 (5): 1312-22
  - Bergmann S and Hammerschmidt S. 2007. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost.* 9:512-520.
  - Bhattacharya S, Ploplis VA, Castellino FJ. 2012. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. *J Biomed Biotechnol.* 2012:482096.
  - Bhowruth V, Alderwick L, Brown A, Bhatt A, Besra G. 2008. Tuberculosis: a balanced diet of lipids and carbohydrates. *Biochem Soc Trans,* 36(4): 555–565
  - Biland L, Duckert F, Prisender S, Nyman D. 1978. Quantitative estimation of coagulation factors in liver disease. The diagnostic and prognostic value of factor XIII, factor V and plasminogen. *Thromb Haemostas* 39, 646-656.

- 
- Blomgran R, Ernst JD. 2011. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology*. 186(12): 7110–7119
  - Brighenti S, Andersson J. 2012. Local immune responses in human tuberculosis: learning from the site of infection. *J Infect Dis*. 205 Suppl 2:S316-24
  - Cáceres N, Tapia G, Ojanguren I, Altare F, Gil O, Pinto S, Vilaplana C, Cardona PJ. 2009. Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis (Edinb)*. 89:175-82
  - Campuzano J, Aguilar D, Arriaga K, León JC, Salas-Rangel LP, González-y-Merchand J, Hernández-Pando R, Espitia C. 2007. The PGRS domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS Rv1759c antigen is an efficient subunit vaccine to prevent reactivation in a murine model of chronic tuberculosis. *Vaccine*. 25(18):3722-9.
  - Candela M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turrone S, Eikmanns BJ, Hammerschmidt S, Brigidi P. 2007. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J Bacteriol*. 189(16):5929-36.
  - Candela M, Biagi E, Centanni M, Turrone S, Vici M, Musiani F, Vitali B, Bergmann S, Hammerschmidt S, Brigidi P. *Microbiology*. 2009. *Bifidobacterial* enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. 155(Pt 10):3294-303
  - Candela M, Miccoli G, Bergmann S, Turrone S, Vitali B, Hammerschmidt S, Brigidi P. 2008. Plasminogen-dependent proteolytic activity in *Bifidobacterium lactis*. *Microbiology*. 154(Pt 8):2457-62.
  - Cardona PJ. 2009. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*. 37(2):80–86
  - Carmeliet P, Collen D. 1998. Development and disease in proteinase deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res*. 91(6):255-285.
  - Caron E, Hall, A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282:1717–1721.

- 
- Castellanos M, 2012. Situación actual de la Tuberculosis en el Mundo, México y Veracruz. Avances y desafíos. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, Veracruz, México; Enero 2012.
  - Castellino FJ, Powell JR. 1981. Human plasminogen. *Methods Enzymol*;80 Pt C:365-78.
  - Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Tsegaye TS, Takeda M, Bugge TH, Kim S, Park Y, Marzi A, Pöhlmann S. 2009. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol.* 83(7):3200-11
  - Chan, J., and Flynn, J. 2004. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin. Immunol.* 110: 2–12
  - Chang JC, Wysocki A, Tchou-Wong KM, Moskowitz N, Zhang Y, Rom WN. 1996. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. *Thorax.* 51(3):306-11
  - Chang KC, Nuernberger EL. 2012. The year in review Part I: Tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 16(6):740–748
  - Chapman HA Jr. 1991. Role of enzyme receptors and inhibitors in regulating proteolytic activities of macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 624:87–96.
  - Chesterman CN. 1978. Fibrinolysis and disseminated intravascular coagulation. In: *Fibrinolysis. Current fundamental and clinical concepts.* Gaffney PJ, Balkuv-Ulutin S (eds), Academic Press, London, 157-172.
  - Chung MC, Tonry JH, Narayanan A, Manes NP, Mackie RS, Gutting B, Mukherjee DV, Popova TG, Kashanchi F, Bailey CL, Popov SG. 2011. *Bacillus anthracis* interacts with plasmin(ogen) to evade C3b-dependent innate immunity. *PLoS One.* 6:e18119
  - Clark-Curtiss JE, Haydel SE. 2003. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57:517-49
  - Coleman JL, Gebbia JA, Benach JL. 2001. *Borrelia burgdorferi* and other bacterial products induce expression and release of the urokinase receptor (CD87). *J Immunol.* 166:473-80

- 
- Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. 1997. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for the enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*. 89:1111-1119
  - Collen D. 1999. The Plasminogen (Fibrinolytic) System. *Thromb. Haemostasis*. 82: 259-270
  - Cooper AM<sup>a</sup>. 2009. T cells in mycobacterial infection and disease. *Curr Opin Immunol*. 21:378-384
  - Cooper AM<sup>b</sup>. 2009. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 27:393-422
  - Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA, Booth NA. 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol*. 47(6):1637-51.
  - D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria HC, Bozza PT. 2006. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette- Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J. Immunol*. 176, 3087–3097
  - Daniel TM, Bates JH, Downes KA. 1994. History of tuberculosis en *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. B. R. Bloom (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C:13–24
  - Dannenburg AM, Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses—dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: Bloom BR, ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. 1st ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 1994:459–83.
  - De la Paz Santangelo M, Gest PM, Guerin ME, Coinçon M, Pham H, Ryan G, Puckett SE, Spencer JS, Gonzalez-Juarrero M, Daher R, Lenaerts AJ, Schnappinger D, Therisod M, Ehrt S, Sygusch J, Jackson M. 2011. Glycolytic and non-glycolytic functions of *Mycobacterium tuberculosis* fructose-1,6-bisphosphate aldolase, an essential enzyme produced by replicating and non-replicating bacilli. *J Biol Chem*. 286(46):40219-31.
  - Dedieu L, Serveau-Avesque C, Kremer L, Canaan S. 2013. Mycobacterial lipolytic enzymes: a gold mine for tuberculosis research. *Biochimie*. 95(1):66-73

- 
- Degen JL, Bugge TH, Goguen JD. 1997. Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *Thromb. Haemost. Suppl* 1:24-31
  - Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GA. 2005. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2005 192(7):1201-9.
  - Dietrich J and Doherty TM. 2009. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: consequences for vaccine development. *APMIS.* 117:440-457
  - Djoba Siawaya JF, Bapela NB, Ronacher K, Veenstra H, Kidd M, Gie R, Beyers N, van Helden P, Walzl G. 2008. Immune parameters as markers of tuberculosis extent of disease and early prediction of anti-tuberculosis chemotherapy response. *J Infect.* 56(5):340-7
  - Edwards DR, Murphy G. 1998. Proteases, invasion and more. *Nature.* 394(6693):527-28
  - Ehlers MR, Daffé M. 1998. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 6(8):328-35.
  - Elder NC. 1992. Extrapulmonary tuberculosis. *Arch Fam Med.* 1(1):91-98.
  - Elkington PT, Friedland JS. 2005. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax.* 2006 Mar;61(3):259-66.
  - Elkington PT, Nuttall RK, Boyle JJ, O'Kane CM, Horncastle DE, Edwards DR, Friedland JS. 2005. *Mycobacterium tuberculosis*, but not vaccine BCG, specifically upregulates matrix metalloproteinase-1. *Am J Respir Crit Care Med.* 15;172(12):1596-604.
  - Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS. 2005. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol.* 142(1):12-20.
  - Espitia C, Cervera I, González R, Mancilla R. 1989. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol.* 77:373-7
  - Espitia C, Rodríguez E, Ramón-Luing L, Echeverría-Valencia G and Vallecillo J. 2012. Host-Pathogen Interactions in Tuberculosis in the book "Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of *Mycobacterium Tuberculosis* Pathogenicity" edited by Pere-Joan Cardona, ISBN 978-953-307-942-4, InTech
  - Eugen-Olsen J, Gustafson P, Sidenius N, Fischer TK, Parner J, Aaby P, Gomes VF, Lisse I. 2002. The serum level of soluble urokinase receptor is elevated in tuberculosis

- 
- patients and predicts mortality during treatment: a community study from Guinea-Bissau. *Int J Tuberc Lung Dis.* 6(8):686-92
- Ezekowitz RA, Gordon S. 1982. Down-regulation of mannosyl receptor-mediated endocytosis and antigen F4/80 in bacillus Calmette-Guérin-activated mouse macrophages. Role of T lymphocytes and lymphokines. *J Exp Med.*155(6):1623-37.
  - Frieden TR, Fujiwara PI, Washko RM, Hamburg MA. 1995. Tuberculosis in New York city turning the tide. *N. Engl. J. Med.* 333: 229–233
  - Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD. 1994. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20;91(26):12594-8.
  - Fuhrman B. 2012. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 222:8-14
  - Fulde M, Rohde M, Polok A, Preissner KT, Chhatwal GS, Bergmann S. 2013. Cooperative plasminogen recruitment to the surface of *Streptococcus canis* via M protein and enolase enhances bacterial survival. *MBio.* 4(2):e00629-12.
  - Gallimore MJ, Aasen AO, Erichsen NS, Larsbraaten M, Lyngaas K, Amundsen E. 1980. Plasminogen concentrations and functional activities and concentration of plasmin inhibitors in plasma samples from normal subjects and patients with septic shock. *Thromb Res* 18, 610-608
  - Gan H, Lee J, Ren F, Chen M, Kornfeld H, Remold HG. 2008. Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat Immunol.*9(10):1189-97
  - Garay S. 1996. Pulmonary tuberculosis en *Tuberculosis.* Little, W. N. Rom and S. Garay (ed.), Brown and Co., Boston, Mass:13–24<sup>a</sup>
  - Garay S. 1996. Tuberculosis and the human immunodeficiency virus infection en *Tuberculosis.* Little, W. N. Rom and S. Garay (ed.), Brown and Co., Boston, Mass:13–24<sup>b</sup>
  - Garcia de Viedma D, Lorenzo G, Cardona PJ, Rodriguez NA, Gordillo S, Serrano MJ, Bouza E. 2005. Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrarespiratory infection. *J Infect Dis;* 192(12):2059-2065.

- 
- Garcia de Viedma D, Marín M, Ruiz M, Alcalá L, Bouza E. 2003. Polyclonal and Compartmentalized infection by Mycobacterium tuberculosis in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J of Infect Diseases*. 187:695–699
  - Gatfield, J., and Pieters, J. (2000). Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288, 1647–1650.
  - Gilad O, Svensson B, Viborg AH, Stuer-Lauridsen B, Jacobsen S. 2011. The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects. *Proteomics*. 2011 Jun;11(12):2503-14
  - Gong Y, Kim SO, Felez J, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. 2001. Conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen is necessary for optimal stimulation of plasminogen activation on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*. 276(22):19078-83
  - Gordon S, Cohn ZA. 1978. Bacille calmette- Guerin infection in the mouse. Regulation of macrophage plasminogen activator by T lymphocytes and specific antigen. *J Exp Med*. 147:1175-1188
  - Grace CS, Goldrick RB. 1968. Fibrinolysis and body build. Interrelationships between blood fibrinolysis, body composition and parameters of lipid and carbohydrate metabolism. *J Atherosclerosis Res* 8, 705-719.
  - Grenier D. 1996. Degradation of host protease inhibitors and activation of plasminogen by proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Microbiology*. 142 ( Pt 4):955-61
  - Guo Y, Li J, Hagström E, Ny T. 2011. Beneficial and detrimental effects of plasmin(ogen) during infection and sepsis in mice. *PLoS One*. 6(9):e24774.
  - Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. 2012. Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. 217(3):363-74
  - Gyetko MR, Wilkinson CC, Sitrin RG. Monocyte urokinase expression: modulation by interleukins. *J Leukoc Biol* 1993; 53:598–601.
  - Haas F, Haas SS. 1996. The origins of Mycobacterium tuberculosis and the notion of its contagiousness en Tuberculosis. Little, W. N. Rom and S. Garay (ed.), Brown and Co., Boston, Mass:13–24
  - Haenselt V. 1982. Pathogenesis of extrapulmonary tuberculosis. *Zentralbl Chir*. 1982;107(5-6):295-300

- 
- Hellgren M, Blombäck M. 1981. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in pregnancy, during delivery and in the puerperium. *Gynecol Obstet Invest* 12, 141-154
  - Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA. 2011. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol Rev.* 35(1):147-200.
  - Henkin J, Marcotte P, Yang H. 1991. The plasminogen-plasmin system. *Prog Card Diseases* 34(2):135-64.
  - Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. 1996. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 89:26-33
  - Hernandez-Pando R, Rook GA. The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology.* 1994; 82:591-5.
  - Herren T, Swaisgood C and Plow EF. 2003. Regulation of plasminogen receptors. *Front. Biosc.* 1:1-8.
  - Herrera MT, Torres M, Nevels D. 2009. Compartmentalized bronchoalveolar IFN- $\gamma$  and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis.* 89 (1): 38- 47
  - Houben EN, Nguyen L, Pieters J. 2006. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol.* Feb;9(1):76-85
  - Hoylaerts M, Rijcken DC, Lijnen HR, Collen D. 1982. "Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin," *Journal of Biological Chemistry.* 257(6): 2912-2919.
  - Hrabec E, Streck M, Zieba M, Kwiatkowska S, Hrabec Z. Circulation level of matrix metalloproteinase-9 is correlated with disease severity in tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:713-9.
  - Hu LT, Pratt SD, Perides G, Katz L, Rogers RA, Klempner MS. 1997. Isolation, cloning, and expression of a 70-kilodalton plasminogen binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 65(12):4989-95.
  - Huynh KK, Joshi SA, Brown EJ. 2011. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Curr Opin Immunol.* 23(4):464-72

- 
- Itzek A, Gillen CM, Fulde M, Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Nitsche-Schmitz DP. 2010. Contribution of plasminogen activation towards the pathogenic potential of oral streptococci. *PLoS One*. 3;5(11):e13826.
  - Izaki S, Hibino T, Isozaki Y, Hsu PS, Izaki M, Matsuo O. 1984. Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor associated with granulomatous inflammation: a study with murine leprosy. *Thromb Haemost*. 52(3):243-9.
  - Izaki S, Isozaki Y, Satoh M, Hibino T, Kon S and Izaki M. 1983. Comparative study with two polar types of murine leprosy: an involvement of plasminogen activator and its possible regulating factor in the granulomatous tissue reaction. *J Invest Dermatol*. 80:81-85
  - Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J., and Pieters, J. 2007. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 130: 37–50
  - Johnson AJ, Tillett WS. 1992. The lysis in rabbits of intravascular blood clots by the streptococcal fibrinolytic system (streptokinase). *J Exp Med*. 95(5):449-64.
  - Jong AY, Chen SH, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH. 2003. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol*. 52: 615–622
  - Juffermans NP, Dekkers PE, Verbon A, Speelman P, van Deventer SJ, van der Poll T. 2001. Concurrent up-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and CD11b during tuberculosis and experimental endotoxemia. *Infect Immun*.69: 5182-5
  - Kager LM, van der Windt GJ, Wieland CW, Florquin S, van 't Veer C, van der Poll T. 2012. Plasminogen activator inhibitor type I may contribute to transient, non-specific changes in immunity in the subacute phase of murine tuberculosis. *Microbes Infect*. 14(9):748-55.
  - Kaplan G, Post FA, Moreira, AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, Mathema B, Ramaswamy SV, Walther G, Steyn LM. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect. Immun*. 71, 7099–7108

- 
- Kaufmann SH, Dorhoi A. 2013. Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions. *Curr Opin Immunol* 25(4):441-9.
  - Kaufmann SH. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11:129–163
  - Kaufmann, SH. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 1(1): 20–30
  - Keller TT, Mairuhu AT, de Kruif MD, Klein SK, Gerdes VE, ten Cate H, Brandjes DP, Levi M, van Gorp EC. 2003. Infections and endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 60(1):40-8.
  - Kenny S, Duval C, Sammut SJ, Steele I, Pritchard DM, Atherton JC, Argent RH, Dimaline R, Dockray GJ, Varro A. 2008. Increased expression of the urokinase plasminogen activator system by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 295(3):G431-41.
  - Khader SA, Bell GK, Pearl JE. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol.* 8(4):369–377.
  - Kim MH, Yoo HS, Kim MY, Jang HJ, Baek MK, Kim HR, Kim KK, Shin BA, Ahn BW, Jung YD. 2007. *Helicobacter pylori* stimulates urokinase plasminogen activator receptor expression and cell invasiveness through reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling in human gastric carcinoma cells. *Int J of Mol Med* 19: 689-697
  - Koo JT, Alleyne TM, Schiano CA, Jafari N, Lathem WW. 2011. Global discovery of small RNAs in *Yersinia pseudotuberculosis* identifies *Yersinia*-specific small, noncoding RNAs required for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(37):E709-17.
  - Korhonen TK, Lähteenmäki K, Kukkonen M, Pouttu R, Hynönen U, Savolainen K, Westerlund-Wikström B, Virkola R. 1997. Plasminogen receptors. Turning *Salmonella* and *Escherichia coli* into proteolytic organisms. *Adv Exp Med Biol.* 412:185-92
  - Korhonen TK, Haiko J, Laakkonen L, Järvinen HM, Westerlund-Wikström B. 2013. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:35.
  - Kukkonen M, Saarela S, Lähteenmäki K, Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Rhen M, Korhonen TK. 1998. Identification of two laminin-binding fimbriae, the type 1 fimbria of

- 
- Salmonella enterica serovar typhimurium and the G fimbria of Escherichia coli, as plasminogen receptors. Infect Immun. 66(10):4965-70.
- Kukkonen M, Lähteenmäki K, Suomalainen M, Kalkkinen N, Emödy L, Lång H, Korhonen TK. 2001. Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of alpha2-antiplasmin in the surface protease Pla of Yersinia pestis. Mol Microbiol. 40(5):1097-111.
  - Kumar D, Rao KV. 2011. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances. Microbes Infect. 13(2):121-33
  - Kunert A, Losse J, Gruszyn C, Hühn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwege J, Zipfel PF. 2007. Immune evasion of the human pathogen Pseudomonas aeruginosa: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. J Immunol. 179(5):2979-88.
  - Kuusela P, Saksela O. 1990. Binding and activation of plasminogen at the surface of Staphylococcus aureus. Increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. Eur J Biochem. 193 (3):759-65
  - Kuusela P, Ullberg M, Kronvall G, Tervo T, Tarkkanen A, Saksela O. 1992. Surface-associated activation of plasminogen on gram-positive bacteria. Effect of plasmin on the adherence of Staphylococcus aureus. Acta Ophthalmol Suppl. 1992;(202):42-6
  - Lähteenmäki K, Edelman S, Korhonen TK. 2005. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. Trends Microbiol. 13(2):79-85
  - Lähteenmäki K, Kukkonen M, Korhonen TK. 2001. The Pla surface protease/adhesin of Yersinia pestis mediates bacterial invasion into human endothelial cells. FEBS Lett. 504(1-2):69-72.
  - Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. 2000. Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. Methods. 21:125-132
  - Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. FEMS. Microbiol Rev. 25(5):531-552
  - Lathem WW, Price PA, Miller VL, Goldman WE. 2007. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. Science. 315(5811):509-13.

- 
- Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, Steer D, Cowan A, Zhang Q, Lu BG, Pike RN, Smith AI, Coughlin PB, Whisstock JC. 2012. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep.* 1(3):185-90
  - Leung AN. 1999. Tuberculosis: the essentials. *Radiology.* 210(2):307-322
  - Levi M, de Jonge E, van der Poll T. 2003. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombolysis.* 16(1-2):43-7.
  - Levi M, de Jonge E, van der Poll T. 2004. New treatment strategies for disseminated intravascular coagulation based on current understanding of the pathophysiology. *Ann Med.* 36(1):41-9
  - Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. 2003. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res.* 60(1):26-39
  - Levi M, van der Poll T, Büller HR. 2004. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation.* 109(22):2698-704.
  - Ligon BL. 2002. Robert Koch: nobel laureate and controversial figure in tuberculin research. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases.* 13(4): 289–299
  - Lijnen HR. 2002. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc).* 67(1):92-8.
  - Lilja H, Vickers A, Scardino P. Measurements of proteases or protease system components in blood to enhance prediction of disease risk or outcome in possible cancer. *J Clin Oncol.* 25(4):347-8.
  - Liu YX. 1999. Regulation of the plasminogen activator system in the ovary. *Bio Signals Receptor.* 8(3):160-77
  - Ljungh A. 2000. Helicobacter pylori interactions with plasminogen. *Methods.* 21(2):151-7.
  - López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, van Soolingen D. 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol.* 33(1):30-7.
  - Lottenberg R, Wenz D and Boyle M.D.P. 1994. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol.* 2:20-24
  - Lottenberg R. 1997. A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial pathogenesis. *Trends. Microbiol.* 5:466-467

- 
- Lu XG, Mao JS, Tong JF, Zhu L, Liu J, Gong XB and Huang J. 2007. Fibrinolytic characteristics and their significance in malignant, tuberculous and cirrhotic pleural and ascitic fluids. *Int J Lab Hematol.* 29:132-138.
  - Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL. 1994. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- $\alpha$ -inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 152:5883–9.
  - MacFarlane RG, Pilling J. 1947. Fibrinolytic activity of normal urine. *Nature.* 159(4049):779.
  - Magalhães V, Veiga-Malta I, Almeida MR, Baptista M, Ribeiro A, Trieu-Cuot P and Ferreira P. 2007. Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in *Streptococcus agalactiae* and enhances its virulence in a mouse model. *Microbes Infect.* 9:1276-1284
  - Małgorzewicz S, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. 2013. Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review). *Int J Mol Med.* 31(3):503-10.
  - Markarion M, Githens JH, Jackson JJ. 1967. Fibrinolytic activity in premature infants. Relationship of the enzyme system to the respiratory distress syndrome. *Am J Dis Child* 113, 312.
  - Markus G, Priore RL, Wissler FC. 1979. The binding of tranexamic acid to native (Glu) and modified (Lys) human plasminogen and its effect on conformation. *J Biol Chem.* 254(4):1211-6
  - Mauviel A. 1993. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem.* 53:288–95.
  - Medved L, Niewenhuizen W. 2003. Molecular mechanism of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost.* 89(3).409-19
  - Mignatti P, Rifkin DB. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73(1):161-95
  - Milburn H.2001. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 7(3):133-141
  - Milstone H. 1941. A factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis. *J. Immunol.* 42:109.

- 
- Mischenko V, Kapina M, Eruslanov E, Kondratieva E, Lyadova I, Young D, Apt A. 2004. Mycobacterial dissemination and cellular responses after 1-lobe restricted tuberculosis infection of genetically susceptible and resistant mice. *J Infect Dis.* 190:2137-2145
  - Modlin R and Rickinson A. 2000. Immunity to infection. *Current Opinion in Immunology.* 12:387-389
  - Molinas FC, Kordich L, Porterie P. 1984. Plasminogen abnormalities in patients with Argentine hemorrhagic fever. *Thromb Res* 48, 713-720.
  - Mölkänen T, Ruotsalainen E, Thorball CW, Järvinen 2011. A. Elevated soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) predicts mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30:1417-24
  - Mondino A, Blasi F. 2004. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol.* 25(8):450-5
  - Monroy V, Amador A, Ruiz B, Ezpinosa-Cueto P, Xolalpa W, Mancilla R, Espitia C. 2000. Binding and activation of human plasminogen by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 68: 4327-4330.
  - Munger, JS, Chapman HA Jr. Tissue destruction by proteases. In: Rom WN, Garay SM, eds. *Tuberculosis.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004:353–62.
  - Munuwwar A, Singh S. 2012. AIDS associated tuberculosis: a catastrophic collision to evade the host immune system. *Tuberculosis.* 92(5):384-7
  - Muttucumaru DG, Smith DA, McMinn EJ, Reese V, Coler RN, Parish T. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0198c, a putative matrix metalloprotease is involved in pathogenicity. *Tuberculosis (Edinb).* 91(2):111-6
  - Natarajan K, Kundu M, Sharma P, Basu J. 2011. Innate immune responses to *M.tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb).* 91(5):427-31
  - Nolasco M, Salcedo M, Vázquez-Ortiz G. 2007. Activación del Sistema Plasminógeno-Plasmina y el Papel de PAI-1 en Patologías Humanas. *Cancerología 2:* 171-183
  - Norris DA, Clark RA, Swigart LM, Huff JC, Weston WL and Howell SE. 1982. Fibronectin fragment(s) are chemotactic for human peripheral blood monocytes, *J. Immunol.* 129:1612-1618.

- 
- North RJ and Jung YJ. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22:599-623.
  - Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(5):366-78
  - Ostrowski SR, Ravn P, Hoyer-Hansen G, Ullum H, Andersen AB. 2006. Elevated levels of soluble urokinase receptor in serum from mycobacteria infected patients: still looking for a marker of treatment efficacy. *Scand J Infect Dis.* 38:1028-32
  - Ottenhoff TH. 2012. New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. *Trends Microbiol.* 20(9):419-28
  - Pancholi V, Fontan P, Jin H. 2003. Plasminogen-mediated group A streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells," *Microbial Pathogenesis.* 35(6): 293–303
  - Pancholi V, Chhatwal GS. 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 293(6):391-401
  - Pandey, A.K., and Sasseti, C.M. 2008. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 4376–4380
  - Parry MA, Zhang XC Bode I. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340:115-26
  - Parry MA, Zhang XC, Bode I. 2000. Molecular mechanism of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends Biochem Sci.* 25(2):53-9.
  - Perch M, Kofoed P, Fischer TK, C6 F, Rombo L, Aaby P, Eugen-Olsen J. 2004. Serum levels of soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with parasitemia in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria infection. *Parasite Immunol.* 26:207-11
  - **Peters** W, Ernst D. 2003. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection.* 5(2):151–158
  - Peyron P, Bordier C., N'Diaye EN, Maridonneau-Parini, I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol- anchored proteins. *J. Immunol.* 165: 5186–5191.

- 
- Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, Daffe M, Emile JF, Marchou B, Cardona PJ. 2008. Foamy macrophages from tuberculous patients granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* 4, e1000204
  - Pieters J. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe.* 3(6):399-407
  - Pieters, J. 1997. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 89–96
  - Ploplis VA, Castellino FJ. 2000. Nonfibrinolytic functions of plasminogen. *Methods.* 21(2):103-10.
  - Plow EF, Ploplis VA, Busuttill S, Carmeliet P, Collen D. 1999. A role of plasminogen in atherosclerosis and restenosis models in mice. *Thromb Haemost.* 82(S1):4-7.
  - Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA. 1992. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 3(5):605-14
  - Potempa J, Korzus E, Travis J. 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 269(23):15957-60.
  - Preston FE, Burakiwski BK, Porter NR, Malia RG. 1981. The fibrinolytic response to stanazol in normal subjects. *Throm Res* 22, 543-552.
  - Qi W, Harries A D, Hinderaker S G. 2011. Performance of culture and drug susceptibility testing in pulmonary tuberculosis patients in northern China. *Int J Tuberc Lung Dis.* 15: 137–139
  - Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun* 2001; 69:5661–70.
  - Ra HJ and Parks WC. 2007. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix. Biol.* 26:587-596.
  - Rabna P, Andersen A, Wejse C, Oliveira I, Gomes VF, Haaland MB, Aaby P, Eugen-Olsen J. 2009. High mortality risk among individuals assumed to be TB-negative can be predicted using a simple test. *Trop Med Int Health.* 14(9):986-94.
  - Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 20(4):213-32.

- 
- Ranson M, Andronicos NM.2003. Plasminogen binding and cancer: promises and pitfalls. *Front Biosci.* 1;8:s294-304
  - Rao NK, Shi GP, Chapman HA. 1995. Urokinase receptor is a multifunctional protein: influence of receptor occupancy on macrophage gene expression. *J Clin Invest.* 96(1):465-74.
  - Reddy KN, Markus G. 1972. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. *J Biol Chem.* 247(6):1683-91.
  - Reichel CA, Kanse SM, and Krombach F. 2012. At the Interface of Fibrinolysis and Inflammation: The Role of Urokinase- Type Plasminogen Activator in the Leukocyte Extravasation Cascade. *Trends Cardiovasc Med* 2012;22:192-196
  - Rennie JAN, Bewsher PD, Murchison LE, Ogston D. 1978. Coagulation and fibrinolysis in thyroid disease. *Acta Haematologica* 59, 171-177.
  - Ricklin D, Lambris JD.2013. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol.* 190(8):3831-3838.
  - Robbins KC, Summaria L. 1976. Plasminogen and plasmin. *Methods Enzymol.* 1976;45:257-73.
  - Rooijackers SH, Van Wamel W, Ruyken M, Van Kessel K, Van Strijp J. 2005. Anti-opsionic properties of staphylokinase. *Microbes and Infection.* 7(3):476–484
  - Rosey EL, Lincoln RA, Ward PN, Yancey RJ Jr, Leigh JA. 1999. PauA: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol Lett.* 178(1):27-33.
  - Ross R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340:115-26
  - Rothschild BM, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal GK, Greenblatt C, Donoghue H, Spigelman M, Brittain D. 2001. Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis.* 33(3):305-311
  - Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.*10(9):943-8
  - Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim MJ, Homolka S, Niemann S, Rohde KH. 2010. Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. *Cell Host Microbe.* 8(1):68-76

- 
- Saathoff E, Villamor E, Mugusi F, Bosch R J, Urassa W, Fawzi W W. 2011. Anemia in adults with tuberculosis is associated with HIV and anthropometric status in Dar es Salaam, Tanzania. *Int J Tuberc Lung Dis* 15: 925–932
  - Sakula A. 1982. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus. *Thorax*. 37 (4): 246–251
  - Sanderson-Smith ML, De Oliveira D, Ranson M, McArthur JD. 2012. Bacterial Plasminogen Receptors: Mediators of a Multifaceted Relationship. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 272148
  - Sanderson-Smith ML, Dinkla K, Cole JN, Cork AJ, Maamary PG, McArthur JD, Chhatwal GS, Walker MJ. 2008. M protein-mediated plasminogen binding is essential for the virulence of an invasive *Streptococcus pyogenes* isolate. *FASEB J*. 22(8):2715-22.
  - Sasindran SJ, Torrelles JB. 2011. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Front Microbiol*. 2:2.
  - Sato J, Schorey J, Ploplis VA, Haalboom E, Krahule L and Castellino FJ. 2003. The fibrinolytic system in dissemination and matrix protein deposition during a mycobacterium infection. *Am. J. Pathol*. 163:517-531
  - Satoh M, Izaki S, Kon S, Izaki M. 1983. Fibrin and collagen deposition and fibroblasts proliferation in granuloma of murine leprosy. Comparison of two mouse strains with different immune reactions. *Experientia*. 39:899-902
  - Saunders BM, Britton WJ. 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 85(2):103-11
  - Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of mycobacterium avium containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol*. 160(3):1290-6
  - Schlossberg D. 2000. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. Mc Graw Hill. Cuarta edición. USA.

- 
- Schoeman J, Mansvelt E, Springer P, van Rensburg AJ, Carlini S, Fourie E. 2007. Coagulant and fibrinolytic status in tuberculous meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 26(5):428-31.
  - Schrader J, Gallimore MJ, Eisenhauer T, Isemer FE, Schoel G, Warneke G, Bruggeman M, Scheler F. 1988. Parameters of the Kallikrein-kinin, coagulation and fibrinolytic system as early indicators of kidney transplant rejection. *Nephron* 48m 183-189.
  - Schuyler M, Forman W. 1984. Alveolar macrophage plasminogen activator. *Exp Lung Res*. 6:159-169
  - Siemens N, Patenge N, Otto J, Fiedler T, Kreikemeyer B. 2011. Streptococcus pyogenes M49 plasminogen/plasmin binding facilitates keratinocyte invasion via integrin-linked kinase (ILK) pathways and protects from macrophage killing. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(24): 21612–21622
  - Singh B, Fleury C, Jalalvand F, Riesbeck K. 2012. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiol Rev*. 36(6):1122-80.
  - Sisson T, Hanson K, Subbotina N, Patwardhan A, Hattori N, Simon R. 2002. Inducible lung-specific urokinase expression reduces fibrosis and mortality after lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(5): L1023–L1032
  - Sjöström I, Gröndahl H, Falk G, Kronvall G, Ullberg M. 1997. Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from Haemophilus influenzae. Sequence determination reveals identity with aspartase. *Biochim Biophys Acta*. 13;1324(2):182-90.
  - Smith-Erichsen N. 1982. Treatment of sepsis in the surgical patient evaluated by means of chromogenic peptide substrate assays. *Acta Chir Scand*, suppl 509, 33-38.
  - Smokovitis A, Sugimoto M, Dannenberg AM Jr, Astrup T. 1976. A histochemical study of the fibrinolytic activity in dermal tuberculous lesions produced by BCG in rabbits. *Exp Mol Pathol*. 25(2):236-41
  - Stie J, Fox D. 2012. Blood-brain barrier invasion by Cryptococcus neoformans is enhanced by functional interactions with plasmin. *Microbiol*. 158:240-58

- 
- Stie J, Fox D. 2012. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. *PLoS One*. 7(11):e49402.
  - Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* 1999; 11: 634-640
  - Sun H, Ringdahl U, Homeister JW, Fay WP, Engleberg NC, Yang AY, Rozek LS, Wang X, Sjöbring U, Ginsburg D. 2004. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science*. 305(5688):1283-6.
  - Sun H. 2006. The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)*. 21:281-8.
  - Sundaramurthy V, Pieters J. 2007. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes Infect*. 9(14-15):1671-9
  - Sutor AH. 1979. Bleeding complications in acute myeloblastic leukemia. *Thromb Haemos (Abst.)* 42, 4555.
  - Tait RC, Walker ID, Conkie JA, Islam SIAM, MacCall F, Mitchell R, Davidson JF. 1992. Plasminogen Levels in healthy volunteers. Influence of age, sex, smoking and oral contraceptives. *Thromb Haem* 68, 5, 506-510
  - Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 17(1):1-14
  - Tapia CR, Ruiz MC, Ferreira, GE. Epidemiología de la Tuberculosis en México. *Temas de Medicina Interna: Tuberculosis*. Asociación de Medicina Interna de México, Ed. Interamericana McGraw-Hill. Vol. III, 1995, pp. 761-788
  - Teles RM, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonça-Lima L, Ferreira H, Santos IM, Nery JA, Sarno EN, Sampaio EP. 2010. High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun*. 2010 Mar;78(3):1012-21.
  - Toossi Z, Wu M, Rojas R, Kalsdorf B, Aung H, Hirsch CS, Walrath J, Wolbink A, van Ham M, Silver RF. 2012. Induction of serine protease inhibitor 9 by *Mycobacterium tuberculosis* inhibits apoptosis and promotes survival of infected macrophages. *J Infect Dis*. 2012 Jan 1;205(1):144-51

- 
- Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G. 2006. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs:cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular Microbiology*. 8(2): 218–232
  - Ullberg M, Kuusela P, Kristiansen BE, Kronvall G. 1992. Binding of Plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and formation of surface-associated plasmin. *J Infect Dis*. 166:1329
  - Ullberg M, Kronvall G, Karlsson I, Wiman B. 1990. Receptors for human plasminogen on gram-negative bacteria. *Infect Immun*. 1990 Jan;58(1):21-5
  - Upadhye V, Majumdar A, Gomashe A, Joshi D, Gangane N, Thamke D, Mendiratta D, Harinath BC. 2009. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* secretory serine protease blocks bacterial multiplication both in axenic culture and in human macrophages. *Scand J Infect Dis*. 2009;41(8):569-76.
  - Van Crevel R, Ottenhoff TH, Van derMeer JW. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical*
  - Vanlaere I, Libert C. 2009. Matrix metalloproteinases as drug targets in infections caused by gram-negative bacteria and in septic shock. *Clin Microbiol Rev*. 22(2):224-39
  - Vieira ML, De Moraes Z, Vasconcelos S, Romero E, Nascimento A. 2011. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. *Microb Pathog*. 51(5):360–365
  - Vijayan VK. 2000. Disseminated tuberculosis. *J Indian Med Assoc*. 98(3):107-109
  - Vranckx L, De Buck E, Anné J, Lammertyn E. 2007. *Legionella pneumophila* exhibits plasminogen activator activity. *Microbiol*. 153(Pt 11):3757-65.
  - Weber C, Noels H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 17(11):1410-22
  - Widström O, Egberg N, Chmielewska J, Blombäck M. 1983. Fibrinolytic and coagulation mechanisms in stages of inflammation: a study of BCG-induced pleural exudate in guinea pig. *Thromb Res*. 29:511-519
  - Wittenhagen P, Kronborg G, Weis N, Nielsen H, Obel N, Pedersen SS, Eugen-Olsen J. 2004. The plasma level of soluble urokinase receptor is elevated in patients with *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia and predicts mortality. *Clin Microbiol Infect*. 10:409-15

- 
- World Health Organization, Global Tuberculosis Control: WHO Report 2012, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2012, WHO/HTM/TB/2012.16.
  - Wu CY, Hu HY, Pu CY, et al. Aerodigestive tract, lung and haematological cancers are risk factors for tuberculosis: an 8-year population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15: 125–130
  - Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C. 2007. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*. 7(18):3332-41.
  - Yasuda T, Poole AR. 2002. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. *Arthritis Rheum*. 46(1):138-48
  - Yavlovich A, Rottem S. 2007. Binding of host extracellular matrix proteins to *Mycoplasma fermentans* and its effect on adherence to, and invasion of HeLa cells. *FEMS Microbiol Lett*. 266(2):158-62.
  - Zahrt TC. 2003. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect*. 5(2):159-67
  - Zavizion B, White JH, Bramley AJ. 1997. *Staphylococcus aureus* stimulates urokinase-type plasminogen activator expression by bovine mammary cells. *J Infect Dis*. 176: 1637-40
  - Zhang L, Seiffert D, Fowler BJ, Jenkins GR, Thinnes TC, Loskutoff DJ, Parmer RJ, Miles LA. 2002. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution. *Thromb Haemost*. 87(3):493-501.
  - Zorio E, Gilabert-Estellés J, España F, Ramón LA, Cosín R, Estellés A. 2008. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem*. 15(9):923-9.
  - Zuñiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, Rodríguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. 2012. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol*. 2012: 193923.

---

# *11. Anexo*

---

El producto de este trabajo fue contenido en el artículo

“The response of the fibrinolytic system to mycobacteria infection”  
Rodríguez-Flores E, Campuzano J, Aguilar D, Hernández-Pando R,  
Espitia C. Tuberculosis (Edinb). 2012 Nov;92(6):497-504.

el cuál, se presenta a continuación.



## MECHANISMS OF PATHOGENESIS

## The response of the fibrinolytic system to mycobacteria infection

Edén Rodríguez-Flores<sup>a</sup>, Jaime Campuzano<sup>a,c</sup>, Diana Aguilar<sup>b</sup>, Rogelio Hernández-Pando<sup>b</sup>, Clara Espitia<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228, México D.F. 04510, Mexico<sup>b</sup>Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México D.F. 04510, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 May 2012

Accepted 5 July 2012

## Keywords:

Mycobacterium

Plasminogen

Chronic infection

## SUMMARY

The human pathogen *Mycobacterium tuberculosis* binds to a variety of host cell proteins, including those of the fibrinolytic system. These observations prompted us to study the expression of components of this system in an animal model of progressive pulmonary tuberculosis. Lung homogenates from BALB/c mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv were analyzed to determine the expression and enzymatic activity of plasmin/plasminogen and tissue plasminogen activator, as well as the mRNA levels for plasminogen, tissue and urokinase plasminogen activators. Plasminogen was also detected in infected lungs with immunohistochemistry. The results show that the expression of molecules of the fibrinolytic system increased gradually over the course of the infection, peaking during the chronic phase of the disease. Furthermore, *in vitro* experiments showed that both plasminogen activators were specifically induced after the stimulation of spleen cells from BCG-immunized mice with *M. tuberculosis* proteins. Together, these results show that molecules of the fibrinolytic system are up-regulated in the chronic phase of experimental tuberculosis and suggest that the mycobacterium itself could play an important role in the overexpression of molecules of the fibrinolytic system, contributing to chronic inflammation in tuberculosis.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The mammalian fibrinolytic system plays a crucial role in fibrinolysis, in which the proenzyme plasminogen (Plg) is converted to plasmin (Plm) by tissue plasminogen activator (tPA) or urokinase plasminogen activator (uPA). tPA-mediated Plg activation is mainly involved in fibrin dissolution in the circulation, while uPA binds to a specific cellular receptor (uPAR), mainly mediating Plg activation involved in pericellular proteolysis.<sup>1</sup> A growing body of evidence shows that many microorganisms interact with the fibrinolytic system, resulting in different biological and pathological events. Plg can be bound to and immobilized on the microbes' surface by Plg receptors and activated by host or pathogen activators to generate the proteolytic enzyme Plm, which turns the microbes into proteolytic organisms, thereby augmenting their invasive potential.<sup>2–11</sup> Bacteria can also exploit the molecules of the fibrinolytic system to avoid the innate immune response,<sup>12,13</sup> and

the fibrinolytic system itself can modulate the inflammatory response induced by the pathogen.<sup>1,14–17</sup>

The recent demonstration that *Mycobacterium tuberculosis* has an unexpectedly high number of Plg receptors with the capacity to immobilized Plg, which can be activated to Plm by host activators *in vitro*,<sup>18,19</sup> suggest that this interaction could have a role in host–bacteria relationships. Early reports demonstrated the participation of this system in the host response to infection with mycobacteria. One important observation was that anticoagulation with warfarin decreased skin test induration and tissue factor generation, showing that an intact coagulation mechanism appears to be important for the development of skin test induration in humans.<sup>20</sup>

The induction of high levels of plasminogen activators (PAs) in response to infection with mycobacteria has been documented.<sup>21</sup> Furthermore, studies on macrophages obtained from BCG infected animals showed that macrophage PAs could be specifically induced after infection with BCG.<sup>22,23</sup> It has also been shown that proteases of the fibrinolytic and coagulation systems are active in the pleural exudate in guinea pigs with pleurisy chronic inflammation induced by BCG,<sup>24</sup> and studies on leprosy in mouse models have suggested the involvement of PA and possibly their regulating factor in the granulomatous tissue reaction.<sup>25</sup> Additionally, fibrin formation has been associated with cell-mediated immune

\* Corresponding author. Tel.: +52 555 6223860; fax: +52 555 6223369.

E-mail address: [espitia@biomedicas.unam.mx](mailto:espitia@biomedicas.unam.mx) (C. Espitia).<sup>c</sup> Present address: Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico.

resistance to invasive bacilli in murine lepromas.<sup>21</sup> More recently, in Plg knockout mice infected with *Mycobacterium avium*, it was shown that Plg could have a role in the turnover of Extra Cellular Matrix proteins (ECM) in granulomas but has a limited effect in *M. avium* dissemination to the lungs.<sup>16</sup> Moreover, high levels of uPAR were found in tuberculosis patients and were associated with mortality.<sup>26</sup> Tuberculosis patients also had statistically significantly higher concentrations of Plm, Plg activator inhibitor (PAI) and Plg than other study groups.<sup>27</sup>

In this work, the expression of the fibrinolytic system molecules Plg/Plm, tPA and uPA was studied during experimental progressive pulmonary tuberculosis in BALB/c mice, as well as in *in vitro* studies with spleen cells from mice immunized with BCG. The results confirm previous observations that PAs can be specifically induced by infection with mycobacteria<sup>22</sup> and show that these molecules are present during the chronic phase of the disease, suggesting they are important contributors to the systemic inflammatory changes occurring during this stage of the disease.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental model of progressive pulmonary tuberculosis

Groups of 3 pathogen-free BALB/c male mice from 6 to 8 weeks of age were anesthetized with an intraperitoneal 56 mg/kg injection of pentothal. The trachea was exposed with a small mid-line incision, and  $2.5 \times 10^5$  UFC of *M. tuberculosis* H37Rv reference strain (ATCC, Rockville MD, USA) suspended in 100  $\mu$ l of phosphate-buffered saline (PBS) was inoculated intratracheally. Three experiments were performed, and all of the procedures were performed in a laminar flow cabinet in a biosafety level III facility. The mice were maintained in cages fitted with microisolators. The protocol was approved by the Ethical Committee for Experimentation in Animals of the Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán,” México.

### 2.2. Detection of plasminogen by immunohistochemistry

The mice were killed by exsanguination at 1, 3, 14, 21, 28, and 60 days post-infection (d.p.i). For the histological study, the left lungs were perfused for 24 h with 100% ethanol and embedded in paraffin. Cryostat sections (5  $\mu$ m thick) were obtained and mounted on silane-coated slides. For immunohistochemistry, the slides were deparaffinized, and the endogenous peroxidase was quenched with 0.03% of hydrogen peroxide in absolute methanol. After two washes with PBS-T (PBS containing 0.01% v/v Tween-20), any non-specific binding was blocked by incubating the slides with universal blocking solution (Valaner DOIX090980) diluted 1/50 in PBS-T containing 3% (w/v) BSA. After two washes with PBS-T, the slides were incubated with a goat polyclonal anti-Plg antibody (Santa Cruz Sc-15036) diluted 1/100 in PBS-T/3% BSA for 12 h at room temperature (RT). After washing with PBS-T, the bound antibodies were detected with a 1:200 dilution of an HRP-conjugated anti-goat antibody (Zymed 81-1620) by incubating for 30 min at RT. After the incubation, the slides were stained for peroxidase activity by adding 1 mg/ml of 3,3'-diaminobenzidine (Sigma D563) and 0.4% hydrogen peroxide in PBS and then counterstained with hematoxylin–eosin (HE). The slides were also Ziehl–Nielsen stained.

For the quantification of the immunohistochemical positive cells, five random fields of each pulmonary lobe were evaluated at a 200 $\times$  magnification. The cells were located and counted by a computerized image analyzer (Q Win Leica), and the data are expressed as the percentage of positive cells.

### 2.3. Detection of Plg/Plm in homogenized lung supernatants by Western blot and ELISA

The right lungs of the animals described above were homogenized with a Polytron (Kinematica, Luzern, Switzerland) in sterile tubes containing 3 ml of isotonic saline. After eliminating the cellular debris by centrifugation, the supernatant was filtered through a 0.22- $\mu$ m filter, and the protein concentration was determined by a Bradford assay. 20  $\mu$ g of protein from each homogenized lung supernatant was separated in a 12% polyacrylamide gel by electrophoresis. After transferring the proteins to PDVF membranes, they were blocked with PBS-T/3% BSA, washed with PBS-T and incubated for 1 h at RT with a 1/500 dilution of a goat polyclonal anti-Plg antibody (Santa Cruz Sc-15036) or a 1/1000 dilution of a rabbit anti-tPA antibody (Santa Cruz Sc-5239). After washing with PBS-T, the bound antibodies were detected with a 1/2000 dilution of an HRP-conjugated rabbit anti-goat antibody (Zymed 81-1620) or a 1/2000 dilution of HRP-conjugated Protein A 1/2000 (Zymed 10-1123), respectively, by incubation for 30 min at RT. The membranes were then stained for peroxidase activity as described above.

Then 10  $\mu$ g of protein from the homogenized lung supernatants was bound to ELISA plates (Nunc 439454) in carbonate buffer, pH 9.6, and the plates were incubated overnight (ON) at 37 °C. After 3 washes with PBS-T, any non-specific binding was blocked by incubation with PBS-T/3% BSA for 1 h at 37 °C, and the wells were then incubated for 1 h at RT with goat anti-Plg or rabbit anti-tPA antibodies. Subsequently, the wells were incubated for 30 min with an anti-goat-HRP or Protein A-HRP as described above. After extensive rinsing, the peroxidase activity was revealed with 1 mg/ml of O-phenylenediamine (Sigma P6662) and 0.4% hydrogen peroxide in PBS. The reaction was stopped with 3 N HCl, and the OD<sub>492nm</sub> was measured with an automatic microtiter plate reader (Thermo Labsystems).

### 2.4. Detection of plasmin and tPA activities in lung homogenates

Plm and tPA activities were determined by a chromogenic assay in microtiter plates (Costar 3590). 20  $\mu$ g of protein from lung homogenate supernatants was mixed with 1.5 mM of Chromozym PL (tosylglycyl-prolyl-lysine-4-nitranilide acetate; Roche Diagnostic) or Chromozym t-PA (N-Methylsulfonyl-D-Phe-Gly-Arg-4-nitranilide acetate) in PBS in a final volume of 200  $\mu$ l. The assay was performed in triplicate, and the protein activity was detected by measuring the OD<sub>405nm</sub> immediately after addition of the dye and then again every hour for 24 h at 37 °C.

The Plm concentration in the homogenized lungs was then determined by comparison to a standard curve established with commercial Plm (Roche 10 602 361 001) using concentrations that ranged from 6.25 to 1.25  $\mu$ g/ml of Plm under the conditions described above.

### 2.5. Real-time PCR expression analysis of molecules of the fibrinolytic system in lung

Groups of 3 pathogen-free BALB/c male mice from 6 to 8 weeks of age were infected with *M. tuberculosis* H37Rv, and the animals were sacrificed at the same time and in the same manner described above. Both lung lobes from all 3 mice in each group were used to isolate messenger RNA (mRNA) using an RNeasy Mini Kit (QIAGEN Mexico, Colima, Mexico) according to the recommendations of the manufacturer. The quality and quantity of RNA were evaluated with spectrophotometry (260/280) and electrophoresis on agarose gels. The reverse transcription of the mRNA was performed using 5  $\mu$ g of RNA and the Omniscript kit with oligo-dT (QIAGEN Mexico). The

real-time PCR was performed using a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a Quantitate SYBR Green Mastermix kit (Qiagen). Standard curves of quantified and diluted PCR product, as well as negative controls, were included in each PCR run. Specific primers were designed using the program PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems) for the following targets: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 50-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-30, 50-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-30; Plg: 50-GGATTCTGGCTTAGAGGCGTTCAG-30, 50-GTTCACCCACTAATAGGGACGTGA-30; tPA: 50-CTACAGAGCGACCTGCAGAGAT-30, 50-AA TACAGGGCCTGCTGACACGT-30; uPA: 50-ATGCAGCCCCACTACTATG GC-30, 50-GGTCTCCA GAATGCCCT-30.

The cycling conditions used were: initial denaturation at 95 °C for 15 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 20 s, 60 °C for 20 s, and 72 °C for 34 s. The quantities of the specific mRNA in the sample were measured according to the corresponding gene-specific standard. The mRNA copy number of each gene was normalized to the mRNA encoding the GAPDH gene. The mRNA of non-infected tissue was used as a control for all experiments in our BALB/c model.

## 2.6. Immunization of BALB/c mice with BCG

Six BALB/c male mice from 6 to 8 weeks of age were immunized subcutaneous with  $10^5$  UFC of *Mycobacterium bovis* BCG, and a control group was inoculated with PBS. After 14 days, the animals were killed by exsanguination, and the spleens were aseptically removed. The total spleen cells were purified and counted, and  $1.5 \times 10^6$  cells were added to the wells and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells were then incubated for 24 h with 10 µg of *M. tuberculosis* H37Rv Culture filtrate proteins (CF), which were obtained as described elsewhere.<sup>28</sup> Subsequently, the cells were centrifuged, the supernatant was separated and the protein concentration was determined.

## 2.7. Determination of plasmin activity in spleen cell supernatants

The Plm activity in the total spleen cell supernatants was determined in a chromogenic assay in microtiter plates (Costar 3590). 100 µg of cell supernatant protein was mixed with 1.5 mM of Chromozym PL (tosylglycyl-prolyl-lysine-4-nitrilide acetate; Roche Diagnostic) in PBS in a final volume of 200 µl. The assay was performed in triplicate, and the protein activity was detected by measuring the OD<sub>405nm</sub> with an automatic microtiter plate reader (Labsystems). The readings were taken during a 24 h time period at 37 °C.

## 2.8. Detection of Plg activators in spleen cell extracts by ELISA and western blot

20 µg of spleen cell extracts per well were bound to ELISA plates (Nunc 439454), and Plg activators were detected with goat polyclonal anti-uPA (M-20, Santa Cruz Biotech sc-4831) and anti-tPA antibodies as described before. Additionally, 50 µg of spleen cell culture medium supernatants were separated in 12% polyacrylamide gels by electrophoresis. After transferring the proteins to PDVF membranes, the detection of tPA and uPA with specific antibodies was carried out as described above.

## 2.9. Real-time PCR analysis of the expression of genes of the fibrinolytic system in tissue

The cell pellets obtained from the total spleen cells from 6 different mice in three different experiments were used to isolate messenger RNA (mRNA) using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN Mexico, Colima, Mexico) according to the recommendations of the manufacturer. The quality and quantity of RNA were evaluated

through spectrophotometry (260/280) and on agarose gels. The reverse transcription of the mRNA was performed using 5 µg of RNA and the Omniscript kit with oligo-dT (QIAGEN Mexico). The real-time PCR was performed using the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the Quantitect SYBR Green Mastermix kit (Qiagen) as described above.

## 2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using multiple ANOVA. All experiments were carried out in triplicate and the data are presented as the means ± SD. The asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Detection of plasmin/plasminogen and tPA in homogenized lungs

Plg and tPA were detected in the supernatants of homogenized lungs from infected animals by Western Blot (Figure 1A and C) and ELISA (Figure 1B and D). The level of both molecules increased as the infection progressed. The increase of Plg, as detected by ELISA, was noticeable on day 28, with an approximately 1.7-fold increase compared to day 21. This increase in Plg was statistically significant beginning on day 21 compared to the levels on prior days (Figure 1B). In the case of tPA, a considerable increase in the protein level was observed beginning 14 d.p.i. The peak in tPA expression was observed on day 28, at which time the level of tPA was 12-fold higher compared to that of control animals (Figure 1D). These results are in agreement with those for the enzymatic activities for both Plm and tPA, which increased significantly beginning on day 14 and peaked on day 28. (Figure 2A and B).

The presence of Plg/Plm in tissues was also confirmed by immunohistochemistry. During the first few days after infection, a slight inflammatory infiltrate was observed in the lung (not shown). Two weeks after infection, the lung tissue showed small granulomas (Figure 3B). On day 21 and 28, the granulomas increased in size (Figure 3C). Two months after infection, the presence of extensive granulomas could be observed (Figure 3D). Plg/Plm was detected by immunohistochemistry beginning on day 14, coinciding with the presence of the cellular inflammatory infiltrate, which increased during the subsequent days of infection (Figure 3). The percentage of positive cells and their increase beginning on day 14 are shown in Figure 3E. The maximum number of positive cells was reached after 28 d.p.i.

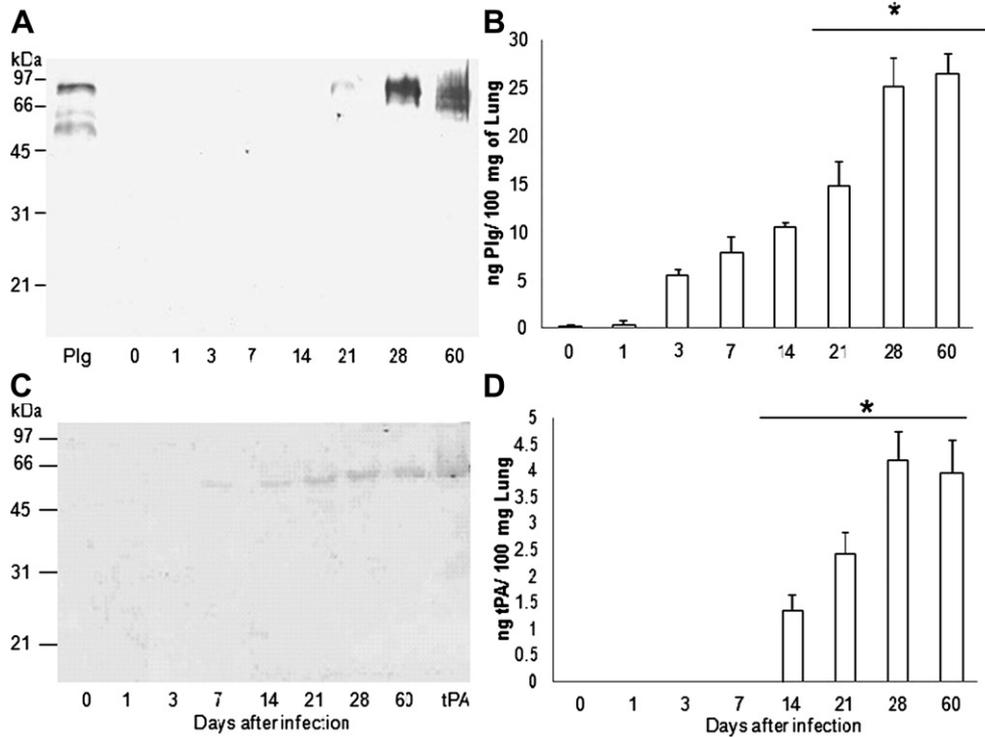
As shown in Figure 4A, extended areas of pneumonia with numerous inflammatory cells, which showed strong Plg immunostaining, could be observed on day 60 (Figure 4B). Interestingly, the Plg labeling was located mainly in the foamy macrophages associated with the acid-fast stained bacilli (Figure 4B and D).

### 3.2. Real-time PCR analysis of fibrinolytic system expression in infected tissue

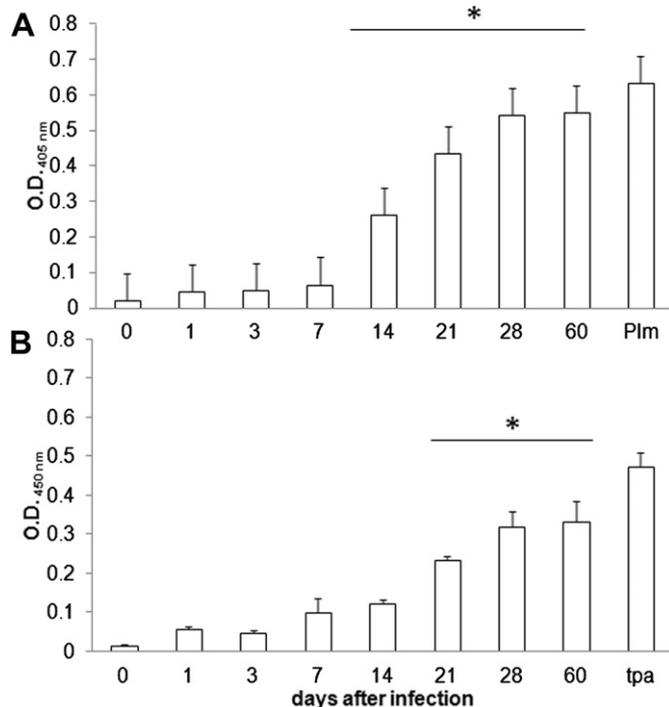
Plg, uPA and tPA mRNA expression was also measured. It was found that Plg and tPA mRNA increased beginning on day 21, which was the peak of tPA expression (Figure 5A). In contrast, Plg reached maximal expression on day 60 (Figure 5B). uPA mRNA expression started on day 14 and reached the highest level on day 60 (Figure 5C). It is important to note that in all the cases, the level of mRNA for PAs increased in accordance with the disease severity.

### 3.3. Measurement of Plm activity

The total spleen cells from mice immunized with BCG were stimulated with CF proteins from *M. tuberculosis* to measure Plm



**Figure 1.** Detection of Plg/Plm and tPA in homogenized infected lungs by Western blot and ELISA. Plg/Plm detection was carried out with anti-Plg polyclonal antibody by Western blot (A) and ELISA (B). tPA presence was detected with an anti-tPA polyclonal antibody (C and D). ELISA was carried out in triplicate and the data are presented as the means  $\pm$  SD. Asterisks represent statistical significance ( $p < 0.05$ ) when compared with not infected mice.



**Figure 2.** Enzymatic activity of Plm (A) and tPA (B), as measured by the respective chromogenic substrates. The enzymatic activity in homogenized infected lungs was measured at different times post-infection. The enzyme activity assay was carried out in triplicate, and a representative experiment with the data presented as the means  $\pm$  the SD is shown. The asterisks indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) when compared with non-infected mice.

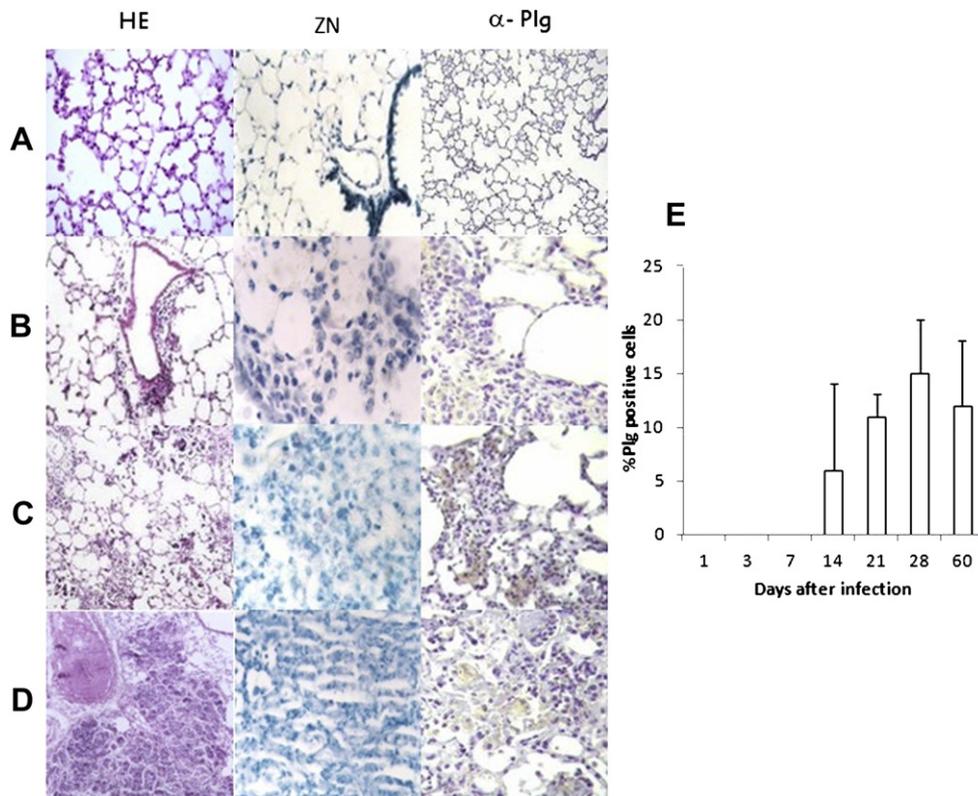
production in response to mycobacterium infection. We found that the production of Plm by the spleen cells was significantly increased by adding CF proteins from *M. tuberculosis* to spleen cells from BCG-immunized mice in the presence of Plg. There was a significant increase in Plm activation in cells from the immunized animals compared those from the non-immunized controls (Figure 6), clearly demonstrating the presence of the PA activator(s) that induce the activation of Plg to Plm.

#### 3.4. Identification of Plg activators produced in response to mycobacteria proteins

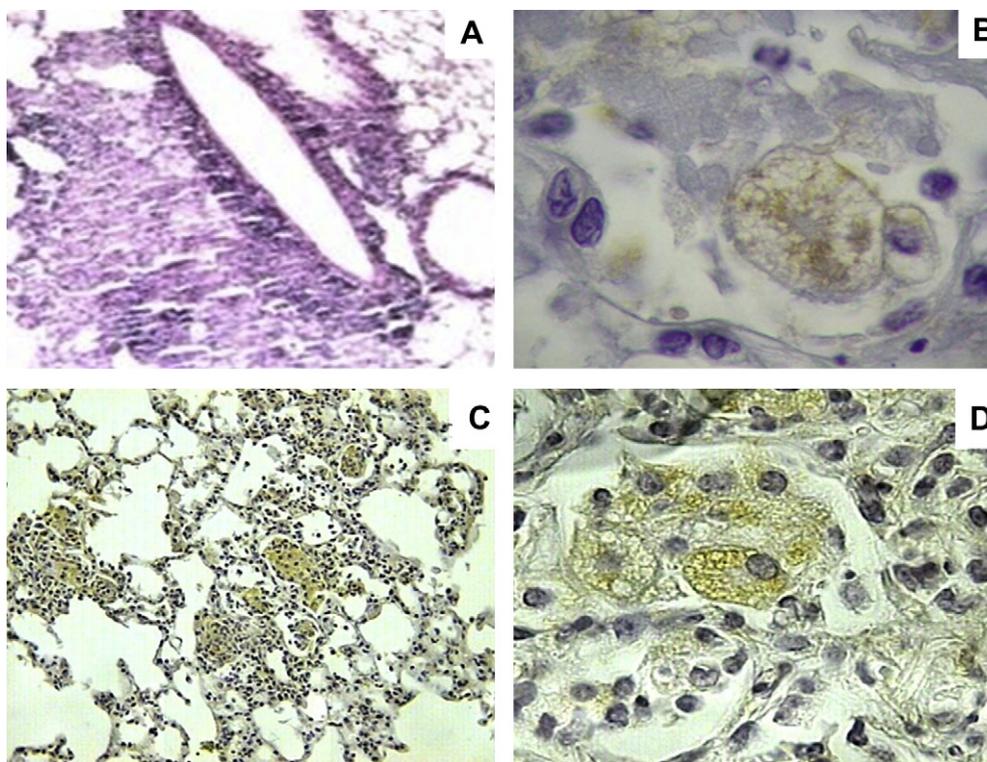
To identify the Plg activators responsible for the detected Plm activity, spleen cell extracts from BCG-sensitized and control mice were used to measure uPA and tPA mRNA expression with Real-time PCR and uPA and tPA protein expression with ELISA and Western blot assays. An increase in the production of mRNA for both Plg activators was observed in spleen cell extracts from the mice immunized with BCG (Figure 7). However, statistically significant differences with regard to PBS controls were observed for both activators only on extracts from cells stimulated with *M. tuberculosis* CF. Both ELISAs and Western blots showed positive results with uPA and tPA antibodies (Figure 8A). On the Western blot, a positive band of 28 kDa was revealed with the anti-uPA antibody, and a band of 70 kDa was observed with the tPA antibody (Figure 8B). Because the molecular mass predicted for uPA is 48.5 kDa, the 28-kDa product could correspond to a degradation product.

#### 4. Discussion

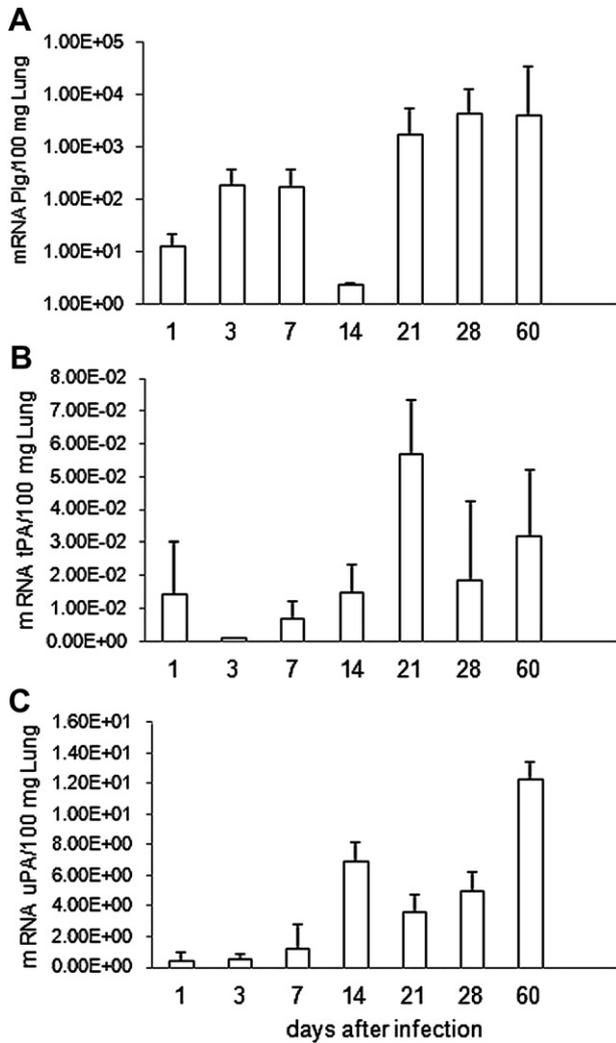
The factors that regulate the course and outcome of *M. tuberculosis* infection are multifaceted and involve a complex interplay between the host immune system and the survival strategies employed by the bacilli.<sup>8</sup> In recent years, several studies



**Figure 3.** Histological and immunohistochemical features in lungs from non-infected BALB/c mice (A) and 14 (B), 28 (C) and 60 (D) days after intratracheal infection with the virulent *M. tuberculosis* strain H37Rv (10 $\times$ ). Two weeks after infection, an inflammatory infiltrate was observed (HE-B) which stained positive for bacilli and Plg, was evident ( $\alpha$ Plg-B). Granulomas were present 28 days after infection (HE-C). The number of bacilli (ZN-C) and Plg-labeled cells increased as the infection progressed ( $\alpha$ Plg-C). Two months after infection, extensive granuloma and pneumonic areas (HE-D) with bacilli (ZN-D) and strong staining for Plg were detected ( $\alpha$ Plg-D). The quantification of immunohistochemical positive cells from random fields of each pulmonary lobe was performed at a 200 $\times$  magnification, and the data are expressed as the percentage of positive cells (E).



**Figure 4.** Representative histological and immunohistochemical features of the lungs of BALB/c mice 60 days after intratracheal infection with the virulent *M. tuberculosis* strain H37Rv. (A) Extensive areas are affected by pneumonia (10 $\times$ ). (B) In these pneumonic areas, there are vacuolated macrophages with acid-fast stained bacilli (200 $\times$ ). (C) Numerous inflammatory cells in the pneumonic areas show strong Plg immunostaining (10 $\times$ ). (D) A high resolution micrograph of the pneumonia shows vacuolated macrophages with strong, specific Plg immunostaining (100 $\times$ ).

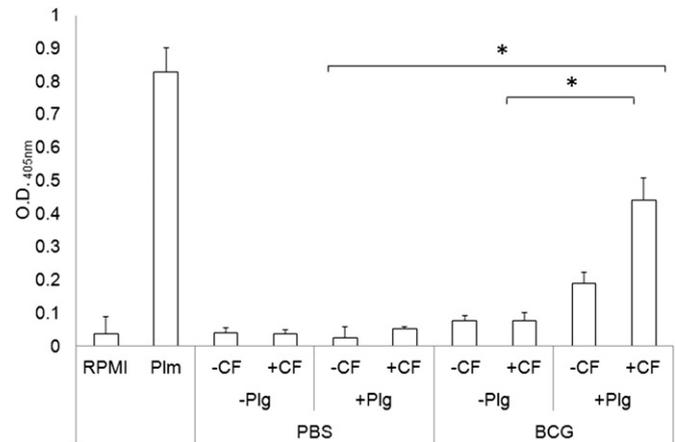


**Figure 5.** Gene expression of Plg (A), tPA (B) and uPA (C) determined by real time RT-PCR of the infected lungs. BALB/c mice were infected with *M. tuberculosis*. The lungs from three different animals for each time point were used to determine the gene expression levels. The mRNA expression was measured in triplicate, and a representative experiment with the data presented as the means  $\pm$  SD is shown.

have suggested important roles for the fibrinolytic system in bacterial pathogenesis. Many prokaryotic cells bind Plg in a specific, saturable manner. When Plg is bound via its lysine binding sites to cell surface proteins with exposed lysines, its activation to Plm is accelerated, and cell-bound Plm is protected from inactivation by natural inhibitors. Plm mediates direct or indirect degradation of the ECM, and bound Plm is used by cells to facilitate migration through host tissues.<sup>6,29–31</sup> For instance, it has been shown that *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* are able to invade brain microvascular endothelial cells by a plasmin-dependent mechanism *in vitro*, promoting virulence by means of Plm/Plg acquisition.<sup>5,9</sup>

Some pathogenic bacteria also use the Plg/Plm system to avoid the innate immune response. The recruitment of Plg by *Bacillus anthracis* and *Leptospira interrogans* diminishes the opsonization process.<sup>12,13</sup>

The expression of uPA has also been associated with the inflammatory response in different diseases. In a recent study, it was shown that uPAR was crucially involved in the host defense against sepsis caused by *Burkholderia pseudomallei* by facilitating the migration of neutrophils toward the primary site of infection and, subsequently, facilitating microorganism phagocytosis.<sup>32</sup>

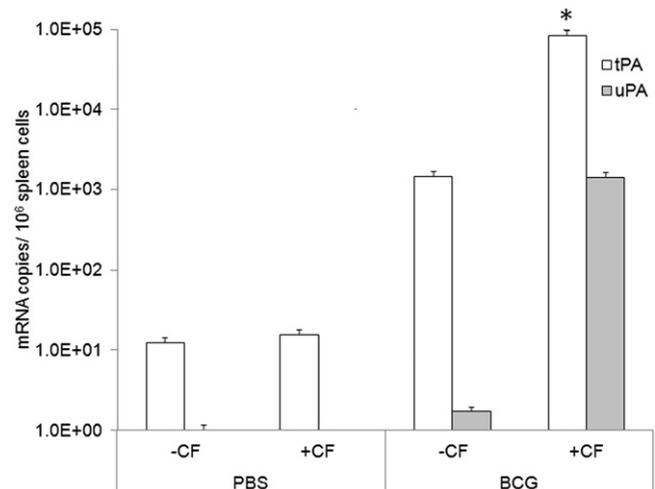


**Figure 6.** Plasmin production was induced after BCG infection. The Plm activity in the supernatants from spleen cells from BCG-immunized and non-immunized mice, which were stimulated with *M. tuberculosis* culture filtrate (CF) or not, was determined. The experiment was independently performed 3 times, and the asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ).

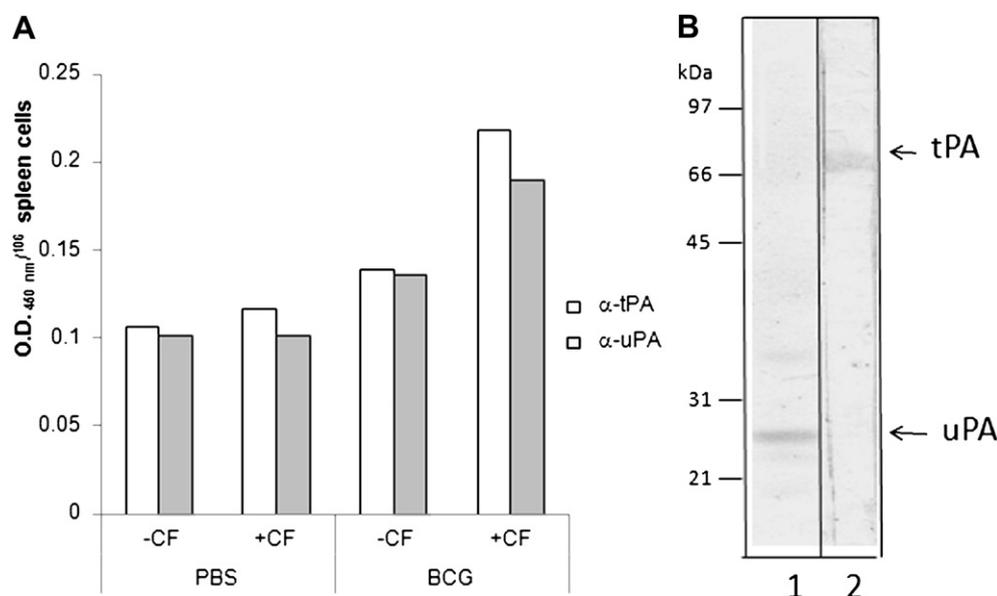
Similarly, *Helicobacter pylori* induced uPAR expression and stimulated cell invasiveness in human gastric cancer cells.<sup>5</sup> Additionally, proteins from *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus pyogenes* induced the up-regulation of both membrane and soluble uPAR by monocytes *in vitro*,<sup>33</sup> and *Staphylococcus aureus* induced a 3- to 10-fold increase in uPA activity in mammary cells.<sup>34</sup>

Elevated soluble uPAR in patients with *S. aureus* and *Streptococcus pneumoniae* bacteremia predicts mortality.<sup>35,36</sup> In addition, an important association between soluble uPAR and acute malaria infection in humans has been reported.<sup>37</sup>

In *M. tuberculosis*, the first evidence of the presence of PlgR and PAs was reported by Monroy et al., 2000.<sup>18</sup> Subsequently, the identity of some of the *M. tuberculosis* Plg-binding proteins was revealed, and it was also demonstrated that Plg bound to mycobacterial receptors is converted into Plm by tPA.<sup>19</sup> *In vivo* studies performed by infecting mice individually deficient for Plg, tPA uPA and uPAR with *M. avium*, along with wild-type control mice, showed that Plm/Plg could play a role in the turnover of ECM within granulomas, suggesting it has a limiting effect on the early dissemination of bacteria from the lungs. Thus, Plm/Plg limits progressive fibrosis in the granuloma during a chronic mycobacterial infection.<sup>16</sup>



**Figure 7.** Gene expression of tPA (A) and uPA (B) determined by real time RT-PCR in spleen cell extracts from BCG-immunized mice. The results are expressed as the mean from three different experiments. The cells were stimulated with *M. tuberculosis* culture filtrate proteins (CF) or PBS as a control.



**Figure 8.** Detection of tPA and uPA by ELISA (A) and Western blot (B) from spleen cell extracts obtained after stimulation with *M. tuberculosis* culture filtrate (CF) proteins. The assays were performed with anti-tPA and anti-uPA polyclonal antibodies. The ELISA was performed in triplicate, and a representative experiment with the data presented as the means  $\pm$  SD is shown. The Western blot was carried out on the total protein from spleen cells, and uPA (line 1) and tPA (line 2) were detected with polyclonal antibodies.

Similar to other diseases, uPA has been associated with tuberculosis. High expression of uPAR was detected in monocytes obtained from subjects with active tuberculosis.<sup>5</sup> Soluble uPAR levels in the serum of patients with tuberculosis were predictive of mortality and corrected upon treatment.<sup>26</sup> In one study, it was found that the expression of uPAR was increased to more than double in patients with extrapulmonary tuberculosis compared to the levels of uPAR previously reported with pulmonary tuberculosis.<sup>38</sup>

All of these observations provide evidence that mycobacteria can interact with the fibrinolytic system; however, little is known about the biological significance of this interaction in an *M. tuberculosis* infection. The aim of this work was to analyze the expression of molecules from the fibrinolytic system in a model of progressive tuberculosis in mice. In this model, two phases of the disease can be observed, beginning with an acute phase characterized by an inflammatory infiltration into the alveolar-capillary interstitium and blood vessel and bronchial walls with the formation of granulomas and a high percentage of interleukin-2 (IL-2) positive cells, as well as a gradual increase in interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) mRNA levels. On day 28, this phase is followed by a chronic or advanced phase characterized by pneumonia, focal necrosis and fibrosis and IL-4 positive cells in the lung lesions.<sup>39</sup> Interestingly, in the present work, it was found that the highest expression of some fibrinolytic system molecules occurs only during the last phase of the disease. It is worth noting that the chronic phase of *M. tuberculosis* infection in mouse and guinea pigs experimental models is characterized by the accumulation of foamy macrophages (FM), which are the cells exhibiting a strong accumulation of Plg on day 60 of the infection in this work. Interestingly, studies on FMs have shown that lipid bodies are present in macrophages at the beginning of infection and accumulate in the chronic phase. The accumulation of lipid bodies in this case was defined by their progressive capacity to generate cholesterol crystals, a process that resembles atherosclerotic atheroma plaque formation,<sup>40</sup> which has itself been defined as a chronic inflammatory process.<sup>41,42</sup> In addition, it is now known that fibrinolytic activity is up-regulated in atherosclerotic lesions. Plm generated at sites of atherosclerotic lesions will trigger cytokine expression in human macrophages, including TNF- $\alpha$  and IL-6.<sup>29</sup> The activation clearly depends on the proteolytic activity of Plm, which

cleaves the A2 subunit of annexin A2. In mice, IL-6 participates in macrophage lipid uptake by increasing the expression of CD36.<sup>21</sup> Additionally, uPA stimulates cholesterol biosynthesis in macrophages, contributing to the progression of atherosclerosis.<sup>43</sup>

Taking these observations together, it can be hypothesized that the up regulation of the fibrinolytic system that occurs in atheroma formation could play an integral role in the chronic inflammatory response observed in tuberculosis. According to our own results, *M. tuberculosis* induces high levels of expression of Plg/Plm, uPA and tPA in the lungs of infected animals, and the expression of the latter two molecules could be specifically induced by mycobacterial antigens, which was demonstrated in this work with splenocytes derived of BCG-sensitized animals that specifically produced both molecules in response to mycobacterial protein antigens. In addition, the bacterium has the capacity to recruit Plg to the cell surface, which could be converted into Plm by a host-derived activator. In this manner, the pathogen itself could play a pivotal role in the induction of these molecules at the site of infection during the inflammatory response and related tissue damage, suggesting an important role for the fibrinolytic system in the pathogenesis of tuberculosis.

#### Acknowledgments

We thank Cristina Parada for her technical assistance. This work was supported by grants CONACyT No 81214 and DGPA IN221107 from the Universidad Nacional Autonoma de México.

**Funding:** None.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

#### References

- Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost* 1999; **82**:259–70.
- Attali C, Durmort C, Vernet T, Di Guilmi AM. The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and

- epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun* 2008;**76**:5350–6.
3. Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for the enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* 1997;**89**:1111–9.
  4. Jong AY, Chen SH, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* 2003;**52**:615–22.
  5. Juffermans NP, Dekkers PE, Verbon A, Speelman P, van Deventer SJ, van der Poll T. Concurrent up-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and CD11b during tuberculosis and experimental endotoxemia. *Infect Immun* 2001;**69**:5182–5.
  6. Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. *Methods* 2000;**21**:125–32.
  7. Lottenberg R. A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol* 1997;**5**:466–7.
  8. Mischenko V, Kapina M, Eruslanov E, Kondratieva E, Lyadova I, Young D, Apt A. Mycobacterial dissemination and cellular responses after 1-lobe restricted tuberculosis infection of genetically susceptible and resistant mice. *J Infect Dis* 2004;**190**:2137–45.
  9. Stie J, Fox D. Blood–brain barrier invasion by *Cryptococcus neoformans* is enhanced by functional interactions with plasmin. *Microbiology* 2012;**158**:240–58.
  10. Lähteenmäki K, Edelman S, Korhonen TK. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol* 2005;**13**:79–85.
  11. Magalhães V, Veiga-Malta I, Almeida MR, Baptista M, Ribeiro A, Trieu-Cuot P, Ferreira P. Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in *Streptococcus agalactiae* and enhances its virulence in a mouse model. *Microbes Infect* 2007;**9**:1276–84.
  12. Chung MC, Tonry JH, Narayanan A, Manes NP, Mackie RS, Gutting B, Mukherjee DV, Popova TG, Kashanchi F, Bailey CL, Popov SG. *Bacillus anthracis* interacts with plasmin(ogen) to evade C3b-dependent innate immunity. *PLoS One* 2011;**6**:e18119.
  13. Vieira ML, de Moraes ZM, Vasconcelos SA, Romero EC, Nascimento AL. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. *Microb Pathog* 2011;**51**:360–5.
  14. Bergmann S, Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost* 2007;**9**:512–20.
  15. Degen JL, Bugge TH, Goguen JD. Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *Thromb Haemost* 1997;(Suppl. 1):24–31.
  16. Sato J, Schorey J, Ploplis VA, Haalboom E, Krahule L, Castellino FJ. The fibrinolytic system in dissemination and matrix protein deposition during a mycobacterium infection. *Am J Pathol* 2003;**163**:517–31.
  17. Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T, Aviram M. Uptake of oxidized LDL: a possible role for interleukin-angiostatin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized LDL: a possible role for interleukin-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**:1464–9.
  18. Monroy V, Amador A, Ruiz B, Ezpinosa-Cueto P, Xolalpa W, Mancilla R, Espitia C. Binding and activation of human plasminogen by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000;**68**:4327–30.
  19. Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 2007;**7**:3332–41.
  20. Edwards RL, Rickles FR. Delayed hypersensitivity in man: effects of systemic anticoagulation. *Science* 1978;**200**:541–3.
  21. Satoh M, Izaki S, Kon S, Izaki M. Fibrin and collagen deposition and fibroblasts proliferation in granuloma of murine leprosy. Comparison of two mouse strains with different immune reactions. *Experientia* 1983;**39**:899–902.
  22. Gordon S, Cohn ZA. Bacille Calmette–Guerin infection in the mouse. Regulation of macrophage plasminogen activator by T lymphocytes and specific antigen. *J Exp Med* 1978;**147**:1175–88.
  23. Schuyler M, Forman W. Alveolar macrophage plasminogen activator. *Exp Lung Res* 1984;**6**:159–69.
  24. Widström O, Egberg N, Chmielewska J, Blombäck M. Fibrinolytic and coagulation mechanisms in stages of inflammation: a study of BCG-induced pleural exudate in guinea pig. *Thromb Res* 1983;**29**:511–9.
  25. Izaki S, Iwasaki Y, Satoh M, Hibino T, Kon S, Izaki M. Comparative study with two polar types of murine leprosy: an involvement of plasminogen activator and its possible regulating factor in the granulomatous tissue reaction. *J Invest Dermatol* 1983;**80**:81–5.
  26. Eugen-Olsen J, Gustafson P, Sidenius N, Fischer TK, Parner J, Aaby P, Gomes VF, Lisse I. The serum level of soluble urokinase receptor is elevated in tuberculosis patients and predicts mortality during treatment: a community study from Guinea-Bissau. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;**6**:686–92.
  27. Lu XG, Mao JS, Tong JF, Zhu L, Liu J, Gong XB, Huang J. Fibrinolytic characteristics and their significance in malignant, tuberculous and cirrhotic pleural and ascitic fluids. *Int J Lab Hematol* 2007;**29**:132–8.
  28. Espitia C, Cervera I, González R, Mancilla R. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol* 1989;**77**:373–7.
  29. Kim MH, Yoo HS, Kim MY, Jang HJ, Baek MK, Kim HR, Kim KK, Shin BA, Ahn BW, Jung YD. *Helicobacter pylori* stimulates urokinase plasminogen activator receptor expression and cell invasiveness through reactive oxygen species and NF-kappa B signaling in human gastric carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2007;**19**:689–97.
  30. Li Q, Laumonier Y, Syrovets T, Simmet T. Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:1383–9.
  31. Lottenberg R, Wenz D, Boyle MDP. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol* 1994;**2**:20–4.
  32. Wiersinga WJ, Kager LM, Hovius JW, van der Windt GJ, de Vos AF, Meijers JC, Roelofs JJ, Dondorp A, Levi M, Day NP, Peacock SJ, van der Poll T. Urokinase receptor is necessary for bacterial defense against pneumonia-derived septic melioidosis by facilitating phagocytosis. *J Immunol* 2010;**184**:3079–86.
  33. Coleman JL, Gebbia JA, Benach JL. *Borrelia burgdorferi* and other bacterial products induce expression and release of the urokinase receptor (CD87). *J Immunol* 2001;**166**:473–80.
  34. Zavizion B, White JH, Bramley AJ. *Staphylococcus aureus* stimulates urokinase-type plasminogen activator expression by bovine mammary cells. *J Infect Dis* 1997;**176**:1637–40.
  35. Mølkänen T, Ruotsalainen E, Thorball CW, Järvinen A. Elevated soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) predicts mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;**30**:1417–24.
  36. Wittenhagen P, Kronborg G, Weis N, Nielsen H, Obel N, Pedersen SS, Eugen-Olsen J. The plasma level of soluble urokinase receptor is elevated in patients with *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia and predicts mortality. *Clin Microbiol Infect* 2004;**10**:409–15.
  37. Perch M, Kofoed P, Fischer TK, Cof F, Rombo L, Aaby P, Eugen-Olsen J. Serum levels of soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with parasitemia in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria infection. *Parasite Immunol* 2004;**26**:207–11.
  38. Ostrowski SR, Ravn P, Hoyer-Hansen G, Ullum H, Andersen AB. Elevated levels of soluble urokinase receptor in serum from mycobacteria infected patients: still looking for a marker of treatment efficacy. *Scand J Infect Dis* 2006;**38**:1028–32.
  39. Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasco C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996;**89**:26–33.
  40. Cáceres N, Tapia G, Ojanguren I, Altare F, Gil O, Pinto S, Vilaplana C, Cardona PJ. Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis (Edinb)* 2009;**89**:175–82.
  41. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115–26.
  42. Parry MA, Zhang XC, Bode I. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115–26.
  43. Fuhrman B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012;**222**:8–14.