



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNORREGULADORES DE LOS  
DERIVADOS BIOACTIVOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS QUE  
CONTRIBUYEN AL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. RUIZ HUERTA ANDY DOREY**

TUTORA: DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNORREGULADORES DE LOS  
DERIVADOS BIOACTIVOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS QUE  
CONTRIBUYEN AL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. RUIZ HUERTA ANDY DOREY**

TUTORA: DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/446/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted qué en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de noviembre de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **RUIZ HUERTA ANDY DOREY** con número de cuenta **306226487** con la tesis titulada "**Identificación de los mecanismos inmunorreguladores de los derivados bioactivos de los ácidos grasos poliinsaturados que contribuyen al control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis***", realizada bajo la dirección de la **DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES  
Vocal: DR. RICARDO VALLE RIOS  
Vocal: DR. JOSÉ ARELLANO GALINDO  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ  
Secretario: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 16 de mayo de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por apoyar la enseñanza y mejora de los académicos mexicanos, por las competencias que brinda, la aptitud y calidad humana de sus integrantes.

Al CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

### **A los miembros de mi comité tutor**

A la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal, mentora inagotable, guía de mi formación profesional. Gracias por el apoyo y amistad incondicional, por seguir transmitiendo el conocimiento científico y la alegría por la vida.

A la Dra. Leonor Huerta Hernández, por haber aceptado ser parte de mi comité, por sus sugerencias en la mejora de este trabajo, por seguir dedicando su talento y esfuerzo al conocimiento científico.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, por sus comentarios atinados en la revisión y mejora de este trabajo. Por su ambición en la investigación científica, y su energía inagotable de compartir sus conocimientos.

## DEDICATORIA

A quienes me han acompañado...,  
con un consejo,  
una palabra  
y su invaluable amistad.  
Gracias.

[Porque quisiera creer  
que no soy el único que vive huyendo

y que la felicidad  
es una palabra posible]

A. E. Quintero

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Gracias a mi familia, por el apoyo incondicional, sé que puedo contar con ustedes en cualquier momento, los quiero. Jorge y Susan gracias por cuidar a March, Riu, Sonrics, Salem, Mimas, Titán y mis grillos en mi ausencia.

Gracias por todo Susan, por exhortarme a dar un poco más, por ayudarme a despertar de mi mundo turbio, por todo tu apoyo, gracias, te quiero.

Gracias a todo el Equipo de Microbiología; Martha, Yola, Tere, Silvia, Carmelita, Claudia, Manuel, Luz, Laura, y Esme, gracias por su amistad, por su amor a la ciencia, y el apoyo brindado a lo largo de todos estos años, gracias por permitirme haber sido parte de su grupo de trabajo y de una gran familia, siempre les estaré agradecida.

Gracias Fernando (Shurupcito bb<sup>11</sup>), espero sigamos este camino juntos, con muchas aventuras por delante, artículos y libros que escribir, gracias por todo vuestro apoyo, os mega infiamo ∞.

Gracias Rossy, por todo el invaluable apoyo y las palabras de aliento.

Gracias Ángel, por tus comentarios, ayuda en correcciones de mis escritos, eres súper, nunca sobran helados o pasteles para esta amistad.

Gracias al Equipo de Virología, en especial a Fernando, Luis, Carlos, Manuel y Víctor, por el apoyo, ayuda y palabras, incluido el préstamo de sus equipos, gracias por su amistad, y dedicación al mundo de la ciencia.

Gracias amigos, por estar acompañándome en este viaje; Susan, Ángel, Francisco, Víctor, Víctor Manuel, Angie, José, Omar, Renato, Liz, Bernardo, David, Dante, Baldo, Jorge, Carlos, Christian, Luis, Alan, Everardo, y los que me faltan, espero sigamos compartiendo agradables momentos.

A las personas que ya no están, hasta encontrarnos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) porque se han convertido en mi segundo hogar.

Porque ante toda adversidad, la voluntad de seguir investigando y dar a conocer el saber científico nos ayuda a seguir este camino. Gracias.

# ÍNDICE

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
HIPÓTESIS .....	8
OBJETIVOS.....	8
Objetivo general .....	8
Objetivos particulares.....	8
METODOLOGÍA.....	9
Reactivos .....	9
1.-Obtención de Macrófagos Derivados de Monocitos.....	9
2.-Preparación del cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	10
3.-Infección y estimulación de macrófagos humanos .....	10
4.-Actividad bactericida .....	11
5.-Cuantificación de TNF- $\alpha$ .....	11
6.-Cuantificación de RvD1, Mar1, PGE2 y LTB4.....	11
7.-Expresión génica de BPI, LL37, LOX y COX-2 .....	12
8.-Extracción de proteínas nucleares.....	12
9.-Cuantificación de Nrf2 en extractos nucleares .....	13
10.-Translocación de NF $\kappa$ B .....	13

11.-Detección de BPI por microscopía de fluorescencia .....	14
12.-Análisis estadístico.....	14
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>15</b>
1.-RvD1, RvD2, PDX, LXA4 y Mar1 exógenos, modulan la producción de TNF- $\alpha$ dependiente de LPS en MDM.....	15
2.-RvD1, RvD2, PDX, LXA4 y Mar1 modulan la producción de TNF- $\alpha$ por MDM infectados con <i>M. tuberculosis</i> .....	17
3.-RvD1 y Mar1 mejoran la actividad antimicrobiana de MDM infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	18
4.-Respuestas de citocinas diferenciales provocadas por RvD1 y Mar1 en MDM infectados .....	20
5.-Un antagonista tipo D1 de alta afinidad inhibe los efectos de RvD1 y Mar1 sobre la producción de TNF- $\alpha$ y BPI en MDM infectados con <i>M. tuberculosis</i> .....	22
6.-Producción de TNF- $\alpha$ , RvD1, Mar1, PGE2 y LTB4 por adición de DHA y ASA en MDM infectados con <i>M. tuberculosis</i> .....	24
7.-Expresión génica de ciclooxigenasas, lipooxigenasas y péptidos antimicrobianos por adición de DHA y ASA en MDM infectados con <i>M. tuberculosis</i> .....	25
Vías propuestas de acción de RvD1, Mar1, DHA y ASA.....	28
Discusión .....	31
Conclusiones.....	35
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>

## ANEXOS

ANEXO 1. Artículo requisito para la obtención del grado.

ANEXO 2. Porcentaje de viabilidad celular a las 24 horas de estimulación con distintas concentraciones de los mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (SPM).

ANEXO 3. Estrategia del análisis de evaluación de la pureza de monocitos.

ANEXO 4. Análisis de translocación de NFκB.

ANEXO 5. Inducción de BPI por microscopia de fluorescencia.

ANEXO 6. Publicaciones y artículo de revisión durante el doctorado.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía generalizada para la conversión de mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación .....	5
Figura 2. Actividad antiinflamatoria de los SPM en MDM estimulados con LPS .....	16
Figura 3. Efecto de los SPM sobre la producción de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4.....	17
Figura 4. Efecto de los SPM sobre la actividad bactericida y la expresión de BPI y LL37 por macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> .. .....	19
Figura 5. Efecto de RvD1 y Mar1 en la producción de citocinas por macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> . .....	21
Figura 6. Un antagonista tipo D1 de alta afinidad inhibe los efectos de RvD1 y Mar1 sobre producción de TNF- $\alpha$ en macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> .....	23
Figura 7. Efectos de DHA y ASA sobre la producción de TNF- $\alpha$ .....	24
Figura 8. Efectos de DHA y ASA en la producción de RvD1, Mar1, PGE2 y LTB4 .....	25
Figura 9. Efectos de DHA y ASA en la expresión génica de COX y LOX.. .....	26
Figura 10. Efectos de DHA y ASA en la expresión génica de BPI y LL37.....	27
Figura 11. Propuesta de la vía de señalización de RvD1.. .....	28
Figura 12. Propuesta de la vía de señalización de Mar1.. .....	29
Figura 13. Propuesta de la vía de señalización de DHA y aspirina.....	30



## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

ALX: receptor de lipoxinas

ARE: elemento de respuesta antioxidante (*antioxidant response element*)

BCG: bacilo Calmette-Guérin de *Mycobacterium bovis*

BPI: proteína bactericida aumentadora de la permeabilidad (*bactericidal permeability-enhancing protein*)

CCL: ligandos de quimiocina (*chemokines ligand*)

CMKLR1: receptor chemerin tipo quimiocina 1 (*chemerin chemokine-like receptor 1*)

COX-2: ciclooxigenasa tipo 2

DAMP: patrones moleculares asociados a daño (*molecular patterns associated to danger*)

DHA: ácido docosahexaenoico (*docosahexaenoic acid*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

EIA: inmunoensayo enzimático (*enzyme immunoassay*)

ELISA: ensayo inmunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EPA: ácido eicosapentaenoico (*eicosapentaenoic acid*)

GM-CSF: factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

GPR32: receptor 32 acoplado a proteína G (*G protein-coupled receptor 32*)

IFN $\gamma$ : interferón gamma

IL: interleucina

IMF: intensidad media de fluorescencia

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible (*inducible nitric oxide synthase*)

LPS: lipopolisacárido

LL37: péptido antimicrobiano catelicidina (*cathelicidin antimicrobial peptide*)

LTB4: leucotrieno 4

LTC4: cisteinil leucotrieno 4

LXA4: lipoxina A4

Mar1: maresina 1 (*maresin 1*)

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos

MDM: macrófagos diferenciados de monocitos

MDP: muramil dipéptido

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*)

MIP: proteína inflamatoria de macrófagos (*macrophage inflammation protein*)

MOI: multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*)

mRNA: RNA mensajero

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

MQ: macrófago

MTC: complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. orygis* y *M. pinnipedii*)

M1: macrófago tipo proinflamatorio

M2: macrófago tipo antiinflamatorio

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: óxido nítrico

NK: células asesinas naturales (*natural killer*)

NLR: receptores tipo NOD

Nrf2: factor relacionado a NF-E2, factor nuclear (derivado de eritroide 2) tipo 2 (NF-E2L2) (*NF-E2 related factor*, *NFE2L2*, *from nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*)

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)

PBMC: células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononucleated cell*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase-chain reaction*)

PDX: protectina DX

PGE2: prostaglandina E2

PKC: proteína quinasa C (*protein kinase C*)

PMN: leucocitos polimorfonucleares

PRR: receptores de reconocimiento de patógenos (*pattern recognition receptor*)

PUFA: ácido graso poli-insaturado (*poly unsaturated fatty acids*)

RNA: ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

RPM: revoluciones por minuto

RvD1: resolvina D1

RvD2: resolvina D2

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SLR: receptores tipo scavenger

SPM: mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (*specialized pro-resolving lipid mediators*)

TB-MDR: tuberculosis multifarmacorresistente (*multidrug-resistant tuberculosis*)

TB-XDR: tuberculosis extensivamente resistente (*extensively drug-resistant tuberculosis*)

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*)

Th1: células T cooperadoras tipo 1, productoras de citocinas proinflamatorias

Th17: células T cooperadoras tipo 17, productoras de la citocina IL-17

TLR: receptores tipo toll (*Toll-like receptors*)

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

Tri-DAP: L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-mDAP, comprende el dipéptido iE-DAP ( $\gamma$ -D-Glu-mDAP) y un resto L-Ala

UFC: unidades formadoras de colonias

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*)

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WHO/OMS: Organización Mundial de la salud (World Health Organization)

## **Identificación de los mecanismos inmunorreguladores de los derivados bioactivos de los ácidos grasos poliinsaturados que contribuyen al control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis***

### **Resumen**

La producción de lípidos bioactivos entre los que se encuentran prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas, resolvinas y maresinas, también conocidos como mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (SPM, por sus siglas en inglés *specialized pro-resolving lipid mediators*) participan en la modulación del equilibrio de la inflamación/antiinflamación después de un daño o infección, restauran la homeostasis y ayudan a la regeneración tisular. Sin embargo, su efecto en diversas enfermedades comienza a vislumbrarse, entre las que encontramos a la tuberculosis, generada principalmente por la infección de *Mycobacterium tuberculosis*. Por esta razón, investigamos los mecanismos de estos SPM, así como uno de sus precursores, el ácido docosahexaenoico (DHA, *docosahexaenoic acid*) en macrófagos derivados de monocitos humanos infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv.

Encontramos que todos los lípidos redujeron la producción de TNF- $\alpha$ , pero solo la resolvina D1 (RvD1) y la maresina 1 (Mar1) indujeron una reducción significativa en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* con distintos patrones inmunomoduladores. Mientras que ambos SPM incrementaron la expresión génica de BPI, solo Mar1 incrementó la expresión de LL37, los cuales son péptidos antimicrobianos. Además, indujeron la translocación nuclear de NF $\kappa$ B, pero solo Mar1 indujo la translocación del factor nuclear Nrf2. Dado que RvD1 y Mar1 son inducibles y sintetizados a partir del componente dietético, el DHA, se pensó en su potencial inmunoterapéutico contra la tuberculosis. Sin embargo, nuestros resultados preliminares muestran que la infección con *M. tuberculosis* interfiere en el metabolismo del DHA en el macrófago humano para producir RvD1 y Mar1, y que la adición de aspirina como control de la producción de ambos mediadores lipídicos no restaura su síntesis durante la infección en macrófagos humanos. Por lo tanto, solo RvD1 y Mar1 son capaces de controlar la infección por *M. tuberculosis*, pero no el DHA y ambos SPM utilizan mecanismos diferenciales de regulación de la inflamación durante la infección.

**Identification of the immunoregulatory mechanisms of the bioactive derivatives of polyunsaturated fatty acids that contribute to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection**

**Abstract**

The production of bioactive lipids, including prostaglandins, leukotrienes, lipoxins, resolvins, and maresins, also known as specialized pro-resolving lipid mediators (SPM), participate in modulation balancing inflammation/anti-inflammation after damage or infection, restore homeostasis, and aid tissue regeneration. However, its effect on various diseases is beginning to be seen, among which we find tuberculosis, generated mainly by *Mycobacterium tuberculosis* infection. For this reason, we investigated the mechanisms of this SPM and one of its precursors, docosahexaenoic acid (DHA), in macrophages derived from human monocytes infected with the virulent strain of *M. tuberculosis* H37Rv.

We found that all lipids reduced the production of TNF- $\alpha$ . Still, only resolvin D1 (RvD1) and maresin 1 (Mar1) induced a significant reduction in the intracellular growth of *M. tuberculosis*, with different immunomodulatory patterns. While both SPM increased the gene expression of BPI, only Mar1 increased the expression of LL37, which are antimicrobial peptides. Furthermore, they induced nuclear translocation of NF $\kappa$ B, but only Mar1 induced translocation of nuclear factor Nrf2. Since RvD1 and Mar1 are inducible and synthesized from the dietary component, DHA, their immunotherapeutic potential against tuberculosis was considered. However, our preliminary results show that infection with *M. tuberculosis* interferes with the metabolism of DHA in the human macrophage to produce RvD1 and Mar1. The addition of aspirin as a control for both lipid mediators' production does not restore their synthesis during infection in human macrophages. Therefore, only RvD1 and Mar1 can control *M. tuberculosis* infection, but not DHA, and both SPM use different mechanisms of regulation of inflammation during infection.

# **Identificación de los mecanismos inmunorreguladores de los derivados bioactivos de los ácidos grasos poliinsaturados que contribuyen al control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis***

## **Introducción**

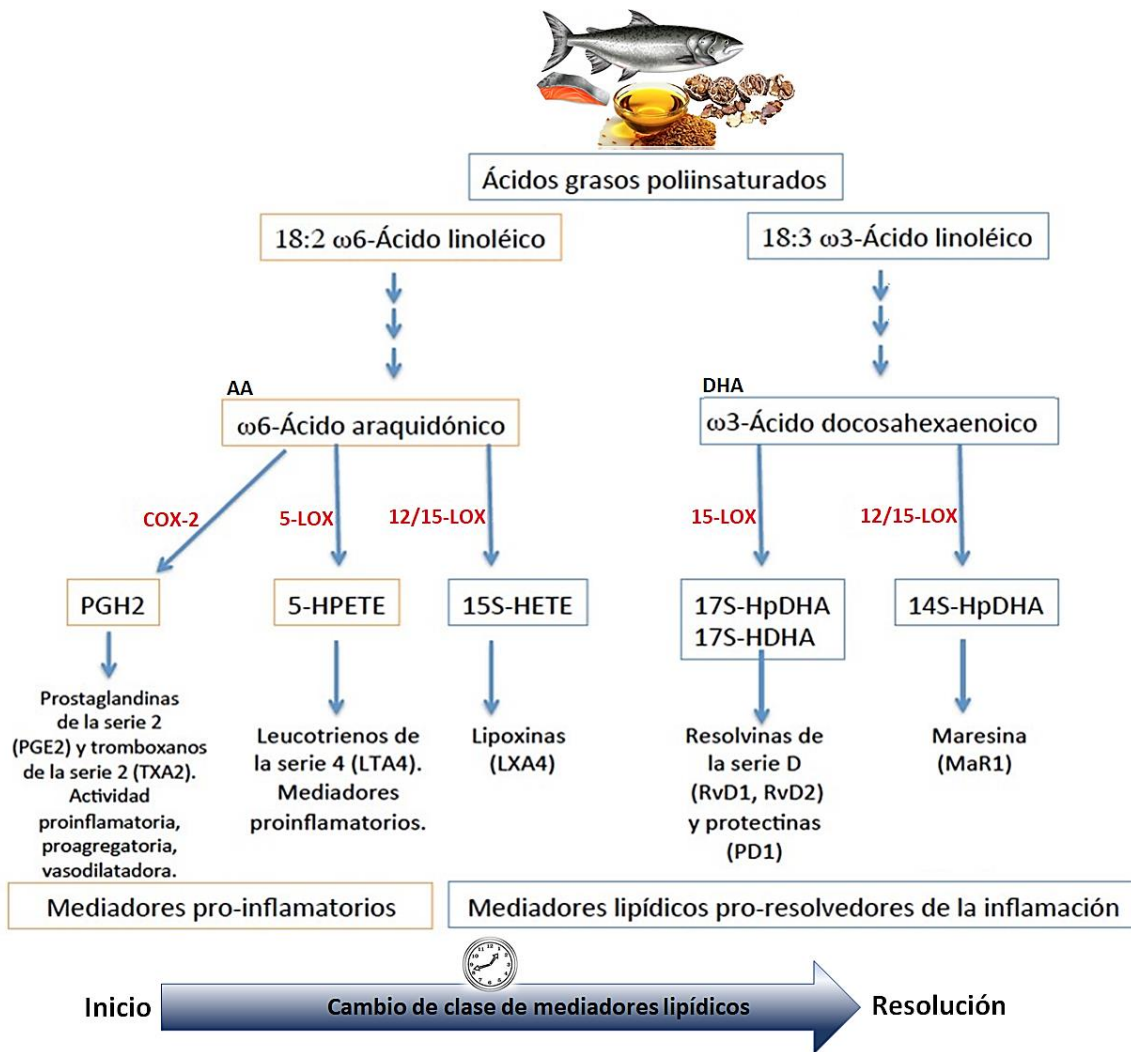
La inflamación es la primera respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado por patógenos o por sustancias extrañas de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Es un proceso fisiológico complejo conservado a lo largo de la evolución que involucra diversos eventos coordinados, desde procesos vasculares, homeostáticos, celulares e inmunes. Se caracteriza por la extravasación de líquido al sitio del daño, que produce edema (tumor), aumento del flujo sanguíneo (rubor), aumento en la temperatura local (calor) y activación de terminales aferentes (dolor), que son los cuatro signos cardinales descritos por el enciclopedista romano Aulo Cornelio Celso. Ocasionalmente puede haber pérdida de la función local (Cinel & Opal, 2009; Medzhitov, 2008; Serhan *et al.*, 2020; Zumla *et al.*, 2015).

Dependiendo de la duración de la inflamación, puede clasificarse en aguda o crónica. La inflamación aguda comprende cambios significativos en los niveles plasmáticos de ciertas proteínas consecuencia de la acción de citocinas proinflamatorias, entre las más importantes se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor alpha*), la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), la interleucina 2 (IL-2), y la interleucina 6 (IL-6), estas citocinas pueden activar a la proteína C reactiva, que se produce en el hígado y que tiene función de opsonina, al mismo tiempo que induce la activación parcial de la cascada del sistema del complemento, cuyos fragmentos C5a y C3a (llamados anafilatóxinas) tienen capacidad quimiotáctica para granulocitos y monocitos, e inducen la desgranulación de los mastocitos. También participan los interferones de tipo I y II (IFN-I e IFN-II), histamina, bradiquinina y prostaglandinas (Deretic, 2012; Galli *et al.*, 2011; Plüddemann *et al.*, 2011) que son cruciales para controlar, combatir y reparar el daño e incluyen cambios en las propiedades fisicoquímicas del plasma (descenso de la viscosidad y aumento de la velocidad de sedimentación eritrocitaria).

La resolución de la inflamación culmina con la reparación del tejido y el regreso a la función normal para evitar lesión tisular extensa en respuesta a infecciones (Ortega-Gómez et al., 2013). En caso de que no haya una resolución satisfactoria de la inflamación aguda, se desencadena un estado inflamatorio crónico, con repercusiones sistémicas y deletéreas para el hospedero como la infiltración tisular por agregados de leucocitos (formación de granulomas), la biosíntesis incontrolada de colágeno (fibrosis o cirrosis), o lesiones oxidativas en el ácido desoxirribonucleico (DNA) que suelen dar lugar a una enfermedad degenerativa (Nathan & Ding, 2010).

La resolución de la inflamación es un proceso fisiológico complejo que depende de la producción de lípidos oxigenados derivados de los ácidos grasos poli-insaturados esenciales, entre los que se encuentran las lipoxinas, resolvinas y protectinas, denominados mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (SPM, por sus siglas en inglés *specialized pro-resolving lipid mediators*). Los SPM se generan después del metabolismo de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 ingeridos con la dieta, son productos derivados del ácido linoléico (C18:  $\Delta$ 2, n-6), ácido araquidónico (AA, C20:  $\Delta$ 4, n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5,8,11,14,17) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6,7,10,13,16,19) generados a partir de reacciones enzimáticas mediadas por la acción de las lipooxigenasas (LOX) y/o ciclooxigenasas (COX) e incluyen protectinas y resolvinas de la serie D derivadas del ácido graso omega-3; DHA, las resolvinas de la serie E derivadas del EPA y lipoxinas derivadas del ácido graso omega-6; AA como se muestra en la Figura 1 (Bannenberg & Serhan, 2010; Serhan et al., 2008; Spite & Serhan, 2010).

La actividad de los SPM en el control de procesos infecciosos respiratorios regula la respuesta inflamatoria, evitando el daño por necrosis asociado a la inflamación y disminuyendo la carga microbiana. En el caso de la tuberculosis, infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que afecta principalmente a los pulmones, el papel de los SPM está pobremente caracterizado, por lo que este proyecto permitirá conocer su efecto modulador en la infección y el papel de sus precursores EPA y DHA.



**Figura 1. Vía generalizada para la conversión de mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación.** COX, ciclooxigenasa; LOX, lipoxigenasa; HETE, ácido hidroxi eicosatetraenoico; HPETE, ácido hidroperoxil eicosatetraenoico; HDHA, ácido hidroxi docosahexaenoico; HpDHA, ácido hidroperoxi docosahexaenoico; PG, prostaglandina; TX, tromboxano; LT, leucotrieno; LX, lipoxina; Rv, resolvina (modificada de Calder, 2012).

Mientras que las prostaglandinas y leucotrienos amplifican la producción de citocinas proinflamatorias, las actividades biológicas de los SPM incluyen la modulación de mecanismos de la respuesta inmune; por ejemplo, controlan los procesos inflamatorios locales, activan mecanismos antimicrobianos como la autofagia, la producción de péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno e inhiben la quimiotaxis de neutrófilos. Las resolvinas y lipoxinas activadas por aspirina son los lípidos mejor descritos



por su papel en el control de la inflamación y la capacidad de activar mecanismos bactericidas. Por ejemplo, RvD2 disminuye la producción de interleucina 17 (IL-17), interleucina 10 (IL-10), prostaglandina E2 (PGE2) y leucotrieno B4 (LTB4) favoreciendo la fagocitosis bacteriana y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*) en un modelo murino de sepsis por *Escherichia coli*. La resolvina RvE1 también induce la producción de ROS con lo que participa en la eliminación bacteriana al mismo tiempo que reduce la inflamación. La lipoxina ATL induce la producción de la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad (BPI, por sus siglas en inglés *bactericidal permeability-enhancing protein*) que protege a las mucosas de infecciones por bacterias Gram negativas (Bülow et al., 2018; El Kebir et al., 2009, 2012; Palmer et al., 2011; Seki et al., 2010). Así, los SPM, antagonistas de los mediadores proinflamatorios, podrían participar en la eliminación de procesos infecciosos además de ser indispensables para el restablecimiento a la homeostasis.

La infección por *M. tuberculosis* se caracteriza por desencadenar una respuesta proinflamatoria inicial en la que las citocinas IL-12 (interleucina 12), IL-6 (interleucina 6) y TNF- $\alpha$  inducen la activación de mecanismos antimicrobianos en los macrófagos. La respuesta proinflamatoria se necesita al inicio de la infección, pero su presencia prolongada se ha asociado a daño histopatológico severo (Cooper et al., 2011; Rook et al., 1991; Sharma & Bose, 2001). La participación de los SPM en la infección por Mtb se desconoce, pero algunos mecanismos como la apoptosis y la autofagia se han asociado al control del crecimiento intracelular de Mtb, sugiriendo que moléculas antiinflamatorias podrían participar en el control antimicrobiano de Mtb. Por otro lado, en un modelo murino, se ha descrito que la presencia de PGE2 y LTB4 es perjudicial en etapas tardías de la infección con Mtb, de manera que el bloqueo de la PGE2 favorece el control de la infección por Mtb y la regulación de la inflamación (Moreno et al., 2002). Debido a que los lípidos resolvedores de la inflamación están involucrados en la regulación de la producción de PGE2, es probable que también estén involucrados en el control de la infección por *M. tuberculosis*.

El papel que estas moléculas lipídicas juegan en la infección por *M. tuberculosis* comienza a investigarse, y sabemos que la dinámica de regulación de la inflamación es indispensable en la infección por *M. tuberculosis*, lo que sugiere un papel relevante de estos SPM. Por lo que, el objetivo de este trabajo es identificar los mecanismos inmunorreguladores de estos SPM en el control de la infección por la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, así como de uno de sus precursores, el ácido docosahexaenoico (DHA, *docosahexaenoic acid*) en macrófagos derivados de monocitos humanos.

## **HIPÓTESIS**

Al identificar los mecanismos de inmunoregulación de los SPM en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, podremos utilizar a uno de sus precursores, el ácido docosahexaenoico (DHA), como tratamiento en el control de la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos derivados de monocitos humanos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar los mecanismos inmunorreguladores de los derivados bioactivos de los ácidos grasos poliinsaturados que contribuyen al control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

### **Objetivos particulares**

- 1.-Evaluar la actividad bactericida y péptidos antimicrobianos inducida por RvD1 y Mar1 sobre la infección de *M. tuberculosis* en macrófagos derivados de monocitos humanos.
- 2.-Evaluar si el macrófago puede sintetizar RvD1 y Mar1 a partir del precursor (DHA).
- 3.-Determinar si con la adición del precursor (DHA) se puede inducir actividad antimicrobiana.
- 4.-Dilucidar si la infección con la cepa virulenta de Mtb puede interferir con los mecanismos de síntesis de RvD1 y Mar1.
- 5.-Determinar si RvD1y Mar1 son inducibles por aspirina.

## **METODOLOGÍA**

### **Reactivos**

Los derivados de los ácidos grasos poliinsaturados 17(S)-Resolvin D1 (RvD1); 7(S),16(R),17(S)-Resolvin D2 (RvD2); 5(S),6(R)-Lipoxin A4 (LXA4); 10(S),17(S)-DiHDoHE-Protectin DX (PDX); 7(R)-Maresin 1 (Mar1) y el precursor, ácido docosahexaenoico (DHA) se adquirieron de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), y la aspirina (ASA) de Sigma Aldrich. Las soluciones de trabajo se realizaron por dilución con etanol, la concentración final de etanol en el cultivo fue menor al 0.1%. Se evaluó la citotoxicidad de las concentraciones finales a utilizar en los cultivos (100 nM para LXA4, RvD1, RvD2 y PDX, 150 nM para Mar1, para DHA, 10 nM, y para ASA, 25 ug/mL) usando el kit Cell Titer (Promega, Madison, WI) (Anexo 1). El LPS se adquirió de Sigma Aldrich (St. Louis, MO), se utilizó a una concentración de 200 ng/ml.

### **1.-Obtención de Macrófagos Derivados de Monocitos**

A partir de paquetes leucocitarios obtenidos de sujetos sanos donadores al banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica; para ello, la sangre se diluyó a una relación 1:1 con medio RPMI 1640 (Lonza) y fueron separadas por medio de centrifugación en un gradiente de densidad en una solución separadora de linfocitos (Lonza). Las células se resuspendieron en RPMI suplementado con 10 % de suero humano (Valley Biomedical Inc.), 200 mM de L-glutamina (Lonza) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Lonza), en adelante denominado medio completo.

Posteriormente, se obtuvieron los monocitos (MN) por separación inmunomagnética, por selección positiva, utilizando perlas conjugadas con anticuerpo anti CD14 humano (Miltenyi Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los MN se resuspendieron en medio completo, y la suspensión celular se ajustó a  $10^6$  células/mL. La pureza y viabilidad de los MN se determinaron por citometría de flujo y se observó que el  $98.36 \pm 1.26\%$  de las células fue CD14+ y la viabilidad de  $99.3 \pm 0.2\%$  (media  $\pm$  ES) (Anexo 2). Los MN CD14+ se incubaron en una placa de 24 pozos ( $10^6$  células/pozo) (Costar) a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> durante siete días para su diferenciación a macrófagos (MDM) realizando un cambio de medio de

cultivo a los 3 días para eliminar las células no adherentes y otro a los siete días para tener medio fresco con volúmenes precisos en el momento de realizar las estimulaciones.

## **2.-Preparación del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv**

El vial con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) (ATCC, Manassas, VA) se descongeló dentro del gabinete de bioseguridad, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Después se agregó 1 ml de medio RPMI suplementado con 30 % de suero humano. Para la obtención de bacilos individuales se adicionaron 5 perlas de cristal de 3 mm y se agitó vigorosamente en un agitador vórtex, durante 5 minutos. La suspensión de Mtb se centrifugó a 2000 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recolectó el sobrenadante y se ajustó el número de bacilos a  $10^7$  bacterias/ml (el ajuste de las micobacterias se realizó acorde al conteo de las micobacterias almacenadas previamente como stock). A partir de esta suspensión se realizaron los cálculos correspondientes para los ensayos de la infección de los macrófagos (razón de 5 bacterias por macrófago, MOI 5).

## **3.-Infección y estimulación de macrófagos humanos**

Los MDM se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb), a una MOI 5, en medio RPMI con 30% de suero humano durante una hora. Al término de este tiempo las células se lavaron tres veces con medio RPMI para eliminar las bacterias no fagocitadas. Posteriormente, los MDM se cultivaron en presencia de 100 nM de RvD1, RvD2, PDX, LXA4, 150 nM de Mar1 o 200 ng/mL de LPS como control positivo y se incluyó un control de etanol. O se cultivaron en presencia de 10 nM de DHA o 25 ug/mL de aspirina (ASA), como control de la producción de LTB4, PGE2, RvD1 y Mar1. Un juego de células se incubó durante 24 h, se recuperaron los sobrenadantes del cultivo y los lisados celulares. Estos se almacenaron en congelación para determinaciones posteriores. El otro juego de células se cultivó durante 3 días y se determinó el crecimiento intracelular de Mtb por el método de unidades formadoras de colonias (UFC).

#### **4.-Actividad bactericida**

Para evaluar los efectos de los SPM en el control del crecimiento intracelular micobacteriano, los macrófagos se infectaron a una multiplicidad de infección de 5 (MOI de 5) y se trataron con las mismas cantidades de los mediadores lipídicos descritos anteriormente después de un lavado exhaustivo para eliminar las bacterias no fagocitadas. Los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* se incubaron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 1 h (día 0) y 72 h (día 3). Después de la incubación, los sobrenadantes se descartaron y las células se lisaron con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1% durante 10 minutos y luego se neutralizaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 20%. Los lisados se diluyeron en serie y se colocaron en placas de agar 7H10 (Difco Laboratories) por triplicado. Las UFC se cuantificaron después de 21 días.

#### **5.-Cuantificación de TNF- $\alpha$**

En los sobrenadantes de los cultivos se cuantificó el TNF- $\alpha$ , usando un ensayo inmunoenzimático (ELISA) casero. Cada muestra se realizó por duplicado. Brevemente, se sensibilizaron placas Maxisorp F96 (Nunc) con 2.5  $\mu$ g/mL de Anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano (Pharmingen, San José, CA) a 4°C toda la noche. Después de lavar con PBS 0.01 M, pH 7.2, Tween-20 al 0.05 % se bloqueó con Superblock (Thermo). Se añadieron las muestras y estándares y se incubaron 2 h a 37°C. La detección se realizó con 5  $\mu$ g/mL del anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano conjugado a biotina (Pharmingen, San José, CA). Posteriormente, las placas se incubaron con 10  $\mu$ g/mL de estreptoavidina-fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch). Después de lavar exhaustivamente, la reacción se reveló con sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich) y se paró con NaOH 1 M. La absorbancia se cuantificó a 405 nm en un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation). Las concentraciones de TNF- $\alpha$  se calcularon a partir de la curva estándar. Los resultados de las mediciones respectivas se midieron con el programa Ascent Software versión 2.6.

#### **6.-Cuantificación de RvD1, Mar1, PGE2 y LTB4**

Las resolvinas, protectinas, prostaglandinas y leucotrienos fueron cuantificados en los sobrenadantes de MDM infectados o no infectados por Mtb mediante un ensayo

inmunoenzimático (EIA) y cada muestra se ensayó por duplicado, utilizando los kits Resolvin D1, Maresin 1, Prostaglandin E2 y Leukotriene B4 ELISA kit (Cayman Chemical, MI, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **7.-Expresión génica de BPI, LL37, LOX y COX-2**

A partir de los lisados celulares se extrajo el RNA total utilizando el kit de extracción RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se utilizó el Kit Superscript First Strand (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La expresión génica de BPI, LL37 y COX-2 se determinó por PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el gen constitutivo 18S ribosomal (validado para su uso como gen de referencia). Para este proceso se utilizaron los ensayos TaqMan pre-diseñados: BPI (Hs01552756\_m1), LL-37 o CAMP (HS00189038\_m1), y COX-2 o PTGS2 (Hs000153133\_m1) marcados con FAM y 18S rRNA (4319413E) (Applied Biosystems, Foster City, CA) marcado con VIC. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador StepOne PlusSystem (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron empleando el método del Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ).

### **8.-Extracción de proteínas nucleares**

La proteína nuclear se obtuvo de MDM por diferenciación en placas de 24 pozos de ultra baja adherencia ( $1 \times 10^6$  células/pozo) (Corning Incorporated, Costar) como se indicó anteriormente. Al final de la diferenciación, las células fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) una hora antes de la adición de los SPM (RvD1, RvD2, PDX, LXA4 a 100 nM y Mar1 a 150 nM). Las células se removieron de las placas con ayuda de un poco de buffer 1mM de EDTA (ácido etilendiamino tetra acético) (Corning Incorporated, Costar) y se comprobó la viabilidad de las mismas con azul de tripano. Se transfirieron a tubos cónicos de polipropileno de 14 ml (5 millones de células por condición), se centrifugaron dos veces por 5 minutos a 1500 rpm a 4 °C y se procedió a la extracción de proteínas nucleares. Todo el procedimiento se realizó en frío. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se agitó brevemente en vórtex, se resuspendió en 1 ml de PBS frío pipeteando suavemente y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Después se centrifugó 5 minutos a 3500 rpm a 4

°C, y se volvió a resuspender en 1 ml de PBS frío pipeteando suavemente para después centrifugar a 3500 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante completamente usando las pipetas p100-p10. El botón celular se resuspendió en un buffer hipotónico para la obtención del extracto citoplásmico (HEPES [4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetanosulfónico] 20 mM pH 7.9, NaCl [Cloruro de sodio] 400 mM, MgCl [Cloruro de Magnesio] 1.5 mM, Glicerol 25 %, EDTA 0.2 Mm, DTT [ditiotreitil] 1 mM fresco y PMSF [fluoruro de fenilmetilsulfonilo] 0.5 mM fresco) y se dejó 1 minuto en hielo, para después centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C. En este paso se reservó el sobrenadante (que es la fracción citoplasmática) y se colocó en tubos previamente etiquetados, asegurándose de no dejar líquido residual. Se guardaron a -20 °C. El sedimento se resuspendió en 20 µl de buffer hipertónico (HEPES 10 mM pH 7.0, KCl [Cloruro de potasio] 10 mM, MgCl 1.5 mM, DTT 1 mM fresco), se incubó por 30 minutos con agitación suave a 4 °C (usando una plataforma angular en el refrigerador). Después se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante (que contenía la proteína nuclear) y se colocó en tubos previamente etiquetados. Los extractos obtenidos se almacenaron en congelación para conservar hasta su uso a -20 °C.

### **9.-Cuantificación de Nrf2 en extractos nucleares**

Para evaluar la translocación nuclear de Nrf2, se utilizaron extractos nucleares y citosólicos de MDM estimulados con LPS y se analizaron utilizando un kit TransAM Nrf2 (Active Motif, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **10.-Translocación de NFκB**

La translocación nuclear de NFκB p65 se determinó mediante un citómetro acoplado a imagen en macrófagos sin infección. Los MDM se estimularon con LPS (500 ng / mL), RvD1 100 nM o Mar1 150 nM durante 60 minutos. Las células se lavaron inmediatamente con PBS frío (previamente a 4°C) (Lonza) y se tiñeron con un kit de translocación Amnis NFκB (Millipore, Burlington, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se analizaron inmediatamente utilizando el equipo Image Stream MKII (Amnis Corporation, Seattle, WA). Se fotografiaron al menos 1,000 células y se midió la translocación nuclear utilizando el Asistente de localización nuclear dentro del software



Amnis Ideas (Amnis Corporation). Un índice de similitud por encima de 1.2 determinó la localización nuclear de NFκB. El índice de similitud es el coeficiente de correlación de Pearson transformado logarítmicamente y es una medida del grado en que dos imágenes se correlacionan linealmente dentro de una región enmascarada. Los resultados se expresan como el porcentaje de células con translocación de NFκB nuclear, Anexo 3.

### **11.-Detección de BPI por microscopía de fluorescencia**

Para los experimentos de microscopía de fluorescencia, se cultivaron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en cámaras Lab-Tek II de 8 pocillos. Los macrófagos se infectaron con *M. tuberculosis* a un MOI de 5. Después de descartar bacterias no fagocitadas, las células se incubaron con el antagonista hidrobromuro tipo D1 de alta afinidad (5 μM) (SCH, TOCRIS Bioscience, Bristol, Reino Unido) durante 30 minutos antes de la estimulación con RvD1 o Mar1 y luego se incubaron durante 24 h adicionales. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con anti-hBPI de conejo purificado (R&D systems, Minneapolis, MN) y anti-M de conejo, anticuerpos de tuberculosis y anticuerpos secundarios acoplados con Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594 (Life Technologies). Se utilizó Hoechst (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA) para detectar núcleos. Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, DE), y las imágenes se adquirieron y analizaron con el software ZEN Pro (Carl Zeiss). Se tomaron imágenes de al menos 50 células para cada condición. Las células se contornearon con la herramienta Spline utilizando la imagen de contraste de fase como fuente. La región de interés seleccionada se pegó en la imagen de fluorescencia y se calculó la intensidad media de fluorescencia de BPI por célula, Anexo 4.

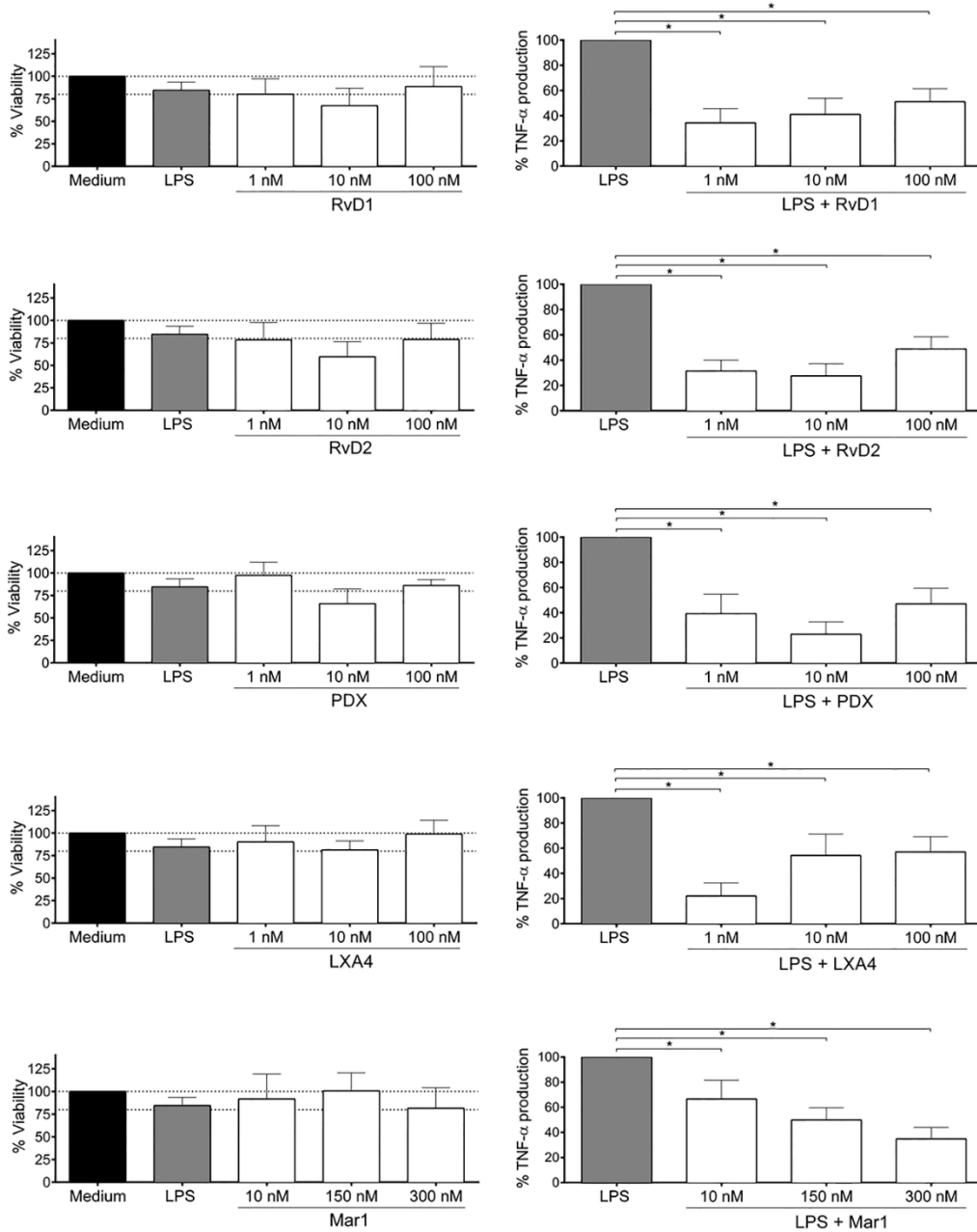
### **12.-Análisis estadístico**

Los datos se analizaron utilizando la ANOVA de Friedman para datos no paramétricos relacionados entre sí, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Todos los valores se expresan como datos individuales en los que se señala la mediana, o como medias con error estándar o en diagrama de caja y bigotes (box plots) indicando cuartiles y medianas según se especifica en la leyenda de las figuras. Se consideró significancia estadística con  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism, versión 6.

## RESULTADOS

### **1.-RvD1, RvD2, PDX, LXA4 y Mar1 exógenos, modulan la producción de TNF- $\alpha$ dependiente de LPS en MDM**

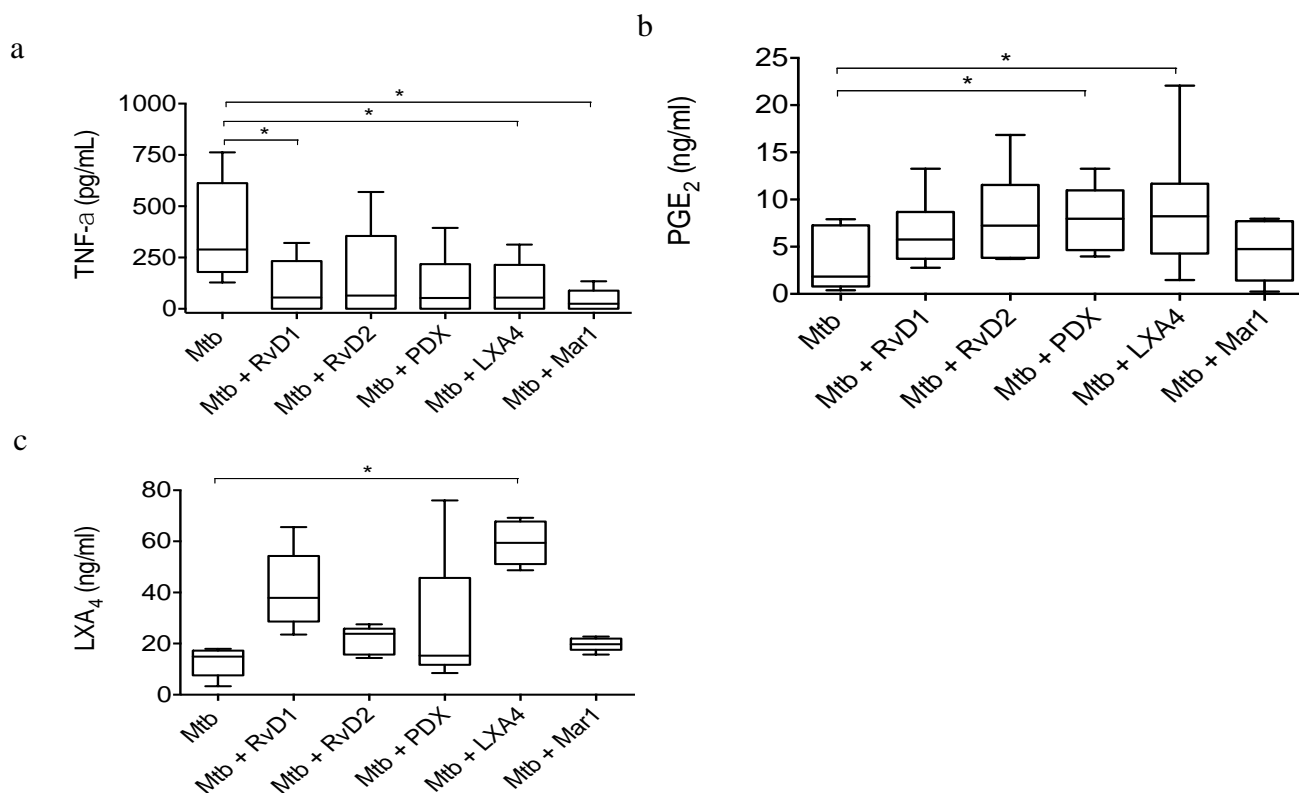
Los SPM son producidos por macrófagos y ejercen su función biológica principalmente en los neutrófilos. Debido a que los efectos de RvD1 y Mar1 en macrófagos están pobremente caracterizados, primero confirmamos que los lípidos en este estudio ejercían actividades moduladoras en macrófagos derivados de monocitos sin infección al medir su efecto en la producción de TNF- $\alpha$  después de la estimulación con LPS. Con base en las concentraciones reportadas en la literatura, utilizamos 1, 10 y 100 nM para RvD1, RvD2, PDX y LXA4 y 10, 150 y 300 nM para Mar1 (Balas et al., 2014; Börgeson et al., 2012; Dalli et al., 2013; Fullerton et al., 2014; Keinan et al., 2013; Mas et al., 2012; Recchiuti et al., 2014; Serhan, 2014; Serhan et al., 2015; Uddin & Levy, 2011; Wang et al., 2011), para evaluar su capacidad para reducir la producción de TNF- $\alpha$  después de la estimulación con LPS en macrófagos, y no se observó una reducción significativa en la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones evaluadas para cada lípido (Fig. 2, izquierda). Observamos una reducción significativa independiente de la dosis de la producción de TNF- $\alpha$  por parte de SPM previo a la resolución (Fig. 2, derecha). Dado que no hubo un efecto significativo de la concentración de lípidos utilizada, todos los experimentos posteriores se realizaron utilizando la concentración más alta que no afectó la viabilidad de los macrófagos.



**Figura 2. Actividad antiinflamatoria de los SPM en MDM estimulados con LPS.** Las células se estimularon con 200 ng/ml de LPS durante 1 h, y luego se agregaron RvD1, RvD2, PDX o LXA4 (a 1, 10 y 100 nM) o Mar1 (a 10, 150 y 300 nM) y se incubaron durante 24 h. Se recuperaron los sobrenadantes y se evaluó la producción de TNF- $\alpha$  mediante ELISA (derecha). La viabilidad celular se determinó en presencia de los lípidos solos (izquierda). Se muestran las medias  $\pm$  errores estándar,  $n = 7$ , \*  $p < 0.05$ .

## 2.-RvD1, RvD2, PDX, LXA4 y Mar1 modulan la producción de TNF- $\alpha$ por MDM infectados con *M. tuberculosis*

Una vez demostrado que los SPM en estudio tienen una actividad reguladora en la producción de TNF- $\alpha$ , se evaluó el efecto de los mediadores en macrófagos infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv mediante la medición de la producción de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4. Observamos que RvD1, LXA4 y Mar1 redujeron significativamente la producción de TNF- $\alpha$  después de la infección por *M. tuberculosis* (Fig. 3a). Además, PDX y LXA4 incrementaron significativamente la producción de PGE2 en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (Fig. 3b) y LXA4 incremento la producción de LXA4 (Fig. 3c). No logramos discernir si la cantidad de LXA4 detectada fueron restos de la lipoxina añadida de manera exógena en lugar de la producción autoinducida.

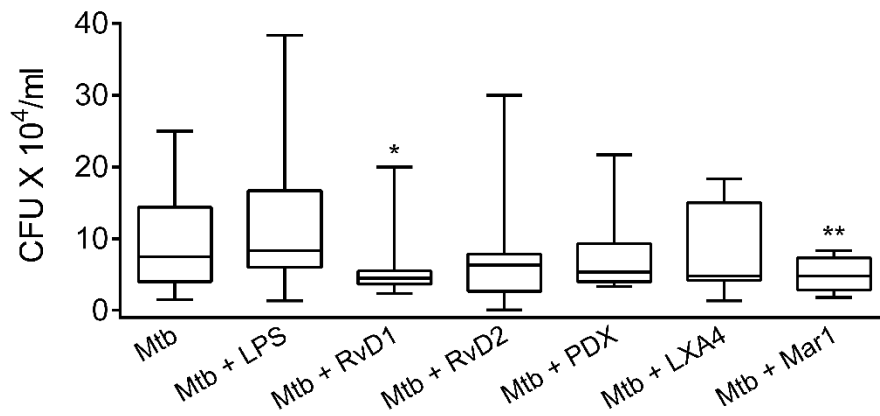


**Figura 3. Efecto de los SPM sobre la producción de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4.** Los macrófagos se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) a una MOI de 5 durante 1 h. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas, se agregaron RvD1, RvD2, PDX o LXA4 (100 nM) o Mar1 (150 nM), y las células se incubaron. Después de 24 h, los sobrenadantes se recuperaron para la cuantificación de a) TNF- $\alpha$  (n= 14) mediante ELISA, de b) PGE2 (n= 10) y c) LXA4 (n= 5) mediante EIA. Los diagramas de caja indican las medianas y los cuartiles. \* p < 0.05 vs Mtb solo.

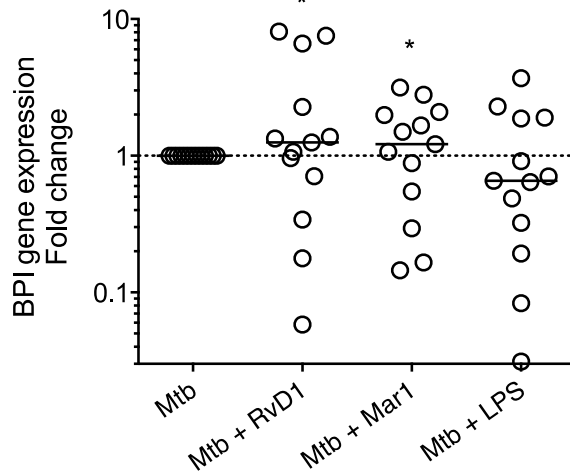
### **3.-RvD1 y Mar1 mejoran la actividad antimicrobiana de MDM infectados con *M. tuberculosis* H37Rv**

Debido a que la resolución de la inflamación puede tener un papel en las respuestas antimicrobianas, investigamos el papel que desempeña la resolución de la inflamación en el control de la infección por *M. tuberculosis*. Observamos una reducción significativa en la carga bacteriana intracelular en macrófagos estimulados con RvD1 (mediana 4.5 [rango 2.3-20] x 10<sup>4</sup> UFC/mL) y Mar1 (mediana 4.8 [rango 1.8-8.3] x 10<sup>4</sup> UFC/mL) en comparación con macrófagos no tratados (mediana 7.5 [rango 1.5-25] x 10<sup>4</sup> UFC/mL) (Fig. 4a). Los otros SPM no mostraron ningún efecto sobre el control de la carga bacteriana. Debido a que RvD1 y Mar1 activaron la respuesta antimicrobiana de los macrófagos, evaluamos si este efecto estaba asociado con la inducción de péptidos antimicrobianos. Se incluyó el LPS porque induce inflamación, pero amortigua las respuestas antimicrobianas. Observamos que tanto RvD1 como Mar1 indujeron la sobreexpresión de BPI en macrófagos infectados, con un cambio en la mediana de 2.276 [rango 0.05-8.1] y un cambio en la mediana de 1.665 [rango 0.14-3.157], respectivamente, en relación con la expresión de BPI en células no tratadas (Fig. 4b). LPS no indujo sobreexpresión de BPI. La sobreexpresión de LL37 se observó después de la estimulación con RvD1, con un cambio en la mediana de 1.59 [rango 0.19-11.64] (Fig. 4c). Aparentemente, la adición de LPS a los macrófagos infectados reguló a la baja la expresión de BPI y LL37.

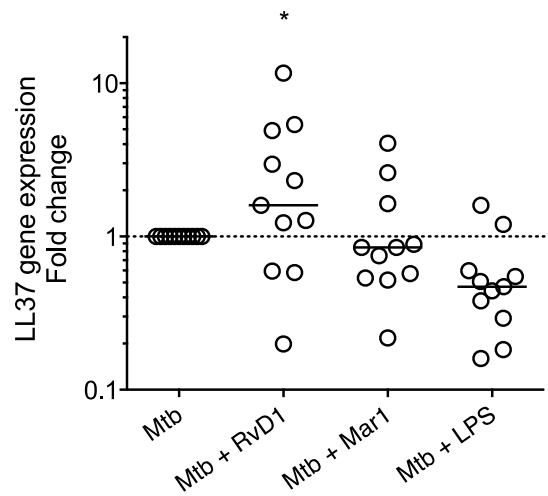
a



b



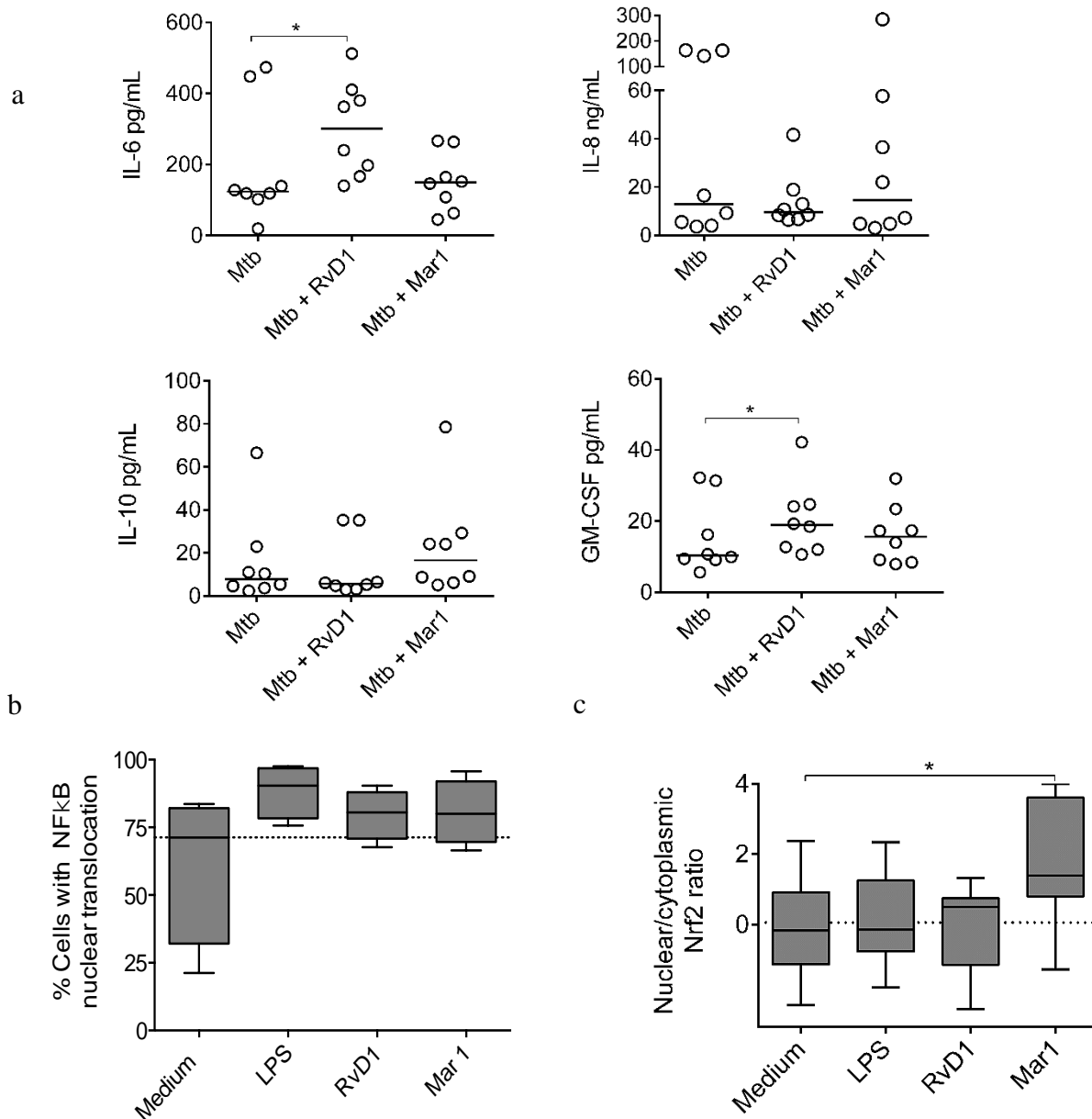
c



**Figura 4. Efecto de los SPM sobre la actividad bactericida y la expresión de BPI y LL37 por MDM infectados con *M. tuberculosis*.** Los MDM se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) a una MOI de 5 durante 1 h. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas, y se añadieron al cultivo 200 ng/ml de LPS, RvD1, RvD2, PDX o LXA4 (100 nM) o Mar1 (150 nM). a) La carga bacteriana intracelular se determinó mediante el método de la unidad formadora de colonias (UFC) después de 3 días de cultivo. Los diagramas de caja indican las medianas y los cuartiles, n= 11. \* p <0.05. Se usaron lisados celulares para la cuantificación de la expresión génica de b) BPI (n= 13) y c) LL37 (n= 11) mediante PCR en tiempo real (qPCR). La expresión génica se normalizó a la abundancia relativa de ARN 18S. Se muestran los resultados individuales del cambio en relación a solo la infección, utilizando el método de Ct comparativo. Las líneas indican las medianas. \* p <0.05.

#### **4.-Respuestas de citocinas diferenciales provocadas por RvD1 y Mar1 en MDM infectados**

Las distintas respuestas antimicrobianas inducidas por RvD1 y Mar1 nos llevaron a evaluar si éstos inducen respuestas de citocinas diferenciales. Encontramos que RvD1 indujo la producción de cantidades significativas de IL-6 y GM-CSF, pero no de IL-10 o IL-8, en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, mientras que Mar1 no indujo un aumento significativo en la producción de cualquiera de las citocinas (Fig. 5a). Debido a que la inducción de citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos requiere señales de transcripción para translocarse al núcleo, determinamos la translocación de los factores nucleares NFκB p65 (inductor de la transcripción de citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos) y Nrf2 (factor nuclear que activa la transcripción de moléculas anti-inflamatorias). Para estos experimentos, se utilizaron LPS, RvD1 y Mar1 como estimulantes únicos para prevenir el efecto de la infección. Observamos que tanto RvD1 como Mar1 indujeron la translocación de NFκB p65 al núcleo en una proporción más pequeña que el LPS (Fig. 5b), pero solo Mar1 indujo una translocación significativa de Nrf2 en comparación con los macrófagos sin estimulación (Fig. 5c).



**Figura 5. Efectos de RvD1 y Mar1 en la producción de citocinas por MDM infectados con *M. tuberculosis*.** Los MDM se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) a un MOI de 5 durante una hora. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se añadieron RvD1 (100 nM), Mar1 (150 nM). Las células permanecieron en cultivo durante 24 h, y a) la producción de IL6, IL8, IL10 y GM-CSF se determinó por Luminex. Se muestran los resultados individuales. Las líneas indican las medianas, n= 8. \* p <0.05 entre los pares de muestras indicados. La translocación nuclear de los factores de transcripción se determinó en células no infectadas estimuladas con LPS (200 ng/ml), RvD1 o Mar1 después de 2 h de cultivo. b) La translocación nuclear de NFκB se determinó por imagen de citometría de células intactas. Se representan los porcentajes de células con

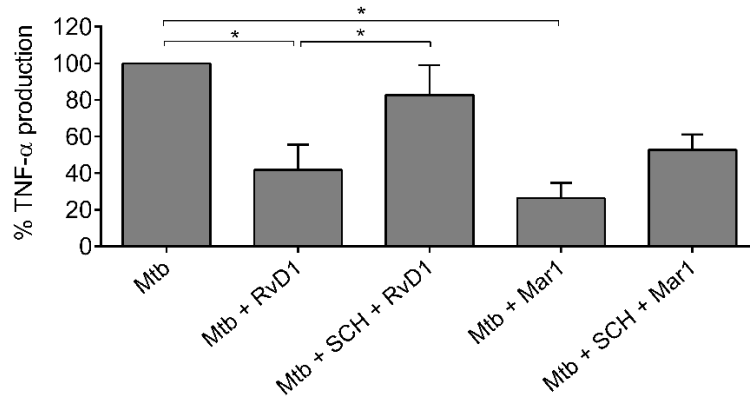


translocación, n= 5. c) La translocación nuclear de Nrf2 se midió mediante ELISA en extractos nucleares y citoplásmicos de las células. Se representa la relación nuclear/citoplásmica. Los diagramas de caja indican las medianas y los cuartiles, n= 8. \* p <0.05 entre los pares de muestras indicados.

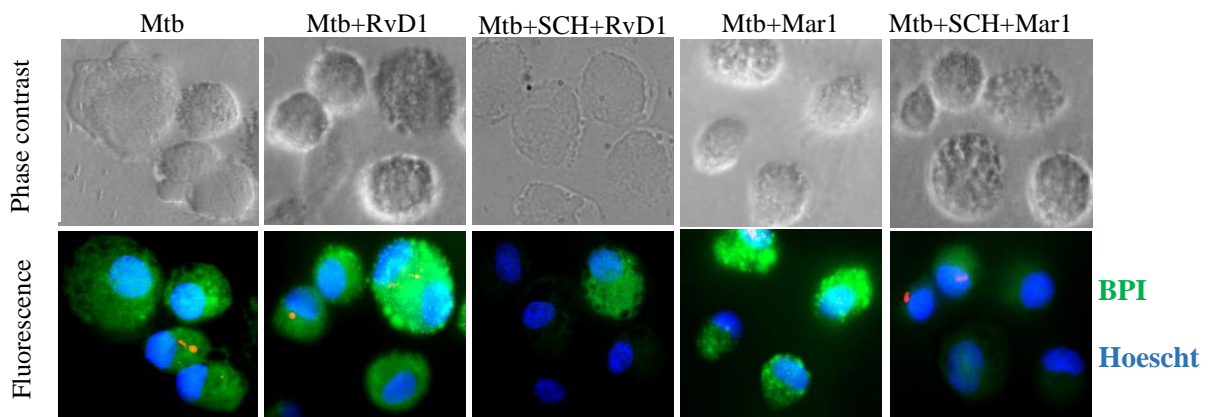
### **5.-Un antagonista tipo D1 de alta afinidad inhibe los efectos de RvD1 y Mar1 sobre la producción de TNF- $\alpha$ y BPI en MDM infectados con *M. tuberculosis***

Exploramos el papel de la señalización de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) en la modulación RvD1 y Mar1 de las respuestas de macrófagos durante la infección por *M. tuberculosis*. Utilizamos el antagonista de tipo D1 SCH, que es un inhibidor genérico de los GPCR antes de la estimulación con RvD1 y Mar1. Encontramos que la adición de SCH a los macrófagos infectados anuló el efecto regulador de RvD1 en la producción de TNF- $\alpha$  (Fig. 6a). Además, la adición de SCH D1 inhibió la sobreexpresión de BPI inducida por RvD1 (Fig. 6b y Fig. 6c). A la inversa, la inhibición de la señalización de GPCR solo revirtió parcialmente los efectos Mar1.

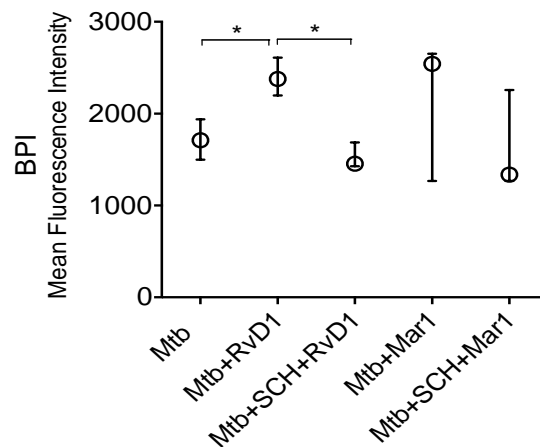
a



b



c

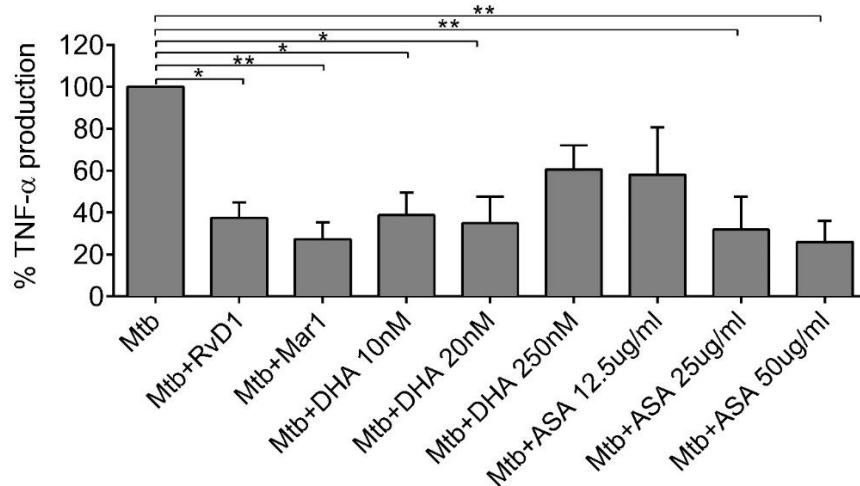


**Figura 6. Un antagonista tipo D1 de alta afinidad inhibe los efectos de RvD1 y Mar1 sobre producción de TNF- $\alpha$  en MDM infectados con *M. tuberculosis*.** Los MDM se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) a una MOI de 5 durante 1 h. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas. El bromhidrato antagonista de tipo D1 de alta afinidad (SCH, 5  $\mu$ M) se añadió 30 minutos antes de

la adición de RvD1 (100 nM) o Mar1 (150 nM). Las células se incubaron durante otras 24 h. a) Los sobrenadantes se recogieron y la producción de TNF- $\alpha$  se midió mediante ELISA. Se muestran las medias  $\pm$  errores estándar, n= 6. \* p <0.05 entre los pares de muestras indicados. Las células se fijaron y la proteína BPI se detectó mediante microscopía de fluorescencia. b) Imágenes representativas de contraste de fase y tinción de fluorescencia para las condiciones experimentales. anti-hBPI (verde) y anti-M de conejo. Se usaron anticuerpos contra la tuberculosis (rojo) y se contrastaron con los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor apropiados. Se usó Hoechst (azul) para teñir los núcleos. c) Se tomaron imágenes de al menos 50 células para cada condición, y se calculó la intensidad de fluorescencia media de BPI por célula. Se representan las medianas con rangos intercuartiles, n= 6. \* p <0.05 entre los pares de muestras indicados.

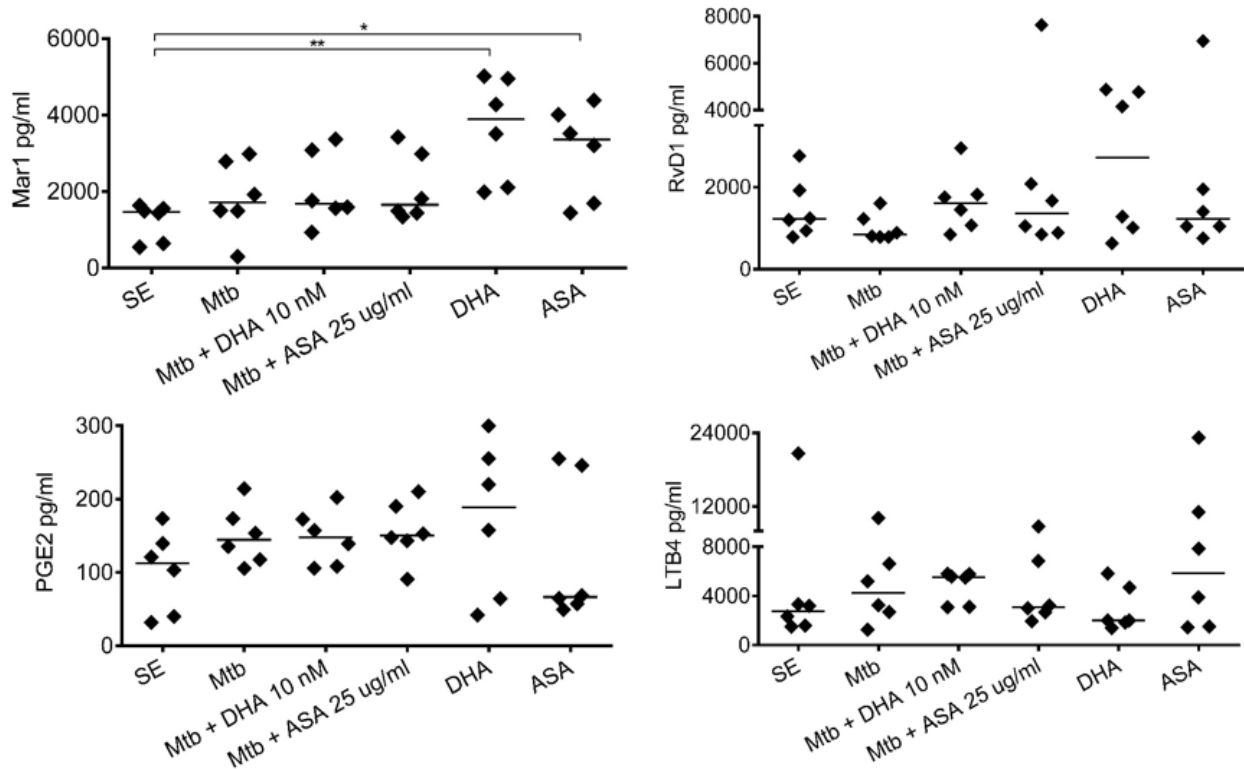
### 6.-Producción de TNF- $\alpha$ , RvD1, Mar1, PGE2 y LTB4 por adición de DHA y ASA en MDM infectados con *M. tuberculosis*

Se realizaron estudios piloto para detectar las concentraciones funcionales de DHA, el precursor de RvD1 y Mar1 y también de aspirina (ASA), un inductor de la síntesis de resolvinas, con base en la producción de TNF- $\alpha$  y pruebas de toxicidad celular, con o sin infección. El DHA regula la producción de TNF- $\alpha$  independientemente de la dosis, mientras que la aspirina (ASA), inductor de la producción de resolvinas también regula la producción de TNF- $\alpha$  pero de manera dosis-dependiente (Fig. 7). Además, se detectó la producción de RvD1, Mar1, PGE2 y LTB4 por adición de DHA y ASA (Fig. 8).



**Figura 7. Efectos de DHA y ASA sobre la producción de TNF- $\alpha$ .** Los macrófagos se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) a una MOI de 5 durante 1 h. Se eliminaron las bacterias no

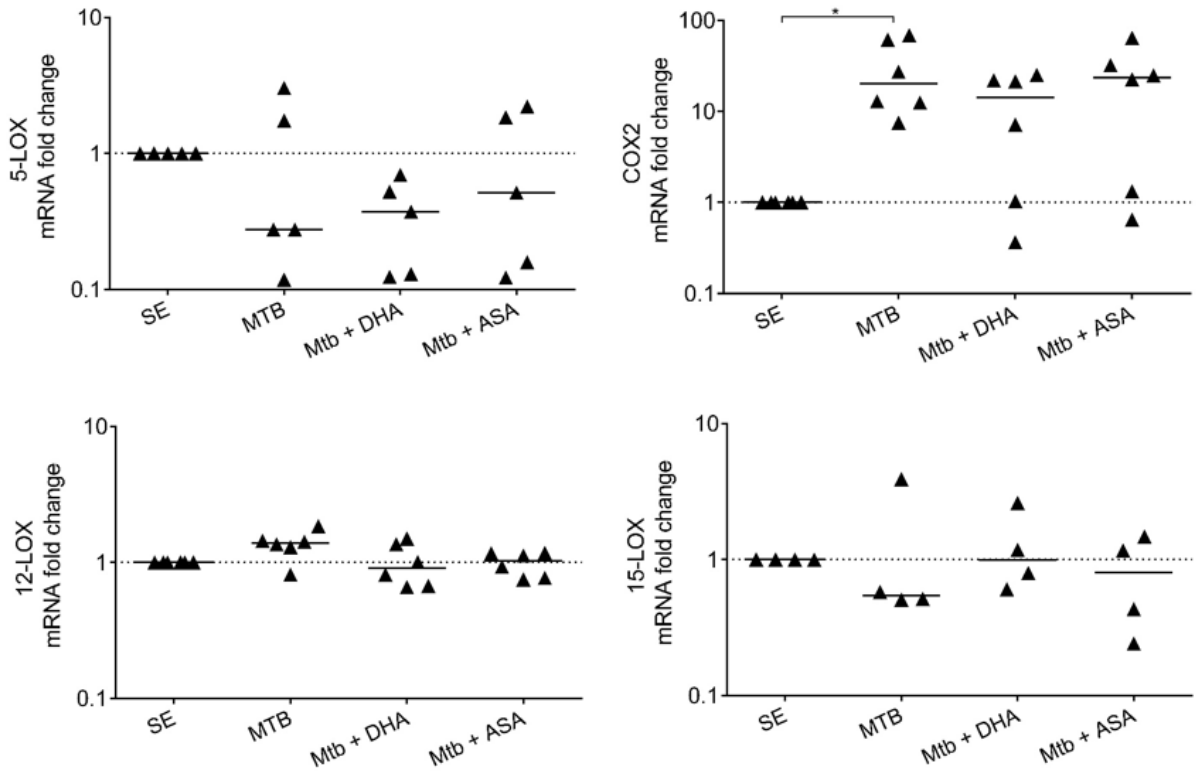
fagocitadas, se agregaron RvD1 (100 nM), Mar1 (150 nM), DHA (10 nM) y ASA (12.5, 25, 50 ug/ml) y las células se incubaron. Después de 24 h, los sobrenadantes se recuperaron para la cuantificación de TNF- $\alpha$  (n= 4) por ELISA.



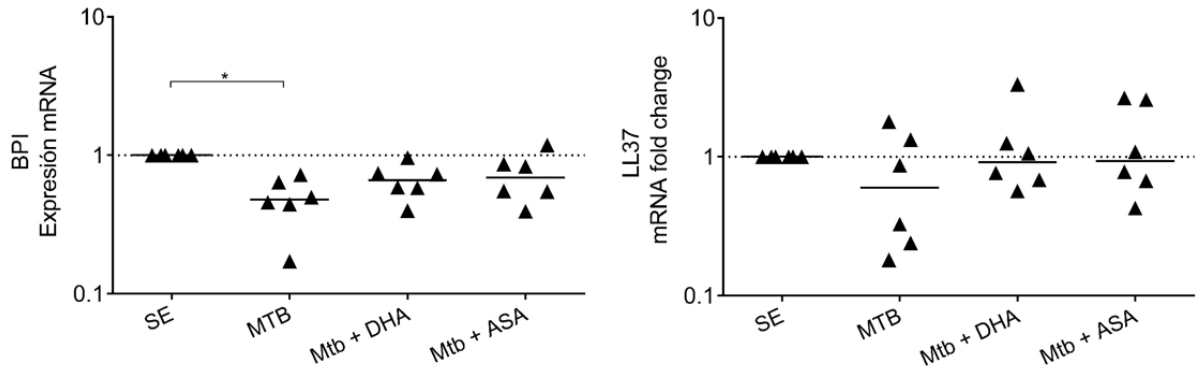
**Figura 8. Efectos de DHA y ASA en la producción de RvD1, Mar1, PGE2 y LTB4.** Los macrófagos se infectaron o no con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) a una MOI de 5 durante 1 h. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas, se agregaron DHA (10 nM), o ASA (25 ug/ml) y las células se incubaron. Después de 24 h, los sobrenadantes se recuperaron para la cuantificación por kits de ELISA (n=6), se indican las medianas, cada símbolo pertenece a un sujeto.

### 7.-Expresión génica de ciclooxigenasas, lipooxigenasas y péptidos antimicrobianos por adición de DHA y ASA en MDM infectados con *M. tuberculosis*

Se evaluó la expresión génica de las lipooxigenasas (LOX) 5, 12, 15, y la ciclooxigenasa 2 (COX2) encargadas de la producción de Mar1 y RvD1. No hubo incremento de las LOX en su expresión génica por adición de DHA o ASA. Y encontramos que COX2 tuvo una alta expresión génica en la infección, pero no disminuyó ante la adición de DHA o ASA (Fig. 9). Por lo que evaluamos la expresión génica de BPI e LL37, para saber si tenían efecto sobre estos péptidos antimicrobianos (Fig. 10).

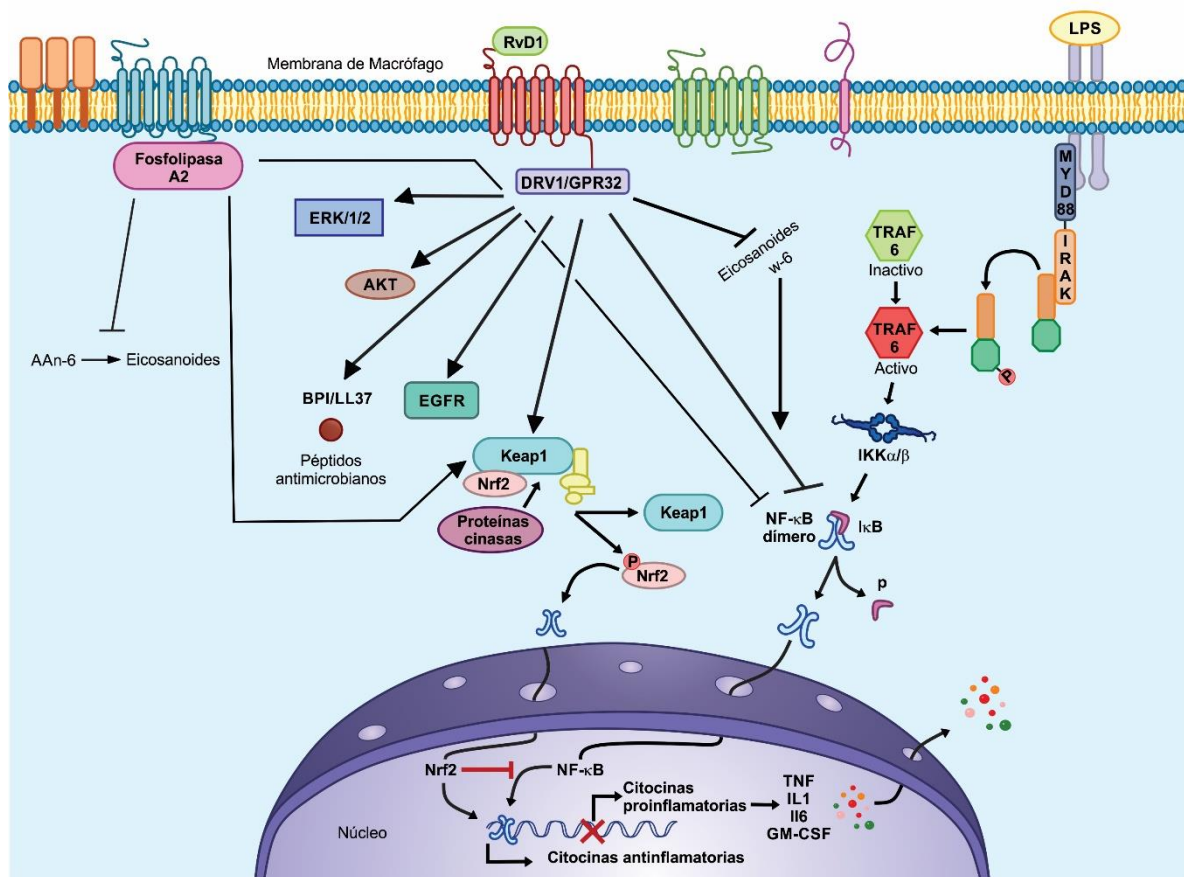


**Figura 9. Efectos de DHA y ASA en la expresión génica de COX y LOX.** Se usaron lisados celulares de macrófagos infectados o no infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) a una MOI de 5 durante 1 h con DHA (10 nM), o ASA (25 ug/ml) para la cuantificación de la expresión génica de 5, 12, 15-LOX o COX2 mediante PCR en tiempo real (qPCR). La expresión génica se normalizó a la abundancia relativa de ARN 18S. Se muestran los resultados individuales del cambio en relación con células no infectadas, utilizando el método de Ct comparativo. Las líneas indican las medianas. n= 4 o 6, \*p <0.05.

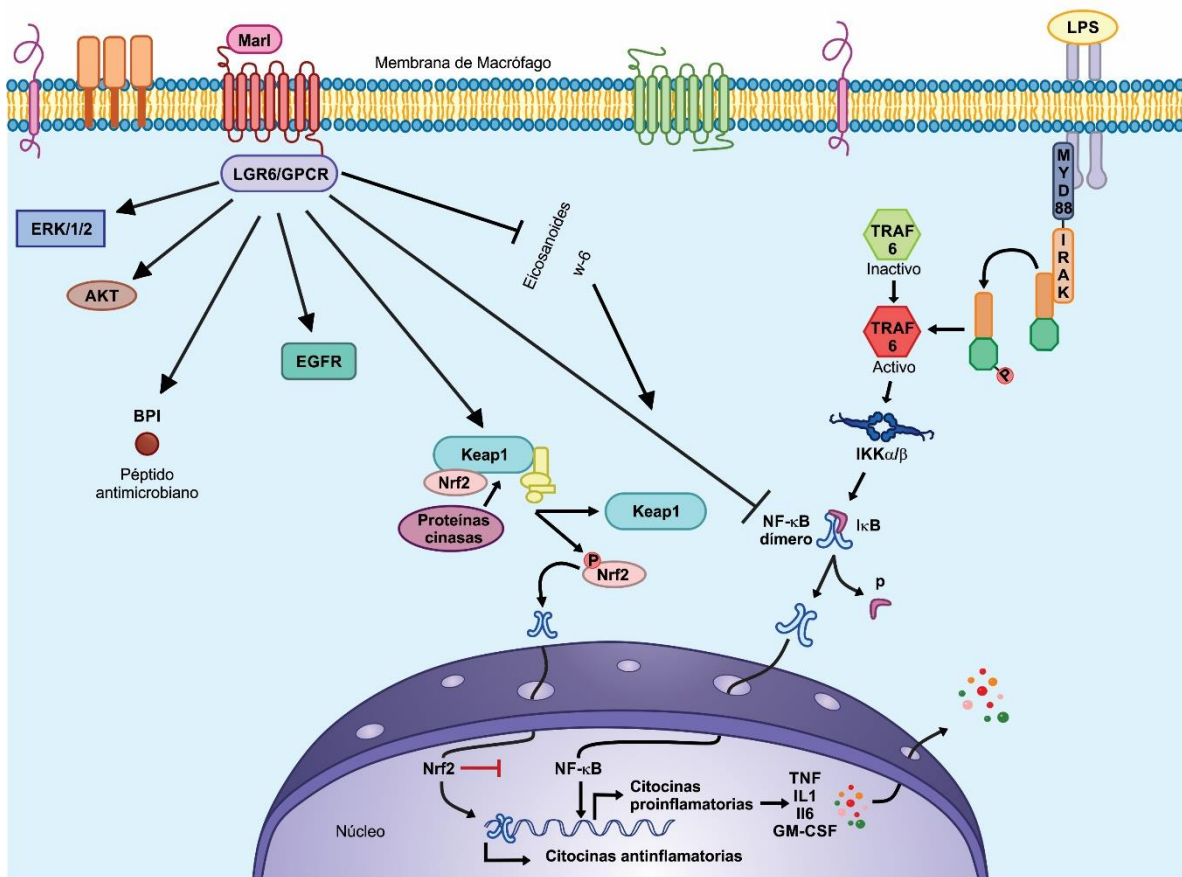


**Figura 10. Efectos de DHA y ASA en la expresión génica de BPI y LL37.** Se usaron lisados celulares de macrófagos infectados o no infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) a una MOI de 5 durante 1 h con DHA (10 nM), o ASA (25 ug/ml) para la cuantificación de la expresión génica de los péptidos antimicrobianos PBI y LL37 mediante PCR en tiempo real (qPCR). La expresión génica se normalizó a la abundancia relativa de ARN 18S. Se muestran los resultados individuales del cambio en relación con células no infectadas, utilizando el método de Ct comparativo. Las líneas indican las medianas. n= 6, \*p <0.05.

## Vías propuestas de acción de RvD1, Mar1, DHA y ASA

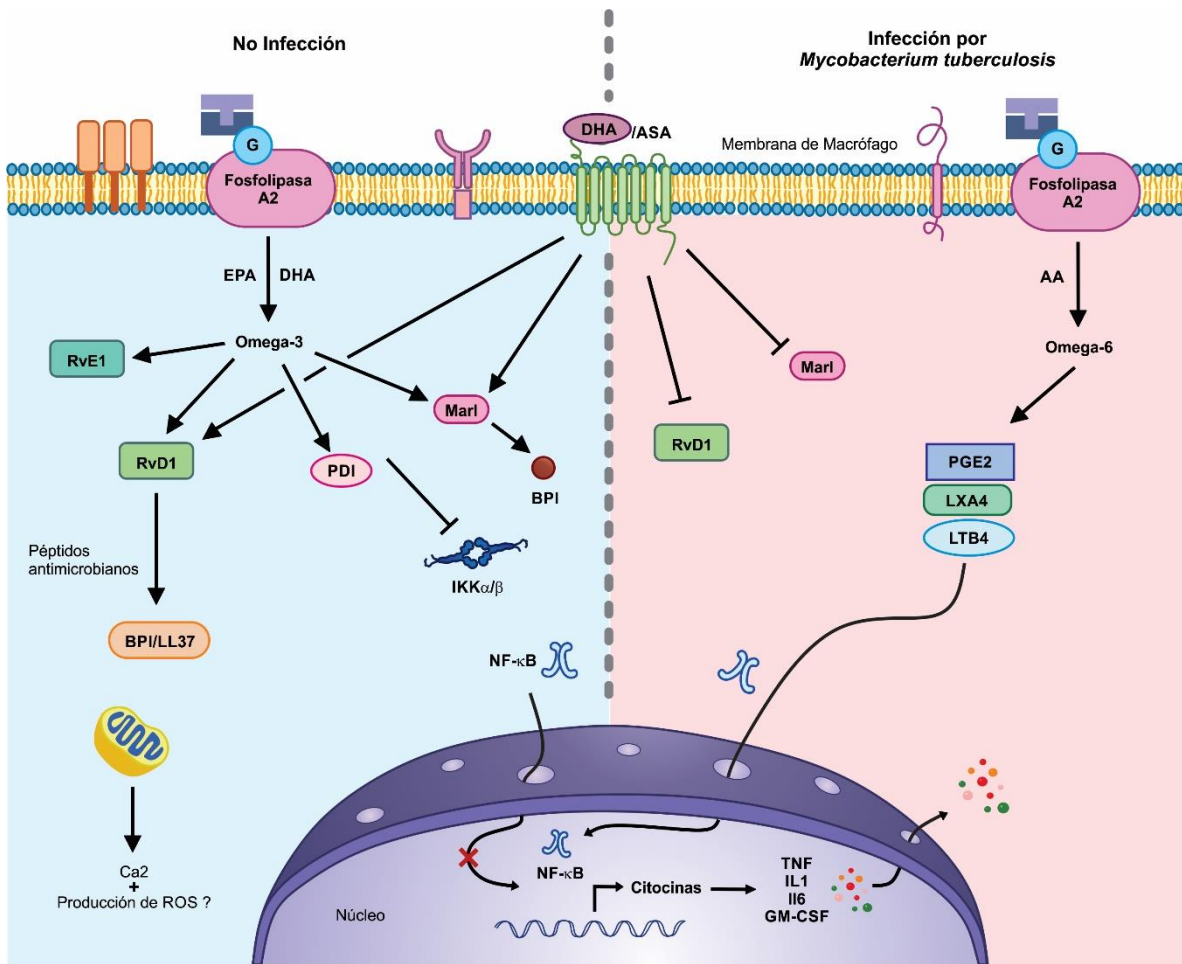


**Figura 11. Propuesta de la vía de señalización de RvD1.** RvD1 se une a uno de sus receptores (GPR32), e inhibe la síntesis de eicosanoides, relacionados a la producción de mediadores lipídicos proinflamatorios, mientras que la señalización hacia Keap1, activa la translocación de Nrf2 e inhibe a NFκB, y de esta forma inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias como el TNF-α. NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, Nrf2: factor relacionado a NF-E2, factor nuclear (derivado de eritroide 2) tipo 2, Keap1: proteínas de asociación 1 de Kelch ECH.



**Figura 12. Propuesta de la vía de señalización de Mar1.** Mar1 se une a un receptor GPCR, y puede activar ERK/1/2, AKT, BPI, EGFR, así como el complejo Keap1, activando la translocación de Nrf2 e inhibir a NFκB, y de esta forma inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ . También es capaz de inhibir la síntesis de eicosanoides, y evitar la translocación nuclear de NFκB, evitando la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ . ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, AKT: serina treonina quinasa, EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, Keap1: proteínas de asociación 1 de Kelch ECH, Nrf2: factor relacionado a NF-E2, factor nuclear (derivado de eritroide 2) tipo 2, GPR: receptor acoplado a proteínas G, NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.





**Figura 13. Propuesta de la vía de señalización de DHA y aspirina.** Tanto el ácido docosahexaenoico (DHA), como la aspirina (ASA) se unen a sus receptores acoplados a proteínas G (GPCR). En un contexto no infeccioso (lado izquierdo) son capaces de sintetizar RvD1 y Mar1, inhibir la translocación de NFκB, así como producir péptidos antimicrobianos (BPI, LL37). Pero en un contexto de infección por *M. tuberculosis* (lado derecho), la micobacteria inhibe la producción de RvD1 y Mar1, así como producción de péptidos antimicrobianos y de esta forma evita su eliminación.

## Discusión

La respuesta inmune contra *M. tuberculosis* induce una respuesta bactericida y proinflamatoria importante para controlar la infección, pero al mismo tiempo, la respuesta inflamatoria inducida es responsable de la lesión tisular en la enfermedad. Por lo tanto, el tratamiento para la tuberculosis debe incluir la adición de terapias antiinflamatorias para prevenir el daño tisular asociado a la necrosis durante las infecciones del tracto respiratorio. En este trabajo, se evaluó la capacidad de los mediadores lipídicos pro-resolvedores (SPM) para mediar la regulación de la producción de TNF- $\alpha$  y las respuestas bactericidas en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, así como el efecto de uno de sus precursores, el ácido docosahexaenoico (DHA). Los SPM suelen estar implicados en la resolución de la inflamación aguda, se liberan a tiempos tempranos en el espacio extracelular y participan de manera activa en las infecciones por patógenos gramnegativos y el virus de la influenza. Sin embargo, se desconoce la implicación de estos mediadores en las infecciones crónicas. Primero demostramos que RvD1, RvD2, PDX, LXA4 y Mar1 redujeron la producción de TNF- $\alpha$  después de la estimulación con LPS en macrófagos humanos. Los resultados coincidieron con informes anteriores que describen el efecto protector de RvD1 sobre la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS en modelos murinos (Wang et al., 2011). Sin embargo, la modulación de la producción de TNF- $\alpha$  por RvD2, PDX, LXA4 y Mar1 en macrófagos humanos no se había descrito antes. También observamos que RvD1, LXA4 y Mar1 redujeron significativamente la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* y exhibieron un efecto modulador similar al observado con la estimulación con LPS. Además, PDX y LXA4 indujeron un aumento significativo en la producción de PGE2 en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*; la PGE2 es importante en la resolución de la inflamación (Loynes et al., 2018) y desempeña un papel en el control de la necrosis durante la infección por micobacterias (Chen et al., 2008). Por lo tanto, la adición de PDX o LXA4 durante la infección por micobacterias podría disminuir la necrosis a través de la inducción de PGE2. Sin embargo, se ha informado que en los macrófagos infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis*, LXA4 actúa regulando negativamente la síntesis de PGE2, lo que contrasta con nuestra observación (Chen et al., 2008). Esta diferencia en los resultados podría estar asociado con el hecho de que PGE2 exhibe efectos antiinflamatorios y proinflamatorios dependiendo de la concentración y el momento del

cultivo (Osma-Garcia et al., 2016; Tchetina et al., 2007) y la inducción de PGE2 durante la infección por *M. tuberculosis* no solo podría ser beneficiosa para el control de la necrosis, sino que también inducen una respuesta proinflamatoria. Además, la falta de regulación por RvD1, RvD2 y Mar1 ejercida sobre la producción de PGE2 y LXA4 sugiere mecanismos diferenciales de regulación de la inflamación por los mediadores lipídicos pro-resolvedores en macrófagos. A excepción de LXA4, no se ha identificado ningún papel de los otros mediadores lipídicos pro-resolvedores en la infección por *M. tuberculosis*.

Encontramos, que la adición de RvD1 y Mar1 indujo una reducción significativa en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* relacionado a una sobreexpresión significativa de los péptidos antimicrobianos LL37 y BPI en macrófagos tratados con RvD1 y solo un incremento en BPI en macrófagos tratados con Mar1. Se ha informado que las respuestas antimicrobianas son inducidas por SPM en modelos animales, por ejemplo, en modelos murinos de neumonía, el tratamiento con la resolvina RvE1 de la serie E o RvD1 activado por aspirina mejora el aclaramiento bacteriano al tiempo que disminuye los niveles pulmonares de citocinas proinflamatorias (Croasdell et al., 2016; Eickmeier et al., 2013). Sin embargo, los mecanismos antimicrobianos inducidos por estos lípidos están mal caracterizados y no se ha informado previamente de la inducción de LL37 y BPI por RvD1 y Mar1 en macrófagos humanos. Hasta ahora, el mecanismo antimicrobiano inducido descrito para resolvinas es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Spite et al., 2009); mientras tanto, se ha informado que la lipoxina activada por aspirina (ATL) induce la expresión de BPI en las células epiteliales (Canny et al., 2002). Este estudio es el primer informe en el que BPI y LL37 se asocian con la inducción de respuestas antimicrobianas por resolvinas y maresinas. Se ha descrito que BPI juega un papel en la modulación de las respuestas de TNF- $\alpha$  (Jahr et al., 1997), y nuestros resultados implican que la inducción de BPI por RvD1 y Mar1 puede ejercer efectos duales (antibacterianos y antiinflamatorios) durante las infecciones por *M. tuberculosis*.

También nos preguntamos si la respuesta diferencial que observamos para RvD1 y Mar1 en la inducción del efecto antimicrobiano se extendía a la producción de otras citocinas, y encontramos que ambos SPM fueron capaces de inducir un perfil diferencial en la producción de citocinas. Mientras RvD1 indujo un aumento significativo en las cantidades de IL-6 y GM-CSF, Mar1 no indujo un aumento en la producción de ninguna de las

citocinas. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la producción diferencial de citocinas y la activación diferencial de los mecanismos bactericidas inducidos por RvD1 y Mar1 pueden explicarse por su capacidad diferencial para inducir la translocación nuclear de factores de transcripción proinflamatorios (NFκB p65) y antiinflamatorios (Nrf2). Aunque tanto RvD1 como Mar1 indujeron una translocación nuclear similar de NFκB p65, sólo Mar1 movilizó una proporción significativa de Nrf2 al núcleo. Dado que los activadores de Nrf2 reducen la acumulación de transcritos de IL-6 e IL-1 tanto en macrófagos de médula ósea murina como en una línea celular de macrófagos humanos (THP-1) (Kobayashi et al., 2016), estos resultados sugieren que Mar1 activa la vía Nrf2 para reducir la producción de citocinas antiinflamatorias, como IL-6 y TNF-α. Además, se ha descrito que RvD1 inhibe la respuesta inflamatoria a través de diferentes mecanismos, como la inducción de la translocación nuclear de NFκB p65/p50, que desactiva las respuestas proinflamatorias dependientes de COX-2 (Gao *et al.* 2017); reducción en la proporción de p-IκB / IκB, lo que revela que RvD1 podría inhibir la activación de NFκB (Zhao et al., 2016); e inducción de la secreción de IL-10, inactivación de GSK3 y activación de CREB para regular la inflamación en monocitos humanos estimulados con LPS (Gu et al., 2016). Estos mecanismos también se han informado para RvD2 y Mar1. PGE2 también participa en la regulación de la producción de TNF-α (Lehmann et al., 1988), pero no observamos la inducción de PGE2 por RvD1 o Mar1. Además, investigamos si las respuestas dependientes de RvD1 y Mar1 estaban asociadas con la señalización de GPCR, y encontramos que la preincubación de macrófagos infectados con un antagonista similar a D1 (SCH) derogó el efecto regulador de RvD1 sobre la producción de TNF-α y la inducción de la sobreexpresión de BPI. Sin embargo, SCH solo alteró parcialmente las respuestas dependientes de Mar1, lo que sugiere que hay otras vías reguladoras ante la respuesta de Mar1.

En general, el tratamiento con RvD1 y Mar1 indujo una inmunomodulación de macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Ambos SPM se metabolizan a partir del DHA, y se ha informado que tanto el DHA y el EPA se ven reducidos significativamente en el suero de pacientes con tuberculosis (Weiner et al., 2012), lo que sugiere que los pacientes con tuberculosis activa pueden tener niveles bajos de resolvinas.

Finalmente, investigamos si el DHA administrado exógenamente era capaz de producir un efecto similar al de RvD1 y Mar1, y empleamos a la aspirina como inductor farmacológico de ambos SPM, encontrando que la infección con *M. tuberculosis* interfiere en el metabolismo del DHA en el macrófago humano para la producción de estos mediadores lipídicos, y que la adición de aspirina no restaura su síntesis durante la infección con *M. tuberculosis* en macrófagos humanos, aunque tanto el DHA como la aspirina disminuyeron la producción de TNF- $\alpha$  inducida por Mtb, existen mecanismos diferenciales de regulación de la inflamación durante la infección.

## **Conclusiones**

RvD1 y Mar1 inducen mecanismos antiinflamatorios (regulación de TNF- $\alpha$ , PGE2 y otras citocinas), producción diferencial de efectores antimicrobianos (BPI y LL37) y control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* por macrófagos humanos.

*M. tuberculosis* impide la producción de RvD1 y Mar1 a partir del DHA o de aspirina. DHA y ASA no logran modificar la producción de TNF- $\alpha$ , PGE2 o LTB4 en los MDM infectados y tampoco incrementan la expresión de BPI y/o LL37.

Estos resultados nos muestran otra vía de evasión de la micobacteria, y nos muestran el potencial terapéutico de RvD1 y Mar1 en la tuberculosis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balas, L., Guichardant, M., Durand, T., & Lagarde, M. (2014). Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. *Biochimie*, *99*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.006>
- Bannenberg, G., & Serhan, C. N. (2010). Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1801*(12), 1260-1273. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.08.002>
- Börjeson, E., McGillicuddy, F. C., Harford, K. A., Corrigan, N., Higgins, D. F., Maderna, P., Roche, H. M., & Godson, C. (2012). Lipoxin A4 attenuates adipose inflammation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(10), 4287-4294. <https://doi.org/10.1096/fj.12-208249>
- Bülow, S., Zeller, L., Werner, M., Toelge, M., Holzinger, J., Entzian, C., Schubert, T., Waldow, F., Gisch, N., Hammerschmidt, S., & Gessner, A. (2018). Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Is an Enhancer of Bacterial Lipoprotein Recognition. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02768>
- Canny, G., Levy, O., Furuta, G. T., Narravula-Alipati, S., Sisson, R. B., Serhan, C. N., & Colgan, S. P. (2002). Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(6), 3902-3907. <https://doi.org/10.1073/pnas.052533799>
- Chen, M., Divangahi, M., Gan, H., Shin, D. S. J., Hong, S., Lee, D. M., Serhan, C. N., Behar, S. M., & Remold, H. G. (2008). Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: Opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(12), 2791-2801. <https://doi.org/10.1084/jem.20080767>
- Cinel, I., & Opal, S. M. (2009). Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer. *Critical Care Medicine*, *37*(1), 291-304. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819267fb>

- Cooper, A. M., Mayer-Barber, K. D., & Sher, A. (2011). Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunology*, 4(3), 252-260. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.13>
- Croasdell, A., Lacy, S. H., Thatcher, T. H., Sime, P. J., & Phipps, R. P. (2016). Resolvin D1 dampens pulmonary inflammation and promotes clearance of Nontypeable Haemophilus influenzae. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 196(6), 2742-2752. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502331>
- Dalli, J., Winkler, J. W., Colas, R. A., Arnardottir, H., Cheng, C.-Y. C., Chiang, N., Petasis, N. A., & Serhan, C. N. (2013). Resolvin D3 and Aspirin-Triggered Resolvin D3 Are Potent Immunoresolvents. *Chemistry & biology*, 20(2), 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.11.010>
- Deretic, V. (2012). Autophagy – an emerging immunological paradigm. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(1), 15-20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102108>
- Eickmeier, O., Seki, H., Haworth, O., Hilberath, JN., Gao, F., Uddin, M., Croze, RH., Carlo, T., Pfeffer, MA., & Levy, BD. (2013). Aspirin-Triggered Resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury. *Mucosal immunology*, 6(2), 256-266. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.66>
- El Kebir, D., Gjorstrup, P., & Filep, J. G. (2012). Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), 14983-14988. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206641109>
- El Kebir, D., József, L., Pan, W., Wang, L., Petasis, N. A., Serhan, C. N., & Filep, J. G. (2009). 15-Epi-lipoxin A4 Inhibits Myeloperoxidase Signaling and Enhances Resolution of Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(4), 311-319. <https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1601OC>



- Fullerton, J. N., O'Brien, A. J., & Gilroy, D. W. (2014). Lipid mediators in immune dysfunction after severe inflammation. *Trends in Immunology*, 35(1), 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.008>
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*, 12(11), 1035-1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>
- Gu, Z., Lamont, G. J., Lamont, R. J., Uriarte, S. M., Wang, H., & Scott, D. A. (2016). Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3 $\beta$  anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes. *Innate immunity*, 22(3), 186-195. <https://doi.org/10.1177/1753425916628618>
- Jahr, T. G., Ryan, L., Sundan, A., Lichenstein, H. S., Skjåk-Braek, G., & Espevik, T. (1997). Induction of tumor necrosis factor production from monocytes stimulated with mannuronic acid polymers and involvement of lipopolysaccharide-binding protein, CD14, and bactericidal/permeability-increasing factor. *Infection and Immunity*, 65(1), 89-94. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.1.89-94.1997>
- Keinan, D., Leigh, N. J., Nelson, J. W., De Oleo, L., & Baker, O. J. (2013). Understanding Resolvin Signaling Pathways to Improve Oral Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5501-5518. <https://doi.org/10.3390/ijms14035501>
- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., & Yamamoto, M. (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*, 7(1), 11624. <https://doi.org/10.1038/ncomms11624>
- Lehmann, V., Benninghoff, B., & Dröge, W. (1988). Tumor necrosis factor-induced activation of peritoneal macrophages is regulated by prostaglandin E2 and cAMP. *The Journal of Immunology*, 141(2), 587-591.

- Loynes, C. A., Lee, J. A., Robertson, A. L., Steel, M. J., Ellett, F., Feng, Y., Levy, B. D., Whyte, M. K. B., & Renshaw, S. A. (2018). PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. *Science Advances*, 4(9), eaar8320. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar8320>
- Mas, E., Croft, K. D., Zahra, P., Barden, A., & Mori, T. A. (2012). Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. *Clinical Chemistry*, 58(10), 1476-1484. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.190199>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Moreno, J. R., García, I. E., de la Luz García Hernández, M., Leon, D. A., Marquez, R., & Pando, R. H. (2002). The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 106(2), 257-266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01403.x>
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140(6), 871-882. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>
- Ortega-Gómez, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: An integrated view. *EMBO Molecular Medicine*, 5(5), 661-674. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202382>
- Osma-García, I. C., Punzón, C., Fresno, M., & Díaz-Muñoz, M. D. (2016). Dose-dependent effects of prostaglandin E2 in macrophage adhesion and migration. *European Journal of Immunology*, 46(3), 677-688. <https://doi.org/10.1002/eji.201545629>
- Palmer, C. D., Mancuso, C. J., Weiss, J. P., Serhan, C. N., Guinan, E. C., & Levy, O. (2011). 17(R)-Resolvin D1 differentially regulates TLR4-mediated responses of primary human macrophages to purified LPS and live E. coli. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(3), 459-470. <https://doi.org/10.1189/jlb.0311145>

- Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2011). Innate immunity to intracellular pathogens: Macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunological Reviews*, 240(1), 11-24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00989.x>
- Recchiuti, A., Codagnone, M., Pierdomenico, A. M., Rossi, C., Mari, V. C., Cianci, E., Simiele, F., Gatta, V., & Romano, M. (2014). Immunoresolving actions of oral resolvin D1 include selective regulation of the transcription machinery in resolution-phase mouse macrophages. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(7), 3090-3102. <https://doi.org/10.1096/fj.13-248393>
- Rook, G. A., al Attiyah, R., & Filley, E. (1991). New insights into the immunopathology of tuberculosis. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 59(3), 148-152. <https://doi.org/10.1159/000163633>
- Seki, H., Fukunaga, K., Arita, M., Arai, H., Nakanishi, H., Taguchi, R., Miyasho, T., Takamiya, R., Asano, K., Ishizaka, A., Takeda, J., & Levy, B. D. (2010). The Anti-Inflammatory and Proresolving Mediator Resolvin E1 Protects Mice from Bacterial Pneumonia and Acute Lung Injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(2), 836-843. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901809>
- Serhan, C. N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92-101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Dalli, J. (2015). The Resolution Code of Acute Inflammation: Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Resolution. *Seminars in immunology*, 27(3), 200-215. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.004>
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology*, 8(5), 349-361. <https://doi.org/10.1038/nri2294>
- Serhan, C. N., Gupta, S. K., Perretti, M., Godson, C., Brennan, E., Li, Y., Soehnlein, O., Shimizu, T., Werz, O., Chiurchiù, V., Azzi, A., Dubourdeau, M., Gupta, S. S., Schopohl, P., Hoch,

- M., Gjorgevikj, D., Khan, F. M., Brauer, D., Tripathi, A., ... Wolkenhauer, O. (2020). The Atlas of Inflammation Resolution (AIR). *Molecular Aspects of Medicine*, 74, 100894. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100894>
- Sharma, S., & Bose, M. (2001). Role of cytokines in immune response to pulmonary tuberculosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 19(3), 213-219.
- Spite, M., Norling, L. V., Summers, L., Yang, R., Cooper, D., Petasis, N. A., Flower, R. J., Perretti, M., & Serhan, C. N. (2009). Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*, 461(7268), 1287-1291. <https://doi.org/10.1038/nature08541>
- Spite, M., & Serhan, C. N. (2010). Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: Impact of aspirin and statins. *Circulation research*, 107(10), 1170-1184. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223883>
- Tchetina, E. V., Di Battista, J. A., Zukor, D. J., Antoniou, J., & Poole, A. R. (2007). Prostaglandin PGE2 at very low concentrations suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic articular cartilage: This involves a decrease in expression of proinflammatory genes, collagenases and COL10A1, a gene linked to chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Research & Therapy*, 9(4), R75. <https://doi.org/10.1186/ar2273>
- Uddin, M., & Levy, B. D. (2011). Resolvins: Natural Agonists for Resolution of Pulmonary Inflammation. *Progress in lipid research*, 50(1), 75-88. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.09.002>
- Wang, B., Gong, X., Wan, J., Zhang, L., Zhang, Z., Li, H., & Min, S. (2011). Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 24(4), 434-441. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2011.04.001>
- Weiner, J., Parida, S. K., Maertzdorf, J., Black, G. F., Repsilber, D., Telaar, A., Mohny, R. P., Arndt-Sullivan, C., Ganoza, C. A., Faé, K. C., Walzl, G., & Kaufmann, S. H. E. (2012). Biomarkers of Inflammation, Immunosuppression and Stress Are Revealed by

Metabolomic Profiling of Tuberculosis Patients. *PLoS ONE*, 7(7).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040221>

Zhao, Y.-L., Zhang, L., Yang, Y.-Y., Tang, Y., Zhou, J.-J., Feng, Y.-Y., Cui, T.-L., Liu, F., & Fu, P. (2016). Resolvin D1 Protects Lipopolysaccharide-induced Acute Kidney Injury by Down-regulating Nuclear Factor-kappa B Signal and Inhibiting Apoptosis. *Chinese Medical Journal*, 129(9), 1100-1107. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.180517>

Zumla, A., Rao, M., Parida, S. K., Keshavjee, S., Cassell, G., Wallis, R., Axelsson-Robertsson, R., Doherty, M., Andersson, J., & Maeurer, M. (2015). Inflammation and tuberculosis: Host-directed therapies. *Journal of Internal Medicine*, 277(4), 373-387. <https://doi.org/10.1111/joim.12256>



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/intimp](http://www.elsevier.com/locate/intimp)

## Resolvin D1 (RvD1) and maresin 1 (Mar1) contribute to human macrophage control of *M. tuberculosis* infection while resolving inflammation

Andy Ruiz<sup>a,b</sup>, Carmen Sarabia<sup>a</sup>, Martha Torres<sup>a</sup>, Esmeralda Juárez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, CDMX 14080, Mexico

<sup>b</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, Mexico



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Resolution of inflammation

Resolvin D1

Maresin 1

Tuberculosis

Macrophages

### ABSTRACT

Resolvins and protectins counter inflammation, enhance phagocytosis, induce bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) expression, and restore inflamed tissue to homeostasis. Because modulating the inflammation/antiinflammation balance is important in *Mycobacterium tuberculosis* infection, we evaluated the effects of resolvins and protectins on human macrophages infected *in vitro*. Monocyte-derived macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Rv at a multiplicity of infection (MOI) of 5 and treated 1 h post-infection *in vitro* with 100 nM LXA4, RvD1, RvD2, PD1 or 150 nM Mar1. After 24 h, cytokine production was measured by Luminex, and BPI and cathelicidin LL37 expression was determined by real-time PCR. Macrophage bactericidal activity was assessed by colony-forming units (CFUs) 3 days posttreatment. Nuclear translocation of Nrf2 was assessed by ELISA, NFκB translocation was determined by imaging cytometry, and BPI production was determined by fluorescence microscopy. We found that all lipids reduced LPS-dependent and *M. tuberculosis*-induced TNF-α production. RvD1 and Mar1 also induced a significant reduction in *M. tuberculosis* intracellular growth. RvD1 and Mar1 elicited distinct immunomodulatory patterns. RvD1 induced upregulation of both antimicrobial effector genes (BPI and LL37) and cytokines (GM-CSF and IL-6). Mar1 induced only BPI overexpression. RvD1 and Mar1 induced NFκB nuclear translocation, but only Mar1 induced Nrf2 translocation. Inhibition of G protein-coupled receptor signaling in infected macrophages abrogated the regulatory effects of RvD1. In conclusion, RvD1 and Mar1 modulate the anti-inflammatory and antimicrobial properties of *M. tuberculosis*-infected human macrophages. Since both proresolving lipids are inducible and synthesized from dietary components, they have immunotherapeutic potential against tuberculosis when inflammation is uncontrolled.

### 1. Introduction

*M. tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, is the leading bacterial cause of human mortality worldwide. In 2017, tuberculosis caused an estimated 1.3 million deaths (range, 1.2–1.4 million) [1]. *M. tuberculosis* enters the lung and penetrates the alveolar space, where the bacteria are taken up by alveolar macrophages, which respond to infection by producing proinflammatory cytokines, such as IL-1β, IL-6, and TNF-α. Proinflammatory cytokines recruit other immune cells to the lung and activate antimicrobial pathways in macrophages to control the infection. However, if the inflammatory environment persists, macrophages become permissive for *M. tuberculosis* intracellular growth, preventing bacterial clearance [2], and severe histopathological damage occurs in the lungs that promotes the transmission of the

disease [3–5]. In our previous studies, we found that control of *M. tuberculosis* infection occurs in low-inflammation environments [6–8], which suggests that regulators of inflammation participate at different levels in antimicrobial responses.

The resolution of inflammation, also known as catabasis, is a process that returns the host tissues to a noninflammatory state [9]. During the resolution of inflammation, there is a reduction in neutrophil influx and an increase in neutrophil apoptosis; the macrophages clear the inflammatory milieu by phagocytosis of microbes and apoptotic neutrophils [10]. In addition, as tissue leukocytes recede, the levels of proinflammatory cytokines and chemokines also decrease, and tissue repair mechanisms are activated to complete the return to homeostasis. The resolution process depends critically on the production of oxygenated lipids derived from essential polyunsaturated fatty acids (PUFAs)

\* Corresponding author at: Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Sección XVI, México City 1408, Mexico.

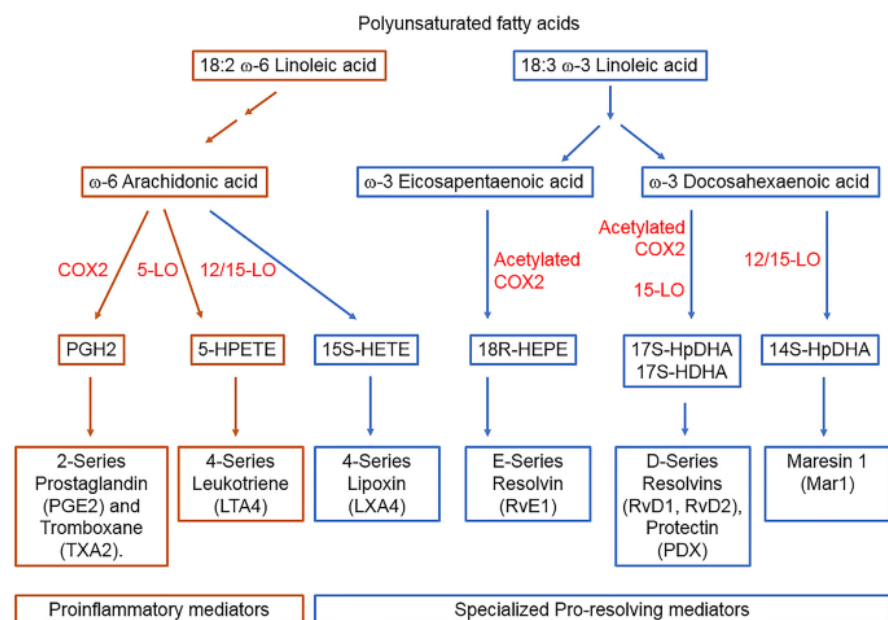
E-mail address: [ejuares@iner.gob.mx](mailto:ejuares@iner.gob.mx) (E. Juárez).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105694>

Received 16 March 2019; Received in revised form 26 May 2019; Accepted 10 June 2019

1567-5769/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.





**Fig. 1.** Generalized pathway for the conversion of polyunsaturated fatty acids to proinflammatory and proresolving mediators. COX, cyclooxygenase; LO, lipoxygenase; HETE, hydroxy eicosatetraenoic acid; HPETE, hydroperoxyl eicosatetraenoic acid; HDHA, hydroxy docosahexaenoic acid; HpDHA, hydroperoxy docosahexaenoic acid; PG, prostaglandin; TX, thromboxane; LT, leukotriene; LX, lipoxin; Rv, resolvin.

[11–13].

The omega-6 PUFA arachidonic acid (AA, C20:4, n-6) is subjected to enzymatic conversion to prostaglandins, leukotrienes, or lipoxins [14,15]. Omega-3 PUFAs eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) are enzymatically converted into specific bioactive compounds that display protective anti-inflammatory and proresolving activities. PUFA enzymatic reactions are mediated by cyclooxygenases (COX) and lipoxygenases (LO), as depicted in Fig. 1 [16–19]. Prostaglandins and leukotrienes amplify the production of proinflammatory cytokines, whereas specialized proresolving mediators, including lipoxins, resolvins, and protectins, modulate immune responses to control local inflammation.

Resolvins RvD1 and RvE1 display protective actions in mouse models of pneumonia and acute lung injury by reducing lung levels of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , enhancing bacterial clearance, decreasing lung neutrophil trafficking, and improving survival [20,21]. In addition to cytokines, prostaglandin E2 (PGE2) and leukotriene B4 (LTB4) regulation, resolvins RvD2 and RvE1 and aspirin-triggered lipoxin potentiate the activation of antimicrobial mechanisms, i.e., phagocytosis, reactive oxygen species (ROS) production and the induction of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), to protect mucosae from Gram-negative infections [20,22–26]. The specialized proresolving mediators are also antagonists of proinflammatory mediators in chronic inflammatory processes [27].

The role that resolution of inflammation plays during infection with *M. tuberculosis* is unknown but may be relevant to the pathogenesis of the disease. Production of PGE2 and LTB4 has been reported to be detrimental in a murine model of progressive tuberculosis, and blockade of PGE2 synthesis correlates with infection control and inflammation resolution [28]. However, *in vitro* models indicate that the virulent strain *M. tuberculosis* H37Rv reduces PGE2 synthesis and induces the production of lipoxin A4 (LXA4) in infected macrophages to promote necrosis and ensure bacterial dissemination [29]. The role of other specialized proresolving mediators during *M. tuberculosis* infection remains to be elucidated.

Because the resolution of inflammation appears to be necessary in *M. tuberculosis* infection, it is likely that lipoxins, resolvins, and protectins may have a substantial role in the infection that has not been characterized. Hence, in this study, we evaluated the effects of the addition of resolvins (RvD1 and RvD2), protectins (PDX and Mar1), and lipoxin (LXA4) on the inflammatory microenvironment and the

antimicrobial activity of human macrophages infected with *M. tuberculosis* H37Rv.

## 2. Methods

### 2.1. Reagents

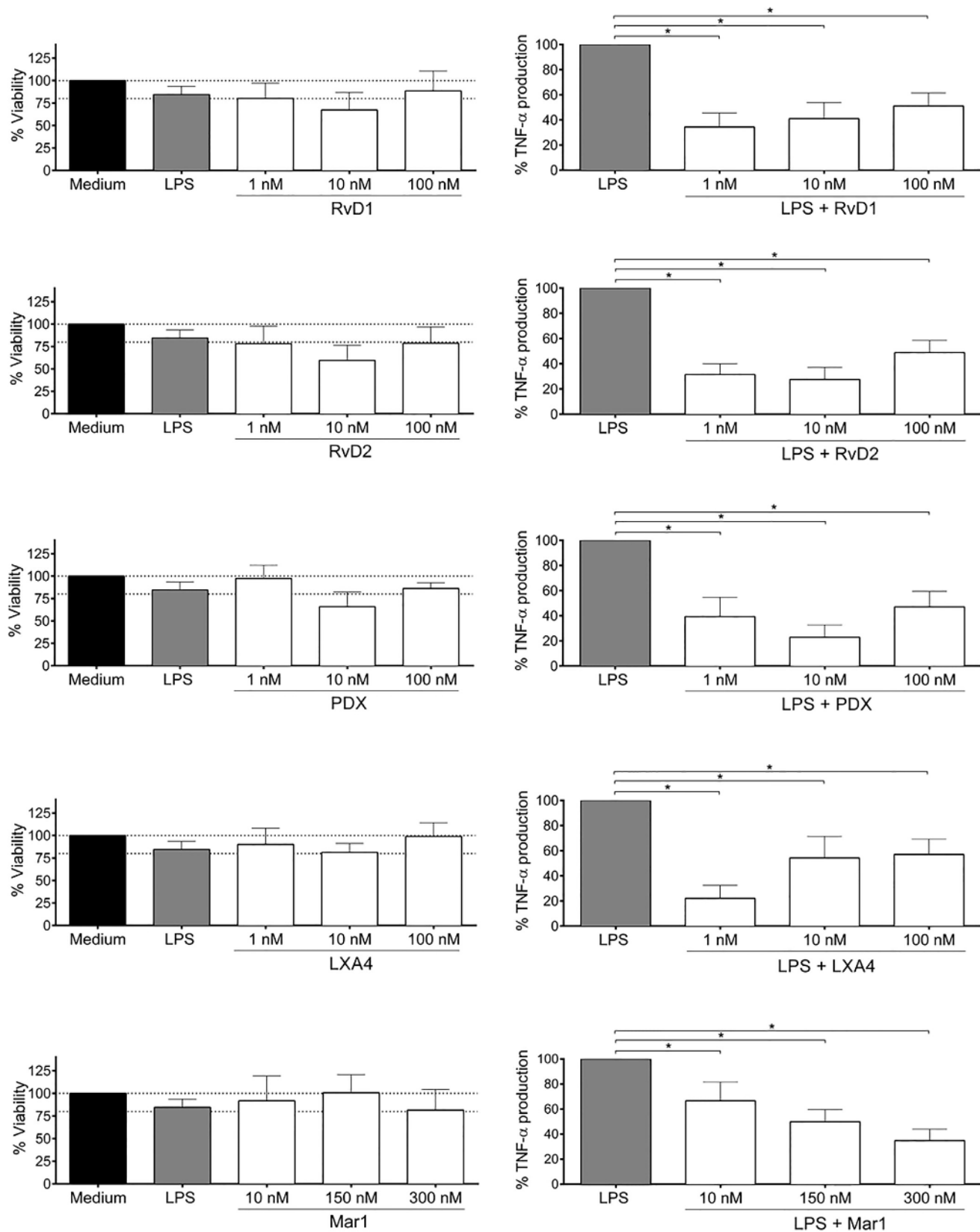
Bioactive compounds, omega-3 and 6 PUFAs, 17(S)-resolvin D1 (RvD1), 7(S),16(R),17(S)-resolvin D2 (RvD2), 5(S),6(R)-lipoxin A4 (LXA4), 10(S),17(S)-diHDoHE (PDX), and 7(R)-maresin 1 (Mar1), were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Reagents were dissolved in ethanol (J.T. Baker, Avantor, Roadnor, PA). The culture proportions of ethanol were lower than 0.1%. Lipopolysaccharide (LPS) and all other reagents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise stated.

### 2.2. Cells

Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by positive selection using magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) as previously reported [8]. Cell suspension purity and viability were assessed by flow cytometry, revealing that 97.38  $\pm$  1.26% of cells were CD14+ and that the cell viability was 99.4  $\pm$  0.2% (mean  $\pm$  SE). The monocyte suspension was adjusted to 1  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL in RPMI-1640 supplemented with 200 mM L-glutamine (Lonza, Walkersville, MD), 5  $\mu$ g L<sup>-1</sup> gentamicin sulfate (Lonza) and 10% heat-inactivated human serum (Valley Biomedicals, Winchester, VA). We cultured human monocytes for 7 days under adherence conditions to generate monocyte-derived macrophages (MDMs), herein referred to as macrophages. These studies were approved by the Institutional Review Board at the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (number B1615).

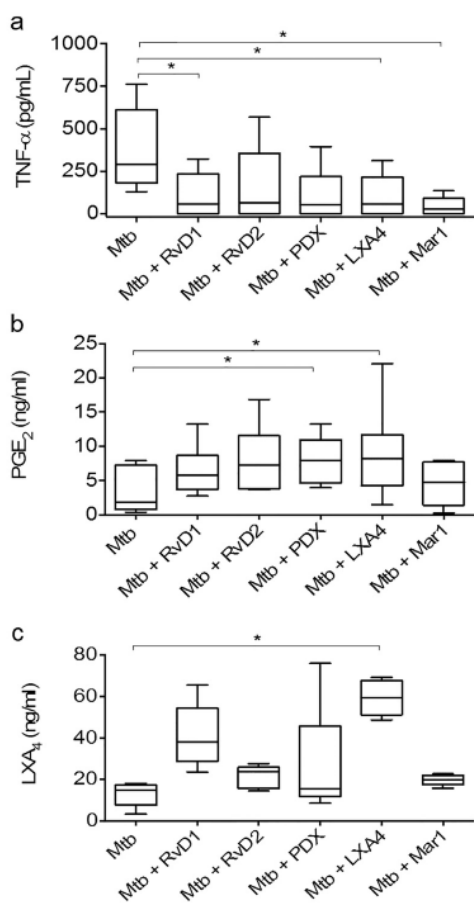
### 2.3. Assessment of proresolution mediators' effect on reduction of TNF- $\alpha$ production

Macrophages (5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well) were stimulated with 200 ng/mL of LPS for 1 h. Furthermore, RvD1, RvD2, PDX, LXA4 and Mar1 were added at varying concentrations, and the cells were cultured for an additional 24 h. The supernatants were collected and cryopreserved for TNF- $\alpha$  measurement. Viability was assessed using a CellTiter cell



**Fig. 2.** Anti-inflammatory activity of the lipid resolvers of inflammation on macrophages stimulated with LPS. Cells were stimulated with 200 ng/mL LPS for 1 h, and then RvD1, RvD2, PDX, or LXA4 (at 1, 10 and 100 nM) or Mar1 (at 10, 150, and 300 nM) was added and incubated for another 24 h. The supernatants were collected, and TNF- $\alpha$  production was measured by ELISA (right). Cell viability was determined in the presence of the lipids alone (left). Depicted are the means  $\pm$  standard errors, n = 7. \*p < 0.05.





**Fig. 3.** Effects of the lipids under study on the production of TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> and LXA<sub>4</sub>. Macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) at an MOI of 5 for 1 h. Nonphagocytosed bacteria were removed, RvD1, RvD2, PDX, or LXA4 (100 nM) or Mar1 (150 nM) was added, and the cells were incubated. After 24 h, the supernatants were recovered for the quantification of a) TNF- $\alpha$  (n = 14) by ELISA and of b) PGE<sub>2</sub> (n = 10) and c) LXA<sub>4</sub> (n = 5) by EIA. Box plots indicate the medians and quartiles. \*p < 0.05 vs Mtb alone.

viability assay (Promega, Madison, WI, USA) probing the lipids in the same concentrations but in the absence of LPS.

#### 2.4. Mycobacteria preparation

*M. tuberculosis* H37Rv (ATCC, Manassas, VA) was cultured in Middlebrook 7H9 broth medium (Difco Laboratories, Detroit, MI). After 21 days of incubation of *M. tuberculosis* at 37 °C, the mycobacterial stock solution was harvested, aliquoted and stored at -80 °C until use. Colony-forming units (CFUs) were determined after disruption of mycobacterial clumps [30].

#### 2.5. Infection with *M. tuberculosis* and treatment with the resolvins RvD1 and RvD2, the protectins PDX and Mar1 and the lipoxin LXA4

Macrophages ( $2 \times 10^5$  per well) were infected with *M. tuberculosis* at an MOI of 5 in RPMI with 30% non-heat-inactivated, pooled human AB serum. Cells were then incubated for 1 h followed by three washes to remove any nonphagocytosed bacteria. Macrophages were then cultured for another hour in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated pooled human serum with or without 100 nM resolvin D1 (RvD1), resolvin D2 (RvD2), protectin PDX or lipoxin LXA4, or 150 nM maresin 1 (Mar1). The cells were cultured for 24 h before collection of the supernatants and cell lysates, which were stored at -20 °C until

use. We included cells treated only with LPS (200 ng/mL) as a control.

#### 2.6. Antimicrobial activity

To evaluate the effects of the specialized proresolving mediators on mycobacterial intracellular growth control, macrophages were infected at an MOI of 5 and treated with the same amounts of the specialized proresolving mediators described above after extensive washing to remove nonphagocytosed bacteria. Macrophages infected with *M. tuberculosis* were further incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 1 h (day 0) and 72 h (day 3). After incubation, the supernatants were discarded, and the cells were lysed with 0.1% SDS for 10 min and then neutralized with 20% bovine serum albumin (BSA). The lysates were serially diluted and plated onto 7H10 (Difco Laboratories) agar plates in triplicate. The CFUs were quantified after 21 days.

#### 2.7. Cytokine production

Supernatants from 24 h cultures were assayed for the release of IL-6, IL-8, IL-10 and GM-CSF using Bio-Plex human cytokine customized detection kits (Bio-Rad, Hercules, CA, US) following the manufacturer's protocol. In selected experiments, TNF- $\alpha$  and IL-10 levels were measured using an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with specific pairs of antibodies, including anti-human TNF- $\alpha$  (Pharmingen, San Diego, CA) or anti-IL-10 (Probiotech, Monterrey, MX), as previously described [31]. Supplemented RPMI-1640 was used as a negative control. Absorbance was read using a Multiskan Ascent Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at 405 nm. The results are presented as the mean value of duplicate wells.

#### 2.8. Prostaglandin E2 and lipoxin A4 detection

Prostaglandin E2 and lipoxin A4 production in the culture supernatants was quantified by means of an enzymatic immunoassay (EIA). Each sample was assayed in duplicate using prostaglandin E2 and lipoxin A4 EIA kits (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) according to the manufacturer's instructions.

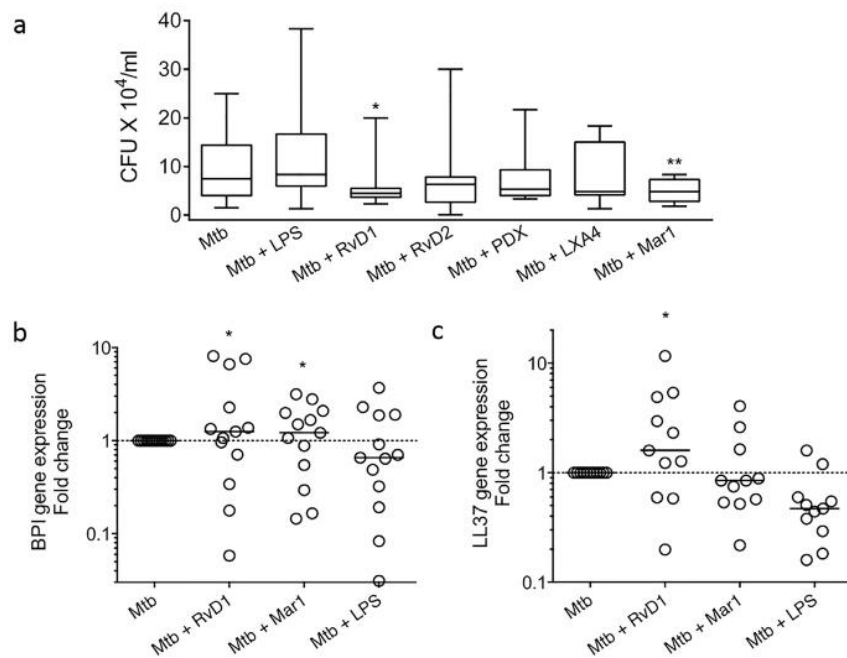
#### 2.9. Reverse transcription and real-time PCR for gene expression

Total RNA was extracted and reverse transcribed; the cDNA was subjected to quantitative real-time PCR (qRT-PCR, TaqMan) to determine the mRNA expression levels using the comparative threshold cycle ( $\Delta\Delta C_t$ ), as previously described [6]. Real-time PCRs were performed in duplicate wells according to the manufacturer's protocol for TaqMan predesigned gene assays. The LL37 (Hs00189038\_m1) and BPI (Hs01552756\_m1) genes were evaluated, and gene assays were purchased from Applied Biosystems (Carlsbad, CA). The Ct values for each gene were normalized to the endogenous control 18S rRNA gene (4319413E).

#### 2.10. Extraction of nuclear proteins

The macrophages were cultured,  $5 \times 10^6$  cells per experimental condition, in ultralow attachment plates (Corning Incorporated, Corning, NY). The cells were stimulated with LPS (500 ng/mL) or with 100 nM RvD1 or 150 nM Mar1 for 60 min. The cells were detached from the plates with 1 mM EDTA, and the viability was checked by trypan blue exclusion. The cells were transferred to 14 mL polypropylene tubes and centrifuged for 5 min at 1500 rpm at 4 °C, and the nuclear proteins were extracted. All procedures were performed in cold conditions. The supernatant was discarded, the cell pellet was transferred in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) to a 1.5 mL tube and washed three times with cold PBS (5 min at 3500 rpm at 4 °C), and the supernatant was completely removed. The cell pellet was resuspended in a hypotonic buffer to obtain the cytoplasmic extract (20 mM HEPES [4-(2-





**Fig. 4.** Effects of lipids on bactericidal activity and BPI and LL37 expression by macrophages infected with *M. tuberculosis*. MDMs were infected with *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) at an MOI of 5 for 1 h. Nonphagocytosed bacteria were removed, and 200 ng/mL LPS, 100 nM RvD1, RvD2, PDX, or LXA4 or 150 nM Mar1 was added to the culture. a) The intracellular bacterial load was determined by the colony-forming unit (CFU) method after 3 days of culture. Box plots indicate the medians and quartiles,  $n = 11$ . \* $p < 0.05$ . Cell lysates were used for the quantification of gene expression of b) BPI ( $n = 13$ ) and c) LL37 ( $n = 11$ ) by real-time PCR (qPCR). Gene expression was normalized to the relative abundance of 18S RNA. Depicted are individual results of the fold change relative to infection alone, using the method of comparative Ct. Lines indicate the medians. \* $p < 0.05$ .

hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] pH 7.9, 400 mM NaCl [sodium chloride], 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> [magnesium chloride], 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM fresh DTT [dithiothreitol] and 0.5 mM fresh PMSF [phenylmethylsulfonyl fluoride]) and left for 1 min on ice before centrifuging at 3500 rpm for 10 min at 4 °C. The cytoplasmic fraction (supernatant) was cryopreserved. The pellet was resuspended in 20  $\mu$ L of hypertonic buffer (10 mM HEPES pH 7.0, 10 mM KCl [potassium chloride], 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM fresh DTT) and incubated for 30 min with gentle agitation at 4 °C. The pellet was then centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C, and the supernatant containing the nuclear protein was recovered and stored at -20 °C until use. The samples were validated by western blotting *via* the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA, Supplementary Fig. 1).

#### 2.11. Quantification of Nrf2 in nuclear extracts

To assess the nuclear translocation of Nrf2, the nuclear and cytosolic extracts were assayed using a TransAM Nrf2 kit (Active Motif, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions.

#### 2.12. NF $\kappa$ B translocation

The nuclear translocation of NF $\kappa$ B p65 was determined by imaging cytometry of intact cells. Macrophages were stimulated with LPS (500 ng/mL), 100 nM RvD1 or 150 nM Mar1 for 60 min. The cells were immediately washed with ice-cold PBS (Lonza) and stained using an Amnis NF $\kappa$ B Translocation kit (Millipore, Burlington, MA) following the manufacturer's instructions. The cells were immediately analyzed using Image Stream MKII equipment (Amnis Corporation, Seattle, WA). At least 1000 cells were photographed, and nuclear translocation was measured using the Nuclear Localization Wizard within the Amnis Ideas software (Amnis Corporation). A similarity index above 1.2 determined the nuclear localization of NF $\kappa$ B. The similarity index is the log-transformed Pearson's correlation coefficient and is a measure of the degree to which two images are linearly correlated within a masked region. The analysis strategy is depicted in Supplementary Fig. 2. The results are expressed as the percentage of cells with nuclear NF $\kappa$ B translocation.

#### 2.13. BPI detection by fluorescence microscopy

For fluorescence microscopy experiments,  $2 \times 10^5$  cells/well were cultured in 8-well Lab-Tek II chambers. Macrophages were infected with *M. tuberculosis* at an MOI of 5. After discarding nonphagocytosed bacteria, the cells were incubated with the high-affinity D1-like antagonist hydrobromide (5  $\mu$ M) (SCH, TOCRIS Bioscience, Bristol, UK) for 30 min prior to stimulation with RvD1 or Mar1 and were then incubated for an additional 24 h. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with purified rabbit anti-hBPI (R&D systems, Minneapolis, MN) and rabbit anti-*M. tuberculosis* antibodies and appropriate secondary antibodies coupled with Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 (Life Technologies). Hoechst (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA) was used to detect nuclei. The cells were visualized with a fluorescence Axio Scope A1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, DE), and the images were acquired and analyzed with ZEN Pro software (Carl Zeiss). At least 50 cells were imaged for each condition. The cells were contoured with the Spline tool using the phase contrast image as the source. The selected region of interest was pasted onto the fluorescence image, and the mean fluorescence intensity of BPI per cell was calculated. The analysis strategy is depicted in Supplementary Fig. 3.

#### 2.14. Data and statistical analysis

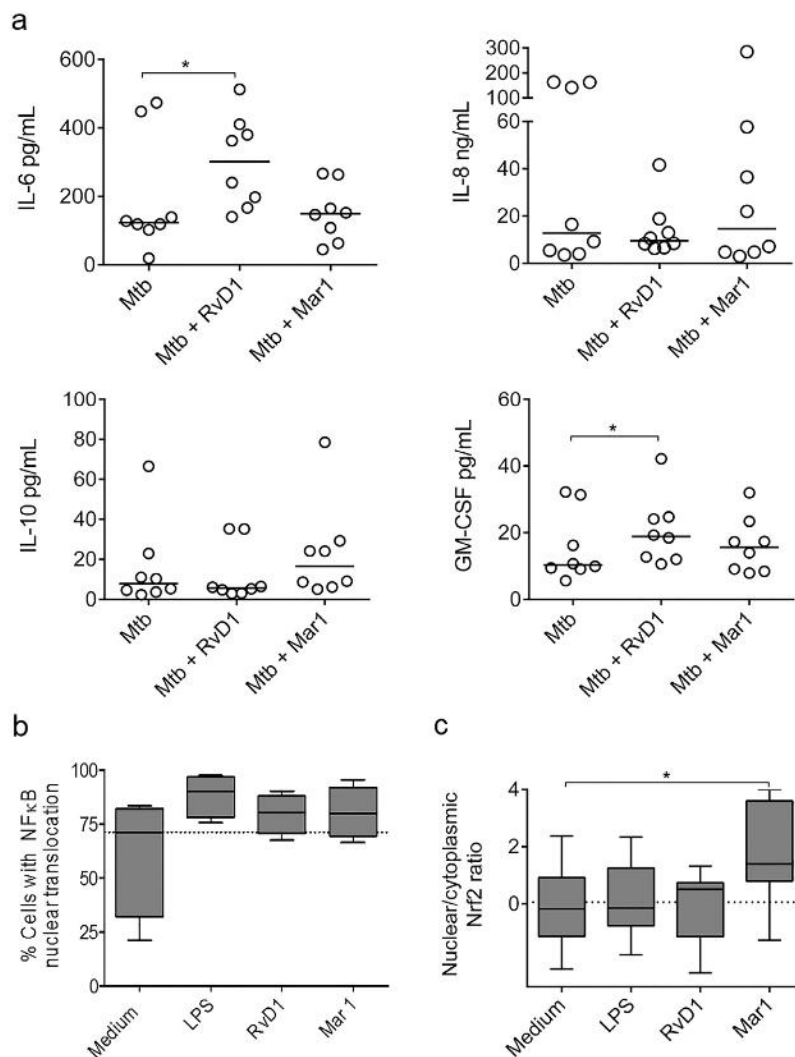
We used Friedman's ANOVA followed by Dunn's posttest to assess differences among treatments. Statistical analyses were performed with Prism version 6.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA), and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Exogenous RvD1, RvD2, PDX, LXA4 and Mar1 modulate LPS-dependent TNF- $\alpha$ production

Specialized proresolving mediators are produced by macrophages and exert their biological function mainly on neutrophils. The effects of RvD1 and Mar1 on macrophages are poorly characterized. We first confirmed that the lipids in this study exerted modulatory activities on macrophages by measuring their effect on TNF- $\alpha$  production after LPS





**Fig. 5.** Effects of RvD1 and Mar1 on the production of cytokines by macrophages infected with *M. tuberculosis*. MDMs were infected with *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) at an MOI of 5 for 1 h. Nonphagocytosed bacteria were removed, and 100 nM RvD1, 150 nM Mar1 or 200 ng/mL LPS was added. The cells remained in culture for 24 h, and a) the production of IL6, IL8, IL10 and GM-CSF was determined by Luminex. Depicted are individual results. Lines indicate the medians,  $n = 8$ .  $*p < 0.05$  between the indicated pairs of samples. Nuclear translocation of transcription factors was determined in uninfected cells stimulated with LPS, RvD1 or Mar1 after 2 h of culture. b) Nuclear translocation of NF $\kappa$ B was determined by imaging cytometry of intact cells. Depicted are the percentages of cells with translocation,  $n = 5$ . c) Nuclear translocation of Nrf2 was measured by ELISA in nuclear and cytoplasmic extracts of the cells. Depicted is the nuclear/cytoplasmic ratio. Box plots indicate the medians and quartiles,  $n = 8$ .  $*p < 0.05$  between the indicated pairs of samples.

stimulation. Based on the concentrations reported in the literature, we used 1, 10 and 100 nM for RvD1, RvD2, PDX, and LXA4 and 10, 150, and 300 nM for Mar1 to assess their ability to reduce the production of TNF- $\alpha$  after LPS stimulation in macrophages, and no significant reduction in cell viability was observed at any of the evaluated concentrations of each lipid (Fig. 2, left). We observed a non-dose-response significant reduction of TNF- $\alpha$  production by every specialized pro-resolving mediator (Fig. 2, right). Since there was no significant effect of the lipid concentration used, all subsequent experiments were performed using the highest concentration that did not affect the viability of the macrophages.

### 3.2. RvD1, RvD2, PDX, LXA4 and Mar1 modulate TNF- $\alpha$ production by macrophages infected with *M. tuberculosis*

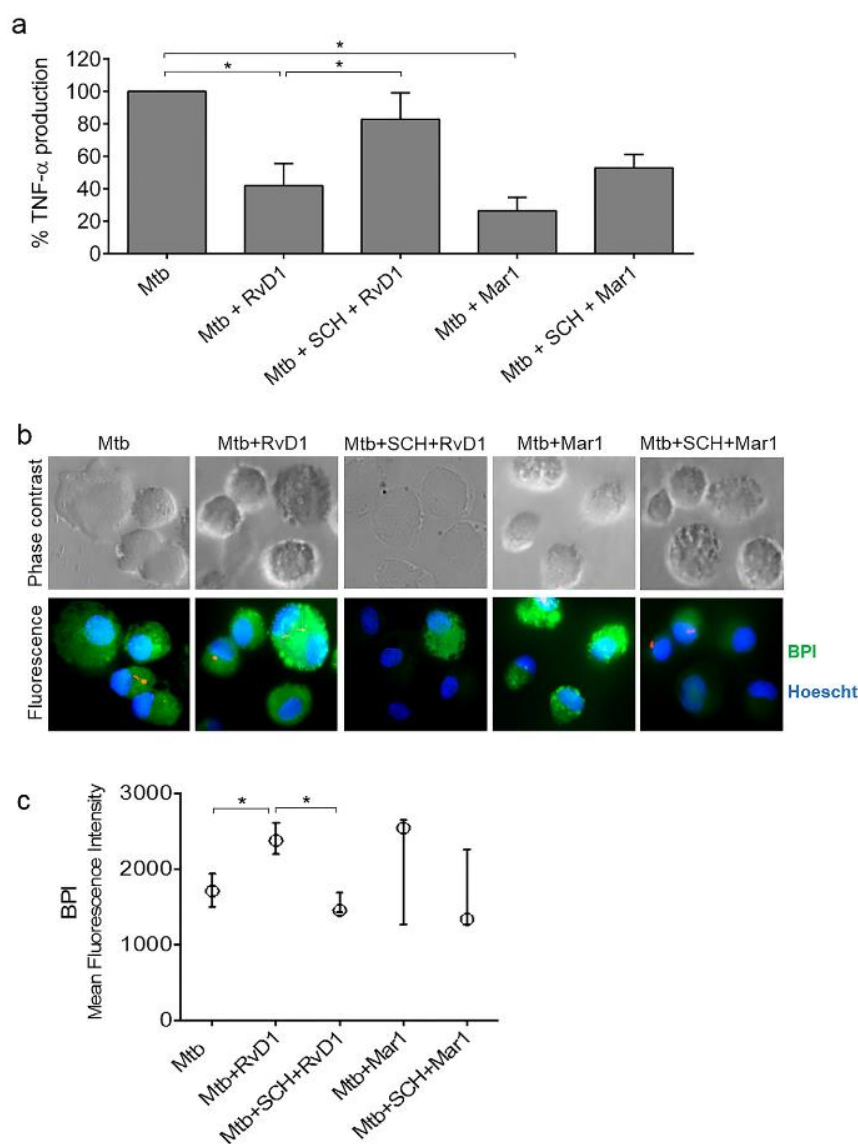
We further evaluated the effect of specialized pro-resolving mediators on macrophage resolution during *M. tuberculosis* infection by measuring TNF- $\alpha$ , PGE2 and LXA4 production. We observed that RvD1, LXA4 and Mar1 were able to significantly reduce TNF- $\alpha$  production after *M. tuberculosis* infection (Fig. 3a). In addition, PDX and LXA4 induced a significant increase in PGE2 production in macrophages infected with *M. tuberculosis* (Fig. 3b) and LXA4 induced more LXA4 production (Fig. 3c), but we could not rule out the possibility that the amounts of LXA4 in LXA4-stimulated cells were remnants of the

exogenously applied lipoxin instead of autoinduced production.

### 3.3. RvD1 and Mar1 enhance the antimicrobial activity of macrophages infected with *M. tuberculosis* H37Rv

Because resolution of inflammation may have a role in antimicrobial responses, we investigated the role that inflammation resolution plays in the control of *M. tuberculosis* infection. We observed a significant reduction in the intracellular bacterial burden in macrophages stimulated with RvD1 (median  $4.5$  [range  $2.3$ – $20$ ]  $\times 10^4$  CFU/mL) and Mar1 (median  $4.8$  [range  $1.8$ – $8.3$ ]  $\times 10^4$  CFU/mL) compared to that in untreated macrophages (median  $7.5$  [range  $1.5$ – $25$ ]  $\times 10^4$  CFU/mL) (Fig. 4a). The other lipids exhibited no effect on bacterial burden control.

Because RvD1 and Mar1 activated the macrophage antimicrobial response, we evaluated whether this effect was associated with the induction of antimicrobial peptides. LPS was included because it induces inflammation but dampens antimicrobial responses. We observed that both RvD1 and Mar1 induced the overexpression of BPI in infected macrophages, with a median fold change of  $2.276$  [range  $0.05$ – $8.1$ ] and a median fold change of  $1.665$  [range  $0.14$ – $3.157$ ], respectively, relative to the expression of BPI in untreated cells (Fig. 4b). LPS did not induce BPI upregulation. Overexpression of LL37 was observed after RvD1 stimulation, with a median fold change of  $1.59$  [range



**Fig. 6.** A high-affinity D1-like antagonist inhibited the effects of RvD1 and Mar1 on the modulation of TNF- $\alpha$  production and decreased the BPI production induced by RvD1 in macrophages infected with *M. tuberculosis*.

MDMs were infected with *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) at an MOI of 5 for 1 h. Nonphagocytosed bacteria were removed. The high-affinity D1-like antagonist hydrobromide (SCH, 5  $\mu$ M) was added 30 min before the addition of RvD1 (100 nM) or Mar1 (150 nM). The cells were incubated for another 24 h. a) The supernatants were collected, and TNF- $\alpha$  production was measured by ELISA. Depicted are the means  $\pm$  standard errors,  $n = 6$ . \* $p < 0.05$  between the indicated pairs of samples. The cells were fixed, and BPI protein was detected by fluorescence microscopy. b) Representative images of phase contrast and fluorescence staining for the experimental conditions. Purified rabbit anti-hBPI (green) and rabbit anti-*M. tuberculosis* (red) antibodies were used and counterstained with appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies. Hoechst (blue) was used to stain nuclei. c) At least 50 cells were imaged for each condition, and the mean fluorescence intensity of BPI per cell was calculated. The medians with interquartile ranges are depicted,  $n = 6$ . \* $p < 0.05$  between the indicated pairs of samples. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

0.19–11.64] (Fig. 4c). Apparently, the addition of LPS to infected macrophages downregulated BPI and LL37 expression.

#### 3.4. Differential cytokine responses elicited by RvD1 and Mar1 in infected macrophages

The distinct antimicrobial responses induced by RvD1 and Mar1 prompted us to determine whether they induce differential cytokine responses. We found that RvD1 induced the production of significant amounts of IL-6 and GM-CSF, but not of IL-10 or IL-8, in macrophages infected with *M. tuberculosis*, whereas Mar1 did not induce a significant increase in the production of any of the cytokines (Fig. 5a). Neither the cytokine production nor the previous effects observed for RvD1 and Mar1 were due to the vehicle (Supplementary Fig. 4).

Because proinflammatory cytokine and antimicrobial peptide induction requires transcription signals to translocate to the nucleus, we determined the translocation of the nuclear factors NF $\kappa$ B p65 (inducer of the transcription of proinflammatory cytokines and antimicrobial peptides) and Nrf2 (nuclear factor that activates the transcription of anti-inflammatory molecules). For these experiments, LPS, RvD1 and

Mar1 were used as single stimulants to prevent the effect of infection. We observed that both RvD1 and Mar1 induced the translocation of NF $\kappa$ B p65 to the nucleus in a smaller proportion than LPS (Fig. 5b), but only Mar1 induced a significant translocation of Nrf2 in comparison to macrophages without stimulation (Fig. 5c).

#### 3.5. A high-affinity D1-like antagonist inhibits the effects of RvD1 and Mar1 on TNF- $\alpha$ and BPI production in macrophages infected with *M. tuberculosis*

We explored the role of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling in RvD1 and Mar1 modulation of macrophage responses during *M. tuberculosis* infection. We used the D1-like antagonist SCH prior to RvD1 and Mar1 stimulation. We found that the addition of SCH to infected macrophages abrogated the regulatory effect of RvD1 on TNF- $\alpha$  production (Fig. 6a). Moreover, the addition of SCH inhibited the overexpression of BPI induced by RvD1 (Fig. 6b and Fig. 6c). Conversely, inhibition of GPCR signaling only partially reversed Mar1 effects.



#### 4. Discussion

The immune response to *M. tuberculosis* induces a bactericidal and proinflammatory response that is important to control the infection, but at the same time, the induced inflammatory response is responsible for tissue injury during the tuberculosis disease process. Therefore, treatment of tuberculosis should include the addition of anti-inflammatory therapies to prevent tissue damage associated with necrosis during respiratory tract infections.

In this study, we evaluated the ability of proresolving mediators to mediate the regulation of TNF- $\alpha$  production and bactericidal responses in *M. tuberculosis*-infected macrophages. Proresolving mediators are typically implicated in the resolution of acute inflammation. They are released early to the extracellular space and are relevant for infections with gram-negative pathogens and influenza virus. The implication of these mediators in chronic infections, however, is unknown.

First, we demonstrated that RvD1, RvD2, PDX, LXA4 and Mar1 reduced TNF- $\alpha$  production after LPS stimulation in human macrophages. These results are in accordance with previous reports describing the protective effect of RvD1 on LPS-induced TNF- $\alpha$  production in mice [21]. However, the modulation of TNF- $\alpha$  production by RvD2, PDX, LXA4 and Mar1 in human macrophages had not been described before.

We also observed that RvD1, LXA4 and Mar1 significantly reduced TNF- $\alpha$  production in *M. tuberculosis*-infected macrophages and exhibited a modulatory effect similar to that observed with LPS stimulation. In addition, PDX and LXA4 induced a significant increase in PGE2 production in *M. tuberculosis*-infected macrophages; PGE2 is important in inflammation resolution [32] and plays a role in controlling necrosis during mycobacterial infection [29]. Therefore, the addition of PDX or LXA4 during mycobacterial infection could decrease necrosis through the induction of PGE2. However, it has been reported that in macrophages infected with virulent *M. tuberculosis*, LXA4 acts by down-regulating PGE2 synthesis, which is in contrast with our observation [29]. These inconsistent results could be associated with the fact that PGE2 exhibits both anti- and proinflammatory effects depending on the concentration and timing of culture [33,34], and PGE2 induction during *M. tuberculosis* infection not only could be beneficial for necrosis control but may also induce a proinflammatory response.

In addition, the lack of regulation by RvD1, RvD2 and Mar1 exerted on PGE2 and LXA4 production suggests differential mechanisms of inflammation regulation by the proresolving mediators in macrophages. Except for LXA4, no role for the other proresolving mediators has been identified in the *M. tuberculosis* infection.

Interestingly, the addition of RvD1 and Mar1 also induced a significant reduction in *M. tuberculosis* intracellular growth that was accompanied by a significant overexpression of LL37 and BPI in RvD1-treated macrophages and only BPI in Mar1-treated macrophages. Antimicrobial responses have been reported to be induced by proresolving mediators in animal models. For instance, it has been described in animal models of pneumonia that treatment with the E-series resolvins RvE1 or aspirin-triggered RvD1 enhances bacterial clearance while decreasing lung levels of proinflammatory cytokines [35,36]. However, the antimicrobial mechanisms induced by these lipids are poorly characterized, and the induction of LL-37 and BPI by RvD1 and Mar1 in human macrophages has not been previously reported. Thus far, the induced-antimicrobial mechanism described for resolvins is the production of ROS [26]; meanwhile, it has been reported that aspirin-activated lipoxin (ATL) induces the expression of BPI in epithelial cells [37].

This study is the first report in which BPI and LL-37 are associated with the induction of antimicrobial responses by resolvins and marins. It has been described that BPI plays a role in modulating TNF- $\alpha$  responses [38], and our results imply that the induction of BPI by RvD1 and Mar1 may exert dual effects (antibacterial and anti-inflammatory) during *M. tuberculosis* infections.

We wondered if the differential response that we observed for RvD1

and Mar1 in antimicrobial effector induction extended to the production of other cytokines. We observed that the addition of RvD1 and Mar1 to infected macrophages induced a differential profile of cytokine production. While RvD1 induced a significant increase in the amounts of IL-6 and GM-CSF, Mar1 did not induce an increased production of any of the cytokines. Therefore, we hypothesized that the differential cytokine production and the differential activation of bactericidal mechanisms induced by RvD1 and Mar1 can be explained by their differential ability to induce nuclear translocation of both proinflammatory (NF $\kappa$ B p65) and anti-inflammatory (Nrf2) transcription factors. Although both RvD1 and Mar1 induced a similar nuclear translocation of NF $\kappa$ B p65, only Mar1 mobilized a significant proportion of Nrf2 to the nucleus. Since activators of Nrf2 reportedly reduce IL-6 and IL-1 transcript accumulation in both murine bone marrow macrophages and a human macrophage cell line (THP-1) [39], these results suggest that Mar1 activates the Nrf2 pathway to reduce the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ . In addition, it has been described that RvD1 inhibits the inflammatory response through different mechanisms, such as induction of the nuclear translocation of NF $\kappa$ B p50/p50, which deactivates proinflammatory responses dependent on COX-2 [40]; reduction in the ratio of p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B, which reveals that RvD1 could inhibit the activation of NF $\kappa$ B [41]; and induction of IL-10 secretion, inactivation of GSK3, and activation of CREB to regulate inflammation in human monocytes stimulated with LPS [42]. These mechanisms have also been reported for RvD2 and Mar1. PGE2 also participates in the regulation of TNF- $\alpha$  production [43], but we did not observe induction of PGE2 by RvD1 or Mar1.

Finally, we investigated whether the RvD1- and Mar1-dependent responses were associated with GPCR signaling. We found that preincubation of infected macrophages with a D1-like antagonist (SCH) abrogated the regulatory effect of RvD1 on TNF- $\alpha$  production and the induction of BPI overexpression. However, SCH only partially altered the Mar1-dependent responses, suggesting a differential involvement of regulatory pathways that were beyond the reach of this study.

Overall, treatment with RvD1 and Mar1 induced an immunomodulation of *M. tuberculosis*-infected macrophages. Importantly, these proresolving mediators lack the immunosuppressive properties of classical anti-inflammatory therapies. Both proresolving mediators are metabolized from DHA. Essential DHA and EPA and their derivatives have been reported to be significantly reduced in the sera of tuberculosis patients [44], suggesting that patients with active tuberculosis may have low levels of resolvins. In addition, aspirin induces the production of RvD1 and Mar1 [35,45], which makes it possible to propose their pharmacological induction.

#### 5. Conclusion

RvD1 and Mar1 induce anti-inflammatory mechanisms (regulation of TNF- $\alpha$ , PGE2 and other cytokines), differential production of antimicrobial effectors (BPI and LL37) and intracellular growth control of *M. tuberculosis* by human macrophages. These findings have clinical implications that need to be addressed in the future. In particular, the dietary origin of these lipids and their induction by nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as aspirin and celecoxib make them potential targets of new therapeutic schemes in patients with pulmonary tuberculosis.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105694>.

#### Acknowledgments

A. R. would like to thank the "Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas," Universidad Nacional Autónoma de México, and appreciates the scholarship received from "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Mexico (CONACyT-Mexico)".

## Declaration of Competing Interests

None declared.

## References

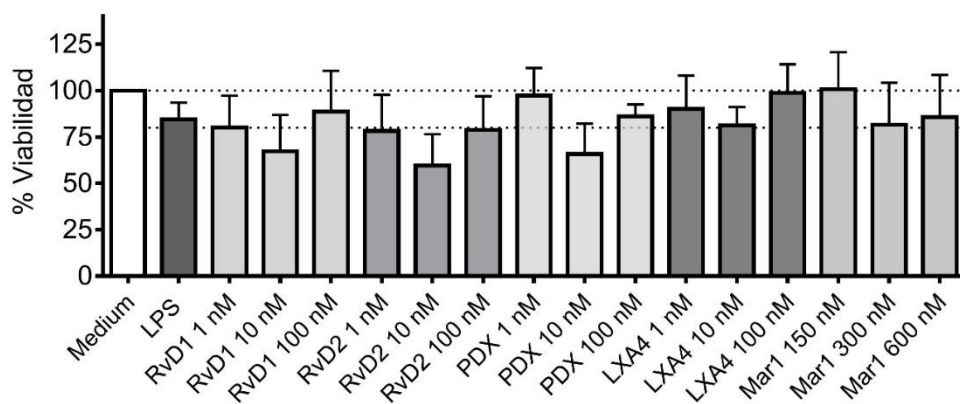
- [1] World Health Organization, Global Tuberculosis Report 2018, (2018).
- [2] C.R. Scharn, A.C. Collins, et al., Heme oxygenase-1 regulates inflammation and mycobacterial survival in human macrophages during Mycobacterium tuberculosis infection, *J. Immunol.* 196 (11) (2016) 4641–4649.
- [3] A.M. Cooper, K.D. Mayer-Barber, et al., Role of innate cytokines in mycobacterial infection, *Mucosal Immunol.* 4 (3) (2011) 252–260.
- [4] G.A. Rook, R. al Attiyah, et al., New insights into the immunopathology of tuberculosis, *Pathobiology* 59 (3) (1991) 148–152.
- [5] S. Sharma, M. Bose, Role of cytokines in immune response to pulmonary tuberculosis, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 19 (3) (2001) 213–219.
- [6] E. Juarez, C. Carranza, et al., NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to Mycobacterium tuberculosis in humans, *Eur. J. Immunol.* 42 (4) (2012) 880–889.
- [7] E. Juarez, C. Carranza, et al., Nucleotide-oligomerizing domain-1 (NOD1) receptor activation induces pro-inflammatory responses and autophagy in human alveolar macrophages, *BMC Pulm. Med.* 14 (2014) 152.
- [8] E. Juarez, C. Carranza, et al., Loperamide restricts intracellular growth of mycobacterium tuberculosis in lung macrophages, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55 (6) (2016) 837–847.
- [9] C.N. Serhan, K. Gotlinger, et al., Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 73 (3–4) (2004) 155–172.
- [10] J.M. Schwab, N. Chiang, et al., Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes, *Nature* 447 (7146) (2007) 869–874.
- [11] J.N. Fullerton, A.J. O'Brien, et al., Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much, *J. Pathol.* 231 (1) (2013) 8–20.
- [12] A. Ortega-Gomez, M. Perretti, et al., Resolution of inflammation: an integrated view, *EMBO Mol. Med.* 5 (5) (2013) 661–674.
- [13] H. Andersson, B. Andersson, et al., Apoptotic neutrophils augment the inflammatory response to Mycobacterium tuberculosis infection in human macrophages, *PLoS One* 9 (7) (2014) e101514.
- [14] B. Samuelsson, S.E. Dahlen, et al., Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects, *Science* 237 (4819) (1987) 1171–1176.
- [15] C.N. Serhan, Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 101–137.
- [16] P.C. Calder, The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (7) (2012) 1073–1080.
- [17] D.W. Gilroy, T. Lawrence, et al., Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (5) (2004) 401–416.
- [18] C.N. Serhan, N. Chiang, et al., Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (5) (2008) 349–361.
- [19] M. Spite, C.N. Serhan, Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins, *Circ. Res.* 107 (10) (2010) 1170–1184.
- [20] H. Seki, K. Fukunaga, et al., The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury, *J. Immunol.* 184 (2) (2010) 836–843.
- [21] B. Wang, X. Gong, et al., Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24 (4) (2011) 434–441.
- [22] D. El Kebir, P. Gjorstrup, et al., Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (37) (2012) 14983–14988.
- [23] D. El Kebir, L. Jozsef, et al., 15-Epi-lipoxin A4 inhibits myeloperoxidase signaling and enhances resolution of acute lung injury, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (4) (2009) 311–319.
- [24] M. Morita, K. Kuba, et al., The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza, *Cell* 153 (1) (2013) 112–125.
- [25] C.D. Palmer, C.J. Mancuso, et al., 17(R)-Resolvin D1 differentially regulates TLR4-mediated responses of primary human macrophages to purified LPS and live *E. coli*, *J. Leukoc. Biol.* 90 (3) (2011) 459–470.
- [26] M. Spite, L.V. Norling, et al., Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis, *Nature* 461 (7268) (2009) 1287–1291.
- [27] H.M. Hsiao, T.H. Thatcher, et al., Resolvin D1 reduces emphysema and chronic inflammation, *Am. J. Pathol.* 185 (12) (2015) 3189–3201.
- [28] J. Rangel Moreno, I. Estrada Garcia, et al., The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis, *Immunology* 106 (2) (2002) 257–266.
- [29] M. Chen, M. Divangahi, et al., Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death, *J. Exp. Med.* 205 (12) (2008) 2791–2801.
- [30] C. Carranza, E. Juarez, et al., Mycobacterium tuberculosis growth control by lung macrophages and CD8 cells from patient contacts, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (2) (2006) 238–245.
- [31] S.K. Schwander, M. Torres, et al., Enhanced responses to Mycobacterium tuberculosis antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis, *J. Infect. Dis.* 178 (5) (1998) 1434–1445.
- [32] C.A. Loynes, J.A. Lee, et al., PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo, *Sci. Adv.* 4 (9) (2018) eaar8320.
- [33] I.C. Osma-Garcia, C. Punzon, et al., Dose-dependent effects of prostaglandin E2 in macrophage adhesion and migration, *Eur. J. Immunol.* 46 (3) (2016) 677–688.
- [34] E.V. Tchetingina, J.A. Di Battista, et al., Prostaglandin PGE2 at very low concentrations suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic articular cartilage: this involves a decrease in expression of proinflammatory genes, collagenases and COL10A1, a gene linked to chondrocyte hypertrophy, *Arthritis Res. Ther.* 9 (4) (2007) R75.
- [35] A. Croasdel, S.H. Lacy, et al., Resolvin D1 dampens pulmonary inflammation and promotes clearance of nontypeable Haemophilus influenzae, *J. Immunol.* 196 (6) (2016) 2742–2752.
- [36] O. Eickmeier, H. Seki, et al., Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury, *Mucosal Immunol.* 6 (2) (2013) 256–266.
- [37] G. Canny, O. Levy, et al., Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (6) (2002) 3902–3907.
- [38] T.G. Jahr, L. Ryan, et al., Induction of tumor necrosis factor production from monocytes stimulated with mannuronic acid polymers and involvement of lipopolysaccharide-binding protein, CD14, and bactericidal/permeability-increasing factor, *Infect. Immun.* 65 (1) (1997) 89–94.
- [39] E.H. Kobayashi, et al., Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat. Commun.* (7) (2016) 1–14.
- [40] Y. Gao, H. Zhang, et al., Resolvin D1 improves the resolution of inflammation via activating NF-kappaB p50/p50-mediated cyclooxygenase-2 expression in acute respiratory distress syndrome, *J. Immunol.* 199 (6) (2017) 2043–2054.
- [41] Y.L. Zhao, L. Zhang, et al., Resolvin D1 protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by down-regulating nuclear factor-kappa B signal and inhibiting apoptosis, *Chin. Med. J. (Engl.)* 129 (9) (2016) 1100–1107.
- [42] Z. Gu, G.J. Lamont, et al., Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3beta anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes, *Innate Immun.* 22 (3) (2016) 186–195.
- [43] V. Lehmann, B. Benninghoff, et al., Tumor necrosis factor-induced activation of peritoneal macrophages is regulated by prostaglandin E2 and cAMP, *J. Immunol.* 141 (2) (1988) 587–591.
- [44] J. Weiner III, S.K. Parida, et al., Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active disease are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients, *PLoS One* 7 (7) (2012) e40221.
- [45] C.N. Serhan, S. Hong, et al., Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals, *J. Exp. Med.* 196 (8) (2002) 1025–1037.



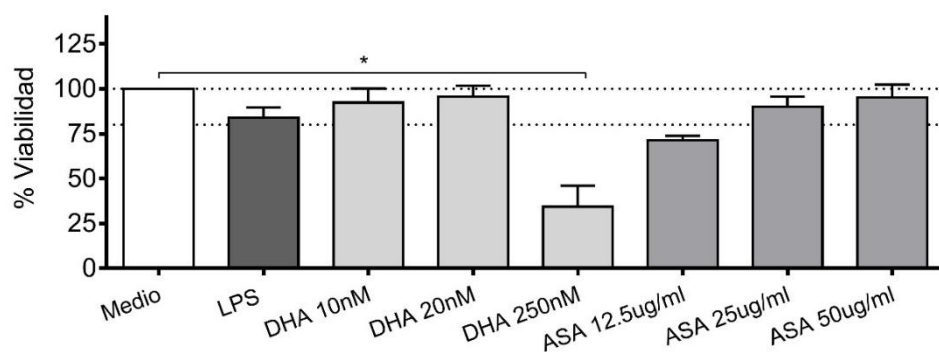
**ANEXO 2. Porcentaje de viabilidad celular a las 24 horas de estimulación con distintas concentraciones de los mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (SPM)**

Las células fueron estimuladas con LPS (200 ng/ml) o RvD1, RvD2, PDX y LXA4 a 1, 10, o 100 nM (0.1 nM, datos no mostrados), y MaR1 a 150, 300 o 600 nM (10 nM, datos no mostrados), a las 24 horas. El porcentaje de viabilidad se determinó utilizando un kit de detección (Cell Titer), n=8. Las concentraciones finales utilizadas en el estudio fueron de 100 nM para RvD1, RvD2, PDX y LXA4, y de 150 nM para MaR1 (a). Para el ácido docosahexaenoico se utilizaron las concentraciones de 10, 20 y 250 nM, mientras que para la aspirina (ASA), se utilizaron las concentraciones de 12.5, 25, y 50 ug/mL (b).

a)



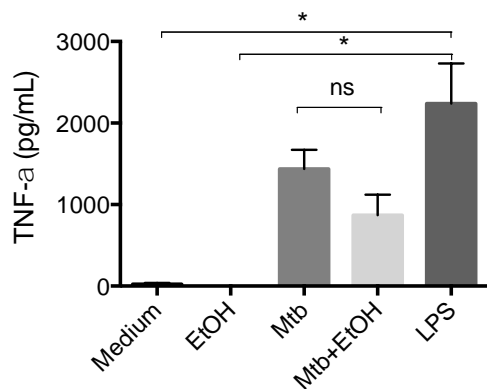
b)



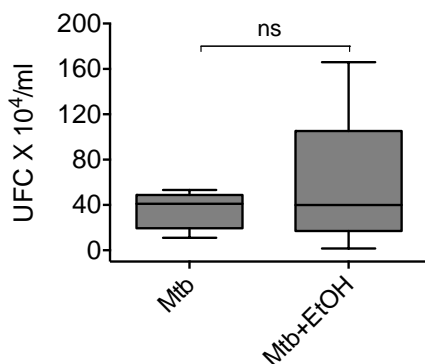
## ANEXO 2 (continuación)

También se evaluó que el etanol (EtOH), vehículo de los SPM no modificara las respuestas inmunitarias en las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio.

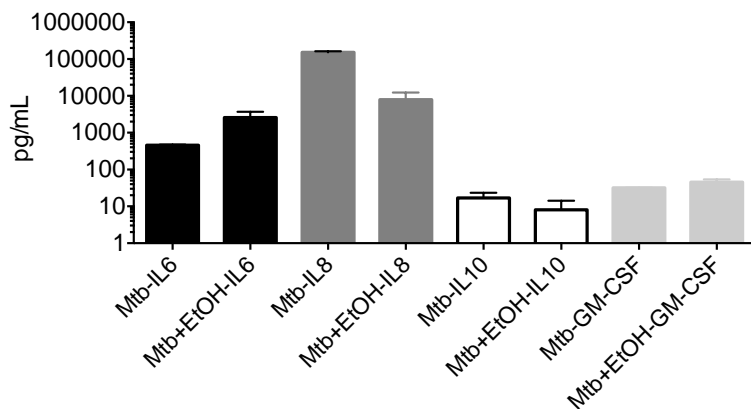
c) EtOH no modula la producción de TNF- $\alpha$



d) EtOH no induce la muerte de *M. tuberculosis*



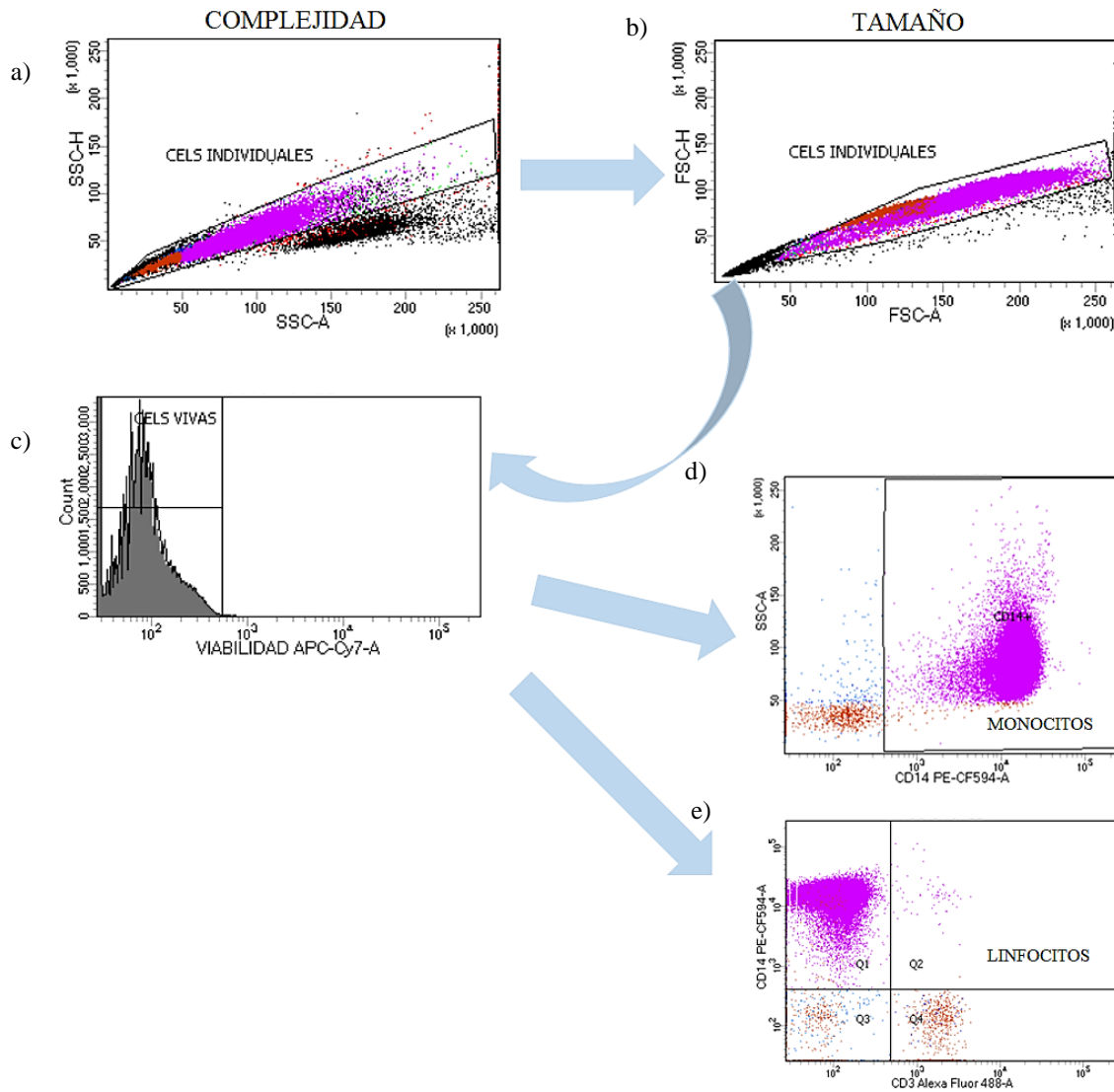
e) EtOH no induce la producción de citocinas





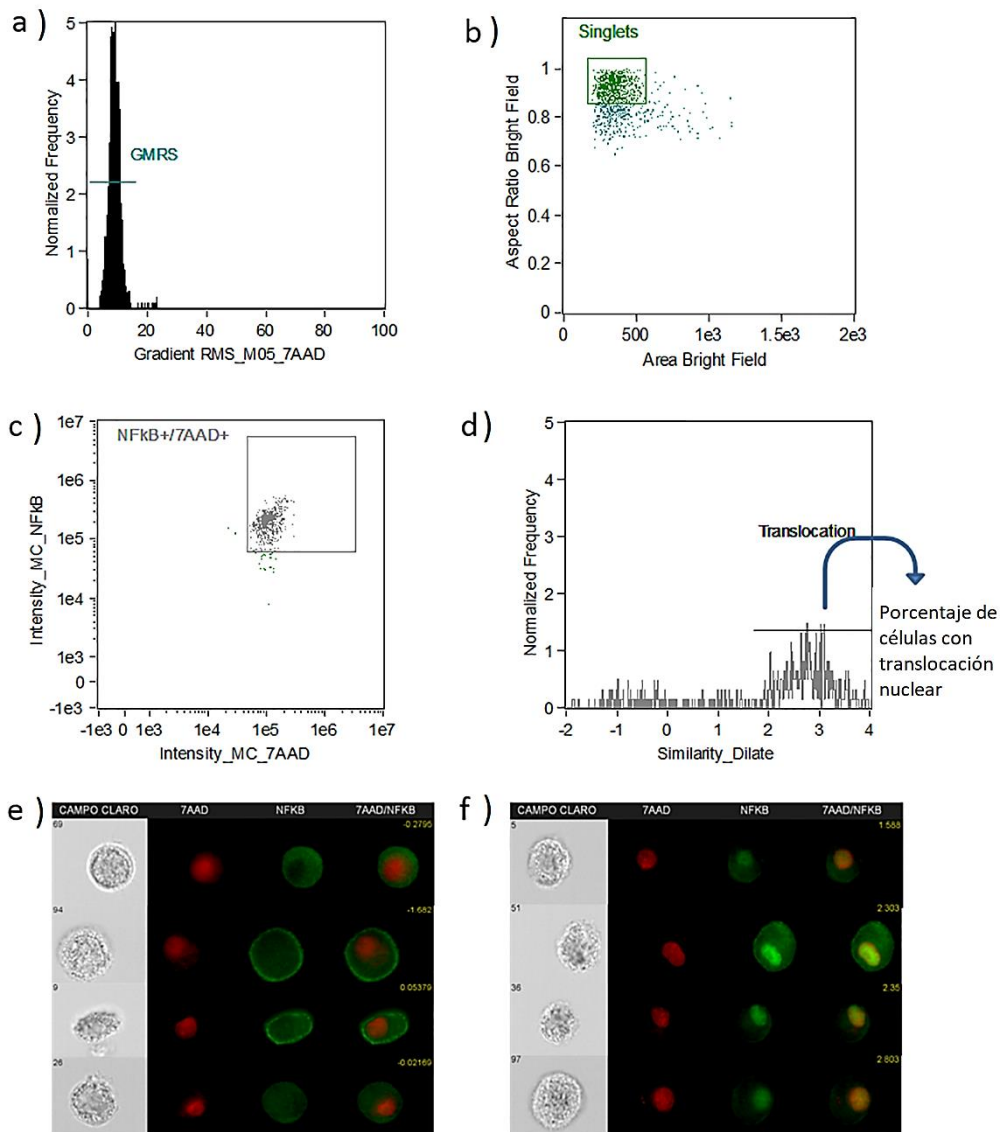
### ANEXO 3. Estrategia del análisis de evaluación de la pureza de monocitos

La pureza de la población de monocitos (CD14+) se evaluó mediante citometría de flujo. Se observó que el  $97.38 \pm 1.26\%$  de las células fue CD14+ y la viabilidad fue de  $99.3 \pm 0.2\%$  (media  $\pm$  ES). a) Primero fueron seleccionadas las células individuales (singlets) de acuerdo a su tamaño, b) después se seleccionaron las células individuales de acuerdo a su granularidad. c) Posteriormente se seleccionaron las células vivas utilizando una sonda de viabilidad (Fixable Viability Dye, eBioscience). d) Se separaron las células CD14 positivas (CD14+) de las negativas (utilizando un control de células sin tinción), e) y se separaron las células por el marcador CD3+ para linfocitos.



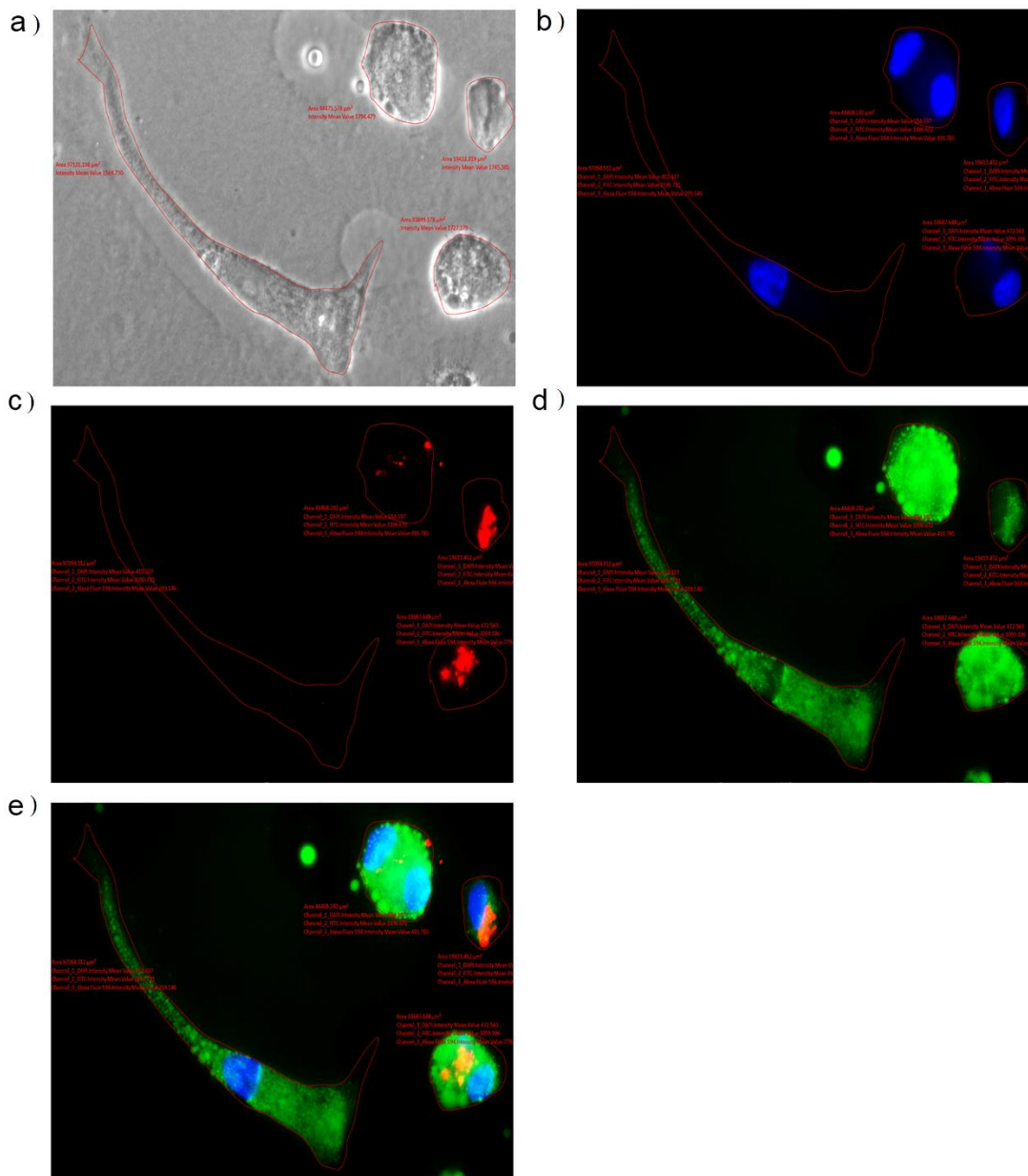
## ANEXO 4. Análisis de translocación de NFκB

Primero se realizó la selección de las células en mejor enfoque (a), después se eligieron las células individuales (b), y se eligió la región de las células 7AAD+/ NFκB+ (c). Posteriormente se realizó la selección de las células con alto valor de dilatación de similitud (células translocadas) (d). Se muestran las células de baja similitud (no translocadas) (e), y en (f) células con alta similitud (translocadas). El número en células dobles positivas indica el valor de dilatación de similitud. El porcentaje de células con translocación nuclear se determinó a partir de d.



## ANEXO 5. Inducción de BPI por microscopia de fluorescencia

Las células se contornearon en la imagen de contraste de fase utilizando la herramienta Spline con el software Ideas (a). La región de interés se pegó en las imágenes de fluorescencia y se calculó automáticamente la intensidad media de fluorescencia por célula de cada canal. Canal 1: Núcleo (b), Canal 2: BPI (c), Canal 3: *M. tuberculosis* (d), Fusión de imágenes de fluorescencia (e).



## ANEXO 6. Publicaciones y artículo de revisión durante el doctorado

### Artículos

- ✓ Juárez E., **Ruiz A.**, Cortez O., Sada E., y Torres M. 2018. Antimicrobial and immunomodulatory activity induced by loperamide in mycobacterial infections. *International Immunopharmacology*, 65, 29-36.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.09.013>.
- ✓ **Ruiz A.**, Sarabia C., Torres M., Juárez E. 2019. Resolvin D1 (RvD1) and maresin 1 (Mar1) contribute to human macrophage control of *M. tuberculosis* infection while resolving inflammation. *International Immunopharmacology* 74: 105694. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105694. **Artículo requisito de titulación.**
- ✓ **Ruiz A.**, Guzmán-Beltrán S., Carreto-Binaghi LE., Gonzalez Y., Juárez E. 2019. DNA from virulent *M. tuberculosis* induces TNF- $\alpha$  production and autophagy in M1 polarized macrophages. *Microbial Pathogenesis* 132: 166–177. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.04.041.
- ✓ Palacios Y, **Ruiz A**, Ramón-Luing LA, Ocaña-Guzman R, Barreto-Rodriguez O, Sánchez-Monciváis A, Tecuatzi-Cadena B, Regalado-García AG, Pineda-Gudiño RD, García-Martínez A, Juárez-Hernández F, Farias-Contreras JP, Fricke-Galindo I, Pérez-Rubio G, Falfán-Valencia R, Buendía-Roldan I, Medina-Quero K, Chavez-Galan L. 2021. Severe COVID-19 Patients Show an Increase in Soluble TNFR1 and ADAM17, with a Relationship to Mortality. *Int J Mol Sci*. 22(16):8423. 10.3390/ijms22168423.
- ✓ **Ruiz A**, Palacios Y, Garcia I, Chavez-Galan L. 2021. Transmembrane TNF and Its Receptors TNFR1 and TNFR2 in Mycobacterial Infections. *Int J Mol Sci*. 22(11):5461. 10.3390/ijms22115461.
- ✓ **Ruiz A**, Flores-Gonzalez J, Buendia-Roldan I, Chavez-Galan L. Telomere Shortening and Its Association with Cell Dysfunction in Lung Diseases. *Int J Mol Sci*. 23(1):425. 10.3390/ijms23010425.
- ✓ Chavez-Galan L, **Ruiz A**, Martinez-Espinosa K, Aguilar-Duran H, Torres M, Falfan-Valencia R, Pérez-Rubio G, Selman M, Buendia-Roldan I. Circulating Levels of PD-L1, TIM-3 and MMP-7 Are Promising Biomarkers to Differentiate COVID-19 Patients That Require Invasive Mechanical Ventilation. *Biomolecules*. 12(3):445. 10.3390/biom12030445.
- ✓ Fricke-Galindo I, Buendía-Roldán I, **Ruiz A**, Palacios Y, Pérez-Rubio G, Hernández-Zenteno RJ, Reyes-Melendres F, Zazueta-Márquez A, Alarcón-Dionet A, Guzmán-Vargas J, Bravo-Gutiérrez OA, Quintero-Puerta T, Gutiérrez-Pérez IA, Nava-Quiroz KJ, Bañuelos-Flores JL, Mejía M, Rojas-Serrano J, Ramos-Martínez E, Guzmán-Guzmán IP, Chávez-Galán L, Falfán-Valencia R. 2022. TNFRSF1B and TNF variants are associated with differences in soluble TNF receptors' levels in patients with severe COVID-19. *J Infect Dis*. 10.1093/infdis/jiac101.

- ✓ Chavez-Galan L, Becerril C, **Ruiz A**, Ramon-Luing LA, Cisneros J, Montaña M, Salgado A, Ramos C, Buendía-Roldán I, Pardo A, Selman M. 2022. Fibroblasts From Idiopathic Pulmonary Fibrosis Induce Apoptosis and Reduce the Migration Capacity of T Lymphocytes. *Front Immunol.* 13:820347. 10.3389/fimmu.2022.820347.
- ✓ Ruiz A, Romero-García AS, Mancilla-Jiménez R, Juárez E. 2022. Los ácidos grasos poliinsaturados y sus derivados regulan infecciones respiratorias. *Neumol Cir Torax.* 81 (1): 1-299. <https://dx.doi.org/000000000000>.

### **Capítulo de libro**

- ✓ Ruiz A., Juárez E. Inducing Autophagy to Eliminate Intracellular Bacteria. *Frontiers in Anti-infective Agents*, 2020, Vol. 2, 100-124 (Chapter 5).

# Los ácidos grasos poliinsaturados y sus derivados regulan infecciones respiratorias

## Polysaturated fatty acids and their derivatives regulate respiratory infections

Andy Ruiz,<sup>\*‡</sup> Aida Susana Romero-García,<sup>‡</sup> Raúl Mancilla-Jiménez,<sup>‡</sup> Esmeralda Juárez\*

<sup>\*</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, CDMX, México;

<sup>‡</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México.

**RESUMEN.** La regulación de la inflamación es un proceso fisiopatológico complejo que depende de la producción de lípidos oxigenados derivados de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales, como el omega-3 y el omega-6, entre los que se encuentran las lipoxinas, resolvinas y protectinas, denominados mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (SPM, del inglés *specialized pro-resolving lipid mediators*). La actividad de éstos se asocia con el control de procesos respiratorios infecciosos al modular la producción de citocinas proinflamatorias, evitar el daño por necrosis asociado a la inflamación, disminuir cargas microbianas y promover la regeneración de los tejidos. En este trabajo revisamos los aspectos bioquímicos, inmunológicos y fisiopatológicos de los SPM en la regulación de la inflamación en infecciones respiratorias.

**Palabras clave:** Ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, inflamación, infecciones respiratorias, mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación.

**ABSTRACT.** The regulation of inflammation is a complex pathophysiological process that depends on the production of oxygenated lipid derivatives essential polyunsaturated fatty acids, like omega-3 and omega-6, among which are the lipoxins resolvins and protectins, called specialized pro-resolving lipid mediators (SPM). Their activity is associated with the control of respiratory infection processes to modulate the production of proinflammatory cytokines, avoiding damage due to inflammation-associated necrosis, reducing microbial loads, and promoting tissue remodeling. Therefore, we review some of the biochemical, physiological and immunological aspects of SPM in the regulation of inflammation in respiratory infections.

**Keywords:** Eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, inflammation, respiratory infections, specialized pro-resolving lipid mediators.

### INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales (PUFA, del inglés *polyunsaturated fatty acids*), como el omega-3, se obtienen de fuentes ricas de pescado, salmón, nueces y semillas de lino, mientras que las fuentes ricas en omega-6 incluyen aceites vegetales de maíz, cártamo, girasol, soja y algunos productos animales.<sup>1-3</sup>

El estudio de los PUFA ha incrementado por su participación en la regulación de respuestas inflamatorias, como

la producción de mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (SPM, del inglés *specialized pro-resolving lipid mediators*). Los SPM derivados de los PUFA como el ácido linoleico (C18:  $\Delta 2$ , n-6), ácido araquidónico (AA, C20:  $\Delta 4$ , n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:55,8,11,14,17) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:64,7,10,13,16,19) son generados a partir de reacciones enzimáticas mediadas por lipooxigenasas (LOX) y/o ciclooxigenasas (COX), que incluyen protectinas y resolvinas de la serie D, derivadas del DHA, resolvinas de la serie E, derivadas del EPA, y lipoxinas, derivadas del AA, como se muestra en la *Figura 1*.<sup>4-9</sup>

Tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, los SPM promueven el aclaramiento bacteriano al estimular la producción de péptidos antimicrobianos,<sup>7,10</sup> incrementan la actividad fagocítica de los macrófagos<sup>11-13</sup> y disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias. Además, ayudan en la reparación tisular, aumentan las defensas del hospedero y mejoran su supervivencia.<sup>14,15</sup>

Se tiene evidencia de que las infecciones respiratorias se ven afectadas por el estado nutricional del paciente, el estado metabólico, la medicación, las complicaciones y el

*Correspondencia:*

**Dra. Esmeralda Juárez**

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, CDMX, México.

**Correo electrónico:** esmeraldajc@yahoo.com

*Recibido:* 30-VIII-2021; *aceptado:* 31-III-2022.

**Citar como:** Ruiz A, Romero-García AS, Mancilla-Jiménez R, Juárez E. Los ácidos grasos poliinsaturados y sus derivados regulan infecciones respiratorias. *Neumol Cir Torax.* 2022; 81 (1): 1-299. <https://dx.doi.org/000000000000>



curso de la enfermedad pulmonar propiamente dicha,<sup>16-22</sup> por lo que lograr el equilibrio entre los efectos protectores y perjudiciales de la respuesta inmune pueden ayudar a disminuir la morbimortalidad y las complicaciones en infecciones respiratorias. Por lo tanto, investigar los aspectos bioquímicos, inmunológicos y fisiopatológicos de los PUFA y sus derivados ayudarán a vislumbrar rutas, vías de administración y formulaciones nutricionales que ayuden a seleccionar estrategias para erradicar a los patógenos de vías respiratorias.

### Papel fisiológico de los SPM

Las acciones biológicas de los SPM están mediadas por la activación de receptores afines. La señalización inicia localmente por los receptores asociados a proteínas G específicos (GPCR, por sus siglas en inglés *G protein-coupled receptors*) que se expresan en diferentes tipos de células (células polimorfonucleares [PMN], células dendríticas, monocitos, macrófagos, células epiteliales, fibroblastos, adipocitos, etcétera) y promueven selectividad tisular, ejerciendo su acción ante respuestas extracelulares. En la *Tabla*

1 se muestran algunos de los receptores SPM encontrados hasta el momento, así como sus agonistas, antagonistas y genes reguladores.<sup>23-30</sup>

ALX fue el primer receptor identificado, éste es activado por ligandos endógenos afines, incluidos la lipoxina A4 (LXA4) y las resolvinas D1 y D3 (RvD1 y RvD3), así como las desencadenadas por aspirina (AT-LXA4, AT-RvD1). RvD1 activa al receptor GPR32 que conduce a la regulación de varios micro-ARN (miRNA) involucrados en la orquestación de la inflamación aguda, incluidos miR-(miRNA)146b, miR-208a y miR-219. Este receptor también media las acciones biológicas de RvD5 en el contexto de infecciones bacterianas, por lo que su activación por RvD5 conduce a una mayor fagocitosis bacteriana en los macrófagos humanos y a una baja regulación de varios genes proinflamatorios, incluidos NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa).<sup>31,32</sup>

El efecto biológico de las resolvinas está mediado por los receptores ALX, FPR2, DRV1, GPCR32, DRV2, GPCR18, ChemR23 o ERV1. Se ha demostrado que RvD1 inhibe el NF-κB canónico (p65/p50) y la activación de la vía NF-κB

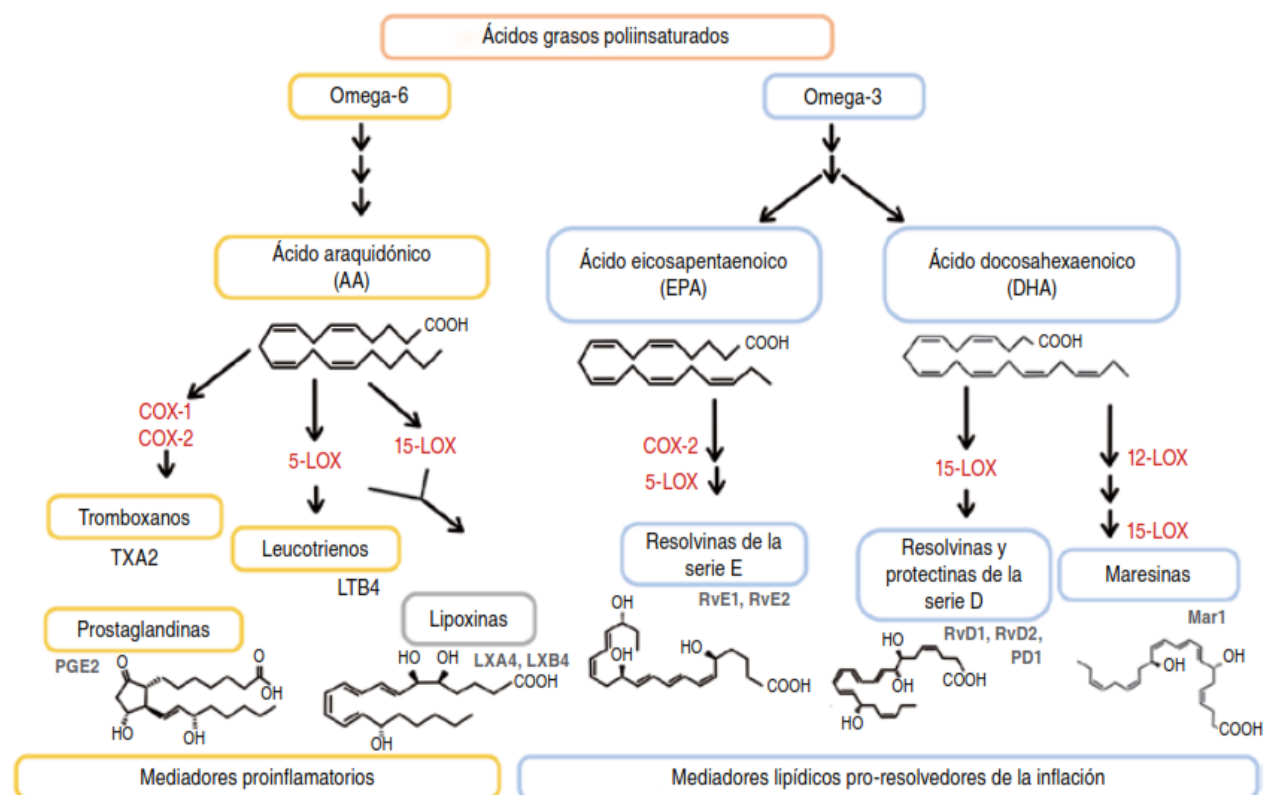


Figura 1: Biosíntesis de los mediadores lipídicos proinflamatorios y pro-resolvedores de la inflamación.

**Tabla 1:** Receptores, genes y agonistas de los *specialized pro-resolving lipid mediators* en diversas células.

SPM	Receptores GPCR	Gen	Antagonista	Célula
RvD1	ALX, ALX/FPR2, FPR2, DRV1, GPCR32/ ALX	GPCR32	–	PMN, CD, monocitos, macrófagos, células epiteliales, fibroblastos
RvD2	DRV2, DRV/GPCR2, DRV2/GPCR18, GPCR18	–	–	NK, PMN, linfocitos, monocitos, macrófagos, células epiteliales
RvD3	ALX, DRV1	–	–	Linfocitos, PMN, monocitos, macrófagos
RvD5	DRV1, DRV1/GPCR32	GPCR32	–	PMN
AT-RvD1	ALX/FPR2	–	–	NK, PMN, linfocitos, monocitos, macrófagos, células epiteliales
RvE1	ChemR23, ERV	CMKLR1	BLT1	PMN, monocitos, macrófagos
RvE2	ERV1/ChemR23	CMKLR1	BLT1	Monocitos, macrófagos
LXA4	ALX, FPR2	FPR2	CB1	Linfocitos, NK, PMN, linfocitos, monocitos, macrófagos, células epiteliales
AT-LXA4	ALX, DRV1/GPCR32	GPCR32	–	NK, PMN, linfocitos, monocitos, macrófagos, células epiteliales
Mar1	–	–	BLT1	PMN, monocitos, macrófagos

SPM= mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (*specialized pro-resolving lipid mediators*); GPCR= receptores asociados a proteínas G (G protein-coupled receptors); RvD1 = resolvin D1; ALX= receptor de lipoxinas (lipoxins receptor). FPR2= receptor de péptidos N-formilo 2 (N-formyl peptide receptor 2); PMN = células polimorfonucleares; GPCR32= receptor 32 asociado a proteína G (G protein-coupled receptor 32); CD = células dendríticas; RvD2 = resolvin D2; DRV2= receptor de resolvin D2 (resolvin D2 receptor); GPCR2=receptor 2 asociado a proteína G (G protein-coupled receptor 2); GPCR18= receptor 18 asociado a proteína G (G protein-coupled receptor 18); NK= células asesinas naturales (natural killer); RvD3 = resolvin D3; DRV1= receptor de resolvin D1 (resolvin D1 receptor); RvD5 = resolvin D5; AT-RvD1= resolvin D1 desencadenada por aspirina (aspirin-triggered resolvin D1); RvE2= resolvin E2; ERV= receptor de resolvinas de la serie E (E-series resolvins receptor); CMKLR1: receptor quimera similar a quimiocina 1 (chemerin chemokine-like receptor 1) LXA4 = lipoxina A4; CB1= receptor cannabinoide tipo 1 (cannabinoid receptor type 1); Mar1 = maresina 1.

no canónica (p50/p50), lo que conduce a la inhibición de apoptosis y bloqueo en la producción de citocinas proinflamatorias, reduciendo la migración transendotelial de PMN, aumentando la actividad de los macrófagos, lo que resulta en la eliminación de células apoptóticas.<sup>33</sup> Por otra parte, RvD1 es capaz de activar PPAR $\gamma$  (receptor de peroxisoma proliferador activado gamma) y suprimir la degradación de NF- $\kappa$ B vía p65.<sup>34</sup>

Algunos estudios han demostrado que RvD2 activa el receptor DRV2/GPCR18 controlando las funciones de fagocitos tanto en humanos como en ratones para dichos receptores, donde infecciones bacterianas fueron controladas, mejorando la supervivencia en murinos y brindando protección de órganos, mientras que estas acciones fueron mermadas en ratones transgénicos Knockout (KO) para DRV2.<sup>35</sup>

En el caso de RvE1, se ha demostrado que tiene una función como agonista para ChemR23/ERV y antagonista para el receptor LTB4 (BLT1) en PMN. Siendo capaz de inhibir el anión superóxido de PMN en respuesta al TNF- $\alpha$  o al péptido bacteriano N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (f-MetLeuPhe), además estimula la fagocitosis de PMN apoptóticos por macrófagos. Mientras que en un modelo de periodontitis de conejo, la administración de RvE1 dio lugar a la regeneración de tejidos dañados, incluyendo hueso, en comparación con el uso de aspirina o esteroides como la dexametasona, además inhibió selectivamente el

tromboxano, demostrando su capacidad de ejercer efectos antiinflamatorios.<sup>26</sup>

Las evaluaciones de las concentraciones de los SPM en el organismo se realizan mediante técnicas de alta resolución estructural como cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS, del inglés *liquid chromatography-mass spectrometry*), metabololipidómica y espectroscopia UV. La información reportada a la fecha, sugiere que los niveles basales de los SPM están en los intervalos submicromolar y nanomolar.<sup>23,29,30,34,36,37</sup> Shivakoti y colaboradores<sup>38</sup> realizaron un estudio comparativo de las concentraciones de algunos SPM, donde determinaron que pacientes australianos diabéticos (DM) presentaban concentraciones más altas de RvD1, RvD2, RvE1, RvE2 y Mar1 en suero, en comparación con pacientes con tuberculosis (TB) y pacientes con TB y diabetes (TB-DM), lo que indica que la infección promueve un desbalance entre estos mediadores lipídicos, dando pie a considerar los niveles de SPM como biomarcadores de enfermedad.

### SPM en enfermedades respiratorias infecciosas y no infecciosas

El sistema respiratorio humano suele dividirse en vías respiratorias superiores y bajas. Las vías respiratorias superiores incluyen cavidades nasales, cavidad oral, senos paranasales, nasofaringe y laringe (que juegan un rol importante en



la eliminación de partículas). Las vías respiratorias bajas incluyen la tráquea, bronquios principales, bronquios terminales y bronquios respiratorios, así como los alvéolos.<sup>39,40</sup> Las infecciones pueden afectar a ambas vías respiratorias, siendo las más frecuentes la rinofaringitis aguda (resfriado común, ocasionado por rinovirus, coronavirus y el virus respiratorio sincitial [VRS]), y más raramente por enterovirus, influenza y parainfluenza.<sup>41-47</sup> En modelos murinos se ha demostrado que la infección por virus de la influenza H5N1 causa una desregulación en la expresión y señalización de SPM, tales como las lipoxinas,<sup>48</sup> mientras que la administración exógena de PD1 logra inhibir la infección de este virus mejorando la supervivencia y función pulmonar.<sup>49</sup> Por otra parte, Ramón y colaboradores<sup>50</sup> demostraron un efecto coadyuvante con la administración del ácido 17(S)-hidroxidocosahexaenoico (17-HDHA) tras la vacunación contra la influenza, al incrementar significativamente los niveles de anticuerpos anti-H1N1 en suero, así como el número de células B en médula ósea de murinos.

Otras de las infecciones frecuentes son la faringoamigdalitis (inflamación de las membranas orofaríngeas y amígdalas palatinas, ocasionada comúnmente por adenovirus, parainfluenza, virus de Epstein-Barr, Coxsackievirus y *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico del grupo A)<sup>43,44,51-53</sup> y la rinosinusitis (inflamación de la mucosa que reviste los senos paranasales, ocasionada por *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Bacteroides* sp. y *Fusobacterium* sp.).<sup>51,54,55</sup> En un modelo de infección con *H. influenzae* se ha encontrado que la administración de AT-RvD1 regula el transporte de leucocitos al pulmón, incrementando la fagocitosis de neutrófilos por macrófagos y reduciendo los niveles de la interleucina 6 (IL-6) y TNF- $\alpha$ .<sup>56</sup>

Por otra parte, la permeabilidad del epitelio alveolar puede desencadenar una respuesta inflamatoria por la entrada de diferentes agentes exógenos y endógenos que pueden estimular de forma persistente al organismo, lo que implica un reto para el mantenimiento de la homeostasis y la resolución de la inflamación.

Algunos microorganismos tienen la capacidad de establecerse de forma crónica como *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), causante de TB, que maneja las cifras más altas de muertes por enfermedad infecciosa en todo el mundo después del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).<sup>57-59</sup> En un modelo experimental de ratones deficientes en la 5-lipooxigenasa (5-LO, enzima encargada de la producción de lipoxinas), parece tener un mejor control de la infección por Mtb en comparación con ratones silvestres infectados con Mtb tratados con un inhibidor de la 5-LO, donde estos últimos tuvieron una mayor mortalidad y mayor carga bacteriana. Estos resultados sugieren que el control de la infección está relacionada con la producción de leucotrienos (vía proinflamatoria) más que por la producción de lipoxinas (vía antiinflamatoria).<sup>60</sup> Mientras que en otro modelo

*in vitro* de macrófagos humanos infectados con la cepa virulenta Mtb H37Rv tratados exógenamente con RvD1 y Mar1 se indujo la expresión de péptidos antimicrobianos como BPI (*bactericidal permeability-increasing protein*) y la catelicidina humana LL37, regulando la producción de TNF- $\alpha$  y controlando el crecimiento intracelular de Mtb.<sup>10</sup> Estas investigaciones nos muestran estrategias que pueden llegar a utilizarse para apoyar el tratamiento actual de la TB, ya sea por suplementación de los precursores de los SPM como DHA/EPA o por administración exógena de los propios SPM.

Dentro de otros agentes externos que pueden causar afecciones respiratorias están los alérgenos (p. ej., las proteínas Derp2, presentes en las heces de los ácaros del polvo), partículas no degradables (como el asbesto) e incluso los cristales de partículas endógenas (p. ej., el colesterol),<sup>61-63</sup> sin dejar de lado el humo del cigarro, asociado a enfermedades respiratorias crónicas, cardiovasculares y tumorales, que afectan la capacidad fagocítica de los macrófagos.<sup>39,64-68</sup> Algunas investigaciones han demostrado que análogos de prostaglandinas y lipoxinas tienen propiedades físico-químicas que mejoran el uso de los glucocorticoides, ya que una disminución de estos últimos mejoran los efectos adversos, así como la resistencia a los esteroides en asma.<sup>69-71</sup>

Además, en un modelo de asma alérgica, se determinó que la administración de algunos activadores como TLR7 (*toll like receptor 7*) incrementaban los SPM derivados del DHA como PD-1, 17-HDHA y 14-HDHA ayudando al control de la eosinofilia caracterizada en este modelo animal, así como en otro modelo por administración intraperitoneal de RvE1.<sup>72,73</sup>

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el síndrome de dificultad respiratoria neonatal (SDRN), el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), la lesión pulmonar aguda (ALI, *acute lung injury*) y el asma, son afecciones del sistema respiratorio que presentan altas incidencias, morbilidad y mortalidad. La EPOC es caracterizada por la limitación del flujo aéreo y se asocia a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas nocivas o a gases. El humo del tabaco es el principal factor de riesgo,<sup>74-76</sup> le sigue la contaminación del aire,<sup>77,78</sup> la exposición laboral a polvos y productos químicos, la recurrencia de infecciones respiratorias durante la niñez o la predisposición genética. Algunos estudios en modelos murinos se han enfocado en la administración exógena de LXA4, ya que este SPM compite con las proteínas amiloides séricas A (SAA, *Serum amyloid A*) por los GPCR FPRR/ALX, SAA incrementa considerablemente en infecciones y está relacionado en el reclutamiento excesivo de neutrófilos en EPOC, por lo tanto, ambos actúan como antagonistas, lo que puede ayudar a prevenir la inflamación crónica y el enfisema pulmonar.<sup>75,76,79</sup>

Por otra parte, el SDRN, el SDRA y ALI son enfermedades relacionadas con el sistema surfactante pulmonar, pero también ocurren con mayor frecuencia en el contexto de

**Tabla 2:** Acción de los *specialized pro-resolving lipid mediators* en diferentes modelos experimentales.

SPM	Célula o modelo de estudio	Acción	Referencias
Mar1	Células epiteliales bronquiales	Reducción de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-8, disminución de la acumulación de neutrófilos	13
	Macrófagos humanos	Induce la expresión de BPI, regula la producción de TNF- $\alpha$ e induce el control del crecimiento intracelular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
AT-RvD1	Células epiteliales bronquiales	Modula la activación de células de lavado broncoalveolar inducidas por LPS y la respuesta inmune del ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	95
RvE1	Modelos murinos de neumonía	Reduce IL-1 $\beta$ , IL-6, infiltración de PMN, mejora la supervivencia y disminuye las cargas bacterianas	11
	Modelos murinos de enfermedad crítica	Inhibe la translocación y la activación de NF- $\kappa$ B (p65)	96
RvD1	Modelo murino	En infecciones por <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> limita la infiltración de PMN, ayuda al aclaramiento bacteriano y aumenta la resolución de la infección	97
	Modelo murino	En ratones expuestos a largo plazo al humo del cigarrillo, redujo enfisema y el agrandamiento del espacio aéreo, así como la inflamación, el estrés oxidativo y la muerte celular	12
	Macrófagos alveolares humanos	En macrófagos alveolares humanos de pacientes con EPOC y sin EPOC disminuyeron los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$ , mientras que aumentó la fagocitosis y promovió un fenotipo de macrófagos M2	68,98
	Macrófagos humanos	Induce la expresión de BPI e LL37, regula la producción de TNF- $\alpha$ e induce el control del crecimiento intracelular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
PD1	Eosinófilos humanos	Pacientes con deterioro PD1 contribuyen a la persistencia asmática severa y gravedad de la enfermedad, disminuyen las moléculas de adhesión (CD11b y L-selectina), disminuye la quimiotaxis	96
LXA4	Sueros y modelos murinos	Regulan negativamente las respuestas protectoras de linfocitos Th1 contra la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
DHA, EPA y ALA	Fibroblastos pulmonares humanos y línea celular bronquial (BEAS-2B)	Provocan una amplificación de las respuestas inflamatorias a los componentes virales y bacterianos, con producción de IL-6 y CXCL8	15

SPM= mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (*specialized pro-resolving lipid mediators*); Mar1 = maresina 1; IL-6 = interleucina 6; TNF- $\alpha$  = factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ); IL-8 = interleucina 8; BPI = proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad (*bactericidal/permeability-increasing protein*); AT-RvD1 = resolvin D1 desencadenada por aspirina; LPS = lipopolisacárido; RvE1 = resolvin E1; IL-1 $\beta$  = interleucina 1 $\beta$ ; PMN = células polimorfonucleares; NF- $\kappa$ B = factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor- $\kappa$ B*); RvD1 = resolvin D1; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; LL37 = catelicidina; PD1 = protectina D1; LXA4 = lipoxina A4; DHA = ácido docosahexaenoico (*docosahexaenoic acid*); EPA = ácido eicosapentaenoico (*eicosapentaenoic acid*); ALA = ácido  $\alpha$ -linolénico ( *$\alpha$ -linolenic acid*); CXCL8 = quimiocina 8 (*Chemokine [C-X-X motif] ligand 8*).

neumonía, sepsis, aspiración de contenido gástrico o trauma severo, a diferencia del asma, considerada como un trastorno inflamatorio heterogéneo altamente prevalente de las vías respiratorias por inflamación ocasionada por diversos alérgenos.<sup>80-82</sup> Eickmeier y colaboradores<sup>83</sup> encontraron que la administración de AT-RvD1 en un modelo murino de ALI disminuyó la cantidad de neutrófilos del líquido de lavado broncoalveolar, mejoró la integridad de la barrera epitelial y endotelial, disminuyó significativamente los niveles de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 y TNF- $\alpha$ , así como la translocación nuclear de p65 fosforilada por NF- $\kappa$ B, por lo que este SPM podría funcionar también para el SDRN y SDRA.

En la actualidad, la enfermedad de COVID-19 ocasionada por el coronavirus SARS-CoV-2, ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para combatir la gravedad de la enfermedad, enfocándose en la eliminación de las respuestas exacerbadas por producción de citocinas proinflamatorias,<sup>84</sup> donde algunos grupos se enfocaron en los precursores de los SPM, como la suplementación del PUFA omega-3, encontrando mejoras en algunos parámetros de la función respiratoria y renal de pacientes críticos con COVID-19 evaluados durante un mes, en comparación con pacientes sin suplementación.<sup>85</sup> La evaluación de los niveles de algunos SPM en pacientes diagnosticados con COVID-19 mostró que pacientes críticos presentaban



Por otro lado, Raposo y colaboradores<sup>93</sup> evaluaron la ingesta nutricional de vitamina C, vitamina E, DHA, AA, selenio y zinc, en una cohorte con más de 1,500 individuos de entre 25 a 64 años que fueron seguidos durante nueve meses, encontraron una asociación en la susceptibilidad a la infección del tracto respiratorio superior en mujeres que en hombres por disminución en el consumo de DHA, AA y vitaminas C y E. En contraposición, en fibroblastos pulmonares humanos y línea celular bronquial (BEAS-2B) se ha demostrado que los PUFA como el DHA, EPA y ALA ( $\alpha$ -linolénico) provocan una amplificación de las respuestas inflamatorias a los componentes virales y bacterianos, con producción de IL-6 y CXCL8, lo que sugiere que los ácidos grasos poliinsaturados no tienen efectos antiinflamatorios en estas células pulmonares.<sup>94</sup> Un breve resumen de la acción de los SPM se muestran en la *Tabla 2*.

### Participación de los SPM en la resolución de inflamación

La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño ocasionado por patógenos o por sustancias de naturaleza biológica, química, física o mecánica y, dependiendo de la duración, puede clasificarse en aguda o crónica.

La inflamación aguda comprende cambios significativos en niveles plasmáticos de histamina, bradiquinina, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6), cruciales para controlar y eliminar a agentes nocivos,<sup>99-104</sup> pero si la inflamación aguda se mantiene, conduce a inflamación crónica con repercusiones sistémicas y deletéreas para el hospedero, como infiltración tisular por agregados de leucocitos (formación de granulomas), biosíntesis descontrolada de colágeno, dando lugar a fibrosis o cirrosis, pérdida permanente de la función del tejido normal (*functio laesa*) o lesiones oxidativas en el ácido desoxirribonucleico (ADN), dando lugar a enfermedades degenerativas como enfermedades autoinmunes, trastornos cardiovasculares, osteoporosis, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer, ciertos tipos de cáncer e incluso la muerte.<sup>103</sup>

Por lo que es perentorio la participación de los SPM en el mantenimiento y la respuesta de la inflamación, realizando el cambio de un fenotipo proinflamatorio a uno antiinflamatorio, ayudando así a la reparación del tejido y al restablecimiento de la homeostasis, como se muestra en la *Figura 2*.

### CONCLUSIONES

Los PUFA y sus derivados, los SPM, tienen un efecto protector y de control en la eliminación de microorganismos patógenos, inflamación y reparación tisular, lo que los hace

candidatos importantes para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, así como posibles biomarcadores de la inflamación. Es necesario profundizar en el conocimiento de sus mecanismos de señalización, vías de síntesis, producción de sus epímeros e investigaciones que evalúen el consumo de PUFA y los niveles de SPM en sujetos sanos respecto a pacientes con enfermedades respiratorias para comprender mejor la relación entre los perfiles generales de PUFA en la dieta y su impacto en futuras intervenciones nutricionales o farmacológicas como estrategias para erradicar a patógenos de diversas afecciones respiratorias.

### Agradecimientos

A.R. agradece al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la UNAM, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida durante sus estudios y agradece los comentarios realizados por el Dr. José Ángel Santiago Terrones.

### REFERENCIAS

1. Tvřzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011;155(2):117-130. Available in: <https://doi.org/10.5507/bp.2011.038>
2. Conway MC, Mulhern MS, McSorley EM, van Wijngaarden E, Strain JJ, Myers GJ, et al. Dietary determinants of polyunsaturated fatty acid (PUFA) status in a high fish-eating cohort during pregnancy. Nutrients. 2018;10(7):927. doi: 10.3390/nu10070927.
3. Pateiro M, Domínguez R, Varzakas T, Muneakata PES, Movilla Fierro E, Lorenzo JM. Omega-3-rich oils from marine side streams and their potential application in food. Marine Drugs. 2021;19(5):233. Available in: <https://doi.org/10.3390/md19050233>
4. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;7(2):a016311. Available in: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>
5. Wang Q, Yan SF, Hao Y, Jin SW. Specialized pro-resolving mediators regulate alveolar fluid clearance during acute respiratory distress syndrome. Chin Med J (Engl). 2018;131(8):982-989. Available in: <https://doi.org/10.4103/0366-6999.229890>
6. Norris PC, Libreros S, Serhan CN. Resolution metabolites activated by hypoxic environment. Sci Adv 2019;5(10):eaax4895. Available in: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4895>
7. Xia H, Wang J, Sun S, Wang F, Yang Y, Chen L, et al. Resolvin D1 alleviates ventilator-induced lung injury in mice by activating PPAR  $\gamma$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway. Biomed Res Inter. 2019;2019:6254587. Available in: <https://doi.org/10.1155/2019/6254587>
8. Levy BD, Abdunour REE, Tavares A, Brüggemann TR, Norris PC, Bai Y, et al. Cysteinyl maresins regulate the proinflammatory lung actions of cysteinyl leukotrienes. J Allergy Clin Immunol. 2020;145(1):335-344. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.028>
9. Pamplona R, Borrás C, Jové M, Pradas I, Ferrer I, Viña J. Redox lipidomics to better understand brain aging and function. Free Radic



- Biol Med. 2019;144:310-321. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.016>
10. Ruiz A, Sarabia C, Torres M, Juárez E. Resolvin D1 (RvD1) and maresin 1 (Mar1) contribute to human macrophage control of *M. tuberculosis* infection while resolving inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2019;74:105694. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105694>
  11. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, *et al.* The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *J Immunol.* 2010;184(2):836-843. Available in: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901809>
  12. Hsiao HM, Thatcher TH, Colas RA, Serhan CN, Phipps RP, Sime PJ. Resolvin D1 reduces emphysema and chronic inflammation. *Am J Pathol.* 2015;185(12):3189-3201. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.08.008>
  13. Nordgren TM, Bauer CD, Heires AJ, Poole JA, Wyatt TA, West WW, *et al.* Maresin-1 reduces airway inflammation associated with acute and repetitive exposures to organic dust. *Transl Res.* 2015;166(1):57-69. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.01.001>
  14. Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, *et al.* Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1601-1606. Available in: <https://doi.org/10.1172/jci23949>
  15. Rutting S, Zakarya R, Bozier J, Xenaki D, Horvat JC, Wood LG, *et al.* Dietary fatty acids amplify inflammatory responses to infection through p38 MAPK signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;60(5):554-568. Available in: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0215oc>
  16. Qato DM, Wilder J, Schumm LP, Gillet V, Alexander GC. Changes in prescription and over-the-counter medication and dietary supplement use among older adults in the United States, 2005 vs 2011. *JAMA Intern Med.* 2016;176(4):473-482. Available in: <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.8581>
  17. Cederholm T, Jensen GL, Correia MITD, Gonzalez MC, Fukushima R, Higashiguchi T, *et al.*; and GLIM Core Leadership Committee, GLIM Working Group. GLIM criteria for the diagnosis of malnutrition – A consensus report from the global clinical nutrition community. *J Cachexia, Sarcopenia Muscle.* 2019;10(1):207-217. Available in: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12383>
  18. Fiaccadori E, Sabatino A, Barazzoni R, Carrero JJ, Cupisti A, de Waele E, *et al.* ESPEN guideline on clinical nutrition in hospitalized patients with acute or chronic kidney disease. *Clin Nutr.* 2021;40(4):1644-1668. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.01.028>
  19. Lee RJ, Hariri BM, McMahon DB, Chen B, Doghramji L, Adappa ND, *et al.* Bacterial D-amino acids suppress sinonasal innate immunity through sweet taste receptors in solitary chemosensory cells. *Sci Signal.* 2017;10(495):eaam7703. Available in: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aam7703>
  20. Smith GI, Mittendorfer B, Klein S. Metabolically healthy obesity: facts and fantasies. *J Clin Invest.* 2019;129(10):3978-3989. Available in: <https://doi.org/10.1172/jci129186>
  21. Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2018;132:41-48. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.03.004>
  22. Doi T, Langsted A, Nordestgaard BG. A possible explanation for the contrasting results of REDUCE-IT vs. STRENGTH: cohort study mimicking trial designs. *Eur Heart J.* 2021;42(47):4807-4817. Available in: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab555>
  23. Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B 4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation. *J Immunol.* 2007;178(6):3912-3917. Available in: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3912>
  24. Miyata J, Fukunaga K, Iwamoto R, Isobe Y, Niimi K, Takamiya R, *et al.* Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):353-360. e1-2. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.048>
  25. Orr SK, Butler KL, Hayden D, Tompkins RG, Serhan CN, Irimia D. Gene expression of proresolving lipid mediator pathways is associated with clinical outcomes in trauma patients. *Crit Care Med.* 2015;43(12):2642-2650. Available in: <https://doi.org/10.1097/ccm.0000000000001312>
  26. Chiang N, Serhan CN. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol Aspects Med.* 2017;58:114-129. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.005>
  27. Virág L, Jaén RI, Regdon Z, Boscá L, Prieto P. Self-defense of macrophages against oxidative injury: Fighting for their own survival. *Redox Biol.* 2019;26:101261. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101261>
  28. Tang Q, Che C, Lin J, He H, Zhao W, Lv L, *et al.* Maresin1 regulates neutrophil recruitment and IL-10 expression in *Aspergillus fumigatus* keratitis. *Int Immunopharmacol.* 2019;69:103-108. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.032>
  29. Dasilva G, Medina I. Lipidomic methodologies for biomarkers of chronic inflammation in nutritional research:  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 lipid mediators. *Free Radic Biol Med.* 2019;144:90-109. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.017>
  30. Colas RA, Dalli J, Chiang N, Vlasakov I, Sanger JM, Riley IR, *et al.* Identification and actions of the maresin 1 metabolome in infectious inflammation. *J Immunol.* 2016;197(11):4444-4452. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600837>
  31. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, *et al.* Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(4):1660-1665. Available in: <https://doi.org/10.1073/pnas.0907342107>
  32. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration. *Mol Aspects Med.* 2018;64:1-17. doi: 10.1016/j.mam.2017.08.002.
  33. Polus A, Zapala B, Razny U, Gielicz A, Kiec-Wilk B, Malczewska-Malec M, *et al.* Omega-3 fatty acid supplementation influences the whole blood transcriptome in women with obesity, associated with pro-resolving lipid mediator production. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(11):1746-1755. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2016.08.005>
  34. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, *et al.* Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(4):1660-1665. doi: 10.1073/pnas.0907342107.
  35. Chiang N, de la Rosa X, Libreros S, Serhan CN. Novel Resolvin D2 Receptor Axis in Infectious Inflammation. *J Immunol.* 2017;198(2):842-851. doi: 10.4049/jimmunol.1601650.
  36. Spite M, Clària J, Serhan CN. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. *Cell Metab.* 2014;19(1):21-36. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.006>



37. Wood PL, Cebak JE. Lipidomics biomarker studies: Errors, limitations, and the future. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(3):569-575. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.188>
38. Shivakoti R, Dalli J, Kadam D, Gaikwad S, Barthwal M, Colas RA, et al. Lipid mediators of inflammation and Resolution in individuals with tuberculosis and tuberculosis-diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2020;147:106398. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106398>
39. Rosete ODP, Archundia SFJ, Cabello GC, Manjarrez ZME. Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. *Rev Inst Nal Enfer Resp Mex.* 2002;15(4):239-254. Available in: <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2002/in024h.pdf>
40. Zepp JA, Morrissey EE. Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system. *Nat Rev Mol Cell Biology.* 2019;20:551-566. doi: 10.1038/s41580-019-0141-3.
41. DeGeorge KC, Ring DJ, Dalrymple SN. Treatment of the Common Cold. *American family physician.* 2019;100(5):281-289. Available in: <https://www.aafp.org/afp/2019/0901/p281.html>
42. Marcone DN, Carballal G, Reyes N, Ellis A, Rubies Y, Vidaurreta S, et al. Respiratory pathogens in infants less than two months old hospitalized with acute respiratory infection. *Revista Argentina de Microbiología.* 2021;53(1):20-26. Available in: <https://www.aafp.org/afp/2019/0901/p281.html>
43. Hughes S, Troise O, Donaldson H, Mughal N, Moore LSP. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clinical Microbiology and Infection.* 2020;26(10):1395-1399. doi: 10.1016/j.cmi.2020.06.025.
44. Greninger AL, Rybkina K, Lin MJ, Drew-Bear J, Marcink TC, Shean RC, et al. Human parainfluenza virus evolution during lung infection of immunocompromised individuals promotes viral persistence. *J Clin Invest.* 2021;131(23):e150506. doi: 10.1172/JCI150506.
45. Wang H, Yuan M, Yang E, Chen D, Su A, Wu Z. Enterovirus 71 infection induced Aquaporin-4 depolarization by increasing matrix metalloproteinase-9 activity. *Neuroscience Letters.* 2021;759:136049. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136049.
46. Griffiths CD, Bilawchuk LM, McDonough JE, Jamieson KC, Elawar F, Cen Y, et al. IGF1R is an entry receptor for respiratory syncytial virus. *Nature.* 2020;583(7817):615-619. doi: 10.1038/s41586-020-2369-7.
47. Yu J, Liu C, Xiao Y, Xiang Z, Zhou H, Chen L, et al. Respiratory syncytial virus seasonality, Beijing, China, 2007-2015. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(6):1127-1135. doi: 10.3201/eid2506.180532.
48. Cilloniz C, Pantin-Jackwood MJ, Ni C, Goodman AG, Peng X, Proll SC, et al. Lethal dissemination of H5N1 influenza virus is associated with dysregulation of inflammation and lipoxin signaling in a mouse model of infection. *Journal of virology.* 2010;84(15):7613-7624. doi: 10.1128/JVI.00553-10.
49. Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, et al. The Lipid Mediator Protectin D1 Inhibits Influenza Virus Replication and Improves Severe Influenza. *Cell.* 2013;153(1):112-125. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.027.
50. Ramón S, Baker SF, Sahler JM, Kim N, Feldsott EA, Serhan CN, et al. The specialized proresolving mediator 17-HDHA enhances the antibody-mediated immune response against influenza virus: a new class of adjuvant? *J Immunol.* 2014;193(12):6031-6040. doi: 10.4049/jimmunol.1302795.
51. Ebrahimi Taj F, Noorbakhsh S, Ghavidel Darestani S, Shirazi E, Javadinia S. Group A  $\beta$ -hemolytic Streptococcal Infection in Children and the Resultant Neuro-psychiatric Disorder; a Cross Sectional Study; Tehran, Iran. *Basic Clin Neurosci.* 2015 Jan;6(1):38-43. PMID: 27504155; PMCID: PMC4741265.
52. Verma N, Patel S, Osborn V, McBride S, Riaz N, Lee A, et al. Prognostic significance of human papillomavirus and Epstein-Bar virus in nasopharyngeal carcinoma. *Head & Neck.* 2020;42(9):2364-2374. doi: 10.1002/hed.26245.
53. Pallon J, Sundqvist M, Roost M, Hedin K. Association between bacterial finding, antibiotic treatment and clinical course in patients with pharyngotonsillitis: a registry-based study in primary healthcare in Sweden. *BMC Infect Dis.* 2021;21:779. doi: 10.1186/s12879-021-06511-y.
54. Badr DT, Gaffin JM, Phipatanakul W. Pediatric Rhinosinusitis. Vol. 3, *Current Treatment Options in Allergy.* Springer Nature; 2016. p. 268-281. doi: 10.1007/s40521-016-0096-y.
55. Albu S. Chronic rhinosinusitis—an update on epidemiology, pathogenesis and management. *J Clin Med.* 2020;9(7):2285. doi: 10.3390/jcm9072285.
56. Croasdell A, Lacy SH, Thatcher TH, Sime PJ, Phipps RP. Resolvin D1 dampens pulmonary inflammation and promotes clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of Immunology.* 2016;196(6):2742-2752. doi: 10.4049/jimmunol.1502331.
57. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2021.* Geneva. 2021. Available in: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
58. Guzmán-Beltrán S, Carreto-Binaghi LE, Carranza C, Torres M, Gonzalez Y, Muñoz-Torrico M, et al. Oxidative stress and inflammatory mediators in exhaled breath condensate of patients with pulmonary tuberculosis. a pilot study with a biomarker perspective. *Antioxidants.* 2021;10(10):1572. doi: 10.3390/antiox10101572.
59. Nienaber A, Ozturk M, Dolman RC, Zandberg L, Hayford FE, Brombacher F, et al. Beneficial effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on tuberculosis in mice. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2021;170:102304. doi: 10.1016/j.plefa.2021.102304.
60. Peres CM, de Paula L, Medeiros AI, Sorgi CA, Soares EG, Carlos D, et al. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2007;9(4):483-489. doi: 10.1016/j.micinf.2007.01.006.
61. Wang X, Yang Q, Wang P, Luo L, Chen Z, Liao B, Li G. Derp2-mutant gene vaccine inhibits airway inflammation and up-regulates Toll-like receptor 9 in an allergic asthmatic mouse model. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2010;28(4):287-293. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21337914/>
62. Le Y, Cao W, Zhou L, Fan X, Liu Q, Liu F, et al. Infection of *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Both M1/M2 Polarization and MMP Production in Cigarette Smoke-Exposed Macrophages. *Front Immunol.* 2020;11:1902. doi: 10.3389/fimmu.2020.01902.
63. Nakayama M. Macrophage recognition of crystals and nanoparticles. *Front Immunol.* 2018;9:103. doi: 10.3389/fimmu.2018.00103.
64. De Toledo-Piza AR, de Oliveira MI, Negri G, Mendonça RZ, Figueiredo CA. Polyunsaturated fatty acids from *Phyllocaulis boracensis* mucus block the replication of influenza virus. *Arch Microbiol.* 2018;200(6):961-970. doi: 10.1007/s00203-018-1507-1.
65. Abdillahi SM, Tati R, Nordin SL, Baumgarten M, Hallgren O, Bjermer L, et al. The pulmonary extracellular matrix is a bactericidal barrier against *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Implications for an *in vivo* innate host defense function of collagen VI. *Front Immunol.* 2018;9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01988.



66. Aragon IM, Pérez-Mendoza D, Moscoso JA, Faure E, Guery B, Gallegos MT, et al. Diguanilate cyclase DgcP is involved in plant and human *Pseudomonas* spp. infections. *Environ Microbiol*. 2015;17(11):4332-4351. doi: 10.1111/1462-2920.12856.
67. Galvan Morales MA. Effect of human beta defensin-2 in epithelial cell lines infected with respiratory viruses. *J Bioanal Biomed*. 2015;07(04). doi: 10.4172/1948-593X.1000135.
68. Croasdell A, Thatcher TH, Kottmann RM, Colas RA, Dalli J, Serhan CN, et al. Resolvins attenuate inflammation and promote resolution in cigarette smoke-exposed human macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(8):L888-901. doi: 10.1152/ajplung.00125.2015.
69. Kytikova O, Novgorodtseva T, Denisenko Y, Antonyuk M, Gvozdenko T. Pro-resolving lipid mediators in the pathophysiology of asthma. *Medicina*. 2019;55(6):284. doi: 10.3390/medicina55060284.
70. Insuela DBR, Ferrero MR, Coutinho D de S, Martins MA, Carvalho VF. Could arachidonic acid-derived pro-resolving mediators be a new therapeutic strategy for asthma therapy? *Front Immunol*. 2020;11:580598. doi: 10.3389/fimmu.2020.580598
71. Ono E, Dutile S, Kazani S, Wechsler ME, Yang J, Hammock BD, et al. Lipoxin generation is related to soluble epoxide hydrolase activity in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(8):886-897. doi: 10.1164/rccm.201403-0544OC.
72. Hatchwell L, Collison A, Girkin J, Parsons K, Li J, Zhang J, et al. Toll-like receptor 7 governs interferon and inflammatory responses to rhinovirus and is suppressed by IL-5-induced lung eosinophilia. *Thorax*. 2015;70(9):854-861. doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-205465.
73. Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Kawata T, Shimizu Y, et al. Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367(2):509-515. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.012.
74. Sun X, Feng X, Zheng D, Li A, Li C, Li S, et al. Ergosterol attenuates cigarette smoke extract-induced COPD by modulating inflammation, oxidative stress and apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(13):1523-1536. doi: 10.1042/CS20190331.
75. Yoshida M, Minagawa S, Araya J, Sakamoto T, Hara H, Tsubouchi K, et al. Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis. *Nature Communications*. 2019;10(1):3145. doi: 10.1038/s41467-019-10991-7.
76. Vij N, Chandramani-Shivalingappa P, van Westphal C, Hole R, Bodas M. Cigarette smoke-induced autophagy impairment accelerates lung aging, COPD-emphysema exacerbations and pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018;314(1):C73-87. doi: 10.1152/ajpcell.00110.2016.
77. Torres M, Carranza C, Sarkar S, Gonzalez Y, Osornio Vargas A, Black K, et al. Urban airborne particle exposure impairs human lung and blood *Mycobacterium tuberculosis* immunity. *Thorax*. 2019;74(7):675-683. doi: 10.1136/thoraxjnl-2018-212529.
78. Rivas-Santiago CE, Sarkar S, Cantarella P, Osornio-Vargas Á, Quintana-Belmares R, Meng Q, et al. Air pollution particulate matter alters antimycobacterial respiratory epithelium innate immunity. *Infect Immunity*. 2015;83(6):2507-2517. doi: 10.1128/IAI.03018-14.
79. Bozinovski S, Anthony D, Anderson GP, Irving LB, Levy BD, Vlahos R. Treating neutrophilic inflammation in COPD by targeting ALX/FPR2 resolution pathways. *Pharmacol Ther*. 2013;140(3):280-289. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.07.007.
80. Levy BD, Kohli P, Gottinger K, Haworth O, Song H, Kazani S, et al. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. *J Immunol*. 2007;178(1):496-502. doi: 10.4049/jimmunol.178.1.496.
81. Chen H, Li Z, Dong L, Wu Y, Shen H, Chen Z. Lipid metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2019;14:1009-1018. doi: 10.2147/COPD.S196210.
82. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):18. doi: 10.1038/s41572-019-0069-0.
83. Eickmeier O, Seki H, Haworth O, Hilberath JN, Gao F, Uddin M, et al. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury. *Mucosal Immunology*. 2013;6(2):256-266. doi: 10.1038/mi.2012.66.
84. Panigrahy D, Gilligan MM, Huang S, Gartung A, Cortés-Puch I, Sime PJ, et al. Inflammation resolution: a dual-pronged approach to averting cytokine storms in COVID-19? *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(2):337-340. doi: 10.1007/s10555-020-09889-4.
85. Doaei S, Gholami S, Rastgoo S, Gholamalizadeh M, Bourbour F, Bagheri SE, et al. The effect of omega-3 fatty acid supplementation on clinical and biochemical parameters of critically ill patients with COVID-19: a randomized clinical trial. *J Transl Med*. 2021;19(1):128. doi: 10.1186/s12967-021-02795-5.
86. Palmas F, Clarke J, Colas RA, Gomez EA, Keogh A, Boylan M, et al. Dysregulated plasma lipid mediator profiles in critically ill COVID-19 patients. *PLoS ONE*. 2021;16(8):e0256226. doi: 10.1371/journal.pone.0256226.
87. Schwarz B, Sharma L, Roberts L, Peng X, Bermejo S, Leighton I, et al. Cutting edge: severe sars-cov-2 infection in humans is defined by a shift in the serum lipidome, resulting in dysregulation of eicosanoid immune mediators. *J Immunol*. 2021;206(2):329-334. doi: 10.4049/jimmunol.2001025.
88. Recchiuti A, Patrino S, Mattoscio D, Isopi E, Pomilio A, Lamolinara A, et al. Resolvin D1 and D2 reduce SARS-CoV-2-induced inflammatory responses in cystic fibrosis macrophages. *FASEB J*. 2021;35(4):e21441. doi: 10.1096/fj.202001952R.
89. Sekheri M, el Kebir D, Edner N, Filep JG. 5-Epi-LXA 4 and 17-epi-RvD1 restore TLR9-mediated impaired neutrophil phagocytosis and accelerate resolution of lung inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(14):7971-7980. doi: 10.1073/pnas.1920193117.
90. Kebir D El, Filep JG. Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through  $\beta 2$  integrins. *Front Immunol*. 2013;4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00060.
91. El Kebir D, Filep JG. Targeting neutrophil apoptosis for enhancing the resolution of inflammation. *Cells*. 2013;2(2):330-348. doi: 10.3390/cells2020330.
92. Wang B, Gong X, Wan J yuan, Zhang L, Zhang Z, Li H zhong, et al. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011;24(4):434-441. doi: 10.1016/j.pupt.2011.04.001.
93. Raposo SE, Fondell E, Ström P, Bälter O, Bonn SE, Nyrén O, et al. Intake of Vitamin C, vitamin E, selenium, zinc and polyunsaturated fatty acids and upper respiratory tract infection - a prospective cohort study. *Eur J Clin Nutr*. 2017;71(4):450-457. doi: 10.1038/ejcn.2016.261.
94. Rutting S, Zakarya R, Bozier J, Xenaki D, Horvat JC, Wood LG, et al. Dietary fatty acids amplify inflammatory responses to infection through p38 MAPK signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;60(5):554-568. doi: 10.1165/rcmb.2018-0215OC.
95. de Oliveira JR, da Silva PR, Rogério A de P. AT-RvD1 modulates the activation of bronchial epithelial cells induced by lipopolysaccharide and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Eur J Pharmacol*. 2017;805:46-50. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.029.

96. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(8):551-567. doi: 10.1038/nrd.2016.39.
97. Chiang N, Dalli J, Colas RA, Serhan CN. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J Exp Med.* 2015;212(8):1203-1217. doi: 10.1084/jem.20150225.
98. De Sousa JR, Vasconcelos PFDC, Quaresma JAS. Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in infectious diseases. *Infect Drug Resist.* 2019;12:2589-2611. doi: 10.2147/IDR.S208576.
99. Asija R, Prajapat R, Vyas P, Kumar V. A brief cause of acute inflammation: an overview. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics.* 2014;2(22):31-35. Available in: <http://www.jddt.in/index.php/jddt/article/view/250>
100. Zumla A, Rao M, Parida SK, Keshavjee S, Cassell G, Wallis R, et al. Inflammation and tuberculosis: Host-directed therapies. *J Intern Med.* 2015;277(4):373-387. doi: 10.1111/joim.12256.
101. Kuprash DV, Nedospasov SA. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation. *Biochemistry (Mosc).* 2016;81(11):1237-1239. doi: 10.1134/S0006297916110018.
102. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity.* 2014;40(3):315-327.
103. Basil MC, Levy BD. Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:51-67. doi: 10.1038/nri.2015.4.
104. Fredman G. DELineating resolution of inflammation. *Nat Immunol.* 2019;20(1):2-3. doi: 10.1038/s41590-018-0278-9.
105. Serhan CN. Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB Journal.* 2017;31(4):1273-1288. doi: 10.1096/fj.201601222R.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses.