

---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
“Dr. ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

**ANALISIS DEL PORCENTAJE Y DENSIDAD DE EXPRESION DE  
TLR-2 Y TLR-4 ( “Toll like receptors”) EN MONOCITOS DE  
PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:**

**NEUMOLOGIA.**

**PRESENTA:**

**DRA. JHACQUELINE ILLESCAS EUGENIO**

**ASESOR:**

**DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA.  
INVESTIGADOR MEDICO ADSCRITO DEL DEPARTAMENTO DE  
INVESTIGACION EN BIOQUIMICA.**

**COLABORADORES:**

**QC. LESLIE CHAVEZ GALAN  
ESTUDIANTE DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS UNAM.  
DRA. PATRICIA GOROCICA  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN BIOQUIMICA.  
DR. ANDRES HERNANDEZ  
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE EPIDEMIOLOGIA.  
DR. MANUEL CASTILLEJOS  
MAESTRO EN CIENCIAS.**

**MEXICO, D. F.**

**2009.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

---

---

-----

**Dr. Jorge Salas Hernández**  
**Director de enseñanza del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.**

-----

**Dr. Ricardo Lascurain Ledesma**  
**Medico Investigador Adscrito del Departamento de Investigación en Bioquímica**  
**del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.**

---

---

## INDICE

	<b>Pagina.</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>Generalidades.....</b>	<b>8</b>
<b>Características de la micobacteria.....</b>	<b>8</b>
<b>Toll like receptors.....</b>	<b>9</b>
<b>Interacción <i>Mycobacterium tuberculosis</i>-macrófago.....</b>	<b>12</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>13</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>14</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>14</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>20</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>24</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>28</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>31</b>

---

---

## RESUMEN

### **Análisis del porcentaje y densidad de expresión de “toll like receptors” tipo-2 y Tipo-4 (TLR-2 y TLR-4) en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.**

La tuberculosis pulmonar continua siendo un problema importante de salud pública, se estima que un tercio de la población mundial es infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. La OMS registra que hay entre 8 y 10 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes alrededor del mundo por esta enfermedad cada año.

*Mycobacterium tuberculosis* contiene componentes en su pared celular, los cuales activan macrófagos a través de receptores “toll like”. Existen estudios escasos en tuberculosis humana con respecto a la expresión de TLRs, por lo que consideramos importante conocer la expresión de estos receptores particularmente TLR2 y TLR4 en la respuesta contra *Mycobacterium tuberculosis*.

**Objetivo:** Cuantificar el porcentaje y densidad de expresión de “toll like receptors” tipo 2 y 4 en monocitos de pacientes con tuberculosis.

**Diseño del estudio:** Observacional, descriptivo, comparativo y transversal.

**Material y métodos:** En el periodo comprendido entre enero 2007 y marzo 2009 se incluyeron 20 individuos con tuberculosis pulmonar activa, mayores de 16 años con diagnóstico clínico, radiológico y microbiológico; sin tratamiento anti-tuberculosis que aceptaran participar en el protocolo y firmaran el consentimiento informado. Los resultados de este grupo se compararon con un grupo control constituido por 20 sujetos clínicamente sin datos de tuberculosis ni comorbilidades como diabetes o VIH. En todos se obtuvo una muestra de sangre venosa para separar sus monocitos, estas células se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo y dirigidos contra las moléculas TLR-2 y 4.

---

---

**Análisis Estadístico:** El análisis de los datos se realizó usando el software SPSS versión 13. Se utilizó la *U de Mann-Whitney* para evaluar la significancia de las diferencias observadas entre los TLRs. Se considero como significativa una *P* menor de 0.05

**Resultados:** La mediana del porcentaje de expresión de TLR-2 en los pacientes con tuberculosis fue de 74.4 %  $\pm$  24.7 mientras que en el grupo control fue de 45.8 %  $\pm$  27.9 con un valor de *p* de 0.002. La mediana de la densidad de expresión de TLR-2 en los enfermos fue de 31.2  $\pm$  21.5 y en el grupo control fue de 16.7  $\pm$  12.9 con un valor de *p* de 0.0084 que también fue estadísticamente significativo. En cuanto a porcentaje de TLR-4, la mediana en los pacientes con tuberculosis fue de 47.7 %  $\pm$  31.5 y en el grupo control la mediana fue de 34.5 %  $\pm$  28.3 con un valor de *p* de 0.1850. La mediana de densidad de expresión de TLR-4 en el grupo con tuberculosis fue de 19.8  $\pm$  19.8 y en el grupo control fue de 26.3  $\pm$  47.2 con un valor de *p* de 0.1595.

**Conclusión:** Nuestros resultados sugieren que el incremento en los pacientes, tanto en el porcentaje de células positivas a TLR2 como en la densidad de expresión refleja una asociación entre TLR2 y la actividad de la enfermedad.

---

---

## ABSTRACT

Analysis of the percentage and densidad of expression of “toll like receptors” type-2 and Type 4 (TLR-2 and TLR-4) in monocytes of patients with active pulmonary tuberculosis.

The pulmonary tuberculosis is an important problem of health publishes, esteem that a third of the world-wide population is infected by Mycobacterium tuberculosis.

The WHO registers that there is between 8 and 10 million new cases and 3 million deaths around the world by this disease every year.

Mycobacterium tuberculosis contains components in its cell wall, which activate macrophages through receivers “toll like”. Few studies in human tuberculosis about to the expression of TLRs exist, reason why we considered important to know the expression these receivers particularly TLR2 and TLR4 in the answer against Mycobacterium tuberculosis.

**Objective:** To quantify the percentage and density of expression of “toll like receptors” type 2 and 4 in monocytes of patients with tuberculosis.

**Design:** Observational, descriptive, comparative and cross-sectional.

**Material and methods:** In the period between January 2007 and March 2009, 20 individuals with active pulmonary tuberculosis included themselves, majors of 16 years with clinical, radiological and microbiological diagnosis; without treatment anti-tuberculosis that accepted to participate in the protocol and signed the informed consent. The results of this group clinically compared with a group control constituted by 20 subjects without data of tuberculosis nor conmorbididades like diabetes or HIV.

In all a venous blood sample was obtained to separate its monocytes, these cells were incubated with conjugated to fluorocromo and directed monoclonal antibodies against molecules TLR-2 and 4.

---

---

**Statistic analysis:** The analysis of the data was realized using software SPSS version 13. The U of Mann-Whitney was used to evaluate the significance of differences observed between the TLRs. Consider myself like significant a  $p$  of  $<0.05$

**Results:** The median of the percentage of expression of TLR-2 in the patients with tuberculosis was of  $74,4\% \pm 27,9$ ; whereas in the group control was of  $45,8\% \pm 24,7$  with a value of  $p: 0.002$ . The median of the density of expression of TLR-2 in the patients was of  $31,2 \pm 21,5$  and in the group control was of  $16,7 \pm 12,9$  with a value of  $p: 0,0084$  that also was statistically significant.

As far as percentage of TLR-4, the median in the patients with tuberculosis was of  $47,7\% \pm 31,5$  and in the group control the median was of  $34,5\% \pm 28,3$  with a value of  $p:0.1850$ . The median of density of expression of TLR-4 in the group with tuberculosis was of  $19,8 \pm 19,8$  and in the group control was  $26,3 \pm 47,2$  with a value of  $p:0.1595$

**Conclusion:** Our results suggest the increase in the patients, as much in the percentage of positive cells to TLR2, as in the density of expression it reflects an association between TLR2 and the activity of the disease.



---

---

## INTRODUCCION

### Generalidades

La tuberculosis continua siendo un importante problema de salud publica, se calcula que una tercera parte de la población mundial es infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (principal agente causal). La organización mundial de la salud informa que hay entre 8 a 10 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes alrededor del mundo por esta enfermedad cada año. Se estima que ocurren 5 muertes por minuto a nivel mundial (1).

A pesar del alto porcentaje de sujetos infectados por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, el 90% de ellos no presentan síntomas clínicos de la enfermedad pero permanecen con la infección, solo el 10 % restante contrae la enfermedad en algún momento de su vida, aunque de este último porcentaje solo el 5% la expresará en los primeros 2 años (2).

Con estos datos es evidente que la respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis* es eficiente para evitar el desarrollo de la enfermedad pero no lo suficiente para eliminar el bacilo. (11)

### Características de la micobacteria.

*Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno intracelular que tiene un comportamiento especializado que minimiza o evade la respuesta inmune del huésped. Las micobacterias taxonómicamente se incluyen en el grupo de los *actinomycetales* (bacterias en forma de hongo) y en la familia *Mycobacteriaceae*. Son consideradas formas de transición entre las eubacterias (verdaderas bacterias) y los hongos (3).

La envoltura del *Mycobacterium tuberculosis* es una compleja estructura constituida por una cápsula, una pared y una membrana. La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias, le sirve de protección contra múltiples factores externos, sus

---

---

principales componentes son el ácido micólico y glicolípidos, los cuales le confieren algunas de las características antigénicas.

La pared celular se localiza debajo de la cápsula, están separadas por un espacio periplásmico que posee un elevado contenido de lípidos (50-60%) lo que le confiere un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática funcionando como una barrera efectiva. Está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micolicoarabinogalactanopeptidoglucano (mAGP). La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en este tipo de bacterias, los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomanana (LAM), la lipoproteína de 19 kilodaltons (19-kDa) y fosfatidilinositol manosa que juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (4, 18).

La supervivencia de la bacteria y su proliferación en el organismo está determinada por la eficacia de la respuesta inmune innata. En ésta, el macrófago es la principal célula fagocítica, el cual juega un papel muy importante en el control de la infección ya que aunado a su alta capacidad fagocítica tiene la propiedad de iniciar mecanismos bactericidas como la producción de radicales libres para eliminar al patógeno o la fusión del fagosoma con los lisosomas para un adecuado procesamiento y presentación del antígeno (7,14).

### **Receptores Tipo “Toll”.**

Los receptores tipo “Toll” (TLRs por sus siglas en inglés, Toll Like Receptors) son una familia de proteínas transmembranales que originalmente fueron descritas en la mosca *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, en la actualidad se sabe que células humanas

---

---

también los expresan, los TLRs llevan a cabo la activación celular cuando reconocen estructuras altamente conservadas en patógenos, los llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés)(5). Su principal función no radica en reconocer si no en que la célula lleve a cabo una función, por lo que su participación es fundamental para la respuesta inmune innata.

En el campo de estudio de la respuesta inmune del huésped contra *Mycobacterium tuberculosis* son importantes para iniciar y coordinar varias células del sistema inmune incluyendo macrófagos, células dendríticas, células B, fibroblastos y células epiteliales.

Hasta la fecha se han descrito 10 tipos de receptores “toll like” en humanos y 11 en ratón, cada uno responde a una distinta variedad patrones moleculares expresados por diversos antígenos. Se ha reportado que el TLR-1, TLR2, TLR-4, TLR-5 y TLR-6 tienen un papel principalmente antibacteriano a través del reconocimiento del lipopolisacarido (LPS) de las bacterias Gram negativas y lipoproteínas de las Gram positivas; mientras que el TLR-5 reconoce flagelina, proteína clave en bacterias flageladas. Por otro lado, el TLR-3, TLR-7 y TLR-8 responden a formas de RNA y han sido implicadas en la respuesta antiviral. Finalmente el TLR-9 reconoce secuencia CPGs de DNA no metilado, característico de bacterias, virus y hongos (5-6, 19).

En infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* se ha descrito que los TLR-2, TLR-4 y TLR-9 están implicados en la respuesta inmune innata iniciada por el huésped (6), en particular el papel de TLR-2 ha sido ampliamente estudiado debido a que parece tener un papel crítico para censar, inducir apoptosis, secreción de citocinas, etc. en respuesta a la micobacteria (7).

Diversos estudios usando modelos en ratón han demostrado la función de TLR2 y TLR4 en el control a largo plazo de la infección por tuberculosis. En el 2004, Drenan y colaboradores realizaron un estudio en ratones deficientes de TLR-2 en el que

---

---

demostraban que éstos al infectarlos con 100 a 500 micobacterias vivas (*Mycobacterium tuberculosis*) en aerosol presentaban una respuesta torpida a la infección, una formación defectuosa de granulomas y desarrollaban una neumonía crónica. Sin embargo, mostraban niveles aumentados de interferón gamma; factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 12p40 y un incremento de linfocitos T CD4+ y CD8+, pero todos los ratones sucumbían a los 5 meses. Estos resultados nos sugieren que los TLR-2 tienen una función como reguladores de la inflamación (8).

En otro estudio realizado también en el 2004 por Delphine y cols se evaluó el control de la infección a largo plazo en ratones deficientes de TLR-2, de TLR-6 o deficientes de ambos TLR-2 y TLR-4. después de infectarlos con *Mycobacterium bovis*, encontraron que los ratones deficientes de TLR-2 sobrevivían durante un periodo de 6 meses, el crecimiento bacteriano, la formación de granulomas y el reclutamiento de macrófagos fueron normales; en los ratones deficientes de TLR6, hubo un control de la infección crónica y en los que estaban deficientes de ambos TLR-2 y TLR-4 sobrevivieron al periodo de observación de 8 meses (10).

En otro modelo a corto plazo se encontró que en ratones deficientes de TLR-2 e infectados con *Mycobacterium bovis* había un incremento 10 veces más de la carga bacteriana pulmonar a las 2 semanas de la infección (con  $10^6$  UFC de *Mycobacterium bovis* administradas vía intraperitoneal) y tenían una respuesta inmune adaptativa disminuida (9).

Un estudio reciente (publicado en el 2008) en humanos se evaluó la expresión de TLR-2 y TLR-4 en diversas células del líquido pleural comparados con células de sangre periférica en enfermos con tuberculosis pleural encontrando mayor expresión del porcentaje de TLR-2 en monocitos del líquido pleural, lo que nos sugiere que estos tienen una función muy importante en el sitio de infección (12).

---

---

Recientes observaciones sugieren la oportunidad para identificar nuevas terapias blanco para tratar varios desordenes inflamatorios usando TLR ligandos o moléculas de señalización intracelular (6).

### **Interacción *Mycobacterium tuberculosis*-macrófago.**

Una vez adquirido el bacilo los componentes de su pared como son glicolípidos micobacterianos incluyendo lipoarabinomanana (LAM), fosfatidilinositol manosidos (PIM2, PIM6), lipomananas (LM) y la lipoproteína de 19 kDa (todos estos denominados PAMPs: Patógenos asociados a patrones moleculares)(12) son reconocidos por receptores específicos del huésped incluyendo los receptores tipo toll like (TLRs); los receptores NOD like ; los NLRs (Nod like receptors) y las lectinas tipo C como son el receptor de manosa (CD207); moléculas de adhesión intercelular específicas de células dendríticas y la Dectina-1 (7).

Esta interacción *Mycobacterium*-macrófago se lleva a cabo principalmente vía TLR-2 denominándose TLR2 ligando-micobacteria lo que promueve la síntesis de moléculas antibacterianas (ej. Oxido nítrico) y varias citocinas incluyendo factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6); IL-1 $\beta$  e IL-12.

En las células dendríticas al unirse los TLR-2 a las PAMPs induce la secreción de citocinas antiinflamatorias como son la IL-10 la cual promueve la progresión de la enfermedad posiblemente por mecanismos que limitan la respuesta inflamatoria (13).

La identificación y caracterización de estos mecanismos es importante para entender la capacidad del bacilo para interactuar con células presentadoras de antígeno en las cuales reside, lo que resulta en una respuesta inflamatoria que incluso puede ser la responsable del daño tisular.

---

---

## JUSTIFICACION

Debido a la problemática de salud que en la actualidad representa la TB, es necesario esclarecer los mecanismos que conducen a una adecuada respuesta inmune innata, de la cual es parte imprescindible la participación de TLRs, principalmente TLR-2 y TLR-4 en infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*. La mayoría de estudios que existen son en modelos murinos o estudios in Vitro, infectando macrófagos humanos, existen escasos estudios in vivo en humanos por lo que consideramos importante conocer la expresión de estas moléculas *in vivo* en sujetos con la enfermedad activa. Todo esto nos permitirá conocer mejor la fisiopatología de la tuberculosis y en un futuro desarrollar vacunas y terapias blanco más eficientes.

---

---

### **OBJETIVO GENERAL.**

Cuantificar el porcentaje y densidad de expresión de “toll like receptors” tipo 2 y 4 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

### **HIPOTESIS**

Existe una sobreexpresión de toll like receptor tipo 2 y 4 en los monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

---

---

## MATERIAL Y METODOS

### **Se trata de un estudio:**

Observacional.

Descriptivo.

Comparativo.

Transversal.

### **Definición de la población objetivo.**

Se incluirán 20 pacientes con tuberculosis pulmonar activa sin tratamiento anti tuberculosis que acudan al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de manera consecutiva y se compararan con un grupo control constituido por 20 sujetos sanos.

En el periodo comprendido entre enero 2008 y marzo 2009.

### **Criterios de inclusión.**

-Pacientes mayores de 16 años con tuberculosis pulmonar activa diagnosticada clínica, radiológica y microbiologicamente.

-Sin tratamiento anti-tuberculosis.

- Los controles serán individuos sin datos clínicos de tuberculosis ni de otras comorbilidades como diabetes o VIH.

-Que acepten participar en el protocolo y firmen el consentimiento informado

### **Criterios de exclusión**

-Pacientes con tuberculosis pulmonar y otras comorbilidades (Diabetes, VIH, enfermedades autoinmunes, etc).

-Pacientes que estén recibiendo tratamiento antituberculosis.

-Individuos sin tuberculosis con cuadro infeccioso agudo.

-Mujeres con tuberculosis y embarazo.



---

---

### **Aspectos éticos.**

El protocolo fue autorizado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. (No: B29-08).

Se anexa carta de consentimiento informado.

### **Tamaño de muestra.**

Es una muestra por conveniencia en la que se incluirán 20 pacientes con tuberculosis pulmonar activa y 20 controles sin tuberculosis ni comorbilidades.

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

A partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica, las células mononucleadas son separadas por centrifugación a 1,750 r.p.m. en un gradiente densidad de Ficoll-Hypaque (1.077 de densidad) durante 30 minutos a 18°C. Después de la centrifugación, se colectan las células de la interfase, se realizan de 2 a 3 lavados en solución salina fosfato pH 7.2 (PBS). Posteriormente, son cuantificadas en una cámara de Neubauer, las células se cuentan en los cuatro cuadrantes que están en cada esquina de la cámara, finalmente se hace una multiplicación que consiste en: Número Total de células contadas (las 4 esquinas)/Cuatro (las 4 esquinas contadas) por 1ml (volumen en que se re suspendió la muestra) por 20 (Dilución realizada de la células en suspensión) por 10,000 (Constante de la cámara de Neubauer), el resultado nos reporta el número de células por mililitro de solución.

$$Y/4 = Z * 1ml * 20 * 10,000 = X \text{ células/ml}$$

La viabilidad celular es valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripan en PBS a una concentración de 0.4%, todas aquellas células que tengan dañada su membrana permitirán el paso del colorante.

---

---

### **Inmunofluorescencia directa.**

Para realizar las inmunofluorescencias partimos de una gama de anticuerpos monoclonales comerciales, la mayoría de ellos fueron de la empresa BD Pharmingen. Los anticuerpos utilizados ya estaban unidos a su respectivo fluorocromo, a continuación son enlistados: anti-CD14 PE, anti-CD14 FITC, TLR-2 Alexa Flúor y TLR-4 PE.

También utilizamos los controles de isotipo de acuerdo a los fluorocromos que utilizamos y al isotipo del anticuerpo monoclonal.

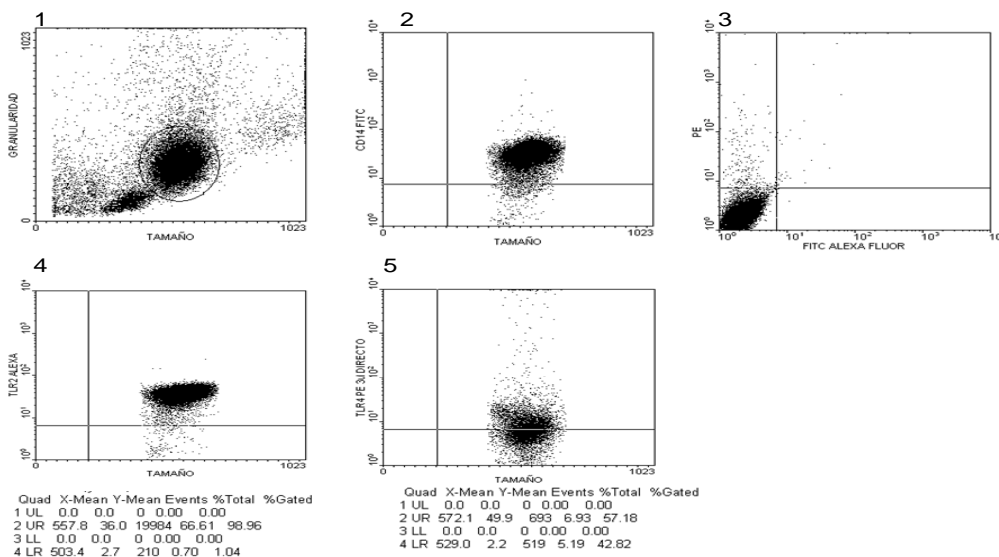
A partir del total de CMN que tenemos en PBS se hacen alícuotas en tubo eppendorf para tener las células a una concentración de  $2 \times 10^5$  en cada tubo. Centrifugamos las células a 1500 r.p.m durante 5 minutos, decantamos el sobrenadante y el “*botón*” celular queda en aproximadamente 50 $\mu$ l de PBS, se adiciona la concentración óptima de los anticuerpos (previamente estandarizada) que se puedan colocar en el mismo tubo o en tubo diferente si los anticuerpos llevan el mismo fluorocromo. Colocar las células durante 20 minutos en hielo para que la reacción de unión antígeno-anticuerpo se lleve a cabo, posteriormente adicionar 300  $\mu$ l de PBS con albúmina bovina al 0.2% y azida de Sodio al 0.2% (PBA), centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m. Decantar nuevamente el sobrenadante, si en ese momento se van a analizar las células resuspender el *botón* celular en solución de FACSFlow (fluorescente-activated cell sorter), si se analizarán en el citómetro horas después, se les adiciona 50  $\mu$ l de *p*-formaldehído al 1%.

### **Análisis en el citómetro**

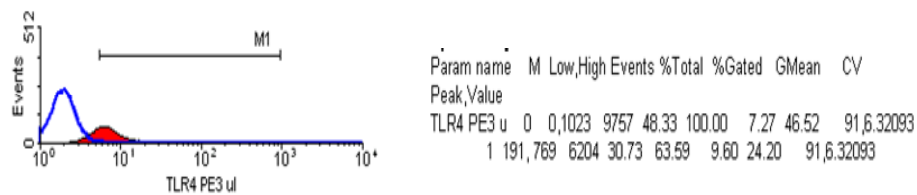
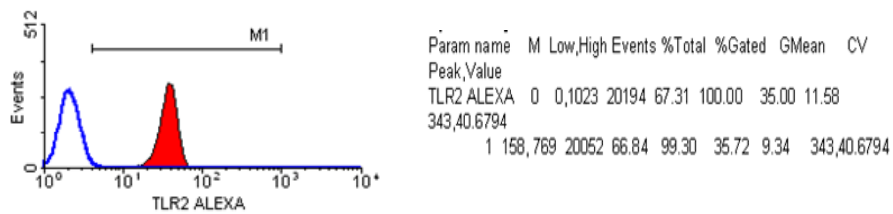
Cuando partimos de células fijadas en *p*-formaldehído al 1%, adicionar 300  $\mu$ l de PBA y resuspender, centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m, decantar sobrenadante y adicionar 300  $\mu$ l de solución de FACSFlow para realizar el análisis en el citómetro. El equipo que utilizamos es un citómetro Becton Dickinson con software CellQuest. Obtenemos 10,000 células que son graficadas primero en tamaño contra granularidad, en esta

gráfica limitamos la región de interés, en nuestro caso la región de monocitos. La siguiente gráfica la hacemos con los controles de isotipo para verificar que los fluorocromos que estamos utilizando tengan reacción inespecífica (falsos positivos) o un fondo de fluorescencia que se considere como positivo. Posteriormente hacemos una gráfica de tamaño celular *versus* CD14, con esta gráfica identificamos que al menos tengamos el 90% de monocitos (CD14+) porque será en esa región en donde vamos a evaluar la expresión de las moléculas presentadora de antígeno. Finalmente, en esa región se analiza la expresión de la molécula de interés. Una vez que se obtiene el análisis en el citómetro, los datos son analizados en el programa WinMDI para obtener los porcentajes de moléculas identificadas.

A continuación se muestran las gráficas de citometría de flujo realizadas tanto a pacientes como a los controles, en este caso corresponden a un enfermo con tuberculosis.



En esta figura se muestra el análisis de los monocitos de un paciente. En 1) es una gráfica de tamaño contra granularidad y en esta gráfica se hace una región de monocitos (área dentro del círculo). En 2) se observa una gráfica de tamaño contra CD14 en donde se observa que todas estas células son CD14 positivas. En 3) es una gráfica para células fluorescentes en presencia del control de isotipo. En 4) es una gráfica de tamaño celular contra expresión de TLR2, se observa que el porcentaje de células que expresan TLR-2 corresponde a 98.96%. En 5) es una gráfica de tamaño celular contra expresión de TLR-4 donde se muestra el porcentaje de células que expresan TLR-4 las cuales son de un 57.18%.



En la parte superior de la figura se muestra un histograma de un enfermo con TB en el que se observa la densidad de expresión de moléculas TLR-2 en monocitos (color rojo) en comparación con la tinción mediante el control de isotipo (azul).

En la parte inferior de la figura corresponde al histograma de TLR-4 (color rojo) comparado asimismo con el control de isotipo (color azul).

### Análisis estadístico.

El análisis de los datos se realizó usando el software SPSS versión 13. Para la estadística descriptiva se utilizaron medianas y desviaciones estándar. La prueba de normalidad fue la de Shapiro Wilk y de Kolmogorov. También se utilizó la U de Mann-Whitney para evaluar la significancia estadística entre las diferencias observadas entre los TLRs. Se considero como significativa una  $P$  menor de 0.05

---

---

## RESULTADOS

Todos los casos estudiados tenían diagnóstico de tuberculosis corroborado clínica, radiológica y microbiológicamente. A todos se les determinó el porcentaje y densidad de expresión de TLR-2 y TLR-4 en monocitos de sangre venosa periférica.

El porcentaje de TLRs fue definido como la cantidad porcentual de moléculas de superficie contadas en 10 000 eventos.

La densidad de expresión de TLRs fue definida como la cantidad de receptores expresados por unidad celular.

La mediana de edad para los enfermos de tuberculosis fue de 31.5 años, la media fue de  $46.64 \pm 24.77$ , la edad mínima fue de 16 años y la máxima fue de 94 años.

La media de edad para los controles fue de 32 años ( $\pm 6.32$ ), la edad mínima fue de 29 años y la máxima de 35 años.

En cuanto a género en el grupo con tuberculosis, 12 (60%) fueron hombres y 8 (40%) mujeres. En el grupo control 9 (45%) fueron hombres y 11 (55%) mujeres.

De los 20 pacientes con tuberculosis 11 (55%) tenían tuberculosis pulmonar; 4 (20%) pacientes tuberculosis miliar y 5 (25%) tuberculosis pleural (Tabla 1).

### **Expresión de TLRs.**

La mediana del porcentaje de expresión de TLR-2 en los pacientes con tuberculosis fue de  $74.4 \% \pm 24.7$  y en el grupo control fue de  $45.8 \% \pm 27.9$  con un valor de  $p$  de 0.002 lo que fue estadísticamente significativo (Tabla 2).

La mediana de la densidad de expresión de TLR-2 en los enfermos fue de  $31.2 \pm 21.5$  y en el grupo control fue de  $16.7 \pm 12.9$  con un valor de  $p$  de 0.0084 que también fue estadísticamente significativo (Figura 2).

En cuanto a porcentaje de TLR-4, la mediana en los pacientes con tuberculosis fue de 47.7 %  $\pm$  31.5 y en el grupo control, la mediana fue de 34.5 %  $\pm$  28.3 con un valor de *p* de 0.1850.

La mediana de densidad de expresión de TLR-4 en el grupo con tuberculosis fue de 19.8  $\pm$  19.8 y en el grupo control fue de 26.3  $\pm$  47.2 con un valor de *p* de 0.1595 ( Figura 3).

**Tabla1.**

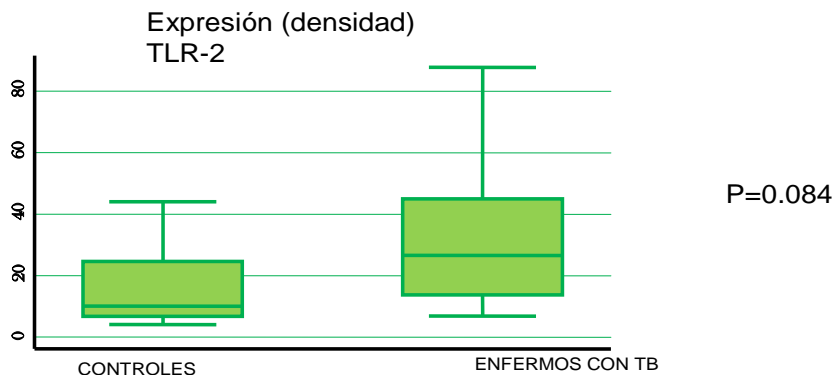
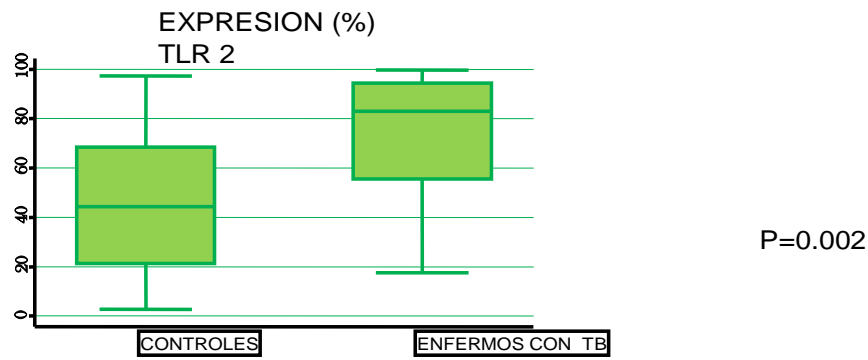
**Características básicas de la población.**

Variables	Casos	Controles
Edad (años) Medias.	31	32
Género. (%)		
Hombres	12 (60%)	9(45%)
Mujeres	8 (40%)	11 (55%)
Estatus		
Sanos	0	20
Enfermos	20	0
Tipo de Tuberculosis		
Pulmonar	11 (55%)	0
Pleural	5 (25%)	0
Miliar	4 (20%)	0

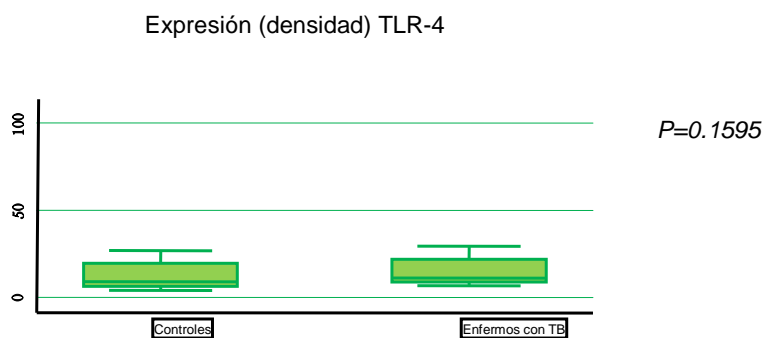
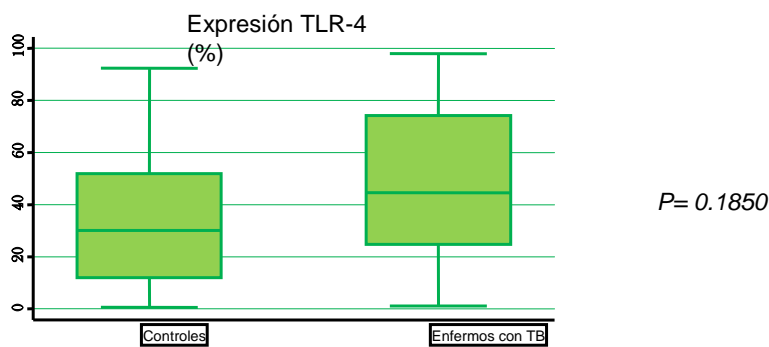
**Tabla 2.**

<b>Molécula</b>	<b>Control</b>	<b>Paciente</b>	<b>Valor de p</b>
<b>TLR-2 (%)</b>	<b>45.8 ± 27.9</b>	<b>74.4 ± 24.7</b>	<b>0.002</b>
<b>TLR-2 (Densidad)</b>	<b>16.7 ± 12.9</b>	<b>31.2 ± 21.5</b>	<b>0.0084</b>
<b>TLR-4 (%)</b>	<b>34.5 ± 28.3</b>	<b>47.7 ± 31.5</b>	<b>0.1850</b>
<b>TLR-4 (Densidad)</b>	<b>26.3 ± 47.2</b>	<b>19.8 ± 19.8</b>	<b>0.1595</b>

**Comparación de porcentaje y densidad de expresión de TLR-2 y TLR-4 en ambos grupos de pacientes y controles.**



**Figura 2.** Se muestran la mediana y desviaciones estándar del porcentaje y densidad de expresión de TLR-2 en enfermos de TB y controles, así como el valor de *P*.



**Figura 3.** Se muestran la mediana y desviaciones estándar del porcentaje y densidad de expresión de TLR-4 en enfermos de TB y controles, así como el valor de *P*.



---

---

## DISCUSION

En las ultimas décadas se ha investigado mucho acerca de los receptores Toll like por su participación en el reconocimiento de moléculas de superficie en diversas patologías incluyendo tuberculosis. Sin embargo la mayoría de estudios se han realizado en modelos murinos e “in vitro” arrojando resultados controversiales. En humanos, existen escasos estudios “in vivo”, por lo que quisimos conocer la expresión de estas moléculas particularmente el tipo 2 y 4 en pacientes con tuberculosis pulmonar activa y compararlo con un grupo de individuos sin la enfermedad ya que no existen valores estandarizados que se consideren normales.

En nuestro estudio nosotros encontramos que en el grupo de enfermos de tuberculosis existe un mayor porcentaje y densidad de expresión particularmente de moléculas TLR-2 en comparación con el grupo control, lo cual fue estadísticamente significativo, en cuanto TLR-4 no hubo significancia estadística. Estos resultados nos proporcionan información contraria a lo que anteriormente se pensaba de que a mayor número de receptores había un efecto protector contra la enfermedad ya que en modelos en ratones a los cuales se les depletaba de estos receptores y luego se les infectaba con micobacterias, tenían peor pronostico presentando una neumonía crónica, con defectos en la formación de granulomas y sucumbían a la enfermedad lo que lógicamente hacía pensar en un efecto protector. Sin embargo, estos ratones también expresaban niveles elevados de interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 12p40 y un incremento de linfocitos T CD4+ y CD8+, aunque todos los ratones sucumbían a los 5 meses. Estos resultados nos sugieren que los TLR-2 más que un efecto protector, tienen una función moduladora como reguladores de la inflamación (8).

---

---

Kincaid y colaboradores realizaron un estudio “in vivo” también en ratones para evaluar la codominancia de moléculas MHC clase II en macrófagos de médula ósea de ratones quiméricos ya sea con TLR-2 o sin TLR-2, a los cuales infectaban con *Mycobacterium tuberculosis* sin encontrar diferencias en la expresión de moléculas MHC clase II en los pulmones de los ratones infectados en ambos grupos, lo que nos sugiere que ambos mecanismos dependientes e independientes de TLR-2 son similares “in vivo” y que el bacilo activa otras vías independientes de TLR-2 para desencadenar la respuesta inmune (14).

Esto apoya la teoría de que el TLR-2 funciona como un modulador de las diversas vías que el bacilo activa cuando es reconocido por el macrófago y que la elevación de estos receptores en los enfermos es una respuesta a la infección.

Por otra parte, en el estudio de Prabha y cols realizado en la India, los autores encontraron en 12 sujetos con tuberculosis pleural que la expresión de TLR-2 en los monocitos del líquido pleural y los de sangre periférica presentan mayor expresión del porcentaje de TLR-2 en el líquido pleural (12). Estos resultados nos indican una mayor expresión de estas moléculas en el sitio de la infección, lo que podría ser un mecanismo de nuestro sistema inmune de tratar de mantener suprimida la enfermedad y por ende esperar una mayor cantidad de TLR-2 en el sitio afectado, como en el caso de nuestro estudio aunque nosotros realizamos la determinación de estas moléculas en sangre periférica y aún así las encontramos mas elevadas en comparación con el grupo control, se podría realizar un segundo estudio y comparar la expresión de estas moléculas en muestras de lavado bronquioloalveolar.

En otro estudio reciente publicado en el 2008 se comparó la expresión de TLR-2, TLR-4 y moléculas MHC clase II en macrófagos humanos infectados con 3 diferentes cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* encontrando una mayor expresión de TLR-2

---

---

y TLR-4 en las cepas del genotipo Canetti y una menor expresión en las cepas del genotipo Beijing (cepa de mayor virulencia), lo que nos indica que la mayor o menor expresión de estas moléculas está en relación al genotipo de la micobacteria y esta diferencia se puede explicar por la diversidad de lípidos tanto polares como apolares de la pared celular de los distintos genotipos (13).

Una deficiencia de nuestro estudio es que no contamos con PPD en el grupo control sin embargo, no lo consideramos tan necesario ya que este solo nos indica infección en el caso de ser positivo y nosotros no estamos evaluando infección sino enfermedad activa. Son necesarios más estudios para conocer y tratar de entender mejor la compleja respuesta inmune que desencadena el bacilo de la tuberculosis y así en un futuro crear nuevas vacunas y terapias blanco para esta enfermedad.

---

---

## CONCLUSIONES

- 1.- Hay una mayor cantidad del porcentaje y de la densidad de expresión de TLR-2 en los monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa comparados con los de los controles sin tuberculosis, muy probablemente como respuesta a la infección.
- 2.- La expresión de TLR-4 no fue significativa en comparación con los controles.
- 3.- Son necesarios más estudios sobre la respuesta inmunológica en tuberculosis para conocer mejor la fisiopatología de la enfermedad y así crear nuevas terapias blanco.

---

---

## ANEXOS

### ANEXO 1. Carta de consentimiento informado.

Fecha \_\_\_\_\_

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si Usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

Título del Proyecto:

“Determinación del porcentaje y densidad de expresión de TLR-2 y TLR4 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa”.

Responsable del proyecto:

Ricardo Lascurain Ledesma, Departamento de Investigación en Bioquímica

Propósito del estudio:

En la tuberculosis es importante eliminar las células infectadas para esto se requiere que células sanguíneas tengan en su superficie moléculas que activen mecanismos microbicidas. El propósito es investigar cuantas células de la sangre tienen moléculas de membrana denominadas TLRs y en que densidad la tienen. Estas moléculas reconocen componentes del microbio causante de la tuberculosis para activar mecanismos que conduzcan a la eliminación del microbio. Los resultados de este estudio podrían ayudar

---

---

a comprender el proceso infeccioso, la información que pretendemos obtener será la base para estudios mas detallados sobre la respuesta inmunitaria contra *M. tuberculosis*.

**Beneficios del estudio:**

Este conocimiento junto con el obtenido de otros laboratorios del mundo, permitirá elaborar nuevos tratamientos médicos para reducir el número de personas infectadas.

**Procedimiento:**

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre sus hábitos y antecedentes médicos y a que se colecte 20 ml de sangre mediante una jeringa estéril desechable, conociendo que habrá una molestia breve por la punción venosa y en raras ocasiones un hematoma o moretón.

Riesgos asociados con el estudio: Este estudio consta de una sola fase que implica la toma de sangre. El riesgo del procedimiento es la formación del moretón debido a que en raras ocasiones se puede lastimar la vena. En estos casos la molestia puede durar dos a tres días. Cabe mencionar que en muy raras ocasiones pudiera presentarse inflamación de la vena posterior a la toma de sangre, en estos casos habrá vigilancia médica y si lo requiere se le administrarán medicamentos para disminuir la inflamación y se le indicará el procedimiento a seguir.

**Aclaraciones:**

No recibirá pago por su participación.

No tendrá que hacer gasto alguno para el estudio.

En el transcurso del estudio, Usted puede solicitar la información de su análisis al investigador responsable.

La información obtenida de este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad, en ningún caso se revelará su identidad.

---

---

**Derecho a rehusar:** Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria y es libre de rehusar a tomar parte, sin que esto afecte la calidad de su atención.

Nombre \_\_\_\_\_ del  
participante: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

MEDICO RESPONSABLE

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

En caso de tener alguna molestia por la toma de sangre

Tel: \_\_\_\_\_

TESTIGO

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

TESTIGO

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

El Dr. Ricardo Lascurain podrá responder a cualquier pregunta sobre este proyecto

Tels. 5487-1705 o 56-66-45-39 extensión 230.

---

---

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Inmunología de la tuberculosis. IndianJ Med Res. 2004; 120: 213-32.
- 2.- World Health Organization. Revised march 2006.104
- 3.- Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. José A. Caminero Luna.2003. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER).
- 4.-Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Patricia Gorocicca ; Jiménez Martínez; Garfías Y. Et al.2005;18(2):142-153.
- 5.- Annu Rev Biochem. 2007; 76: 141-165.
- 6.- Reducing the Toll of Inflammatory Lung Disease. Nazia Chaudhury, BSc; Moira K. B. Whyte, PhD; and Ian Sabroe, PhD. Chest 2007;131:1550-1556.
- 7.- Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs; C-Type lectins; and NLRs. Eun-Kyeong Jo. Current Opinion Infect Dis 2008,21:279-286).
- 8.-Toll-Like Receptor 2-Deficient Mice Succumb to *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. American Journal of Pathology.2004;164 (1):49-56.
- 9.- TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. Heldwein K; Liang T; Andresen K. Et al. J. Leukoc. Biol. 2003; 74: 277-286.
- 10.- Long-Term Control of *Mycobacterium Bovis* BCG infection in the Absence of Toll-Like Receptors (TLRs): Investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4-Deficient Mice. Delphine Nicolle; Cécile Fremont, Xavier Pichon et als. INFECTION AND IMMUNITY.2004;72(12):6994-7004.
- 11.- Tuberculosis 2007. Palomino; Leao; Ritacco. Primera edición.



- 
- 
- 12.- TLR2 and TLR4 expression on the immune cells of tuberculous pleural fluid. Prabha C.; Rajashree P. ; Sulochana D. Immunology Letters.2008;117: 26-34.
- 13.- *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. Rocha-Ramirez; Estrada García; López Marín; et al. Tuberculosis. 2008; 88:212-220
- 14.- Codominance of TLR2- Dependent and TLR2- Independent Modulation of MHC Class II in *Mycobacterium tuberculosis* Infection In Vivo. Kincaid;Wolf; Desvignes; et al. J Immunol 2007, 179:3187-195.
- 15.- Mycobacterium tuberculosis LpRa Is a Lipoprotein Agonist of TLR2 That Regulates Innate Immunity and APC Function. Nicole D. Pecora, Adam J. Gehring, David H. Canaday, et als. The Journal of Immunology.2002;530:209-14.
- 16.- Disparity in IL-12 Release in Dendritic Cells and Macrophages in Response to *Mycobacterium tuberculosis* Is Due to Use of Distinct TLRs. Luca Pompei; Sihyug Jang; Beata Zamlynny, et al. The Journal of Immunology.2007;178:5192-5199.
- 17.- *Mycobacterium tuberculosis* LprG (*RV1411c*): A Novel TLR-2 Ligand That Inhibits Human Macrophage Class II MHC Antigen Processing. Adam J.Gehring, Karen M.Dobos, John T. Belisle, et al. The Journal of Immunology.2004; 173:2660-2668.
- 18.- *Mycobacterium tuberculosis* Lipomannan induced apoptosis and Interleukin-12 Production In Macrophages. D.N.Dao; L. Kremer; Y. Guerardel et. Al. INFECTION AND IMMUNITY.2004;72(4):2067-2074.
- 19.- Differential Roles of Toll-like Receptors in the elicitation of proinflammatory response by macrophages. B.W. Jones; K A Heldwein; T K Means, et al. Ann Rheum Dis.2001;60:6-12.