



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto inmunomodulador de la Loperamida en macrófagos
humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

OMAR CORTÉZ HERNÁNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021**



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.

Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Cortéz

Hernández

Omar

55 45 12 91 43

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

412015663

2. Datos del tutor

Dra.

Esmeralda

Juárez

Carvajal

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Martha

Torres

Rojas

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

5. Datos del sinodal 3

Dr.

José Ángel Guadalupe

Gutiérrez

Pabello

6. Datos del sinodal 4

Dra.

María Teresa

Herrera

Barrios

7. Datos del trabajo escrito

Efecto inmunomodulador de la Loperamida en macrófagos humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*.

56p.

2021

Dedicatoria

A mis padres, Lucía y Víctor, a mis hermanos, Iván y Bicha, quienes siempre me han apoyado para poder concluir esta meta y han estado en esos momentos difíciles para mí. Este logro es de ustedes.

A Gaby, por todo el cariño que me has regalado, la paciencia y el apoyo durante tantos años. Me motivaste a seguir y eso lo agradeceré siempre.

A mis abuelos.

A mis mejores amigos.

A mis mascotas (Cuca, Oso y Woody).

Para mis amigos que se han marchado y me dejaron grandes recuerdos y enseñanzas.

Agradecimientos personales

A mis amigos del INER: Andy, Renato, Francisco, Zyanya, Arely, Paola, Karla, Víctor, Manuel, Nané, Nancy, Laurita, Rosita y Fer.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias: Hilda, Betsy, Lalo, Fer, Pactli, Jorge, Laura, Oralia, Rocío, Alejandro y Joshua.

A grandes maestros de la Facultad de Ciencias que me enseñaron la nobleza de la ciencia y que ésta es para todos: Jorge Luis López Zepeda, Elizabeth Castillo Villanueva, Julieta Fierro, Antonio Lazcano.

A mis maestros y ahora grandes amigos del CETis #2: Lilia Raya, José Refugio y Edith Barrera.

A las y los investigadores del INER por todas sus enseñanzas y su amistad, Dra. Martha Torres, Dra. Yolanda González, Dra. Silvia, Dra. Tere, Dra. Esme, M. en C. Claudia Carranza, Dr. Eduardo Sada, M. en C. Fernando Hernández, Q. Carmelita y QFB. Manuel Salgado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, mi segundo hogar.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y al Departamento de Investigación en Microbiología por albergarme durante el desarrollo de este trabajo.

Finalmente, pero no menos importante, a mi tutora, la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal, por su apoyo infinito para realizar este trabajo, por sus palabras de aliento cuando las necesité y la confianza que depositó en mí.

Agradecimientos académicos

A mis sinodales:

Dra. Martha Torres Rojas

Dra. María Teresa Herrera Barrios

Dr. José Ángel Guadalupe Gutiérrez Pabello

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Por su tiempo y comentarios para mejorar este trabajo.

A mi tutora:

Dra. Esmeralda Juárez Carvajal

Por su disposición, apoyo y enseñanza.

Al Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez

Por su ayuda y proporcionarme el material complementario para el desarrollo experimental.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
RESUMEN	4
Antecedentes	6
INTRODUCCIÓN	8
- Epidemiología y patogénesis de la Tuberculosis	8
- Monocito/macrófago	10
- Inflamación	13
- El macrófago como blanco terapéutico	14
- Inmunomoduladores	20
- Loperamida	25
- Posibles efectos adversos de los inmunomoduladores	26
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	
- Objetivo general	28
- Objetivos particulares	28
METODOLOGÍA	
- Población de estudio y material biológico	29
- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	29
- Obtención de monocitos por perlas magnéticas (Miltenyi)	30

- Diferenciación de monocitos a macrófagos ----- 30
- Preparación de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para la infección *in vitro*. ----- 31
- Infección *in vitro* de MDMs y tratamiento con Loperamida ----- 32
- Obtención de sobrenadantes y lisados de macrófagos ----- 32
- Purificación de RNA total ----- 33
- Síntesis de DNA complementario a partir de RNA ----- 34
- Expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR) ----- 34
- Cuantificación de TNF- α por ELISA ----- 36
- Cuantificación de IL-10 por ELISA ----- 37
- Determinación de citocinas múltiple (Luminex) ----- 38
- Análisis estadístico ----- 39

RESULTADOS

- Efecto de la Loperamida sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias ----- 40
- Efecto de la Loperamida sobre la producción de citocinas anti-inflamatorias ----- 44
- Modulación de citocinas por la Loperamida en células no infectadas ----- 45
- Efecto de la Loperamida sobre citocinas producidas por linfocitos ----- 46

DISCUSIÓN ----- 48

CONCLUSIÓN ----- 50

REFERENCIAS ----- 51

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

CCL: ligandos de quimiocina

cDNA: DNA complementario

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELISA: ensayo inmunoenzimático

GM-CSF: factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos

IFN- γ : interferón gamma

IL: interleucina

LPS: lipopolisacárido

MDM: macrófagos diferenciados de monocitos

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MOI: multiplicidad de infección

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

M1: macrófago tipo pro-inflamatorio

M2: macrófago tipo antiinflamatorio

NK: células asesinas naturales (natural killer)

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PRR: receptores de reconocimiento de patógenos

RNA: ácido ribonucleico

TLR: receptor de tipo toll (toll like receptors)

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Los macrófagos de los diferentes tejidos del cuerpo	11
Figura 2: Fenotipo de los macrófagos	13
Figura 3: Descripción gráfica del bloqueo del receptor scavenger MARCO mediante anticuerpos monoclonales anti-MARCO	17
Figura 4: Efecto de la Loperamida en macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i>	20
Figura 5: La Loperamida regula la producción y transcripción de mediadores proinflamatorios	42
Figura 6: La Loperamida modula la producción de GM-CSF	43
Figura 7: La Loperamida modula la expresión de IL-10 tanto a nivel de proteína como de mensajero	44
Figura 8: Inducción de IL-13 en MDMs infectados y tratados	45
Figura 9: Controles del experimento (Medio, Loperamida y LPS)	46
Figura 10: Pureza de MDMs y producción de citocinas de origen linfocitario	47

RESUMEN

Efecto inmunomodulador de la Loperamida en macrófagos humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por el bacilo intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que principalmente afecta los pulmones y los macrófagos alveolares. Actualmente, el control de la infección por Mtb se centra en antibióticos específicos y trae consigo un tratamiento prolongado y tóxico en algunos casos. La regulación de la producción de citocinas proinflamatorias es primordial en el proceso de la enfermedad, ya que puede inducir un estado hiperinflamatorio que se asocia con daño tisular y la patogénesis de la TB. El uso de inmunomoduladores se ha sugerido para mejorar los esquemas terapéuticos, ya que de manera indirecta pueden controlar una infección activando efectos bactericidas en células del huésped como los macrófagos. Recientemente se ha observado que la Loperamida mejora el control de Mtb en macrófagos humanos y murinos a través de un mecanismo microbicida denominado autofagia, además de que se acompaña con una reducción en la producción de TNF- α .

La Loperamida es un fármaco antidiarreico que tiene potencial para ser utilizado como adyuvante en el tratamiento de la TB. Se desconoce su papel en la respuesta inmune y si su efecto se asocia a un mecanismo inmunomodulador para determinar su posible uso como tratamiento adyuvante.

En este trabajo se evaluó la capacidad de la Loperamida para regular el microambiente de citocinas y el perfil inflamatorio del macrófago en respuesta a Mtb.

Se utilizaron macrófagos derivados de monocitos (MDMs) que fueron infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y se incubaron durante 24 horas en presencia o ausencia de Loperamida y LPS. Se colectaron los sobrenadantes para medir la producción de citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-13, TNF- α , INF- γ y GM-CSF mediante ELISA y determinación de citocinas múltiple (Luminex), además, se lisaron las células para extraer RNA, se sintetizó cDNA y se midió la expresión génica de IL-1 β , IL-10 y TNF- α por PCR en tiempo real. Se encontró que la Loperamida modifica el microambiente de citocinas respecto a la infección sin tratamiento, IL-1 β e IL-10 aumentaron significativamente tanto a nivel proteico como transcripcional. El TNF- α disminuyó significativamente a nivel proteico y transcripcional. Se encontró un aumento a nivel proteico de IL-6 y GM-CSF. En IL-2, IL-4, IL-8, IL-12p40, IL-13 e INF- γ no se encontraron diferencias en células tratadas comparado con la infección sin tratamiento. En conclusión, la Loperamida tiene actividad como inmunomodulador y es un buen candidato a ser evaluado como adyuvante en el tratamiento de la TB.

Antecedentes

El sistema inmunitario ha evolucionado con el fin de proteger a los organismos multicelulares contra invasores pequeños tan diversos como los virus y bacterias, y tan grandes como los gusanos parásitos. Enfrentar esta diversidad de patógenos requiere de una gama de mecanismos de reconocimiento y destrucción; para lograr esto, los vertebrados tienen una red compleja y dinámica de células, moléculas y vías para eliminar a los agentes patógenos (Owen *et al.*, 2013). En 1796 se inició de manera formal el estudio de lo que hoy llamamos inmunología cuando un médico de origen inglés llamado Edward Jenner aplicó a un niño de 8 años derivados de lesiones ulcerosas de vacas infectadas con el virus de la viruela, con ello se logró prevenir dicha enfermedad en el hombre (Owen *et al.*, 2013 y Salinas, 2010).



Edward Jenner (1749 - 1823). Retrato por John Raphael Smith. Reproducido por la Yale University, Harvey Cushing/John Hay Whitney Medical Library (Obtenido de Murphy *et al.*, 2008).

La defensa contra microorganismos tiene lugar en reacciones correspondientes a la inmunidad innata y respuestas posteriores por la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata se basa en la capacidad que tiene para discriminar entre estructuras propias y no propias del organismo o estructuras propias dañadas. Está constituida por mecanismos de defensa celular, bioquímicos y de barrera ya instaurados incluso antes de una infección. Estos mecanismos responden básicamente de la misma forma cada vez que se repite la infección. Los componentes principales de la inmunidad innata son los siguientes: 1) barreras físicas y químicas, como la piel y el pH, sustancias antimicrobianas como la Lisosima o las β -Defensinas (Rivas *et al*, 2006); 2) células fagocíticas como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos asesinos naturales [NK]; 3) proteínas en sangre, como los factores del complemento y mediadores de la inflamación como la histamina y la serotonina; y 4) citocinas, que tienen la función de regular y coordinar muchas actividades celulares encargadas de la inmunidad innata (Abbas *et al.*, 2015).

Por otra parte, la inmunidad adaptativa se inicia poco después que la inmunidad innata para eliminar los patógenos. Ésta tiene dos grandes estirpes de respuesta, la primera llamada inmunidad humoral que consiste en moléculas, denominadas anticuerpos, presentes en sangre producidas por los linfocitos B o células plasmáticas. La segunda, llamada inmunidad celular, que corre a cargo de los linfocitos T que fomentan la destrucción de microorganismos intracelulares para suprimir reservorios de la infección (Murphy *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2015).

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología y patogénesis de la Tuberculosis.

La Tuberculosis (TB) es causada principalmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), perteneciente al género *Mycobacterium*, un patógeno intracelular obligado que se divide de manera lenta, aproximadamente cada 18-20 horas, aerobio, grampositivo, con una pared rica en lípidos y que principalmente afecta al macrófago (González J., 2014).

En la actualidad, la TB sigue siendo una enfermedad infecciosa mortal. (Bekale *et al.*, 2018). En 2018, cerca de 10 millones de personas en el mundo enfermaron de tuberculosis y hubo 1,5 millones de muertes por esta enfermedad (WHO. Global tuberculosis report, 2019).

Los esquemas actuales de tratamiento son intensivos; una ingesta diaria de antibióticos de primera línea por al menos 6 meses para lograr la cura, aunque en algunos casos Mtb se ha vuelto resistente a estos. En los casos donde Mtb es resistente, se genera un tratamiento con fármacos de segunda línea donde se incluyen inyectables que son aún más tóxicos y el tratamiento se prolonga hasta por 18 meses (Mathema *et al.*, 2017).

Mtb ingresa generalmente a los conductos alveolares por inhalación de bacilos en forma de aerosol, donde son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) como el receptor de lectinas tipo C, receptores tipo toll como TLR-2, TLR-4, TLR-9, NLR (receptores de dominio de oligomerización de nucleótido), que a su vez reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) como

por ejemplo el lipoarabidomano manosilado (ManLAM), glucolípidos fenólicos (PGL), peptidoglicano y DNA de Mtb, lo que desencadena la primera línea de defensa del huésped y es el encuentro más temprano entre el huésped y el agente causante de la TB, esta interfaz se da entre células del sistema inmune innato (monocitos, células epiteliales, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales [NK] y neutrófilos) y el bacilo de Mtb. Este proceso es acompañado por la producción de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-2, IFN- γ y quimiocinas como CCL2 (Smith I., 2003, De Martino *et al.*, 2019 y Sia J. y Rengarajan J., 2019).

La variación de la respuesta inmune de los individuos en conjunto con la creciente incidencia global a la resistencia de antibióticos en la TB, ha dado lugar a la atención en el desarrollo de nuevos fármacos con diferentes mecanismos de acción que eviten la generación de nuevas cepas de Mtb resistentes a los fármacos. (Mathema *et al.*, 2017 y Bekale *et al.*, 2018).

Han surgido propuestas interesantes en el uso de inmunomoduladores para mejorar los esquemas de tratamiento para la TB, como la Loperamida, un fármaco sintético que se utiliza para tratar la diarrea, pero se ha reportado que además puede inducir autofagia en macrófagos humanos y disminuir el crecimiento intracelular de Mtb (Juárez *et al.*, 2016).

2. Monocito/Macrófago

2.1. Características generales.

En humanos, los monocitos son células precursoras inmunes que se generan en la médula ósea, después del proceso de maduración se liberan en circulación y constituyen alrededor del 5 al 10% de los leucocitos (Owen *et al.*, 2013). Son una estirpe muy heterogénea y bajo ciertas condiciones se reclutan en sitios periféricos extravasando tejidos seleccionados para diferenciarse en células fagocíticas residentes de tejido y células dendríticas, células efectoras derivadas de los monocitos (Trzebanski S. y Jung S., 2020).

También, una de las poblaciones con mayor pleyotropismo en el sistema inmune son los macrófagos, que están presentes en casi todos los tejidos del cuerpo donde reciben diferente nombre como se muestra en la Figura 1 (Rajab *et al.*, 2018 y Salinas, 2010). Algunas de sus funciones más importantes incluyen la fagocitosis, la reparación, remodelación y angiogénesis de los tejidos, además proveen protección al iniciar la marcha de mecanismos inmunes innatos y el desarrollo de respuestas inmunes específicas mediante el procesamiento y presentación de antígenos, la expresión de diversas moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, y la producción de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 principalmente (Duque M. y Rojas M., 2007).

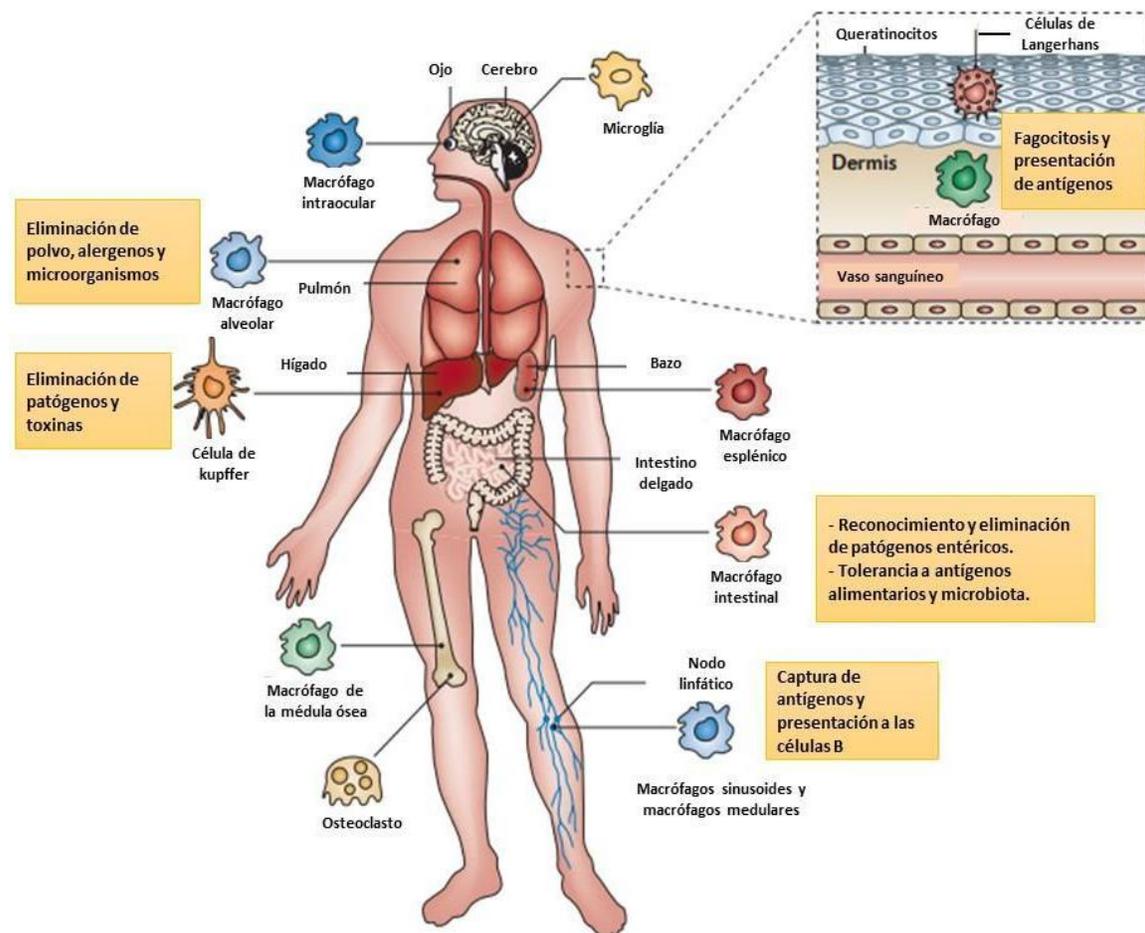


Figura 1. Los macrófagos de los diferentes tejidos del cuerpo. Los monocitos migran rápidamente a casi todos los tejidos del cuerpo, donde se diferencian a varias poblaciones de macrófagos maduros estratégicamente localizados en todo el cuerpo, realizan importantes funciones como la vigilancia inmune, fagocitosis, presentación de antígenos y supresión inmune (modificado de Murray P., Wynn T, 2011).

2.2. Polarización de macrófagos

La activación clásica y alternativa (M1 y M2 respectivamente) en los macrófagos, es un proceso complejo y regulado que culmina en la modificación bioquímica y morfológica del macrófago aumentando la capacidad de la célula para ejercer sus funciones fisiológicas como se muestra en la Figura 2.

Los macrófagos activados pueden ser clasificados de manera general en dos fenotipos, M1 y M2 en función de señales o estímulos del micro-ambiente circundante, por ejemplo la activación clásica es inducida principalmente por citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α y el INF- γ o por moléculas microbianas como el LPS, por otro lado, la activación alternativa del macrófago es inducida por citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-13 (Mantovani *et al.*, 2002 y Gordon, 2003).

Los macrófagos M1 se caracterizan por presentar un aumento en la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y marcadores de activación CD80 y CD86 que aumentan la capacidad de presentación antigénica. Secretan niveles altos de citocinas pro-inflamatorias como INF γ , IL1- β , IL-6, TNF- α y quimiocinas como CCL-2 (Robinsona *et al.*, 2017).

Los macrófagos M2 se caracterizan por un incremento en la expresión del receptor de unión CD209 o DC-SIGN y moléculas como CD163 y CD36. Este tipo de macrófagos produce citocinas anti-inflamatorias como la IL-10, TGF- β y quimiocinas tales como CCL18. Impulsan las respuestas de linfocitos tipo Th2 (linfocito T helper 2) y participan en diversas actividades dirigidas a suprimir la inflamación y promover la reparación de tejidos (Robinsona *et al.*, 2017).

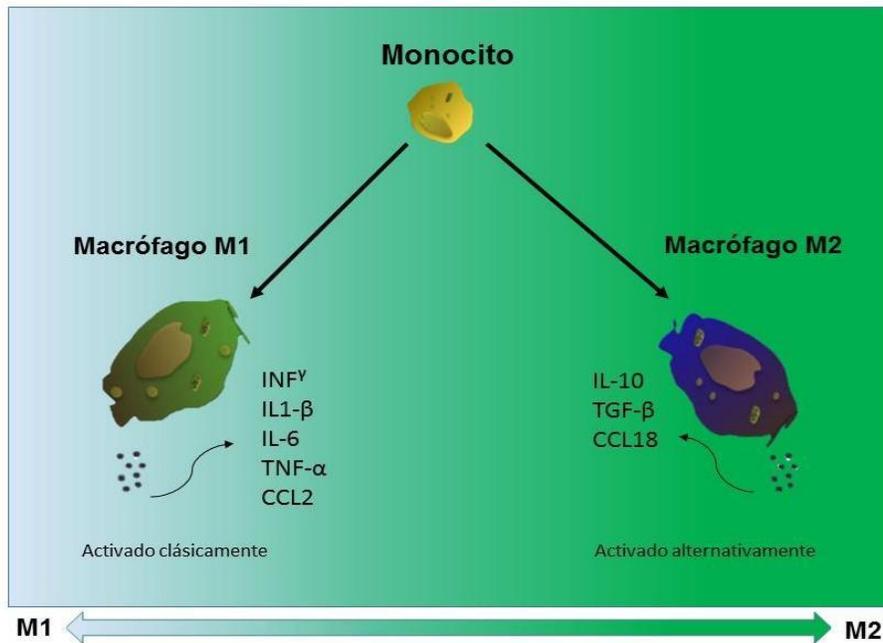


Figura 2. Fenotipo de los macrófagos. Macrófagos M1, caracterizados por ser pro-inflamatorios, macrófagos M2, caracterizados como anti-inflamatorios, produciendo un perfil de citocinas y quimiocinas respectivamente. (Modificado de De las Casas, 2014).

3. Inflamación.

Los macrófagos son actores clave en la homeostasis tisular, pero también juegan un papel importante en las respuestas inmunes innatas de la inflamación ya que están implicados en las primeras líneas de defensa frente a la invasión de agentes extraños como los patógenos, así como en enfermedades inflamatorias crónicas como la Tuberculosis (Foss *et al.*, 2018).

La inflamación es el resultado de la exposición de órganos y tejidos a una serie de estímulos como componentes celulares tóxicos, o nocivos tales como patógenos microbianos. Se caracteriza por una serie de manifestaciones físicas como el

enrojecimiento, calor, dolor, hinchazón y pérdida de función en el área afectada. Estos eventos son a su vez regulados por una gama de mediadores extracelulares, incluyendo miembros de las familias de citocinas y quimiocinas que orquestan el reclutamiento de células inmunes, así como los mecanismos complejos de señalización intracelular que caracterizan la inflamación (Turner *et al.*, 2014). Las citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 e IL-6, son producidas de manera predominantemente por macrófagos activados y estas están implicadas en la regulación de las reacciones inflamatorias (Zhang J. y An J., 2007).

4. El macrófago como blanco terapéutico.

Los macrófagos son las principales células que llevan a cabo la homeostasis de tejido y participan en todas las enfermedades humanas más importantes, como las infecciones, enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis, obesidad y diabetes, enfermedades malignas como los tumores e incluso enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Schultze, 2015). Por lo tanto, de manera específica los macrófagos parecen ser una aproximación o diana terapéutica atractiva por su plasticidad asombrosa para realizar distintas funciones biológicas mucho más específicas y orientar a los macrófagos hacia una respuesta que resulte favorable para contrarrestar las enfermedades (Schultze J. L., 2015 y Wynn *et al.*, 2013). La localización de los mecanismos y moléculas asociados con la plasticidad y la activación de macrófagos proporciona una base para estrategias terapéuticas (Sica A. y Mantovani A., 2012). Algunos ejemplos de terapia dirigida al macrófago se describen a continuación.

4.1. Macrófago anti-inflamatorio en la enfermedad de lupus eritematoso sistémico (LES).

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por un estado inflamatorio dominante que da como resultado múltiples patologías de órganos terminales, incluido el riñón; la nefritis lúpica (NL), una de las complicaciones más graves del LES y una de las principales causas de mortalidad en humanos. Estudios implican la patogénesis de los macrófagos; donde se sugiere que existe una dominancia del fenotipo M1 en que los macrófagos inflamatorios clásicos sobrepoblan el riñón y contribuyen a la inflamación sistémica (Orme J. y Mohan C., 2012).

Estudios actuales proponen a los macrófagos como potencialmente interesantes y prometedores, ya que se ha sugerido que una polarización a M2 puede ser de utilidad terapéutica para el LES (Chalmers *et al.*, 2015 y Menk *et al.*, 2011). Un ejemplo es el uso terapéutico del bloqueo de FR β , un receptor que se sobre expresa en macrófagos M1 implicados en patologías inflamatorias donde se ha propuesto en dos modelos de ratón con LES que la depleción del receptor FR β mediante inmunoterapia reduce signos de inflamación de la enfermedad, prolonga la vida de los animales y no provoca daño en tejidos sanos. Los tratamientos actuales para el LES suelen ser imprecisos ya que son ampliamente inmunosupresores, por lo que se esperan futuros estudios para establecer la manera óptima de dirigirse a los macrófagos con la menor cantidad de efectos no deseados (Varghese *et al.*, 2007).

4.2. Macrófago pro-inflamatorio en el cáncer.

Los tumores están compuestos por diversas células, incluyendo células del sistema inmune innato como los macrófagos, acompañado de células tumorales. Los macrófagos asociados a tumores (TAM) son poblaciones heterogéneas presentes en el micro-ambiente tumoral (Solís *et al.*, 2015 y Georgoudaki *et al.*, 2016). Los TAM poseen diversas funciones pro-tumorales, como son: promover la angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular, supresión de la respuesta inmunitaria antitumoral (Malvicini *et al.*, 2010) mediante la producción de citocinas como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que proporcionan un microambiente anti-inflamatorio, que inhiben la activación de linfocitos tumorocidas e incrementan las poblaciones de linfocitos reguladores (Treg) permitiendo el establecimiento y crecimiento del tumor, así como la diseminación metastásica del mismo (Georgoudaki *et al.*, 2016).

Sin embargo, la plasticidad y la orquestación de la función celular mielomonocítica es un elemento clave que une la inflamación y el cáncer (Biswas, 2010), por lo que se ha descrito en estudios realizados por Georgoudaki *et al.*, (2016), que el receptor scavenger MARCO define un subtipo de TAM supresores ya que se encuentra sobre expresado en estas poblaciones y se asocia con la evolución clínica de la enfermedad. El uso del anticuerpo monoclonal anti-MARCO puede inducir una actividad anti-tumoral en cáncer de mama y de colon, a través de la reprogramación de TAM a un fenotipo pro-inflamatorio y aumento a la inmunogenicidad del tumor como se puede observar en la Figura 3. Estos resultados demostraron que, modificando las células mieloides del microambiente tumoral, con el objetivo de la

terapia, no es activar el sistema inmune, sino más bien eliminar las vías inhibitorias que bloquean las respuestas efectivas de células T antitumorales que representan un mecanismo prometedor en las terapias contra el cáncer (Georgoudaki *et al.*, 2016 y Sharma y Allison, 2015).

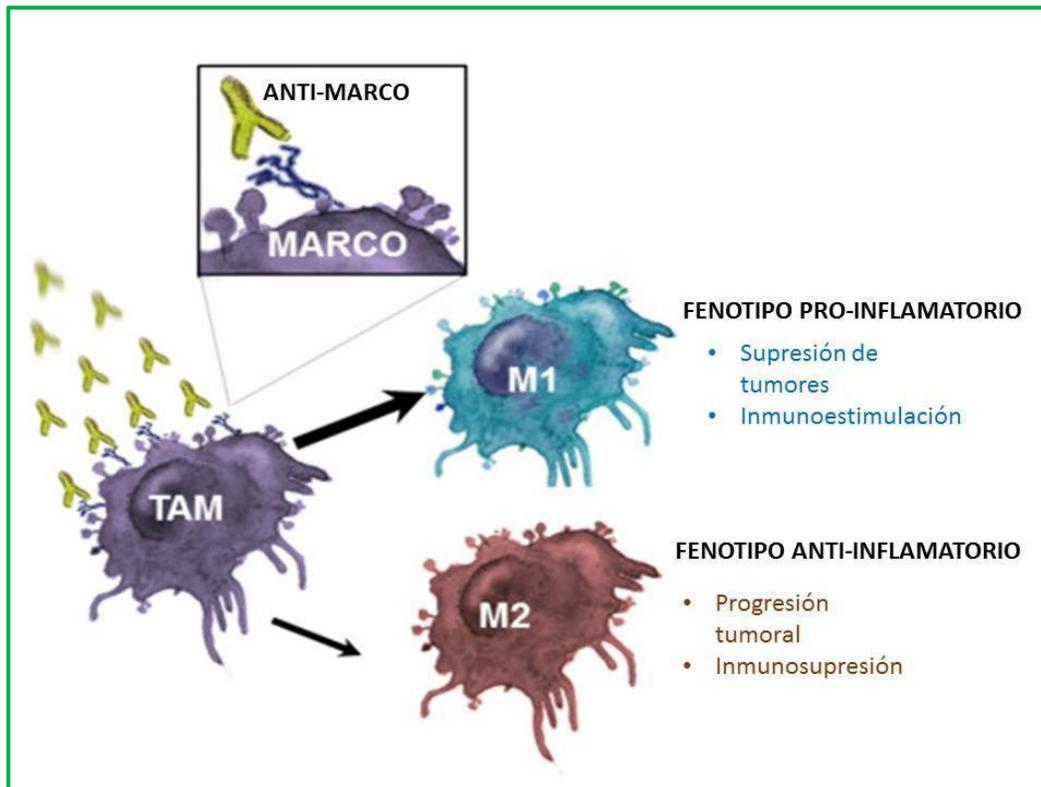


Figura 3. Descripción gráfica del bloqueo del receptor scavenger MARCO mediante anticuerpos monoclonales anti-MARCO. Este evento produce un aumento en las poblaciones de TAM pro-inflamatorios (flecha gruesa) y por consiguiente, la estimulación de la supresión de tumores (tomado y modificado de Georgoudaki *et al.*, 2016).

4.3. Rescatar al macrófago de la tolerancia en la sepsis.

La sepsis está definida como una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y más recientemente ha sido considerada perjudicial hacia el huésped (Santos *et al.*,

2016). Es provocada cuando el cuerpo se enfrenta a una infección generalizada, es decir, se desarrolla cuando los patógenos superan la contención local y entran en circulación sanguínea, causando una inflamación excesiva, seguida por una profunda supresión del sistema inmune innato, falla multiorgánica y en algunos casos la muerte (Theodorakis *et al.*, 2015 y Leelahavanichkul *et al.*, 2012). Tras estos eventos, los macrófagos pierden la capacidad de respuesta o generan tolerancia para así evitar consecuencias debidas a la inflamación y la generación de tolerancia se ha asociado a una disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-12, así como de reguladores negativos de señalización para TLR's como IRKM, ST2 y Myd88, además de reducir la capacidad de respuesta de los macrófagos a futuras infecciones (Guzmán *et al.*, 2017). Sin embargo, en un estudio realizado por Guzmán *et al.*, (2017) reportaron que los macrófagos derivados de monocitos (MDMs) crónicamente expuestos a lipopolisacárido (LPS) y re-estimulados con muramildipéptido (MDP) restauraron la producción de TNF- α , al igual que otros mediadores como son la IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, lo que sugiere una recuperación en la respuesta antimicrobiana de los macrófagos (Guzmán *et al.*, 2017).

4.4. Activar al macrófago e inducir actividad bactericida en la Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por el bacilo intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que principalmente afecta los pulmones y a las células que residen en este órgano, incluyendo los macrófagos (Rojas *et al.*, 2007 y OMS, 2016). En la infección natural por Mtb, el resultado se da entre una

interacción compleja del sistema inmune del huésped y los mecanismos de supervivencia bacteriana. Una de las estrategias para combatir la TB, es la identificación de tratamientos antituberculosos que incluyan fármacos con actividad micobactericida y que potencien mecanismos inmunológicos para la destrucción intracelular de Mtb. (Rojas et al., 2007, Yugang et al, 2019). Juárez et al., (2016) han reportado recientemente que la muerte de Mtb mediada por macrófagos incluye la autofagia, donde el inductor de este mecanismo es la Loperamida, un fármaco de uso común para tratar la diarrea. Encontraron que la Loperamida induce actividad anti-micobacteriana mediante mecanismos como la autofagia y producción de péptidos antimicrobianos en macrófagos humanos (MDMs) y macrófagos murinos, donde en algunos casos, se recluta la proteína LC3 (marcador positivo de autofagia) como puede observarse en la Figura 4, demostrando que la carga intracelular micobacteriana disminuye significativamente, sin embargo, aún se desconoce el papel de la Loperamida en la regulación de la inflamación.

A pesar de los recientes avances para tratar la TB, esta sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Aún existe un vacío de conocimiento que limita el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas eficaces (Philips J. A., Ernst J. D., 2012).

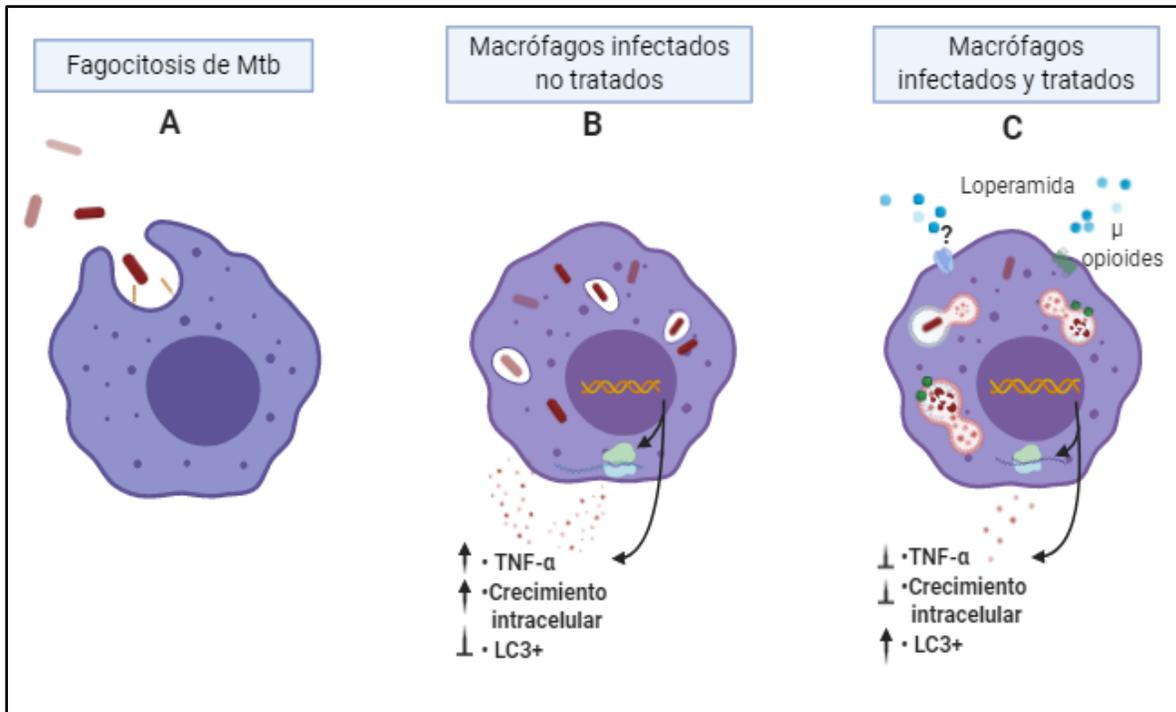


Figura 4. Efecto de la Loperamida en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. (A) Fagocitosis de Mtb. (B) Replicación de los bacilos dentro del macrófago, producción elevada de TNF- α y ausencia de péptidos antimicrobianos. (C) Macrófagos tratados con Loperamida e inducción de autofagia, reducción en los niveles de TNF- α e incremento de LC3+. Created with BioRender.com

5. Inmunomoduladores

La inmunología es un área que se está desarrollando rápidamente en la investigación de biotecnología médica y tiene grandes promesas para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. Las enfermedades infecciosas se consideran como desórdenes inmunológicos, en tanto las enfermedades neoplásicas, el cáncer, el trasplante de órganos y las enfermedades autoinmunes están involucradas en un estado de inmunosupresión (Patil *et al.*, 2012).

Los inmunomoduladores son sustancias biológicas o fármacos sintéticos que se utilizan para estimular (inmunoestimulantes); agentes que se proveen para mejorar la resistencia del organismo a las infecciones aumentando los niveles basales de la respuesta inmune o en el deterioro de la respuesta inmune, suprimir o modular el sistema inmunológico (inmunosupresores) (AAAAI, 2017 y Dinesh *et al.*, 2012), estos últimos son los más utilizados en el trasplante de órganos para disminuir el rechazo y además en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (CCFA, 2009). El sistema inmunológico puede manipularse de cuatro maneras por los inmunomoduladores: (1) por inmunosupresión o anti-inflamación; (2) mediante antígenos microbianos (como la vacunación, adyuvantes o derivados de microbios); (3) por la adición o eliminación de componentes inmunes (inmunoglobulinas, transfusiones de granulocitos o plasmaféresis); y (4) mediante la adición o la inhibición de componentes inmunes que tienen actividad independiente contra antígenos (por ejemplo las redes de citocinas y quimiocinas) (Reuman P.D., 2001). Estos agentes tienen la capacidad de modular mecanismos innatos y adaptativos de defensa para el organismo. De esta manera, los inmunomoduladores se están convirtiendo en un complemento viable a las modalidades establecidas, ofreciendo un nuevo enfoque para el tratamiento de enfermedades infecciosas como la TB (Patil *et al.*, 2012).

5.1. Inmunomoduladores de origen microbiano.

➤ **Muramil dipéptido (MDP)**

El muramil dipéptido (MDP) es un componente de origen bacteriano derivado del peptidoglicano de la mayoría de bacterias gram negativas y gram positivas (Ogawa *et al.*, 2011 y Wardowska *et al.*, 2006).

El MDP ha mostrado diversos efectos biológicos sobre los macrófagos, como un aumento en las actividades fagocíticas, por ejemplo, participa en la reducción del oxígeno al anión superóxido y posteriormente al peróxido de hidrógeno (Wardowska *et al.*, 2006).

Modifica el patrón de secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias como la IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α al activar diferentes vías de señalización inmunológicas, incluyendo al dominio de oligomerización de nucleótidos 2 (NOD2) intracelular, abundante en macrófagos, lo que resulta en la translocación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Salem *et al.*, 2013 y Wardowska *et al.*, 2006).

Las modificaciones estructurales del MDP y sus derivados han sido muy estudiados con el fin de aumentar la actividad adyuvante y la respuesta inmune para uso clínico en enfermedades, principalmente en el tratamiento del cáncer (Ogawa *et al.*, 2011).

➤ **DNA bacteriano**

El DNA bacteriano y los oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN) que contienen motivos CpG activan a células del sistema inmune innato que expresan el receptor Toll-like 9 (TLR9) ya que es ligando de este receptor y células del sistema inmune

adaptativo. El DNA-CpG mejora la función de las células presentadoras de antígeno (CPA) como los monocitos y macrófagos para obtener una mejor respuesta celular (Bode *et al.*, 2012 y Dalpke *et al.*, 2002).

Los efectos reportados para esta molécula incluyen la activación, la proliferación policlonal, la secreción de inmunoglobulinas, secreción de citocinas, regulación de moléculas estimuladoras de los macrófagos y células dendríticas (CD), efectos directos e indirectos para células T, mejora de la hematopoyesis, inducción de respuestas citotóxicas de las células T y su capacidad para inducir respuestas T helper de tipo 1 (Th1) (Dalpke *et al.*, 2002). Por consecuencia, el CpG-ODN se ha reconocido como un adyuvante potente en la vacunación, principalmente contra alergias, tumores y enfermedades infecciosas como el ántrax, influenza y la malaria (Bode *et al.*, 2012 y Dalpke *et al.*, 2002).

5.2. Inmunomoduladores de origen eucarionte.

➤ Citocinas recombinantes (IL-15).

Recientemente la interleucina 15 (IL-15) se ha propuesto como un candidato inmunomodulador para el tratamiento contra el cáncer, ya que esta citocina actúa a través de su receptor específico IL-15Ra, que se expresa en monocitos y macrófagos (Steel *et al.*, 2012). La IL-15 muestra una actividad muy amplia, ya que induce la proliferación y diferenciación de células B, T y células asesinas naturales (NK), mejora la actividad citotóxica de células T CD8+, estimula la síntesis de inmunoglobulinas por parte de las células plasmáticas, induce maduración de

células dendríticas, no estimula a células inmunosupresoras como las T reguladoras (Tregs) (Steel *et al.*, 2012).

De manera general se han sugerido las dosis altas de IL-15 para lograr respuestas altas, sin embargo, la proteína en plasma tiene una vida media corta por lo que se ha intentado prolongar la vida terapéutica de esta, utilizando células de ingeniería para secretar IL-15 o la fusión de IL-15 a otro fragmento de proteína más grande como la fracción cristalizable (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG) (Chen *et al.*, 2015). Debido a las características anteriores, aumentando la participación de IL-15 se podría mejorar la inmunidad innata, la adaptativa y hacer frente a los tumores (Steel *et al.*, 2012 y Chen *et al.*, 2015).

5.3. Inmunomoduladores de origen farmacológico

➤ Resveratrol (RSV)

En los últimos años se ha documentado que el tratamiento con Resveratrol (RSV), en modelos murinos con enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn, caracterizada por un proceso inflamatorio crónico del tracto intestinal en el cual el sistema inmune deja de tolerar a las bacterias de la flora intestinal. El RSV demostrado tener potencial para la regulación negativa de mediadores pro-inflamatorios, por ejemplo: IL-1 β , IL-6, TNF- α , la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), INF- γ , el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la prostaglandina E sintasa 1 (PGES-1), también marcadores de estrés oxidativo como

el óxido nítrico (NO) y vasoconstrictores como la angiotensina II y endotelina. Por otra parte, también se han hallado la regulación positiva de biomarcadores reducidos por la inflamación, como la proteína antioxidante superóxido dismutasa (SOD) y la IL-10 (Park y Pezzuto, 2015 y Rahal *et al.*, 2012). Estos hallazgos pueden tener aplicaciones terapéuticas en la enfermedad inflamatoria intestinal (Park y Pezzuto, 2015).

➤ **Esteriodes (glucocorticoides)**

Son fármacos derivados del cortisol o hidrocortisona que tienen efectos anti-inflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores (Serra *et al.*, 2012). Inhiben la producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ y el GM-CSF debido a la interferencia que tienen los glucocorticoides sobre las cascadas de señalización y mecanismos genómicos. De manera aguda, los glucocorticoides suprimen las moléculas de adhesión endoteliales, inhibiendo la permeabilidad vascular después de un evento inflamatorio, evitando el reclutamiento de leucocitos (Serra *et al.*, 2012 y Lin y Wang, 2016).

6. Loperamida.

La Loperamida es un derivado de la fenilpiperidina con una estructura química muy similar a los agonistas de los receptores opiáceos. Es un agente antidiarreico ampliamente utilizado para el control y alivio sintomático de la diarrea aguda y crónica asociada con la enfermedad inflamatoria intestinal o gastroenteritis

(PubChem, 2017). La Loperamida tiene una alta afinidad por los receptores μ -opioides (μ opioides) en la pared del intestino y por consecuencia inhibe la liberación de prostaglandinas y de acetilcolina, aumentando el tiempo de tránsito intestinal y por ende la absorción de líquidos. También inhibe los canales de calcio dependientes de voltaje (Hagiwara *et. al.*, 2003). Por su alta afinidad a la pared intestinal y su rápido metabolismo, la Loperamida difícilmente alcanza la circulación sistémica (Inmodium, 2010), sin embargo, puede ocasionar algunos efectos secundarios como dolor abdominal, estreñimiento, fatiga, mareos, náusea y vómito. Los niños pueden ser más sensibles a los efectos adversos del fármaco en el sistema nervioso central (SNC) que los adultos (PubChem, 2017).

7. Posibles efectos adversos de los inmunomoduladores.

Al actuar de manera crucial sobre el sistema inmunológico, todos los moduladores de distinto origen que regulan a la baja la expresión y función de componentes anti-inflamatorios pueden aumentar el riesgo de infección, aunque de manera general las infecciones son leves y de poco riesgo también pueden ser graves, incluidas las causadas por agentes oportunistas (Bascones *et. al.*, 2014). Los pacientes pueden perder los beneficios de un inmunomodulador y como consecuencia recibir una nueva terapia con otro medicamento con un mecanismo diferente para controlar su condición, esto causa un desequilibrio inmunológico (Carroll, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Mycobacterium tuberculosis es un microorganismo modelo de una infección por patógenos intracelulares que al infectar al humano genera un proceso inflamatorio que puede hacerse crónico. Actualmente, el control de la infección por este organismo se centra en antibióticos específicos y trae consigo un tratamiento prolongado y tóxico en algunos casos. Se ha sugerido el uso de inmunomoduladores para mejorar los esquemas terapéuticos, ya que de manera indirecta pueden controlar una infección activando efectos bactericidas en células del huésped como los macrófagos.

Se ha reportado que la Loperamida induce efectos bactericidas en macrófagos humanos y murinos controla el crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*. Este fenómeno está asociado a la autofagia y no parece estar asociado a la producción de TNF- α como molécula activadora del macrófago humano en esta infección. Se desconoce la contribución real de la Loperamida en la modulación de la inflamación bajo este contexto de infección, o en algún otro padecimiento, por lo que el presente trabajo está enfocado a medir dicho proceso para determinar el uso potencial de la Loperamida como inmunomodulador.

HIPÓTESIS

El tratamiento con Loperamida en macrófagos humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* genera un microambiente de citocinas anti-inflamatorias que regula a la baja la inflamación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión a nivel de RNA mensajero y de proteína, de citocinas pro y anti-inflamatorias en macrófagos humanos en un contexto de infección por *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar la producción de IL-10, TNF- α , GM-CSF, INF γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70 e IL-13 en sobrenadantes de cultivo celular de macrófagos humanos infectados con *M. tuberculosis* y tratados con Loperamida.
- ❖ Medir la expresión génica (RNA mensajero) de IL-10, TNF- α , e IL-1 β en macrófagos humanos infectados y tratados con Loperamida.

MATERIALY MÉTODOS

Población de estudio y material biológico.

Este estudio se realizó utilizando paquetes leucocitarios provenientes del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER). La población de estudio fueron mujeres y hombres de entre 18 y 65 años considerados como sanos y que cumplieron los requisitos que excluyen factores de riesgo evaluados por el servicio de banco de sangre.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

En tubos Falcon de 50 mL se colocaron 20 mL de sangre con 20 mL de medio RPMI-1640 (Lonza, Walkersville, MD USA); suplementado previamente con 50 µg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich) y 200 mM de L-glutamina (Lonza) denominado RPMI G+G, y se agregaron 10 mL de solución separadora de linfocitos (Lonza) para separar las células mediante un gradiente de densidad, después los tubos se centrifugaron a 1200 rpm a temperatura ambiente en un periodo de 45 minutos. Posterior a la centrifugación, con una pipeta de transferencia (BD Falcon) se tomó el anillo leucocitario que contenía las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) y se colocó en un tubo nuevo, llevándolo a un volumen final de 50 mL. Se centrifugó por tres ocasiones 10 minutos a 1500 rpm, temperatura ambiente para lavar las células.

Obtención de monocitos por perlas magnéticas (Miltenyi).

A partir de las PBMC se realizó la separación de monocitos (MN) mediante una selección positiva de células CD14+ utilizando las microperlas magnéticas MACS (Miltenyi Biotec) de acuerdo a la metodología del fabricante. Las células CD14+ purificadas (MN) se centrifugaron a 1200 rpm a 4°C durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se mezclaron para resuspenderlas en 5 mL de medio RPMI G+G suplementado con 10% de suero humano estéril descomplementado y filtrado (Valley Biomedical Inc.), en adelante mencionado sólo como “medio”. Posteriormente se contaron los MN con uso de la cámara de Neubauer utilizando una dilución 1:1 con azul de tripano (Gibco); con el cual también se determinó la viabilidad celular, que en promedio en los experimentos fue mayor al 99%. Adicionalmente la pureza de los MN se determinó por citometría de flujo realizando una tinción de superficie con anti-CD14-PE-Texas Red (Invitrogen) y analizando las células individuales de acuerdo a su tamaño y granularidad, en la región de células vivas utilizando una sonda de viabilidad cercana al infra-rojo (Near Infra-red, de Life Technologies) y utilizando como control células sin tinción. Las células CD14+ fueron el 97.78 ± 2.12 % (media \pm SD).

Diferenciación de monocitos a macrófagos.

Los MN se ajustaron a 1×10^6 células/mL y se sembraron por duplicado a razón de un millón de células por pozo en placas de ultra baja adherencia de 24 pozos (Costar). Las células se incubaron por siete días a 37 °C con atmósfera húmeda y

CO₂ al 5%, realizando cambio de medio cada tercer día para remover las células no adherentes. Al día 7 la mayoría de los MN mostraron que eran morfológicamente macrófagos y se les denominó macrófagos derivados de monocitos (MDM). De estos, solo el 48.8 ± 17.66 % (media \pm SD) fueron CD14+, determinado por citometría de flujo, indicando la diferenciación a macrófagos (pierden el marcador cuando se diferencian). Se incluyó una tinción con anti-CD3-FITC para establecer el remanente de linfocitos T posterior a la diferenciación de macrófagos; el 2.3 ± 1.58 % de las células al día 7 fueron linfocitos CD3+.

Preparación de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* para la infección *in vitro*.

Se utilizó la cepa virulenta *H37Rv* de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC#25618). Fue crecida en medio líquido 7H9 (Difco) suplementado con 2% de glicerol (Merck) y 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton Dickinson, BD). Se mantuvo en incubación por agitación orbital a 37°C durante 21 días y se cosechó en tubos de 50 mL mediante centrifugación a 3000 rpm, 18°C durante 30 minutos. Las bacterias fueron resuspendidas en medio 7H9, alicuotadas en volúmenes de 1 mL y congeladas a -80°C hasta su uso.

Para su uso, se disgregaron las bacterias de una alícuota (1×10^9 bacterias/mL) durante 5 minutos con perlas estériles de cristal de 3 mm de diámetro para la obtención de bacilos individuales, se centrifugaron a 800 rpm por 5 minutos, se recolectó el sobrenadante con bacilos individuales, se centrifugó a 2000 rpm a temperatura ambiente y el botón celular se resuspendió en medio RPMI con 30%

de suero humano descomplementado (medio infectante) con el volumen a razón de 1×10^7 bacterias/mL

Infección *in vitro* de MDMs y tratamiento con Loperamida.

Los MDMs se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 a 1 (5:1; bacteria:macrófago) en medio infectante durante 1 hora en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para eliminar las bacterias no fagocitadas se realizaron 3 lavados con medio y finalmente se agregó medio fresco. Se trataron los MDMs infectados con Loperamida (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) a una concentración de 3 μ M (la concentración se definió utilizando ensayos piloto donde no se observó una disminución significativa de la viabilidad celular, datos no mostrados) o se estimularon con 100 ng/mL de LPS de *E. coli* (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), el cual se utilizó como control positivo inductor de la producción de citocinas pro-inflamatorias. Los MDMs infectados se incubaron durante 24 horas adicionales con los estímulos en las mismas condiciones. Para efectos de comparación se aplicaron los mismos tratamientos a células no infectadas.

Obtención de sobrenadantes y lisados de macrófagos.

Los sobrenadantes de cultivo celular se tomaron de la placa de cultivo y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.2 mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso, mientras que a los MDMs infectados se añadieron 350 μ L de buffer de lisis RLT

(Qiagen) a cada pozo de la placa de cultivo y por pipeteo se lisaron las células para posteriormente almacenar dichos lisados en tubos de 1.2 mL a -20°C hasta su uso.

Purificación de RNA total.

Para esta metodología se utilizó el RNeasy Mini Kit (Qiagen) y se siguieron las instrucciones del fabricante brevemente descritas a continuación.

Se colocó un volumen de 350 μ L de etanol (preparado al 70%) al lisado celular y se mezcló suavemente por pipeteo para transferir 700 μ L de esta muestra a una columna de micro-centrifugación con tubo de procesado, se centrifugó por 30 segundos a 12,000 rpm y se eliminó el eluido presente en el tubo de procesado para utilizarlo nuevamente. Se lavó la columna con 350 μ L de la solución RW1 y se centrifugó la muestra por 30 segundos a 12,000 rpm volviendo a eliminar el eluido. Para remover el DNA genómico se agregó 80 μ L de DNAsa I en la membrana de la columna dejando la reacción 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente la columna con 350 μ L de solución RW1 y se centrifugó 20 segundos a 12,000 rpm eliminando el eluido presente en el tubo. Se agregaron 500 μ L de tampón RPE en la columna y se centrifugó 30 segundos a 12,000 rpm eliminando el eluido. Nuevamente se agregó 500 μ L de tampón RPE a la columna y se centrifugó durante 2 minutos a 12,000 rpm. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL y se agregaron 20 μ L de agua libre de RNAsas (agua DEPC) en la membrana de la columna y se centrifugó 1 minuto a 8,000 rpm para eluir el RNA.

Las muestras se almacenaron a -20 °C en agua DEPC para evitar la degradación de estas.

Síntesis de DNA complementario a partir de RNA.

Se utilizó el kit Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). En tubos de 0.2 mL se colocaron 4 µL de una mezcla de random hexámeros junto con 16 µL de RNA problema y se incubaron por 15 minutos a 65°C en un termociclador BioRad e inmediatamente se pasó a 4°C por 3 minutos, 5 segundos antes de finalizar el periodo a 4°C se pausó el equipo para agregar 18 µL de una mezcla de reacción (10x RT buffer, 25mM MgCl₂, 0.1 DTT y RNAsa OUT) a cada tubo y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos, posteriormente se agregaron 2 µL de la enzima SuperScript II RT (50 U/µL) y se concentró manualmente la muestra al fondo de cada tubo. Se quitó la pausa del equipo y los tubos pasaron por las siguientes etapas: 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C, 15 minutos a 72°C y 4 minutos a 4°C. Se sacaron los tubos del equipo y se añadieron 2 µL de RNase H a cada tubo y se volvió a incubar durante 20 minutos a 37°C. Finalmente se sacaron los tubos con cDNA del termociclador y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR).

La expresión cuantitativa de los genes para TNF-α (Hs00174128_n1), IL-1β (Hs01555410_n1) e IL-10 (Hs00961622_n1) marcados con FAM se realizó utilizando la técnica de PCR en tiempo real con los juegos de sondas y primers

Taqman comerciales (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando como gen de referencia endógeno el 18S RNA marcado con VIC.

Se preparó una dilución 1:5 de cDNA con agua libre de RNAsas y DNAsas por muestra.

En tubo eppendorf se realizó una mezcla de reacción que contenía 10 μ L de Universal Master Mix (esta mezcla contenía DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, $MgCl_2$ y los desoxirribonucleósidos-trifosfato dTTP, dATP, dCTP y dGTP) (Applied Biosystems, Foster City, CA), la mezcla de sonda-primers (ensayo) Taqman del gen de interés (1 μ L), el ensayo 18S RNA (1 μ L) y el cDNA diluido (10 μ L). Se colocaron 20 μ L de la mezcla en un pozo por duplicado en una placa de 96 pozos cubriéndola con su respectiva membrana óptica y la amplificación se realizó en el equipo Step One Plus (Applied Biosystems) con un protocolo diseñado por el fabricante que consistía en 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C para activar la Taq polimerasa y 40 repeticiones de 10 segundos a 95°C para alinear en DNA y 1 minuto a 60°C para elongar el DNA.

La expresión correspondiente a cada gen de interés se normalizó con la expresión del gen endógeno 18S RNA y la cuantificación relativa de la expresión génica se calculó utilizando el método $\Delta\Delta Ct$, que consiste en hacer el cálculo de valores de expresión relativa como diferencias entre la muestra problema y un calibrador cuyo valor se ajusta a 1 (indicado en el pie de figura donde se muestran los resultados). Cualquier resultado mayor a 1 significa aumento en la expresión génica y cualquier resultado menor a 1 significa disminución de la expresión génica. Se utilizó como condición de calibración los MDMs infectados, sin tratamiento.

Cuantificación de TNF- α por ELISA.

A partir de sobrenadantes de cultivo celular previamente almacenados se procedió a realizar la siguiente técnica:

Se diluyó el anticuerpo de captura anti-TNF- α humano (Pharmlingen) en PBS (Lonza) y se colocaron 50 μ L a cada pozo de la placa de ELISA fondo plano de 96 pozos (Nunc), se cubrió con parafilm y se incubó a 4°C toda la noche para su posterior utilización.

Se desechó la solución de anticuerpo y se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS 0.01M, pH 7.2; Tween20 al 0.05%). Se agregaron 100 μ L por pozo de Superblock (Thermo), la placa se cubrió con parafilm y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se lavó la placa 3 veces con solución de lavado, se adicionaron 50 μ L por pozo de cada una de las muestras, estándares de la curva y blancos por duplicado, se cubrió la placa con parafilm y se incubó a 37°C durante 2 horas.

Nuevamente se lavó la placa 3 veces con solución de lavado y se colocó el anticuerpo secundario anti-TNF- α conjugado a biotina (Pharmlingen) diluido en solución de dilución de anticuerpos (PBS 0.01M, pH 7.2, Tween20 al 0.05% y BSA 2%), se adicionaron 50 μ L por pozo, se cubrió la placa con parafilm y se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos.

La placa se lavó 6 veces con solución de lavado y se secó. Se adicionó la enzima estreptavidina-fosfatasa-alcalina EAF (Jackson Immunoresearch) diluida en

solución de dilución de anticuerpos, se colocaron 50 μ L en cada pozo de la placa, se cubrió con parafilm y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Nuevamente se lavó la placa 6 veces con solución de lavado y se agregaron 50 μ L en cada pozo de sustrato de fosfatasa p-nitrofenil fosfato (Sigma, St. Louis, MO), disuelta en una solución de dietanolamina (Sigma, St. Louis, MO), se cubrió la placa de la luz y se dejó desarrollar el color a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos.

Finalmente se paró la reacción con 50 μ L por pozo de NaOH 1M (Merck) y se leyó la placa a 405 nm usando un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation). Se calculó la ecuación de la recta y se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras en la curva de referencia. Los resultados se mostraron en picogramos por mL (pg/mL).

Cuantificación de IL-10 por ELISA.

Se diluyó el anticuerpo de captura (Peprotech) en PBS (Lonza) y se colocó a razón de 50 μ L por pozo en la placa de ELISA fondo plano de 96 pozos (Nunc), se cubrió con Parafilm y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 24 horas. Se aspiró y se lavó 3 veces cada pozo con 150 μ L de solución de lavado (PBS 0.01M, pH 7.2; Tween20 al 0.05%), a continuación, se adicionaron 150 μ L de buffer de bloqueo Superblock (Thermo) por pozo, se cubrió la placa con parafilm y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa 4 veces con solución de lavado, se adicionaron 100 μ L del estándar de la curva de calibración y de las

muestras a cada pozo por duplicado y se dejó incubar a 37 °C durante 2 horas. La placa se lavó 3 veces con solución de lavado y se adicionó a cada pozo 100 µL de anticuerpo de detección (Peprotech) (anti-IL10-biotina) diluido en solución de dilución de anticuerpos (PBS 0.01M, pH 7.2, Tween20 al 0.05% y BSA 2%) cubriendo la placa con parafilm e incubando 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3 veces y se adicionaron 50 µL por pozo del conjugado estreptavidina-peroxidasa (R&D), se cubrió la placa con parafilm y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces con solución de lavado y se le adicionó a cada pozo 100 µL de sustrato tetramethylbenzidine líquida (Sigma), se protegió la placa de la luz durante 15 minutos y se paró la reacción con 50 µL por pozo de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M).

Finalmente se procedió a leer la absorbancia de la placa a 450 nm, posteriormente a 540 nm, usando un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation) y se restó este valor al primero para corregir imperfecciones plásticas de la placa. Se calculó la ecuación de la recta y se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras en la curva de referencia.

Determinación de citocinas múltiple (Luminex).

Las citocinas GMC-SF, INF γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70 e IL-13 se cuantificaron utilizando kits comerciales de detección de citocinas humanas Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, US), diseñado para el usuario, con la tecnología Luminex siguiendo la metodología del fabricante. Los ensayos se realizaron usando

la estación de lavado Bio-Plex Pro II con soporte de placa magnética para minimizar variaciones.

Análisis estadístico

Para comparaciones entre tratamientos se realizó una ANOVA de Friedman, cuando la F fue significativa ($p < 0.05$) se realizó la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Cuando $p < 0.05$ se consideró como significativo. El análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 6).

RESULTADOS

Efecto de la Loperamida sobre la producción y expresión de citocinas pro-inflamatorias.

Informes anteriores (Juárez *et al.*, 2016) mostraron que MDMs infectados con Mtb H37Rv y tratados con Loperamida mejoraron su actividad bactericida a través de la autofagia, reduciendo de manera significativa el crecimiento intracelular de la micobacteria; sin embargo, no estaba claro si se modulaba el microambiente de citocinas. El propósito de esta investigación fue conocer si los MDMs infectados con Mtb y tratados con Loperamida *in vitro* mostraban la modulación en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, a nivel de mensajero y de proteína, en comparación con sólo la infección.

Observamos que la infección por Mtb induce la producción de IL1- β y TNF- α , tanto a nivel de proteína como de mensajero, Fig. 5. Al tratar las células infectadas con Loperamida se observó un incremento en los niveles de IL-1 β (mediana = 115.6 pg/mL, rango = 1 - 334 pg/mL), aunque el cambio no fue significativo, y la expresión génica de IL1- β mostró un aumento significativo (* $p < 0.05$, rango = 0.01 - 61.12 veces respecto al control), Fig. 5A. En contraste, la producción de TNF- α se redujo significativamente en las células infectadas y tratadas con Loperamida, a nivel de proteína (* $p < 0.05$, mediana = 186.3 pg/mL, rango = 76.91 - 620.2 pg/mL), aunque no hubo cambio en la expresión génica del TNF- α , Fig. 5B.

Para descartar que la infección causara por sí misma un efecto de tolerancia, incluimos la estimulación con LPS. Observamos que la adición de LPS incrementa

significativamente la expresión de IL1- β y TNF- α en los macrófagos infectados, tanto a nivel de proteína como de mensajero, Fig. 5, por lo que el efecto de la Loperamida se puede considerar exclusivo de este fármaco.

Respecto a otras citocinas proinflamatorias, observamos que la infección por Mtb induce significativamente la producción de IL-8 (mediana = 63,390 pg/mL, rango = 3,649 - 163,175 pg/mL), y el tratamiento con Loperamida o con LPS no modifica esta expresión, Fig. 6A. También encontramos que no hubo cambios relevantes en la producción de IL12-p70 en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas, Fig. 6B. En cuanto a la producción del GMC-SF, encontramos que tanto la Loperamida (mediana = 25.01 pg/mL, rango = 5.87 - 69.01 pg/mL) como el LPS (mediana = 46.53 pg/mL, rango = 18.57 - 76.6 pg/mL) inducen un aumento significativo en células infectadas (* $p < 0.05$ para ambos casos), Fig. 6C.

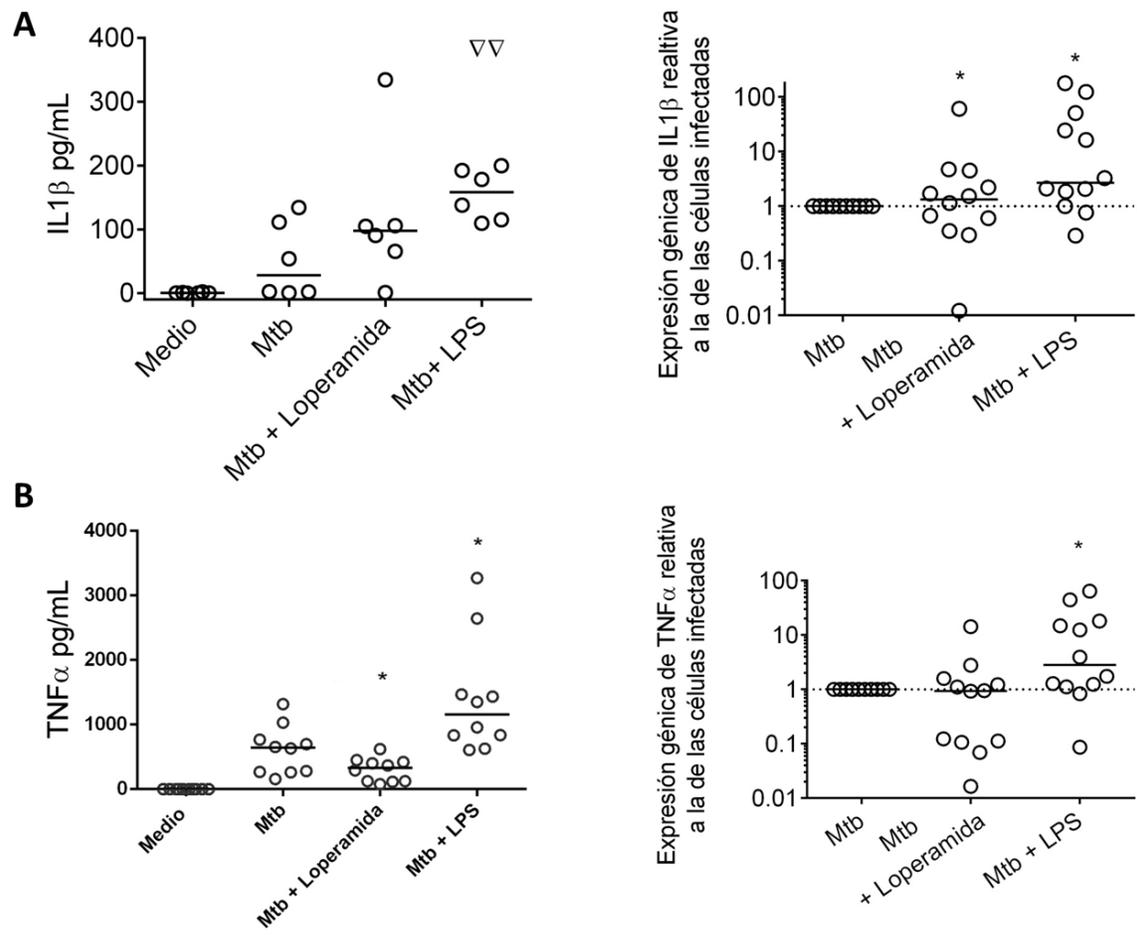


Figura 5. La loperamida regula la producción y transcripción de mediadores proinflamatorios. Las células fueron infectadas con *M. tuberculosis H37Rv* con una MOI de 5 durante 1 h, después las células se trataron con loperamida 3 μ M durante 24 h y se obtuvieron los lisados y sobrenadantes. La detección de proteínas se realizó en sobrenadantes de cultivo por la técnica de Luminex para (A) IL-1 β (n=6, $\blacktriangledown\blacktriangledown$ p<0.05 vs medio) y por ELISA para (B) TNF- α (n=10, *p<0.05), la expresión génica relativa en lisados de cultivo celular se realizó por PCR en tiempo real (qPCR), n=12 y *p<0.05 para ambos casos A y B. La línea horizontal muestra la mediana.

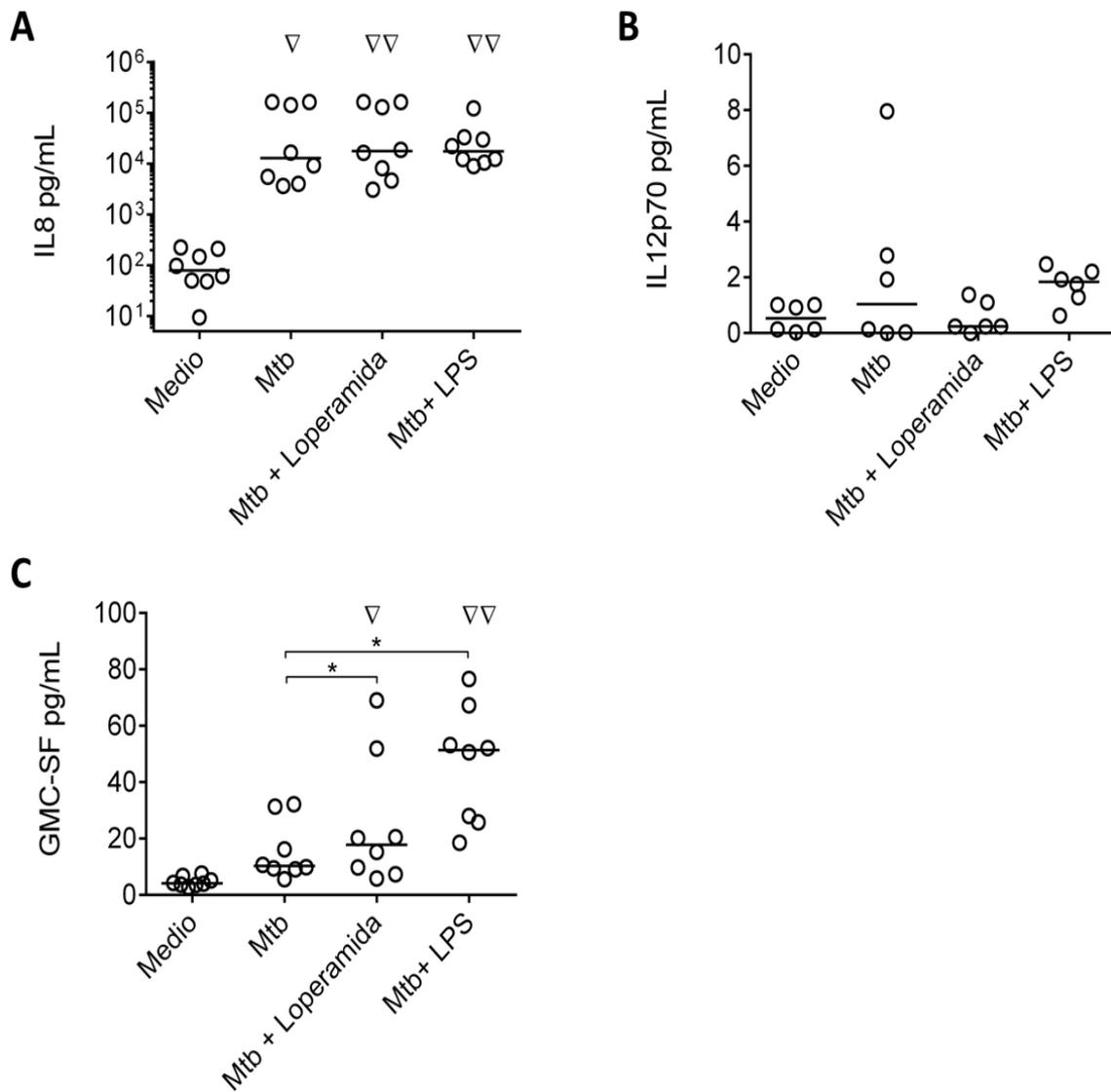


Figura 6. La loperamida modula la producción de GM-CSF. Las células fueron infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 5 durante 1 h, posteriormente tratadas con loperamida 3 μ M durante 24 h y se obtuvieron sobrenadantes para la detección de proteínas por la técnica de Luminex. Se muestran los datos para (A) IL-8 (n=8), (B) IL-12 (n=6) y (C) GM-CSF (n=8); ∇ p<0.05, $\nabla\nabla$ p<0.01 vs medio; *p<0.05 entre los pares seleccionados. La línea horizontal muestra la mediana.

Efecto de la Loperamida sobre la producción de citocinas anti-inflamatorias.

Además de los cambios en citocinas proinflamatorias también observamos diferencias en moduladores anti-inflamatorios bajo el mismo contexto de infección y tratamiento. La IL-10 mostró cambios significativos en el tratamiento con Loperamida en ambos niveles de expresión, tanto para nivel de proteína (* $p < 0.05$, mediana = 146.45 pg/mL, rango = 6.79 - 650.3 pg/mL) como para mensajero (* $p < 0.05$, rango 0.1046 – 20.25 veces el control) en comparación con la infección sin tratamiento; regulando al alza este mediador, Fig. 7.

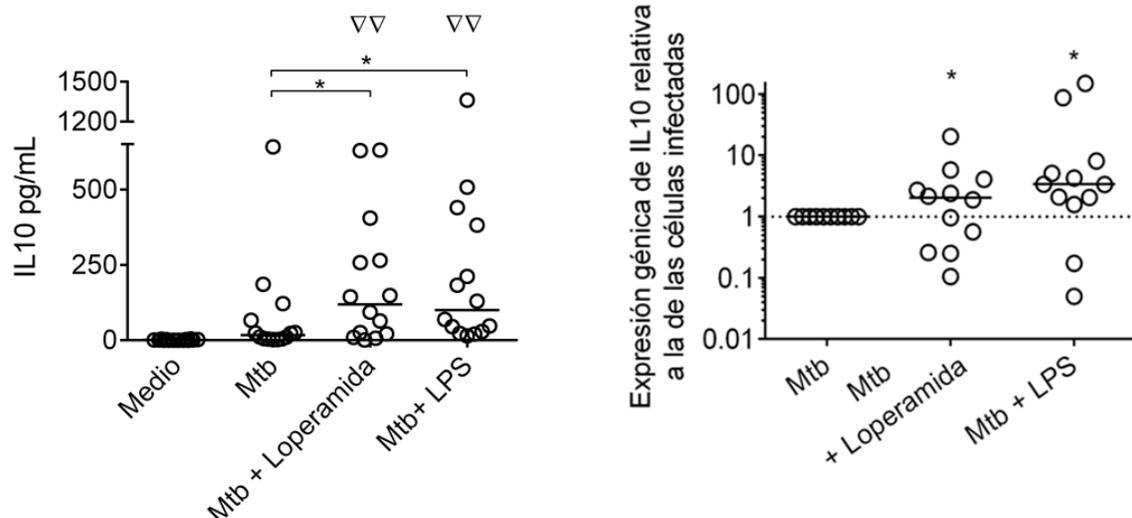


Figura 7. La loperamida modula la expresión de IL10 tanto a nivel de proteína como de mensajero. Los macrófagos fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Rv con una MOI de 5 durante 1 hora, después las células se trataron con loperamida 3 μ M durante 24 horas y se obtuvieron los lisados y sobrenadantes. La cuantificación de proteína se realizó por ELISA (n=14), y la relativa al gen control por qPCR (n=12), * $p < 0.05$, ▼▼ $p < 0.01$ vs medio. La línea horizontal muestra la mediana.

La IL-13 no mostró cambios con los diferentes tratamientos, Fig. 8.

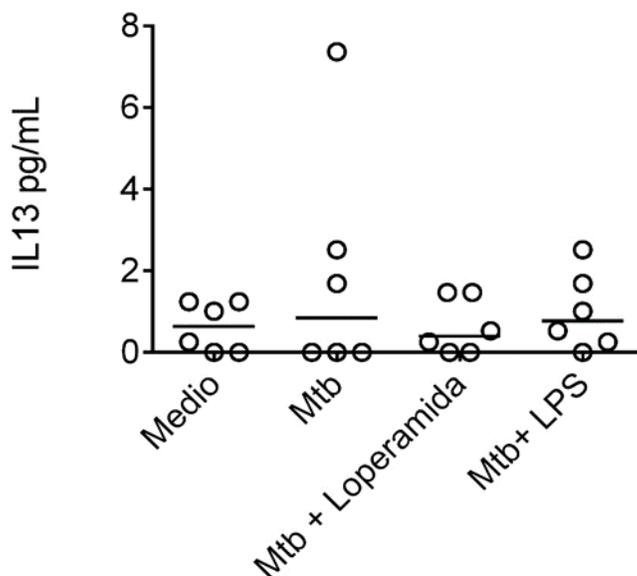


Figura 8. Inducción de IL-13 en MDM infectados y tratados. Las células fueron infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 5 durante 1 hora, posteriormente tratadas con loperamida 3 μ M durante 24 horas y se obtuvieron sobrenadantes para medir la IL-13 mediante Luminex (n=6), no se observó diferencia significativa. La línea horizontal muestra la mediana.

Modulación de citocinas por la Loperamida en células no infectadas.

Debido a que la producción de TNF- α se redujo de manera significativa y la de IL-10 se aumentó significativamente, evaluamos si la Loperamida tenía la capacidad de modular estas citocinas o el efecto dependía de la infección por sí sola, para esto incluimos un experimento sin infección (Medio, Loperamida y LPS), Fig. 9. El LPS indujo la producción de ambas citocinas, el TNF- α no aumentó con la Loperamida

Fig. 9A., y la IL-10 aumentó significativamente respecto al Medio, Fig. 9B., por lo que se puede atribuir este efecto a la Loperamida y no a la infección con Mtb.

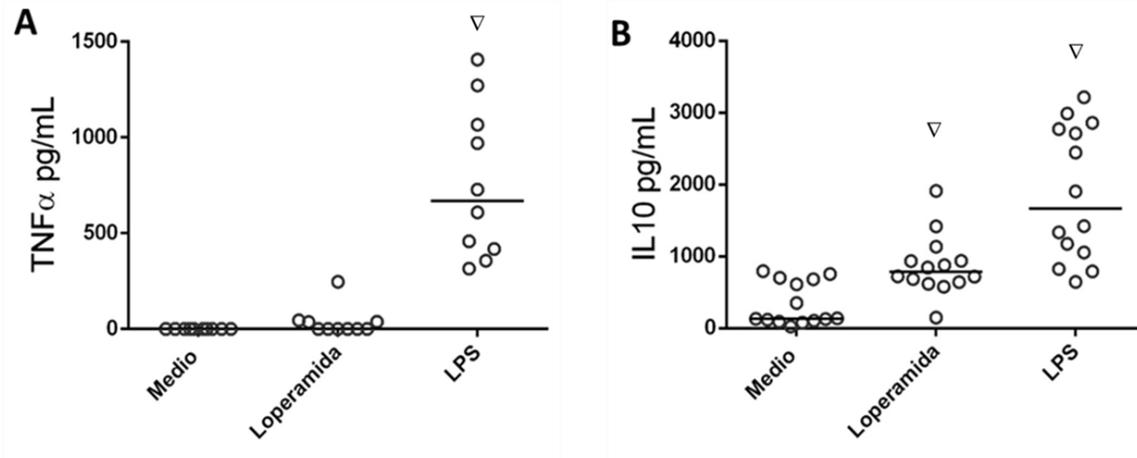


Figura 9. Controles del experimento (Medio, Loperamida y LPS). Células no infectadas y tratadas con Loperamida y LPS, para ambos casos (A y B). La loperamida no tuvo efecto para el TNF- α (n=10) pero sí para la IL-10 (n=14), ▼ p<0.05. La línea horizontal muestra la mediana.

Efecto de la Loperamida sobre citocinas producidas por linfocitos.

Dentro de nuestros experimentos obtuvimos un porcentaje pequeño de linfocitos en nuestros cultivos, Fig. 10 A., por lo tanto, decidimos medir citocinas de origen linfocitario para observar si la Loperamida tenía la capacidad de inducir la producción de estas. La infección junto con LPS provocó un aumento significativo de casi todas las citocinas en cuestión, comparado con el Medio. Las citocinas de origen linfocitario cuya producción aumentó significativamente después del tratamiento con Loperamida fueron IL-2, IL-4 e IFN- γ en comparación con las células sin tratamiento; la producción de IL-5 no se modificó, Fig. 10 B-E.

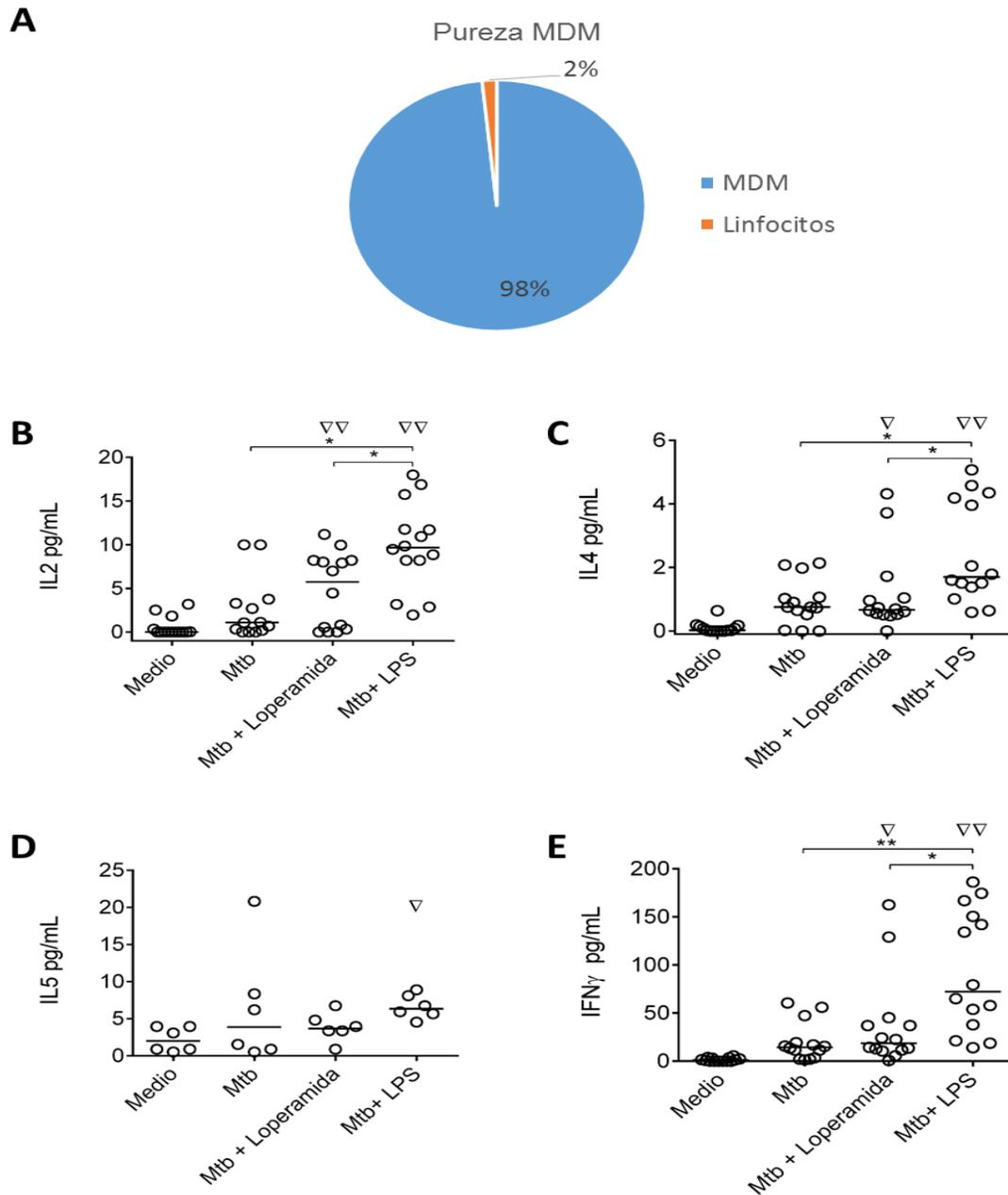


Figura 10. Pureza de MDM y producción de citocinas de origen linfocitario. Mediante citometría de flujo se pudo determinar que cerca del 2% de las células presentes en el cultivo eran linfocitos (A). Las células fueron infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 5 durante 1 hora, posteriormente tratadas con loperamida 3 μ M durante 24 horas y se obtuvieron sobrenadantes para la detección de proteínas por la técnica de Luminex. Se muestran los datos para (B) IL-2 (n=14), (C) IL-4 (n=14), (D) IL-5 (n=6) y (E) INF- γ (n=14); ▼p<0.05, ▼▼p<0.01 vs medio; *p<0.05 entre los pares de muestras seleccionadas. La línea horizontal muestra la mediana.

DISCUSIÓN

La necesidad de nuevos fármacos para mejorar esquemas terapéuticos demanda de los esfuerzos de los investigadores. Conseguirlo es muy complicado porque caracterizar la información de seguridad para humanos, la farmacocinética y la dosificación requiere de grandes inversiones económicas y mucho tiempo de ejecución (Cha *et al.*, 2017); por lo tanto, encontrar nuevos usos para fármacos ya existentes y aprobados para consumo humano es una posible solución. El propósito de este estudio fue evaluar la capacidad de la Loperamida, un fármaco ya aprobado para su uso en humanos, para regular el microambiente de citocinas bajo un contexto de infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Estudios previos publicados por Juárez *et al.*, (2016) demuestran que este compuesto induce actividad bactericida y antimicrobiana *in vitro* en macrófagos alveolares humanos y murinos además de MDM's humanos, sin embargo, no se conocía el posible efecto de este fármaco sobre la regulación de la inflamación a través de los principales mediadores secretados por macrófagos.

Las citocinas proinflamatorias juegan un papel muy importante en las enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares, tal es el caso de la tuberculosis en humanos, enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, donde una respuesta mediada por IL-1 β e IFN- γ proporciona un ambiente antimicrobiano e inmunológico local (Reuschl *et al.*, 2017). Como bien se mencionó anteriormente, no se había reportado el papel que tenía la Loperamida en la regulación de la inflamación y bajo este contexto decidimos medir los principales mediadores

proinflamatorios en macrófagos. Observamos que la IL-1 β tiene una tendencia al alza, que probablemente se logre ver con un incremento en el número de individuos, sin embargo, a nivel genético se aprecia una tendencia al alza que es significativa. El TNF- α se redujo de manera significativa en respuesta al tratamiento con loperamida, lo que sugiere que la inflamación se ve regulada a la baja.

La reducción de la producción de TNF- α generalmente representa una disminución en la capacidad de activación del macrófago, así como en la capacidad de atraer más células al sitio de infección (Philana *et al.*, 2007, Olsen *et al.*, 2016) pero la inducción de IL-1 β indica que la capacidad bactericida no está disminuida pues esta citocina es necesaria para la eliminación de Mtb (Bourigault *et al.*, 2013). Además, la Loperamida indujo la producción de GM-CSF que actúa como activador de macrófagos y los diferencia hacia el fenotipo M1, que tienen actividad bactericida (Rothchild *et al.*, 2017, Bryson *et al.*, 2019). Es posible que la IL-10 sea el mecanismo por el cual se regula la producción de TNF- α , pero no es perjudicial en este sistema, pues el contexto general no es de inmunosupresión.

No se sabe si Loperamida tiene algún efecto sobre linfocitos, es probable que sí, puesto que las citocinas de activación de linfocitos IL-2 e IL-4 se indujeron (Bergström *et al.*, 2013), las cantidades fueron bajas probablemente porque la proporción de linfocitos era baja, pero aun así fue significativa, una causa probable de este fenómeno es la activación de los receptores mu de los opioides en linfocitos (Bidlack *et al.*, 2006), por lo que en un futuro será necesario caracterizar las funciones linfocitarias que se modulan por efecto de la Loperamida.

Las citocinas importantes para la actividad inmune que controlan la infección por *M. tuberculosis* son IL-1 β , TNF- α , IL-2 IL-10, IL12, IL-17 e IFN- γ (Sia J. K., y Rengarajan J., 2019, Flynn *et al.*, 2015). El hecho de que Loperamida indujo la mayoría de estas significa que se puede modular el microambiente de citocinas a favor del hospedero.

CONCLUSIÓN

La Loperamida tiene actividad inmunomoduladora en macrófagos infectados con la cepa virulenta H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, que principalmente consiste en generar un ambiente anti-inflamatorio, sin que haya pérdida de la respuesta protectora. Estos hallazgos tienen importancia en futuras aplicaciones clínicas en las que la modulación de la inflamación sea una necesidad.

REFERENCIAS

- Duque M.A., Rojas M. Alternative macrophage activation: the diversity of one cell involved in innate immunity in response to its environmental complexity. *Inmunología*. 2007. Vol. 26:73-86.
- Murray P., Wynn T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*. 2011. Vol. 11: 723-737.
- Salinas, M. C. 2010. *La inmunología en la salud y la enfermedad*. 1ª ed. México: Editorial Médica Panamericana. P. 26-27.
- Owen J. A., Punt J. and S. Stranford. 2013. *Kuby: Immunology*. 7ª ed. W. H. Freeman.
- Murphy K., Travers P. and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*. 7ª ed. Garland Science, Taylor y Francis Group.
- González J. Microbiología de la Tuberculosis. *Semin Fund Esp Reumatol*. 2014;15(1):25–33.
- Bekale R.B., Du Plessis S.M., Hsu N.J., *et al.* Mycobacterium Tuberculosis and Interactions with the Host Immune System: Opportunities for Nanoparticle Based Immunotherapeutics and Vaccines. *Pharm Res*. 2018;36(1):8.
- WHO. 2019. *Global Tuberculosis Report*. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-report-2019>
- Mathema B, Andrews JR, Cohen T, *et al.* Drivers of Tuberculosis Transmission. *J Infect Dis*. 2017; 216: S644-S653.
- Smith I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):463-496.
- De Martino M., Lodi L., Galli L. and Chiappini E. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. *Front. Pediatr*. 2019. 7:350.
- Sia, J. K., & Rengarajan, J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiology spectrum*, 2019: 7(4).
- Juárez E., Carranza C., Sánchez G., González M., Chávez J., Sarabia C., Torres M. and E. Sada. Loperamide restricts intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016, Vol. 55 (6): 837-847.
- Rivas S., Bruno, Sada E., Hernández R. & Tsutsumi V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*. 2006. Vol. 48(1), 62-71.

- Abbas A.K., Lichtman A. H. and S. Pillai. 2015. *Cellular and molecular immunology*. Eighth edition. Elsevier.
- Trzebanski S., S. Jung. Plasticity of monocyte development and monocyte fates. *Immunology Letters*. 2020. Vol. 227: 66-78.
- Rajab N., Rutar M., Laslett A. L., Wells C. A. Designer macrophages: Pitfalls and opportunities for modelling macrophage phenotypes from pluripotent stem cells. *Differentiation*. 2018. Vol. 104: 42-49.
- Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P. and A. Sica. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *TRENDS in Immunology*. 2002, 23 (11): 549-555.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003. 3(1): 23-35.
- Robinson T., Zhang M., Ochsenbauer C., Smythies L. and R. Cron. CD4 regulatory T cells augment HIV-1 expression of polarized M1 and M2 monocyte derived macrophages. *Virology*. 2017, 504: 79–87.
- De las Casas M. E. 2014. *Polarización de macrófagos: efecto de las inmunoglobulinas y de la serotonina*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. p 4.
- Foss C., Sanchez J. and S. Jain, Imaging Macrophage-associated Inflammation. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2018. Vol. 48, Issue 3, P. 242-245.
- Turner M.D., Nedjai B., Hurst T. and D.J. Pennington. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1843 (2014), pp. 2563-2582.
- Zhang J., An J. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007; Vol. 45: 27–37.
- Schultze JL. Reprogramming of macrophages – new opportunities for therapeutic targeting. *Curr Opin Pharmacol*, (2015) 26:10–5.
- T.A. Wynn, A. Chawla, J.W. Pollard. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, (2013), 496, pp. 445–455.
- Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012. Vol. 122: 787–795.
- Orme J. and Mohan C. Macrophage subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Discov Med*. (2012). 69: 151-158.
- Chalmers S. A., Chitu V., Ramanujam M. & Putterman C. Therapeutic targeting of macrophages in lupus nephritis. *Discov. Med*. (2015). 20, 43–49.

- Menke, Julia *et al.* Distinct Roles of CSF-1 Isoforms in Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. (2011). *JASN* 22.10, 1821–1833.
- Varghese, B., N. Haase, and P.S. Low, Depletion of folate-receptor-positive macrophages leads to alleviation of symptoms and prolonged survival in two murine models of systemic lupus erythematosus. *Mol Pharm*, 2007. 4(5): p. 679-85
- Solís-Martínez R., Hernández-Flores G., Ochoa-Carrillo F.J., Ortiz-Lazareno P., Bravo-Cuellar A. Tumor-associated macrophages contribute to the progression of prostate cancer. *Gaceta Mexicana de Oncología*. (2015).14, 97-102.
- Georgoudaki A-M, Prokopec KE, Boura VF, Hellqvist E, Sohn S, Östling J, Dahan R, Harris RA, Rantalainen M, Klevebring D, Sund M, Brage SE, Fuxe J, Rolny C, Li F, Ravetch JV, Karlsson MC. Reprogramming tumor-associated macrophages by antibody targeting inhibits cancer progression and metastasis. *Cell Rep*. 2016; 15, 2000–2011.
- Malvicini Mariana, Puchulo Guillermo, Matar, Pablo, & Mazzolini, Guillermo. Inmunoterapia del cáncer: Importancia de controlar la inmunosupresión. *Medicina* (Buenos Aires), 2010. 70(6), 565-570.
- Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 2010. 11(10): 889–896.
- Padmanee Sharma and James P. Allison. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 2015. 348, 56-61.
- Santos S. S., Carmo A. M., Brunialti M. K., Machado F. R., Azevedo L. C., Assuncao M., Trevelin S. C., Cunha F. Q. and R. Salomao. Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. *Intensive Care Med*. 2016; 4(1): 5.
- Theodorakis E., Diamantaki E., Tsatsanis C., Georgopoulos D. and K. Vaporid. Macrophage phenotype in sepsis immunosuppression. *Crit Care*, (2015). 19(1): P44.
- Guzmán S., Torres M., Arellano M., Juárez E. Human macrophages chronically exposed to LPS can be reactivated by stimulation with MDP to acquire an antimicrobial phenotype. *Cellular Immunology*. 2017. Vol. 315: 45–55.
- Leelahavanichkul, A., Bocharov, A. V., Kurlander, R., Baranova, I. N., Vishnyakova, T. G., Souza, A. C. P., Eggerman, T. L. Scavenger Receptor B and CD36 Targeting Improves Sepsis Survival and Acute Outcomes in Mice. *Journal of Immunology*. 2012. (Baltimore, Md: 1950), 188(6).

- Rojas W., Anaya J.M., Aristizábal B., Cano L. E., Gómez L. M. y D. Lopera. 2007. *Inmunología de Rojas*. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia. p 289.
- OMS. 2016. *Tuberculosis*. [En línea]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- Philips, J.A., Ernst D.J. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol*. 2012; 7:353-84.
- Yugang L., Weihui L., Zhiwei X., Hui X., Zheng G.H. MpbR, an essential transcriptional factor for Mycobacterium tuberculosis survival in the host, modulates PIM biosynthesis and reduces innate immune responses. *Journal of Genetics and Genomics*. 2019. Vol. 46, Issue 12: 575-589.
- Patil U.S., Jaydeokar A.V. and D.D. Bandawane. Immunomodulators: A pharmacological review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012. 4 (1): 30-36.
- American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI). 2017. *Immunomodulators*. [En línea]. Disponible en: <https://www.aaaai.org/conditions-and-treatments/conditions-dictionary/immunomodulators>
- Dinesh Kumara, Vikrant Aryab, Ranjeet Kaurc, Zulfiqar Ali Bhata, Vivek Kumar Guptab, Vijender Kumara. A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2012; 45 (3): 165–184.
- Crohn´s & Colitis Fundation of America (CCFA). 2009. *Immunomodulators*. [En línea]. Disponible en: <http://www.ccfa.org/resources/immunomodulators.html>
- Reuman, PD. Immunomodulators. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 20 (10): 995-996, (2001).
- Ogawa C., Yuen-Joyce Liu and Koichi S. Kobayashi. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr Bioact Compd*. 2011; 7(3): 180–197.
- Wardowska A., Dzierzbicka K., Trzonkowski P. and Myśliwski A. Immunomodulatory properties of new conjugates of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide with retro-tuftsin (Arg-Pro-Lys-Thr-OMe). *International Immunopharmacology*. 2006; (6): 1560–1568.
- Salem M., Benedict J., Rogler G. and Haagen O. Muramyl dipeptide responsive pathways in Crohn´s disease: from NOD2 and beyond. *Cell. Mol. Life Sci*. 2013; (70): 3391–3404.
- Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T. and D. M. Klinman. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 10(4): 499–511.

- Dalpke A. H., Zimmermann S., Albrecht I., and K. Heeg. Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Immunology*. 2002; 106(1): 102–112.
- Steel J. C., Waldmann T. A. and J. C. Morris. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2012; 33(1): 35-41.
- Chen S., Huang Q., Liu J., Xing J., Zhang N., Liu Y. and Li, Q.. A targeted IL-15 fusion protein with potent anti-tumor activity. *Cancer Biology & Therapy*. 2015; 16(9): 1415–1421.
- Park Eun-Jung and John M. Pezzuto. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015; 1071–1113.
- Rahal K., Schmiedlin-Ren P., Adler J., Dhanani M., Sultani V., Rittershaus A. C., Reingold L., Zhu J., McKenna B. J., Christman G. M., Zimmermann E. M. Resveratrol has antiinflammatory and antifibrotic effects in the peptidoglycan-polysaccharide rat model of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18(4): 613-623.
- Serra, H. A., Roganovich, J. M., & L. F Rizzo. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional. De lo molecular al uso clínico. *Medicina (Buenos Aires)*. 2012; 72(2), 158-170.
- Lin Kai-Ti and Lu-Hai Wang. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. *Steroids*. 2016; (111): 84–88.
- PubChem. Open Chemistry Database. 2017. Loperamide. [En línea]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/loperamide#section=Top>
- Inmodium. 2010. Loperamida. [En línea]. Disponible en: http://www.janssen.com/paraguay/sites/www_janssen_com_paraguay/files/product/pdf/imodiumr-ccds_16dic2010.pdf
- Hagiwara K., Nakagawasai O., Murata A., Yamadera F., Miyoshi I., Tan-No K., Tadano T., Yanagisawa T., Iijima T., Murakami M. Analgesic action of loperamide, an opioid agonist, and its blocking action on voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Neurosci. Res*. 2003. Vol. 46:493–497.
- Bascones A. M., Mattila R., Gomez R. F. and J. H. Meurman. Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014. 1;19 (1): 24-31.
- Carroll J. Managing The Immunomodulators. *Biotechnol Healthc*. 2010.
- Cha, Y., Erez, T., Reynolds, I., Kumar, D., Ross, J., Koytiger, G., Kusko R., Zeskind B., Risso S., Kagan E., Papapetropoulos S., Grossman I., Laifenfeld D. Pharma perspective on drug repurposing. *Br. J. Pharmacol*. (2017). 1–13.

- Reuschl AK, Edwards MR, Parker R, Connell DW, Hoang L, Halliday A, Jarvis H, Siddiqui N, Wright C, Bremang S, Newton SM, Beverley P, Shattock RJ, Kon OM, Lalvani A. Innate activation of human primary epithelial cells broadens the host response to Mycobacterium tuberculosis in the airways. *PLoS Pathog.* 2017; 13(9).
- Philana L., Plessner H.L., Voitenok N., Flynn J. Tumor Necrosis Factor and Tuberculosis. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* 2007. Vol. 12: 22-25
- Olsen A., Chen Y., Ji Q., Zhu G., De Silva A. D., Vilchèze C., Weisbrod T., Li W., Xu J., Larsen M., Zhang J., Porcelli S. A., Jacobs W. R., Jr, Chan J.. Targeting Mycobacterium tuberculosis Tumor Necrosis Factor Alpha-Downregulating Genes for the Development of Antituberculous Vaccines. 2016. *mBio.* Vol. 7(3).
- Bourigault M. L., Segueni N., Rose S., Court N., Vacher R., Vasseur V., Erard F., Le Bert M., Garcia I., Iwakura Y., Jacobs M., Ryffel B., Quesniaux V. F.. Relative contribution of IL-1 α , IL-1 β and TNF to the host response to Mycobacterium tuberculosis and attenuated M. bovis BCG. *Immunity, inflammation and disease.* 2013. Vol: 1(1): 47–62.
- Rothchild A. C., Stowell B., Goyal G., Nunes C., Yang Q., Papavinasasundaram K., Sasseti C. M., Dranoff G., Chen X., Lee J., Behar S. M.. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Production by T Cells during Mycobacterium tuberculosis Infection. *MBio.* 2017. Vol. 8(5): 01514-17.
- Bryson BD, Rosebrock TR, Tafesse FG, Itoh CY, Nibasumba A., Babunovic GH, Corleis B., Martin C., Keegan C., Andrade P., Realegeno S., Kwon D., Modlin RL, Fortune, SM. Heterogeneous GM-CSF signaling in macrophages is associated with control of Mycobacterium tuberculosis. *Nature communications.* 2019. Vol. 10 (1): 2329.
- Bergström S. E., Bergdahl E., Sundqvist K. G. A Cytokine-controlled mechanism for integrated regulation of T-lymphocyte motility, adhesion and activation. *Immunology.* 2013. Vol. 140(4): 441–455.
- Sia J. K., & Rengarajan J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. 2019. *Microbiology spectrum.* Vol. 7(4).
- Flynn J. L., Gideon H. P., Mattila J. T., Lin P. L. Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis. *Immunological reviews.* 2015. Vol. 264(1): 60–73.
- Bidlack, J.M., Khimich, M., Parkhill, A.L. et al. 2006. Opioid Receptors and Signaling on Cells from the Immune System. *Jrnl Neuroimmune Pharm* 1, 260–269.