



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Perfil de la respuesta innata activada por el DNA de  
*Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos humanos.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ANDY DOREY RUIZ HUERTA**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL**

**MÉXICO  
DISTRITO FEDERAL  
(2014)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Datos de Jurado**

### 1. Datos del alumno

Ruiz

Huerta

Andy Dorey

16 43 78 50

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306226487

### 2. Datos del tutor

Dra.

Esmeralda

Juárez

Carvajal

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.

Yolanda

González

Hernández

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.

Martha

Torres

Rojas

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.

María del Carmen

Figueroa

Arredondo

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.

María Teresa

Herrera

Barrios

### 7. Datos del trabajo escrito

Perfil de la respuesta innata activada por

el DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos humanos

65p.

2014

## **RECONOCIMIENTOS**

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal en el Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

El comité de Jurado estuvo integrado por:

Dra. Yolanda González Hernández

Dra. Martha Torres Rojas

Dra. Esmeralda Juárez Carvajal

Dra. María del Carmen Figueroa Arredondo

Dra. María Teresa Herrera Barrios

El proyecto se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-SALUD-2012-C01-181008).

*Nuestra ciencia, tan grande si se la compara con la debilidad de nuestros medios, tan pobre ante los ilimitados limbos de lo desconocido, ¿qué sabe de la realidad absoluta? Nada. El mundo nos interesa solamente por las ideas que nos formamos de él. Desaparecida la idea, todo es esterilidad, caos, nada. Un conjunto de hechos no constituye la ciencia; no es sino un frío catálogo. Es menester darle calor, vivificarlo en el hogar encendido del alma; es menester hacer que intervengan las ideas y las luces de la razón; hay que interpretar los hechos.*

*[Jean-Henri Fabre]*

## DEDICATORIA

*A mis maestros: mis padres,  
hermanos y amigos,  
por su infinita paciencia,  
enseñanza, consejo y  
apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis papás Jorge y Maricela, por el mayor obsequio: la vida, y todo lo que ello conlleva, especialmente por su amor, su tiempo, paciencia y comprensión.

Agradezco a mis hermanos Jorge y Susana por todo lo que hemos pasado juntos y lo que seguiremos compartiendo.

A Luis Fernando por apoyarme, quererme y estar a mi lado.

A la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal, por todas sus enseñanzas, por su amistad, por su consejo, y por renovar cada día mi interés por la ciencia, así como despertar mi curiosidad por la misma, con tan solo amar lo que hace.

Agradezco a la Dra. Martha Torres, por permitirme haber sido parte de su grupo de estudiantes en el Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

A mis compañeros del Departamento de Investigación en Microbiología, por su amistad y compañerismo.

A cada persona que ha estado junto a mí en los momentos precisos y necesarios. Por regalarme un poco de su valioso tiempo en esto que llamamos vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segundo hogar.

# ÍNDICE

	Página
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	8
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>ANTECEDENTES</b> .....	15
Epidemiología .....	16
Etiología .....	17
Descripción de los macrófagos .....	19
Autofagia como mecanismo innato ante invasión intracelular .....	20
Inducción de autofagia por activación de receptores de la inmunidad innata.....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>MÉTODOS</b> .....	28
Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	28
Obtención de monocitos por adherencia.....	28
Diferenciación de monocitos a macrófagos.....	29
Obtención de DNA de <i>M. tuberculosis</i> .....	29
Cuantificación del DNA de <i>M. tuberculosis</i> .....	30
Amplificación del DNA genómico de Mtb .....	30
Estimulación de macrófagos .....	30
Detección de autofagia y determinación del fenotipo de macrófagos por citometría de flujo.....	30

Cuantificación de TNF- $\alpha$ por ELISA.....	32
Obtención de RNA para qPCR.....	33
Determinación de mRNA por qPCR .....	34
Análisis estadístico .....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	36
1. Polarización de macrófagos a fenotipos M1 y M2.....	36
2. Caracterización de las poblaciones de macrófagos M1 y M2.....	37
Expresión basal en el porcentaje de CD14 CD16 en macrófagos M1 y M2.....	37
Efecto de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14 CD16 en macrófagos M1 y M2.....	37
Efecto de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14, CD36 y CD16 en macrófagos M1 y M2.....	40
Efecto de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14, CD206 y HLA-DR en macrófagos M1 y M2.....	40
3. Producción de TNF- $\alpha$ .....	41
Los macrófagos M1 responden a la estimulación con DNAMtb con producción moderada de TNF- $\alpha$ .....	41
El oligodesoxinucleótido inhibidor (ODN-I) disminuye la producción de TNF- $\alpha$ inducida por DNAMtb en macrófagos M1.....	42
4. Evaluación de la inducción de Autofagia por estimulación con DNAMtb en macrófagos M1 y M2.....	42
5. Expresión génica de IRGM en macrófagos M1 por estimulación con DNAMtb.....	45
6. Evaluación de HLA-DR ante la estimulación con DNAMtb en macrófagos M1 y M2.....	45
<b>DISCUSIÓN</b> .....	49
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	53
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	54

<b>APÉNDICES</b> .....	58
<b>APÉNDICE 1</b>	
Tabla de las proteínas involucradas en los principales pasos de la autofagia: nucleación, elongación y cierre del autofagosoma.....	58
<b>APÉNDICE 2</b>	
Detección del DNAMtb por electroforesis en gel de agarosa.....	61
<b>APÉNDICE 3</b>	
Caracterización del fenotipo funcional de macrófagos M1 y M2.....	62
<b>APÉNDICE 4</b>	
Estrategia del análisis de autofagia por citometría de flujo .....	63
<b>APÉNDICE 5</b>	
Estrategia de análisis para evaluar la expresión de las moléculas CD14 y CD16 en macrófagos M1 y M2 por citometría de flujo .....	64
<b>APÉNDICE 6</b>	
Estrategia para la identificación de macrófagos M1 y M2 basados en la expresión de CD36 CD16 Y CD206 HLA-DR por citometría de flujo .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Página

Figura 1: Micrografía Electrónica de Transmisión (TEM). Detalles estructurales del bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	18
Figura 2: Poblaciones de macrófagos de acuerdo a su localización anatómica en tejido y sus fenotipos de activación.....	20
Figura 3: Diagrama de la autofagia como mecanismo innato de defensa.....	23
Figura 4: Vía de señalización de TLR9.....	25
Figura 5: Expresión génica de IL-10 y TLR9 en macrófagos M1 y M2.....	36
Figura 6: Expresión basal en el porcentaje de CD14 y CD16 en macrófagos M1 y M2.....	38
Figura 7: Evaluación de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14 y CD16 de macrófagos M1 y M2.....	39
Figura 8: Evaluación de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14, CD36 y CD16 en macrófagos M1.....	40
Figura 9: Evaluación de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14, CD206 y HLA-DR en macrófagos M1.....	41
Figura 10: Producción de TNF- $\alpha$ en macrófagos M1 y M2.....	43
Figura 11: Producción de TNF- $\alpha$ por bloqueo del inhibidor de TLR9 en macrófagos M1 y M2.....	44
Figura 12: Evaluación de autofagia por estimulación con DNAMtb en macrófagos M1 y M2.....	46
Figura 13: Expresión génica de IRGM en macrófagos M1 por estimulación con DNAMtb.....	47
Figura 14: Evaluación de HLA-DR ante la estimulación con DNAMtb en macrófagos M1 y M2.....	48
Tabla 1: Clasificación de los macrófagos de acuerdo a su función .....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS

Atg12-ATG5-ATG16L: dímero de proteínas relacionadas a autofagia

Bag-1: proteína atánogen asociada a Bcl2

BCG: bacilo Calmette-Guérin de *Mycobacterium bovis*

BIG-H3: dominio fasciclina de la proteína 4

CCL: ligandos de quimiocina (*chemokines ligand*)

CMA: autofagia mediada por chaperonas (*chaperone-mediated autophagy*)

CpG: DNA no metilado con motivos CpG

DFCP1: proteína 1 de doble contenido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAMtb: DNA de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

dsDNA: DNA de doble cadena

ELISA: ensayo inmunoenzimático

ESX-1: sistema de secreción tipo 1

ECM: matriz extracelular (*extracellular matrix*)

FYVE: proteína compuesta de los aminoácidos fenilalanina, tirosina, valina y ácido glatámico

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

Hsc: proteína afín de choque térmico

Hip: proteína de interacción con hsc70

HLA: antígeno leucocitario humano (*human leukocyte antigen*)

Hop: proteína de organización hsc70-hsp90

IFN $\gamma$ : interferón gamma

IL: interleucina

IMF: intensidad media de fluorescencia

iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible

LAM: lipoarabinomanana

LAMP-2A: proteína de membrana lisosomal

LC3-II: cadena ligera 3 asociada a los microtúbulos

LPS: lipopolisacárido

Ly-hsc70: proteína del lumen lisosomal

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

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos

MDM: macrófagos diferenciados de monocitos

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

mRNA: RNA mensajero

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

MTC o TBC: 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-kB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: óxido nítrico

NOD: dominio de oligomerización de unión a nucleótido (*nucleotide oligomerization domain*)

NK: células asesinas naturales (*natural killer*)

NLR: receptores tipo NOD

ODN: oligodesoxinucleótidos

ODN-I: oligodesoxinucleótido inhibidor

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*)

pDNA: DNA plasmático

PE: fosfatidiletanolamina

PIM: fosfatidilinositol manósido

PI(3)K: cinasa fosfatidilinositol-3-OH clase III, también conocida como Vps34 (proteína vacuolar)

PI(3)PIP: proteína de interacción fosfatidilinositol 3-fosfato

RNA: ácido ribonucleico

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

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SLAM: molécula de activación de la señal linfocitaria

SLR: receptores tipo scavenger

SPHK1: cinasa 1 de esfingosina

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

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

TEM: micrografía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*)

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*)

ULK1: cinasa 1 tipo unc-51

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WIPI2: proteína con repeticiones de triptófano y ácido aspártico que interactúa con fosfoinositida-2

## RESUMEN

Componentes de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) modelan la respuesta innata del macrófago principalmente al ser reconocidos por receptores tipo Toll (TLR). Se sabe que el DNA de Mtb (DNAMtb) es reconocido por TLR9 pero las implicaciones de este reconocimiento están poco caracterizadas. Se ha descrito que la activación de TLR9 por DNAMtb induce la aparición de vesículas degradativas autofágicas (autofagosomas) en macrófagos murinos. Pero se desconoce si en células humanas ocurre este fenómeno cuyas funciones incluyen la eliminación de patógenos intracelulares, el acercamiento de componentes microbianos a sus receptores en las membranas de las que se forma el autofagosoma, y una regulación de la respuesta proinflamatoria (secreción de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ], la interleucina 1 [IL-1], la interleucina 2 [IL-2], quimiocinas, y los interferones de tipo I y II [IFN-I e IFN-II]). En este trabajo se investigó el perfil de la respuesta innata en macrófagos humanos ante la estimulación de DNAMtb.

Los macrófagos humanos fueron diferenciados a partir de monocitos (MDM), obtenidos de paquetes leucocitarios del banco de sangre del INER. Tanto la autofagia como el fenotipo del macrófago se determinaron por citometría de flujo. La producción de TNF- $\alpha$  se determinó por ELISA, usando como controles inductores de autofagia a la rapamicina y el LPS. La expresión génica de TLR9, IL-10 e IRGM (GTPasa inducida durante el proceso de autofagia) se cuantificó por PCR en tiempo real.

Nuestros resultados indican que la respuesta de los macrófagos humanos al DNAMtb induce la producción moderada de TNF- $\alpha$  respecto a macrófagos sin estimular y al LPS, lo que hace atractivo su uso como inmunomodulador. Del mismo modo hay una inducción moderada de autofagia, lo que se confirma con la expresión génica de IRGM.

Un análisis exhaustivo de los mecanismos involucrados en esta respuesta contribuirá a esclarecer aspectos cruciales de la patogénesis de la tuberculosis y el uso de componentes de Mtb como adyuvante de vacunas, así como la activación de autofagia como blanco terapéutico.

## **ABSTRACT**

Components of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) model the macrophage innate immune response mainly because their recognition by Toll-like receptors (TLR). It is known that the DNA of Mtb (DNAMtb) is recognized by TLR9 but the implications of this recognition are poorly characterized. It has been reported that activation of TLR9 by DNAMtb induces the formation of degradative autophagic vesicles (autophagosomes) in murine macrophages. Whether this phenomenon, whose functions include elimination intracellular pathogens, facilitation of microbial components ligation to their receptors on the membranes of the autophagosome, and regulation of the proinflammatory response (secretion of cytokines such as tumor necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ], interleukin-1 [IL-1], interleukin-2 [IL-2], chemokines, interferons, and Type I and II [IFN-I and IFN-II]) occurs in human cells remains unknown. In this work we studied the innate human responses profile of macrophages after stimulation with DNAMtb.

MDM human macrophages were obtained from buffy coats from INER's blood bank. Both autophagy and macrophage phenotype were determined by flow cytometry. The production of TNF- $\alpha$  was determined by ELISA, using rapamycin and LPS as positive controls. TLR9, IL-10 and IRGM (GTPase induced during autophagy) gene expression was quantified by real time PCR.

Our results indicate that the response of human macrophages to DNAMtb induces moderate TNF- $\alpha$  production compared to non-stimulated macrophages and LPS, which makes it attractive to use as an immunomodulator. Similarly there is a moderate induction of autophagy, which is confirmed by the gene expression of IRGM.

A comprehensive analysis of the mechanisms involved in this response will help clarify crucial aspects of the pathogenesis of tuberculosis and the use of components of Mtb as a vaccine adjuvants, as well as activation of autophagy as a therapeutic target.

## Perfil de la respuesta innata activada por el DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos humanos

---

### ANTECEDENTES

El sistema inmune en vertebrados es un asombroso complejo de órganos y células especializado en proteger al hospedero contra organismos infecciosos y sustancias ajenas de carácter no infeccioso, simultáneamente distingue las células, tejidos y órganos que son parte de un individuo (Cooper, 2001). La encargada de su estudio es la inmunología, ciencia que nace en 1796 al lograrse una vacunación satisfactoria contra la viruela por el médico inglés Edward Jenner (Cooper, 2001; Smith, 2011).

La inmunidad innata o también conocida como inmunidad natural o espontánea, es la primera línea de defensa contra un agente infeccioso, la constituyen barreras físicas, químicas, epitelios y sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies; leucocitos (neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales [NK]); proteínas efectoras circulantes (factores del sistema del complemento, colectinas, pentraxinas y otros mediadores de la inflamación). También la constituyen citocinas, proteínas que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células encargadas de la inmunidad innata, p.ej., el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 2 (IL-2), quimiocinas, y los interferones de tipo I y II (IFN-I e IFN-II) (Galli *et al.*, 2011; Plüddeman *et al.*, 2011; Deretic, 2012).

La segunda línea de defensa de la respuesta inmune la constituye la inmunidad adaptativa, también conocida como inmunidad adquirida o de memoria, ésta se desarrolla a partir de la innata, pocos días después de la infección inicial, elimina los patógenos que evaden las reacciones innatas y posteriormente establecen una memoria inmunológica contra el patógeno invasor. Los principales agentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y los anticuerpos que éstos producen (Plüddeman *et al.*, 2011).

## Epidemiología

Las enfermedades de mayor impacto en la salud pública en el mundo, son a causa de agentes infecciosos. La tuberculosis es la segunda causa de mortalidad después del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Se estima que un total de 1.3 millones de personas murieron de tuberculosis en el 2012, entre las cuales 320,000 fueron afectadas por el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana, agente causal del SIDA). Para México se reportaron 20,470 nuevos casos de tuberculosis con 13,038 frotis positivos diagnosticados (por baciloscopia de BAAR) (Dye and Williams, 2010; WHO. Global tuberculosis report, 2013).

La tuberculosis está presente en todo el mundo, es una enfermedad infectocontagiosa de naturaleza crónica que afecta a seres humanos de todas las edades. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada. La enfermedad es causada por micobacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC o TBC), que incluye a *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. orygis* y *M. pinnipedii*. Existen evidencias de tuberculosis desde el neolítico, pero es a partir de la revolución industrial donde la enfermedad adquiere carácter mundial, debido principalmente a modificaciones demográficas y el posterior hacinamiento de las poblaciones, que facilitaron su diseminación (Cartes, 2013).

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), es el principal agente causante de la tuberculosis en el humano. Se ha adaptado de forma efectiva a un ciclo de vida que le permite persistir de manera latente dentro de los fagosomas que lo engullen. La infección se adquiere por reactivación o directamente de persona a persona por la vía aérea, cuando personas infectadas tosen, estornudan o escupen (Barry *et al.*, 2009; Borrero *et al.*, 2011; Cartes, 2013; Modlin and Barry, 2013).

A lo largo de un año, un enfermo con tuberculosis puede infectar de unas 10 a 15 personas por contacto estrecho, pero solo del 5 al 10% de los infectados desarrollaran la enfermedad, dependiendo de su estado inmunitario (p.ej. individuos inmunodeprimidos por infección por VIH, diabetes o enfermedades autoinmunes), de factores socioeconómicos (pobreza o

situación de calle) y de factores individuales como edad (extremos de vida; niños y adultos mayores), sexo y susceptibilidad genética. La reciente aparición de tuberculosis multifarmacoresistente (TB-MDR) y la tuberculosis extensivamente resistente (TB-XDR) en más de 70 países representa una nueva amenaza alarmante (Philips and Ernst, 2012; Ernst, 2012; WHO. Global tuberculosis report, 2013).

El alto costo, la baja efectividad y la poca disponibilidad en los medicamentos para eliminar la tuberculosis han llevado a la urgente necesidad de comprender los mecanismos inmunes implicados en la protección y la patogénesis de la enfermedad (Harari *et al.*, 2011). Actualmente la Organización Mundial de la Salud ha liderado estrategias y planes mundiales para controlar, reducir y eliminar la tuberculosis (Ernst, 2012; WHO. Global tuberculosis report, 2013).

## **Etiología**

El agente causal de la tuberculosis es *Mtb*, un patógeno intracelular obligado que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. Es un bacilo ligeramente curvo o recto, pertenece a las bacterias aerobias grampositivas, con dimensiones de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud como se muestra en la Figura 1. Son inmóviles, no esporulan ni forman cápsulas, son resistentes a la decoloración alcohol-ácida cuando se tiñen con fucshina básica fenicada (tinción de Ziehl-Neelsen o tinción de BAAR). Su crecimiento es muy lento (un tiempo de duplicación de 12 horas), lo que contrasta con la mayoría de las bacterias, que pueden duplicar su número en una hora o menos (Patrick *et al.* 2009).

Una característica distintiva de *Mtb* es el alto porcentaje de lípidos presentes en la pared celular, que alcanza el 60% de su peso seco. Lo que determina sus características como: hidrofobia, que es la tendencia que muestran las células a adherirse unas con otras durante su crecimiento en medios acuosos, y por ello a flotar en la superficie. Resisten a la acción de ácidos, álcalis, y a la desecación, propiedad importante para su transmisión al permitir la sobrevivencia del bacilo en el esputo expectorado seco. Además sus lípidos altamente

hidrofóbicos le confieren resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos fijadores de complemento (Patrick *et al.* 2009).



**Figura 1.** Micrografía Electrónica de Transmisión (TEM). Detalles estructurales del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis. Obtenida de Centers for Disease Control and Prevention ([phil.cdc.gov/phil/details.asp](http://phil.cdc.gov/phil/details.asp)).

Mtb obtiene su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono (como glucosa y glicerol). El aumento de la presión de CO<sub>2</sub> estimula su crecimiento, crece en medios simples con glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio (medios de Löwenstein-Jensen o Middlebrook). Forma colonias no pigmentadas, rugosas de color “gamuza” (un tipo de beige), después de 14 a 28 días de incubación. Su crecimiento se propicia en una atmósfera de 5 a 10% de dióxido de carbono, con un tiempo medio de generación de 12 a 24 horas (Champoux *et al.*, 1990). No resiste el calor ni la radiación ultravioleta (Patrick *et al.* 2009; Borrero *et al.*, 2011).

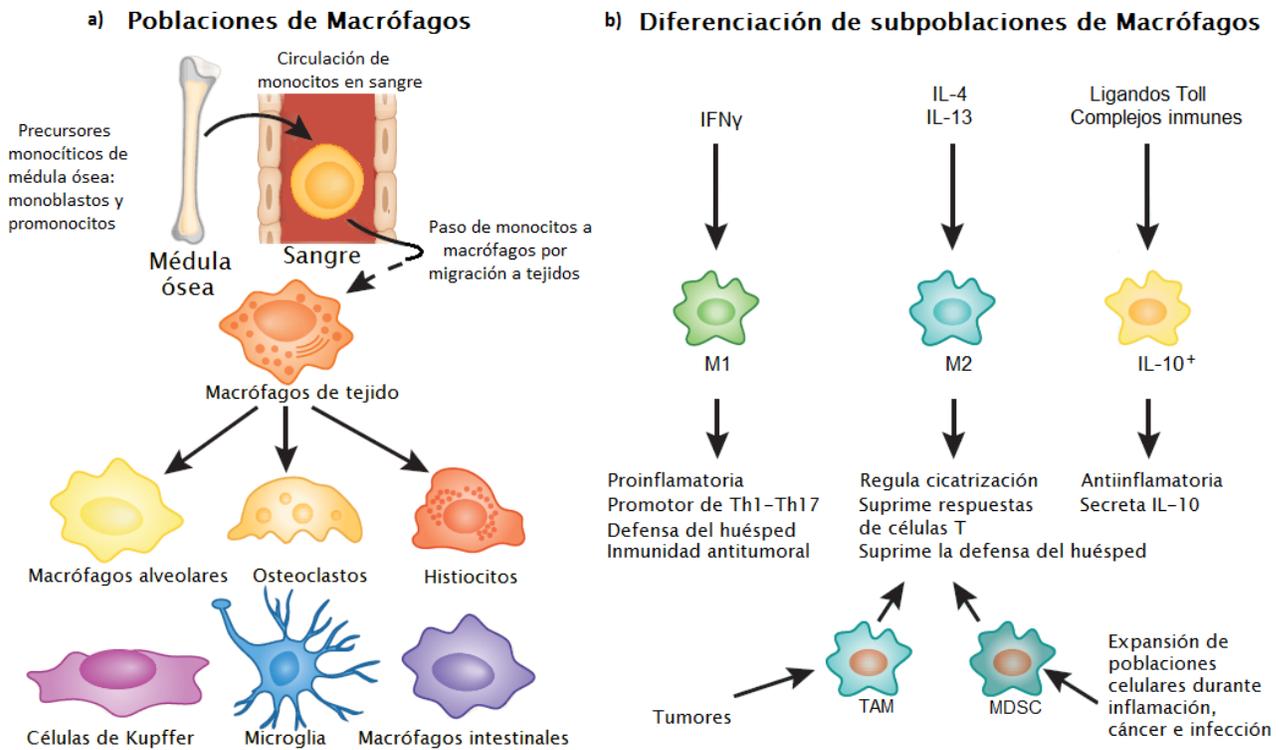
El número de bacilos de Mtb requeridos para causar infección en los seres humanos se estima en un rango de 1 a 400 bacilos, número suficientemente pequeño para que la infección pueda ser eliminada por las respuestas innata y adaptativa en la mayoría de los individuos infectados (WHO. Global tuberculosis report, 2013).

### **Descripción de los macrófagos**

Los macrófagos son células que forman parte del sistema fagocítico mononuclear (que incluye todas las células derivadas de los precursores monocíticos de la médula ósea). Se piensa que los macrófagos de los seres humanos y de otros vertebrados son los descendientes evolutivos directos de células fagocíticas presentes en animales más simples, como las que Metchnikoff observó por primera vez en el invertebrado estrella de mar (Cooper, 2001; Borrero *et al.*, 2011; Plüddeman *et al.*, 2011).

Los monocitos constituyen entre el 5 y 10% de los leucocitos circulantes en los seres humanos, se caracterizan por la heterogeneidad fenotípica y su capacidad de respuesta hacia los cambios microambientales (Gordon *et al.*, 2003; Benoit *et al.*, 2008). Los procesos de diferenciación de los monocitos dan origen a macrófagos tisulares que incluyen macrófagos alveolares (en pulmones), histiocitos (en tejido conectivo intersticial), osteoclastos (en hueso), la microglía (en cerebro), macrófagos intestinales, células de Kupffer (en hígado), células dendríticas y así sucesivamente, pero aún no se conocen detalladamente las vías de señalización, desarrollo y diferenciación de los monocitos *in vivo*, responsables de la variabilidad de tipos celulares originados. En la Figura 2 se muestran algunas poblaciones de macrófagos en tejido y las principales vías de diferenciación de acuerdo a su actividad inflamatoria (Gordon, 2007; Galli *et al.*, 2011).

En los tejidos, los macrófagos son activados por gran variedad de estímulos ante una respuesta inmune (Sima and Glogauer, 2013). Se han descrito diferentes vías de activación *in vitro* para macrófagos, y propuesto varios esquemas de clasificación. Uno de los más empleados se refiere a los macrófagos activados por vía clásica como M1, y los que son activados por otras vías clasificados como M2 (que incluyen M2a, M2b y M2c), cada subconjunto con características fenotípicas y funcionales propias como se muestra en la Tabla 1 (Gordon, 2007; Benoit *et al.*, 2008; Sharon *et al.*, 2008; Galli *et al.*, 2011; Plüddeman *et al.*, 2011; Mantovani, 2012; Erbel *et al.*, 2013; Kittan *et al.*, 2013).



**Figura 2.** a) Poblaciones de macrófagos de acuerdo a su localización anatómica en tejido y b) sus principales fenotipos de activación (Modificado de Galli *et al.*, 2011).

### Autofagia como mecanismo innato ante invasión intracelular

Como se ha mencionado, Mtb es un parásito intracelular y puede ser fagocitado por los macrófagos (Patrick *et al.* 2009; Plüddeman *et al.*, 2011). Cuando esto sucede está en riesgo de activarse la autofagia, mecanismo innato conservado en la evolución, que mantiene la homeostasis celular en respuesta a un amplio espectro de condiciones de estrés, tales como inanición, ausencia de factores de crecimiento, hipoxia e infección (Deretic, 2012; Kim *et al.*, 2013). Su papel consiste en la formación de una vacuola para la eliminación de componentes no deseados de la célula como, proteínas de vida media-larga, organelos dañados y patógenos intracelulares como Mtb, permitiendo a la células economizar en la síntesis de macromoléculas y de esta forma aumentar la supervivencia celular (Deretic, 2012; Watson *et al.* 2012).

**Tabla 1. Clasificación de los macrófagos de acuerdo a su función.**

Fenotipo de macrófagos	Estímulo	Función fenotípica	Perfil de citocinas e inflamación	Marcadores de superficie
<b>M1</b>	IFN $\gamma$ , LPS, GM-CSF, ligando del TLR/IL-1R, TNF- $\alpha$ , productos microbianos	Proinflamatoria Respuesta Th1	IL-1, IL-2, IL-15, IL-28, IL-23, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-23, MCP-1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL20/MIP-3, ROS, NO, iNOS, NOS2	CD86, CD80, MHC clase II, IL-1R, TLR2, TLR4
<b>M2a</b>	IL-4, IL-13	Respuesta Th2, inflamación tipo II (antiinflamatoria)	IL-1R, IL-10, CD23, fibronectina, BIG-H3, arginasa-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IGF, CCL13/MCP-4, CCL22, CCL18, integrinas $\beta$ 2	MHC clase II, receptor antagonista IL-1, CD163, CD206, receptores scavenger, decoy IL-1R11, FIZZ/Ym-1
<b>M2b</b>	Ligandos TLR/ IL-1R	Regulación de la respuesta inmune, activación Th2	IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, SPHK1	CD86, CD80, CCL1, MHC clase II
<b>M2c</b>	IL-10, TGF $\beta$ , hormonas glucocorticoides.	Inmunosupresión, remodelación de la matriz, reparación tisular	IL-10, IL-1B, IL-6, TGF $\beta$ , proteínas ECM, arginasa-1	CD14, TGF $\beta$ , receptor de antagonista IL-1R, SLAM (CD150), CD206, MHC clase II, CCL16, CCL18

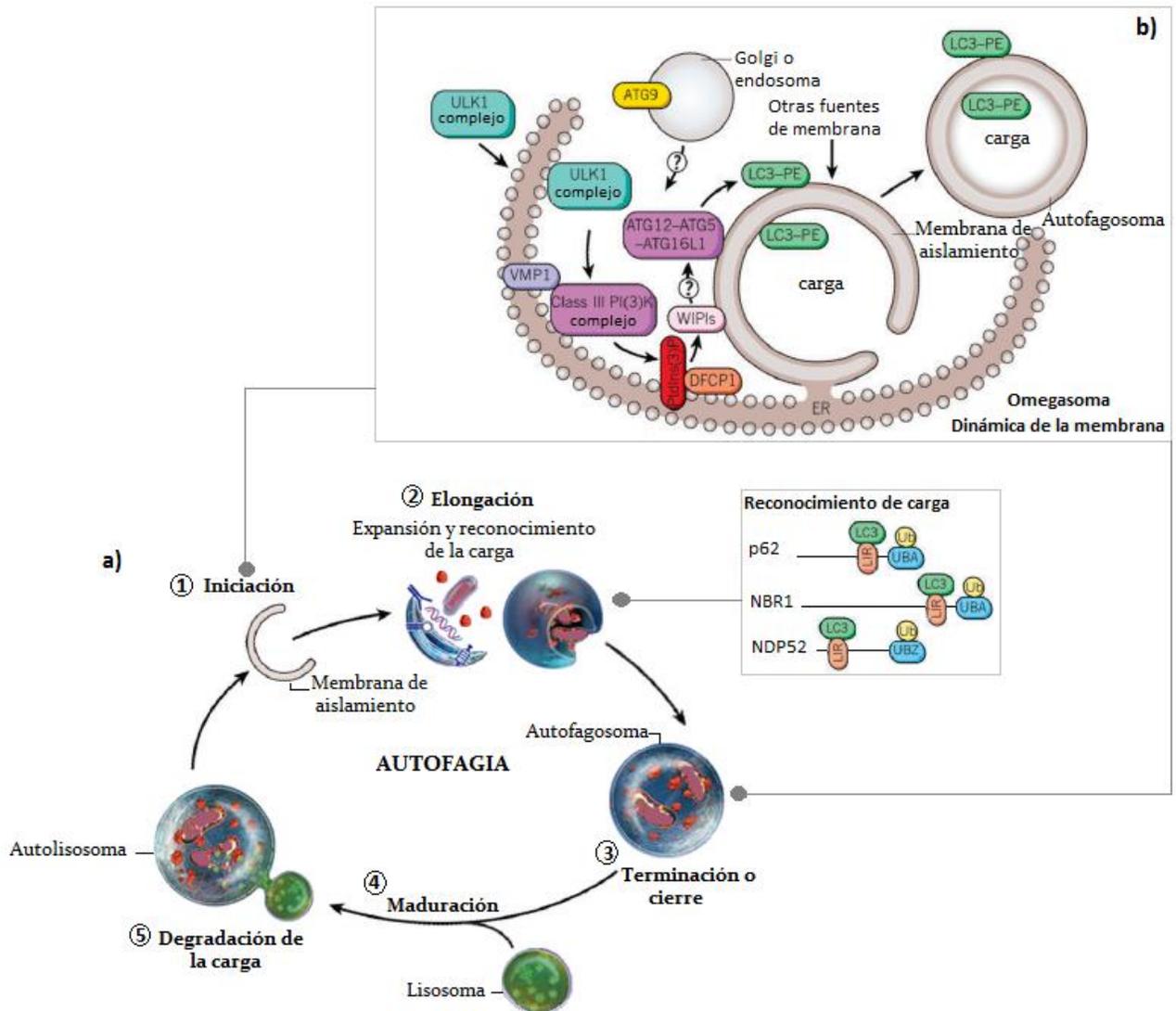
BIG-H3: dominio fasciclina de la proteína 4, MIP: proteína inflamatoria de macrófagos, SLAM: molécula de activación de la señal linfocitaria, SPHK1: cinasa 1 de esfingosina. IFN $\gamma$ : Interferón gamma, LPS: lipopolisacárido, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa, MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos, CCL: ligando de quimiocina, ROS: especies reactivas de oxígeno, NO: óxido nítrico, iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible, MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta, ECM: matriz extracelular. Tabla modificada de Gordon, 2007.

En las células eucariotas se han descrito tres tipos principales de autofagia: la autofagia mediada por chaperonas (CMA), la microautofagia y la macroautofagia. 1) La CMA está limitada a proteínas solubles con motivos pentapéptidos (propia mente la secuencia KFERQ

[Lys-Phe-Glu-Arg-Gln]) que son reconocidas por un complejo de proteínas chaperonas citosólicas (la hsc70-hsp40-hsp90 [proteínas afines de choque térmico de 70, 40 y 90 kDa respectivamente], y las co-chaperonas hip [proteína de interacción con hsc70], hop [proteína de organización hsc70-hsp90] y bag-1 [proteína atánogen asociada a Bcl2]). Este complejo interactúa con el receptor de LAMP-2A (proteína de la membrana lisosomal) y diversas subunidades formadoras de poro (como la ly-hsc70, en el lumen lisosomal), donde pasará la proteína desdoblada para su degradación (Pereira *et al.*, 2011). 2) La microautofagia, involucra la inmersión directa del material a degradar por el lisosoma mediante extensión, protrusión y septación de la membrana lisosomal, y por último 3) la macroautofagia, también conocida como la vía clásica de la autofagia; secuestra porciones citoplasmáticas, organelos dañados o patógenos intracelulares dentro de vesículas especializadas de doble membrana denominadas autofagosomas, las que al fusionarse con los lisosomas degradarán su contenido (Xie *et al.*, 2008; Shin, *et al.*, 2010; Mansilla and Colombo, 2013).

En lo sucesivo denominaremos “autofagia” al mecanismo de nuestro interés particular: la macroautofagia. En células de mamífero, la autofagia involucra una serie de etapas, el primer paso estructural es la nucleación de la vesícula autofágica, que requiere de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI(3)K) (Pereira *et al.*, 2011; Deretic, 2012), el segundo y tercer paso consiste en la elongación y el cierre de la membrana autofagosomal, donde participan los conjugados de Atg7, Atg5 y Atg12 (proteínas relacionadas a la autofagia, Atg7 participa en dos vías de conjugación tipo-ubiquitina y la conjugación de Atg5 a Atg12 participan en la conversión de LC3 a su conjugado fosfatidiletanolamina [PE] de forma LC3-II). El conjugado Atg5-Atg12 forma un gran complejo con la proteína Atg16L1, ambos sistemas de conjugación son necesarios para la generación del autofagosoma, el sitio específico de formación del autofagosoma se piensa que ocurre en una región del retículo endoplásmico llamado omegasoma (Shin, *et al.*, 2010; Pereira *et al.* 2011; Deretic, 2012). El último paso es la fusión con los lisosomas, lo que lleva a la ruptura de la membrana interna y la consiguiente exposición del material citoplásmico secuestrado a hidrolasas lisosomales (Blasius and Beutler, 2010; Shin, *et al.*, 2010; Deretic, 2012; Mansilla and Colombo, 2013). En la figura 3 se puede observar un diagrama que muestra a grandes rasgos las diferentes

etapas de la autofagia. Las proteínas involucradas en la nucleación, elongación y cierre del autofagosoma se enlistan en la tabla del Apéndice 1.



**Figura 3.** Diagrama de la autofagia como mecanismo innato de defensa. a) Etapas generales de la autofagia: el primer paso (la nucleación), inicia con la formación de la membrana de aislamiento. El segundo paso se caracteriza por la elongación de la membrana de aislamiento y el reconocimiento de la carga, seguido del tercer paso, la formación del autofagosoma. Por último el autofagosoma completamente formado, entrega los componentes citosólicos a un lisosoma a través de la fusión de vesículas, formando un autolisosoma. Enzimas digestivas lisosomales contenidas dentro del autolisosoma degradan proteínas y/u orgánulos, para su reciclaje y uso en la generación de energía u otros procesos. b) Omegasoma: sitio específico del retículo endoplasmático donde se piensa que se produce la formación del autofagosoma. En la nucleación la traslocación del complejo ULK1 al omegasoma, induce la migración del complejo PI(3)K, este se fosforila a PI(3)PIP e interactúa con

DFCP1 en la misma región. Se piensa que DFCP1, WIPI2 y Atg12-ATG5-ATG16L promueven el reclutamiento de LC3-II a la membrana de aislamiento, esencial para la correcta elongación y cierre del autofagosoma y su posterior maduración. ULK1: cinasa 1 tipo unc-51; PI(3)K: cinasa fosfatidilinositol-3-OH clase III; PI(3)PIP: proteína de interacción fosfatidilinositol 3-fosfato; DFCP1: proteína 1 de doble contenido; FYVE [Phe-Tyr-Val-Glu]; WIPI2: proteína con repeticiones WD [Trp-Asp] que interactúa con fosfoinositida-2; Atg12-ATG5-ATG16L: dímero de proteínas relacionadas a autofagia; LC3-II: cadena ligera 3 asociada a los microtúbulos. Modificado de Levine *et al.*, 2011.

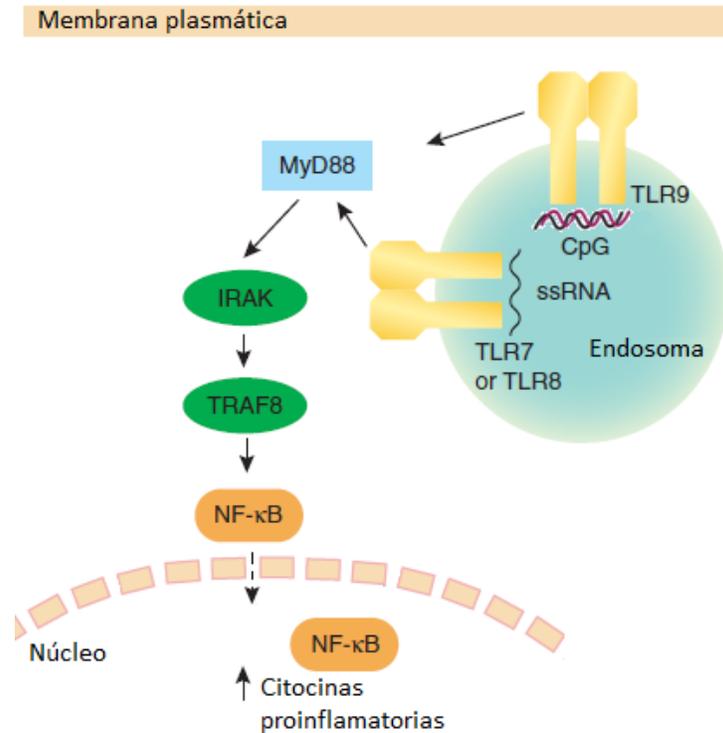
### **Inducción de autofagia por activación de receptores de la inmunidad innata**

La autofagia modula y es modulada por la producción de citocinas y tiene efectos importantes sobre la inmunidad innata y adaptativa (Vojo Deretic, 2012; Watson *et al.* 2012; Goletti D., *et al.* 2013). La inducción de autofagia se lleva a cabo mediante señalización de receptores tipo NOD (NLR), tipo Scavenger (SLR), y receptores tipo Toll (TLR) (Knuefermann *et al.* 2007). Los TLR que participan en interacción con la autofagia son, el heterodímero TLR2/TLR1, el TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y TLR9, en diversos tipos de células incluyendo macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Deretic, 2011).

Los TLR que participan en el reconocimiento de Mtb son TLR2, TLR4, TLR9 y probablemente TLR8 (Juarez *et al.* 2010; Watson *et al.* 2012; Yu *et al.*, 2013). El TLR9 es un receptor transmembranal, localizado en membrana plasmática y endosomal, así como en fagolisosomas, sus ligandos son DNA bacteriano o viral de doble cadena (dsDNA), motivos CpG de DNA y oligodesoxinucleótidos sintéticos con motivos CpG (CpG-ODN) (Suzuki *et al.* 2005; Juarez *et al.* 2010; Carvalho *et al.* 2011).

La vía de señalización de TLR9 es similar a otras vías de los TLR, al igual que TLR7, induce no sólo interferones de tipo I (Saitoh and Akira, 2010), sino también citocinas proinflamatorias que son dependientes de MyD88 (proteína codificada por el gen de diferenciación mieloide de respuesta primaria) (Knuefermann *et al.* 2007; Saitoh and Akira, 2010). TLR9 al unirse con su ligando (dsDNA o CpG) presenta una cascada de señalizaciones, como se muestra en la figura 4, donde es modulada por moléculas como

MyD88, IRAK (cinasa asociada al receptor de IL-1) y TRAF8 (factor asociado al receptor de TNF- $\alpha$ ), que darán como resultado la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), el cual se translocará al núcleo para la transcripción de genes tanto de citocinas como péptidos antimicrobianos que modularán la respuesta inmune innata y establecerán un “puente” con la respuesta inmune adaptativa (Schmidt and Maine, 2007; Juarez *et al.* 2010; Saitoh and Akira, 2010).



**Figura 4.** Vía de señalización de TLR9. Al unirse con su ligando (CpG), el TLR9 presenta una cascada de señalizaciones dependiente de MyD88, dando la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, que se transloca al núcleo para la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias (Diagrama modificado de Saitoh and Akira, 2010).

TLR9 reconoce dsDNA de virus, como el citomegalovirus (MCMV), virus del herpes simple 1 (HSV-1), HSV-2, y adenovirus. Además de reconocer genomas de protozoos, incluyendo *Trypanosoma cruzi* (Blasius and Beutler, 2010; Kumagai and Akira, 2012). Se tienen reportes de que en infección con DNA de Mtb, el TLR9 induce una respuesta inmune protectora en modelo murino (Bafica, *et al.*, 2005). Y se conoce que la infección de macrófagos murinos con Mtb induce autofagia (Watson *et al.* 2012).

Se ha demostrado que algunas micobacterias, incluyendo Mtb y el bacilo Calmette-Guérin de *Micobacterium bovis* (BCG) contienen motivos CpG, potentes inmunoestimuladores de la respuesta inmune innata (Bafica, *et al.*, 2005; Saitoh and Akira, 2010), y que TLR9 se describió inicialmente como el reconocimiento de motivos CpG no metilados con efectos inmunoestimulantes de estos ácidos nucleicos. Algunos estimulantes de este receptor se están utilizando como agentes terapéuticos para el cáncer y el asma o como adyuvantes de vacunas (Bellot *et al.* 2013; Xiaowen *et al.* 2013). El problema es que el crecimiento de algunos tipos de tumores se favorece con la autofagia (Bellot *et al.* 2013).

Por estas razones consideramos que el DNAMtb es un posible candidato a adyuvante o inmunomodulador y que TLR9 es un receptor necesario en el reconocimiento de DNAMtb y, por tanto un posible inductor de autofagia como mecanismo de respuesta innata en macrófagos humanos. Por otro lado, nuestra pregunta de estudio incluye hacer la distinción del tipo de macrófago (M1 o M2) que es capaz de responder a la estimulación con DNAMtb. Conocer las implicaciones de esta estimulación permitirá establecer si su uso es deseable o no en el sistema propuesto.

## **HIPÓTESIS**

La estimulación con DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos humanos induce autofagia vía dependiente de TLR9, direccionando una respuesta tipo Th1.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Investigar la capacidad del DNAMtb de inducir autofagia en macrófagos humanos y de modular la respuesta inflamatoria.

### **Objetivos específicos**

- 1) Evaluar el efecto de DNAMtb en la expresión de marcadores de superficie de los macrófagos M1 y M2.
- 2) Evaluar la capacidad del DNAMtb para inducir la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos humanos.
- 3) Evaluar la inducción de autofagia por estimulación con DNAMtb en macrófagos humanos.
- 4) Evaluar la capacidad del DNAMtb de modificar la expresión de HLA-DR en macrófagos humanos.

## **MÉTODOS**

### **1.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).**

Las células fueron aisladas de paquetes leucocitarios obtenidos del banco de sangre del INER, recuperadas por estratificación de sangre diluida 1:1 en RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD) con el uso de una solución separadora de linfocitos (Lonza) después de centrifugarse 45 minutos (1,200rpm, 25°C). Se recuperó el anillo leucocitario por aspiración con una pipeta de transferencia y se colocó en un nuevo tubo cónico de 50ml (Falcon). Los residuos de la solución separadora de linfocitos se eliminaron de las células llevando el volumen a 50ml con medio RPMI, se centrifugó 10 minutos, 1,500rpm, a 25°C (tres veces). Finalmente el botón celular se resuspendió en RPMI suplementado con 10% de suero humano (Valley Biomedical Inc., N.Y.), 200mM de L-glutamina (Lonza) y 50µg/ml de sulfato de gentamicina (Lonza).

### **2.- Obtención de monocitos por adherencia.**

Después de la obtención de los PBMC, y su resuspensión en medio RPMI, éstas se incubaron en cajas de Petri de poliestireno a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante una hora para permitir la adherencia de los monocitos al plástico. Para eliminar a las células no adheridas se adicionó RPMI sobre las cajas de Petri con ayuda de una pipeta de transferencia. Los monocitos se recuperaron mediante un levantador celular (“cell lifter”, Corning Incorporated, Costar) y se colocaron en un tubo cónico de 50ml. Para concentrar los monocitos obtenidos se llenó el volumen con medio RPMI suplementado con 10% de suero humano y se centrifugó durante 10 minutos, 1,500rpm a 25°C. El botón celular obtenido se resuspendió en 5ml de RPMI suplementado con 10% de suero humano. Se realizó el conteo de los monocitos obtenidos en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), con una dilución 1:1 de azul de tripano (Gibco) y la suspensión celular se ajustó a 1X10<sup>6</sup> células/ml.

### **3.- Diferenciación de monocitos a macrófagos.**

Los macrófagos diferenciados de monocitos (MDM) se incubaron en una placa de ultra baja adherencia de 24 pozos ( $1 \times 10^6$  células/pozo) (Corning Incorporated, Costar) a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  durante siete días en presencia de 100ng/ml de  $\text{IFN}\gamma$  recombinante humano (R & D, Minneapolis, MN) para macrófagos M1 o de 40ng/ml de IL-4 (R & D) más 50ng/ml de IL-10 (Pharmingen, San José, CA) para macrófagos M2. Con reestimulación de las mismas citocinas al cuarto día.

#### **4.- Obtención de DNA de *M. tuberculosis*.**

Se descongelaron  $8 \times 10^9$  bacterias de Mtb H37Rv y se incubaron por agitación por 2 horas (400rpm) a  $80^\circ\text{C}$ . Después se lavaron dos veces con PBS (Lonza), centrifugándose durante 5 minutos a 8,000rpm, y se agitaron 30 segundos. Posteriormente se añadió 200 $\mu\text{l}$  de proteinasa K (2mg/ml en un buffer 50mM TRIS-1mM EDTA-0.5% Tween 20) y se incubaron a  $56^\circ\text{C}$  con agitación (400rpm) toda la noche en el Termomixer (Thermo-Shaker, bioSan). Al siguiente día se les agregó 500 $\mu\text{l}$  de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1, y se agitó hasta que se observó una suspensión lechosa.

Para obtener el DNA genómico se centrifugaron durante 15 minutos a 14,000rpm a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa, sin tomar la fase orgánica, en un vial con 20 $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 3M pH 7.2 y 600 $\mu\text{l}$  de etanol absoluto frío, previamente preparado a  $-20^\circ\text{C}$ . Se centrifugaron 15 minutos a 14,000rpm y se eliminó el sobrenadante. Finalmente el DNA precipitado se dejó secar dentro de la campana de flujo laminar a temperatura ambiente, y se resuspendió en 20 $\mu\text{l}$  de agua inyectable (libre de pirógenos). Se homogeneizaron bien las alícuotas y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso experimental.

#### **5.- Cuantificación del DNA de *M. tuberculosis*.**

El DNA se cuantificó en el espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 10W) a una dilución 1:500 del DNA en agua inyectable (libre de pirógenos). La absorbancia se midió a 260 y 280nm, registrándose el índice A260/A280 de 1.65.

## **6.- Amplificación del DNA genómico de Mtb**

Conjuntamente la integridad del DNA de *M.tuberculosis* H37Rv se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, donde se apreció el DNA total (de alto peso molecular) y una banda amplificada por PCR de punto final del marcador genético de la cepa en estudio IS6110. Esto nos sirvió para comprobar que teníamos DNA genómico en nuestro sistema (Apéndice 2).

## **7.- Estimulación de macrófagos**

Los MDM ( $1 \times 10^6$ ) se estimularon durante 24 horas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (DNAMtb), 500ng/ml de rapamicina (como control positivo para autofagia [ya que potencia la co-localización de micobacterias con autofagosomas y lisosomas] y como control negativo para la producción de TNF- $\alpha$  [inmunosupresor]) (Sigma, St. Louis, MO), 5 $\mu\text{g/ml}$  de ODN-I (como inhibidor de TLR9) (Invivogen, San Diego, CA) y 100 ng/ml de LPS (como control positivo para la producción de TNF- $\alpha$ ) (Sigma). Los sobrenadantes se recuperaron para la posterior cuantificación de TNF- $\alpha$  y las células se utilizaron para detección de autofagia (expresión de marcadores de superficie, y expresión génica).

## **8.- Detección de autofagia y determinación del fenotipo de macrófagos por citometría de flujo.**

Las células estimuladas durante 24 horas se transfirieron a tubos de poliestireno de 5ml (Becton Dickinson, San José, CA). Se centrifugaron durante 5 minutos a 2000rpm, 4°C. El botón celular se resuspendió en 2ml de PBS (Lonza) y se volvieron a centrifugar, eliminando el PBS, para la eliminación del medio de cultivo (RPMI). Las células se resuspendieron en

1ml de PBS y se añadió 1µl de la sonda de viabilidad APC (Fixable Viability Dye, eBioscience, San Diego, CA, dilución 1:20 con DMSO) que nos permite “marcar” irreversiblemente las células muertas, para que sean excluidas del análisis. Se incubaron en obscuridad 20 minutos a 4°C. Después de la incubación se lavaron con 1ml de PBS al 2% SFB (suero fetal bovino, Hyclone) para bloquear los receptores Fc y evitar unión inespecífica de los anticuerpos.

Para la tinción de autofagia y marcadores de superficie las células se resuspendieron en 250µl de la sonda CYTO-ID (kit de detección de autofagia; Enzo, Farmingdale, NY) y se incubaron en obscuridad 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se añadieron los anticuerpos de superficie (0.5µl/10<sup>6</sup> células de Anti human CD14-PE-Texas Red, Invitrogen, Carlsbad, CA [el CD14 es un antígeno de superficie, se expresa en monocitos y macrófagos, coopera con otras proteínas para mediar la respuesta inmune innata a lipopolisacáridos bacterianos y a la proteína de unión a lipopolisacárido]; 0.5µl/10<sup>6</sup> células de Anti human HLA-DR-Alexa 700, Biolegend, San Diego, CA [HLA-DR es esencial en la presentación de antígenos exógenos]; 1µl/10<sup>6</sup> células de Anti human CD206-APC/Cy7, Biolegend [CD206 es un receptor de reconocimiento de patrón participante en inmunorreacciones de macrófagos y células dendríticas inmaduras, facilita la endocitosis y fagocitosis]; 1µl/10<sup>6</sup> células de Anti human CD16-PE/Cy7, Biolegend [se asocia a la subunidad del receptor Fc de baja afinidad y media la fagocitosis]; y 1µl/10<sup>6</sup> células de CD36-PECy5A, Invitrogen [CD36 actúa como molécula de adhesión en la agregación de plaquetas y participa en la eliminación fagocítica de células apoptóticas]) y se incubaron por otros 15 minutos en obscuridad a 4°C, se lavaron con 1ml de PBS y se resuspendieron en 200µl de PBS para la adquisición de los datos por citometría de flujo.

Para la tinción de marcadores intracelulares las células se resuspendieron en 100µl de PBS 2% SFB y se añadieron los anticuerpos de superficie (CD14, CD206, HLADR, mismos fluorocromos utilizados anteriormente), incubándose en obscuridad 20 minutos a 4°C. Después de la incubación se lavaron con 1ml de PBS 2%SFB y se resuspendieron en una solución fijadora de paraformaldehído (200µl de PFA al 1%) y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el PFA con 1ml de PBS 2%SFB y se agregó

la solución permeabilizadora 1X (BD), incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Sin lavar se añadieron los anticuerpos intracelulares; LC3 ( $2\mu\text{l}/10^6$  de Anti human LC3-FITC, Novus Biologicals. LC3 está presente tanto en la membrana interna y externa de los autofagosomas, y la formación de sus conjugados es importante para el aislamiento, elongación y/o cierre de la membrana autofagosomal) y TLR9 ( $1\mu\text{l}/10^6$  de Anti-TLR9-PE, Invitrogen. TLR9 se expresa en monocitos, macrófagos, células dendríticas y células B, reconoce dsDNA) y se dejaron incubando en obscuridad 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las células se lavaron con 1ml de PBS y se resuspendieron en  $200\mu\text{l}$  de PBS para la adquisición de los datos por citometría de flujo.

En todos los casos se incluyeron controles sin teñir y en experimentos seleccionados se incluyeron controles FMO (fluorescence minus one). Finalmente se adquirieron al menos 50,000 eventos en un citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, San José, CA), compensando los detectores de fluorescencia con perlas CompBeads (BD). Los datos fueron analizados con el Software citómetro de flujo (BD FACSDiva).

## **9.- Cuantificación de TNF- $\alpha$ por ELISA.**

En los sobrenadantes de los cultivos se midió el TNF- $\alpha$ , citocina proinflamatoria secretada por los macrófagos activados, esto se hizo mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y cada muestra se ensayó por duplicado.

Las placas de ELISA (Placas Maxisorp F96, Nunc) se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche con anticuerpo de captura diluido (Anticuerpo anti-TNF alfa humano, Pharmingen, San José, CA) 1:500 con PBS (Lonza, Walkersville, MD)  $50\mu\text{l}$  por pozo. Se agregó solución de lavado (3 veces, PBS 0.01M, pH 7.2; Tween-20 al 0.05%) para eliminar el anticuerpo de captura. Se adicionó  $100\mu\text{l}$  de Superblock (Pierce, Rockford, IL) por pozo, incubándose 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se agregó solución de lavado (3 veces) para eliminar los restos del Superblok y se adicionaron las muestras,  $50\mu\text{l}$  por pozo. Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas, se agregó solución de lavado como antes, y se agregó el anticuerpo conjugado anti-TNF alfa humano biotinado (Pharmingen) diluido 1:1000 en PBS 0.01M pH 7.2; Tween-20 al 0.05 %, BSA

2%, 50µl por pozo, incubándose 45 minutos a temperatura ambiente. Se agregó solución de lavado (ahora 6 veces) y se eliminaron los restos de TNF-α biotinado. Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con estreptoavidina-fosfatasa alcalina (Jackson) diluida 1:2000 en PBS 0.01M pH 7.2; Tween-20 al 0.05%, BSA 2%, 50µl por pozo. Se agregó solución de lavado (6 veces) y se eliminaron los restos de estreptoavidina-fosfatasa alcalina, para la adición de Sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma, St. Louis, MO), 50µl por pozo, dejando desarrollar el color en obscuridad durante 15 minutos. La reacción se paró con NaOH 1M. Y la absorbancia se cuantificó a 405nm usando un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation). Las concentraciones de TNF-α se calcularon a partir de la curva estándar. Los resultados de las mediciones respectivas se midieron con el programa Ascent Software versión 2.6

#### **10.- Obtención de RNA para qPCR.**

La obtención del RNA se realizó de las células lisadas con 350µl del buffer de lisis (RTL), utilizando el kit de extracción RNeasy Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los lisados celulares se transfirieron en tubos de 1.2ml libres de RNAsas y se agitaron para homogenizar las muestras. Se agregaron 350µl de etanol al 70% a cada tubo, y se mezcló por inversión. El volumen de 700µl se transfirió en columnas y se centrifugó durante 20 segundos a 1,2000rpm. Se eliminaron los eluidos de etanol y las columnas se lavaron con 350µl de solución RW1 (buffer con una pequeña cantidad de tioacianato de guanidina), centrifugándose durante 20 segundos a 12,000rpm. El DNA genómico se removió con la adición de 40µl de DNAasa I (10µl de DNAsa I en 70µl de buffer de digestión [RDD]) y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó solución RW1, para lavar el RNA unido a la membrana, y se eliminaron los residuos del tubo, agregándose 500µl de buffer RPE (buffer que contiene sales de guanidina en 1:4 de etanol) en cada columna, centrifugando 2 minutos a 12,000rpm. Posteriormente las columnas se transfirieron a tubos de 1.5ml y se les agregó 20µl de agua libre de RNAsas, centrifugando 1 minuto a 8,000rpm, se repitió este paso para la elución del RNA. Finalmente las muestras de RNA purificado fueron almacenadas a -20°C.

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se utilizó el Kit Superscript First Strand (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se agregó 1µl de random hexamers (hexonucleotidos, 50ng/µl), 1µl de mezcla de dNTP (desoxirribonuclótidos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10nM) y 5µg de RNA problema por tubo de muestra a procesar, ajustando el volumen a 10µl con agua DEPC. Se incubaron durante 5 minutos a 65°C y 3 minutos a 4°C en un termociclador (iCycler, Bio-Rad, México). A los tubos se les agregó 9µl de mezcla de reacción (2µl de 10X PCR buffer, 4µl de 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2µl de 0.1 DTT y 1µl de RNase OUT para cada tubo), se mezclaron y se concentraron por centrifugación breve. Los tubos se regresaron al termociclador y se incubaron durante 2 minutos a 25°C, y se les agregó 1µl de la enzima SuperScript II RT (reversa transcriptasa, 50 unidades). La síntesis se hizo en el termociclador, 10 minutos a 25°C, después 50 minutos a 42°C y terminar las reacciones a 72°C durante 15 minutos. Finalmente los tubos se centrifugaron brevemente, y se les añadió 1µl de RNasa H incubándose 20 minutos a 37°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

#### **11.- Determinación de mRNA por qPCR.**

El análisis de mRNA extraído se realizó en un termociclador (Step One Plus de Applied Biosystems, Carlsbad, CA) para la expresión del mRNA de 18S, TLR9, IL10 e IRGM. Las muestras y reactivos fueron procesados por separado. Se realizó una dilución 1:3 del cDNA obtenido de las muestras a procesar con agua DEPC para cada gen. Se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorff de 1.5ml (6.25µl de agua DEPC, 12.5µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 1.25µl de la sonda para cada gen (18S, TLR9, IL10 e IRGM, todas de Applied Biosystems, para un solo pozo de la placa). Se colocaron 34µl de la mezcla de reacción a los tubos y se les agregó 8µl de la dilución del cDNA (1:3), se centrifugaron brevemente. Se colocaron 20µl de la mezcla por pozo de una placa para reacción óptica de 96 pozos (placa para PCR), cubriéndose la placa con una membrana óptica adhesiva. Posteriormente se procesaron las muestras en el termociclador para la reacción de PCR en tiempo real (con temperaturas de ciclado de 2 horas a 50°C, 10 minutos a 95°C, y 60°C), y la expresión génica se determinó por el método de cuantificación relativa ( $\Delta\Delta CT$ ).

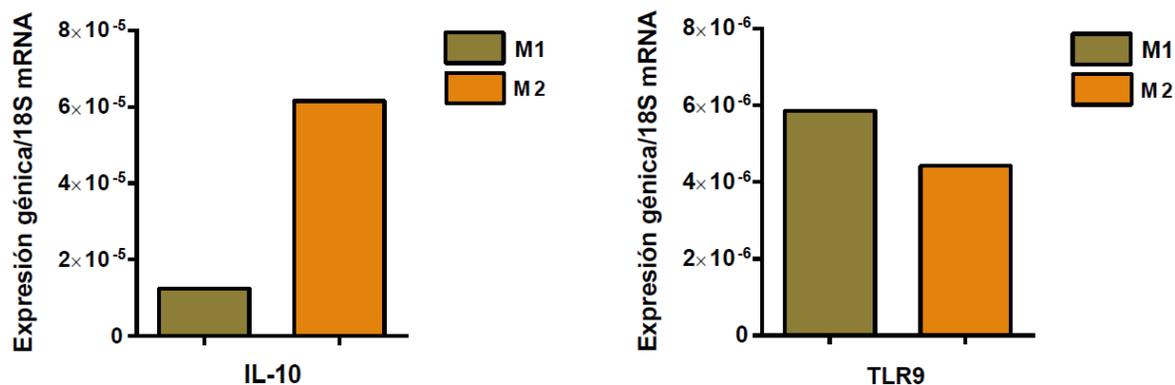
## **12.- Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron utilizando pruebas no paramétricas para datos no relacionados (Kruskal-Wallis test y U de Mann Withney), o para pares de datos no relacionados (Suma de rangos de Wilcoxon y Friedman test) según el diseño del experimento. También se utilizó Kolmogorov-Smirnov test la prueba de Wilcoxon para evaluar la diferencia contra una mediana hipotética (1) en los experimentos de autofagia. Todos los valores se expresan como la mediana. Se consideró significancia estadística con  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism, versión 6, y el programa estadístico de análisis de matrices complejas de datos de citometría de flujo Spice, versión 5.1.

## **RESULTADOS**

### **1. Polarización de macrófagos a fenotipos M1 y M2**

En este proyecto se emplearon dos protocolos de polarización para generar macrófagos M1 y M2 previamente establecidos (Buendía Montserrat, datos no publicados usados con permiso), en el Apéndice 3 se muestran los protocolos que inducen la diferenciación de los dos tipos de macrófagos. Nosotros incluimos la expresión del mRNA de IL-10 como otro parámetro para confirmar el proceso de polarización. La evidencia experimental confirma el proceso de diferenciación y muestra la inducción de la expresión del gen IL-10, que por definición debe estar ausente en los macrófagos M1 y presente en los M2 (Fig. 5a). Adicionalmente investigamos la expresión génica de TLR9 para establecer que nuestras células tienen el potencial de detectar DNAMtb, y que la expresión del gen TR9 es más abundante en macrófagos M1 que en los M2 (Fig. 5b).



**Figura 5.** Expresión génica de IL-10 y TLR9 en macrófagos M1 y M2. A partir de los lisados celulares se preparó cDNA para la cuantificación de la expresión génica de IL-10 y TLR9, de acuerdo a la abundancia relativa del gen 18S RNA por PCR en tiempo real (qPCR), método del Ct comparativo. Se muestra la mediana, no hay diferencias estadísticas, n=4.

## 2. Caracterización de las poblaciones de macrófagos M1 y M2

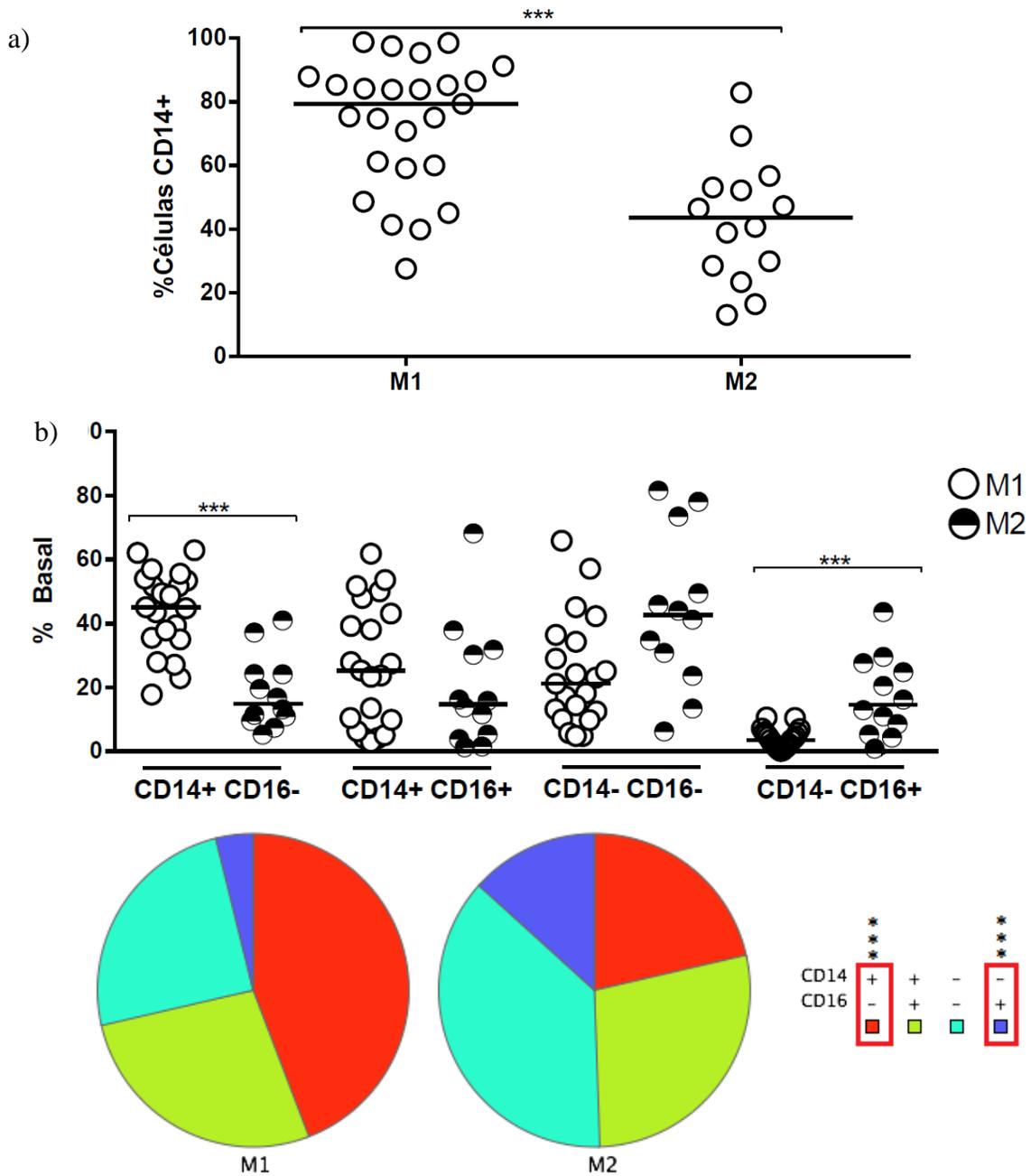
### Expresión basal en el porcentaje de CD14 y CD16 en macrófagos M1 y M2

EL CD14 es un antígeno de superficie, también co-receptor de LPS. Se expresa en células mielomonocíticas (preferentemente en monocitos y macrófagos), sus ligandos son endotoxinas, LPS, TLR4, TLR2 y la proteína de unión a lipopolisacárido (LPB). El CD16 es el receptor FcγR de baja afinidad, participa en la modulación de la fagocitosis, y se expresa en neutrófilos, células NK y macrófagos. Ambos marcadores se han utilizado para la caracterización de macrófagos proinflamatorios (M1) o antiinflamatorios (M2).

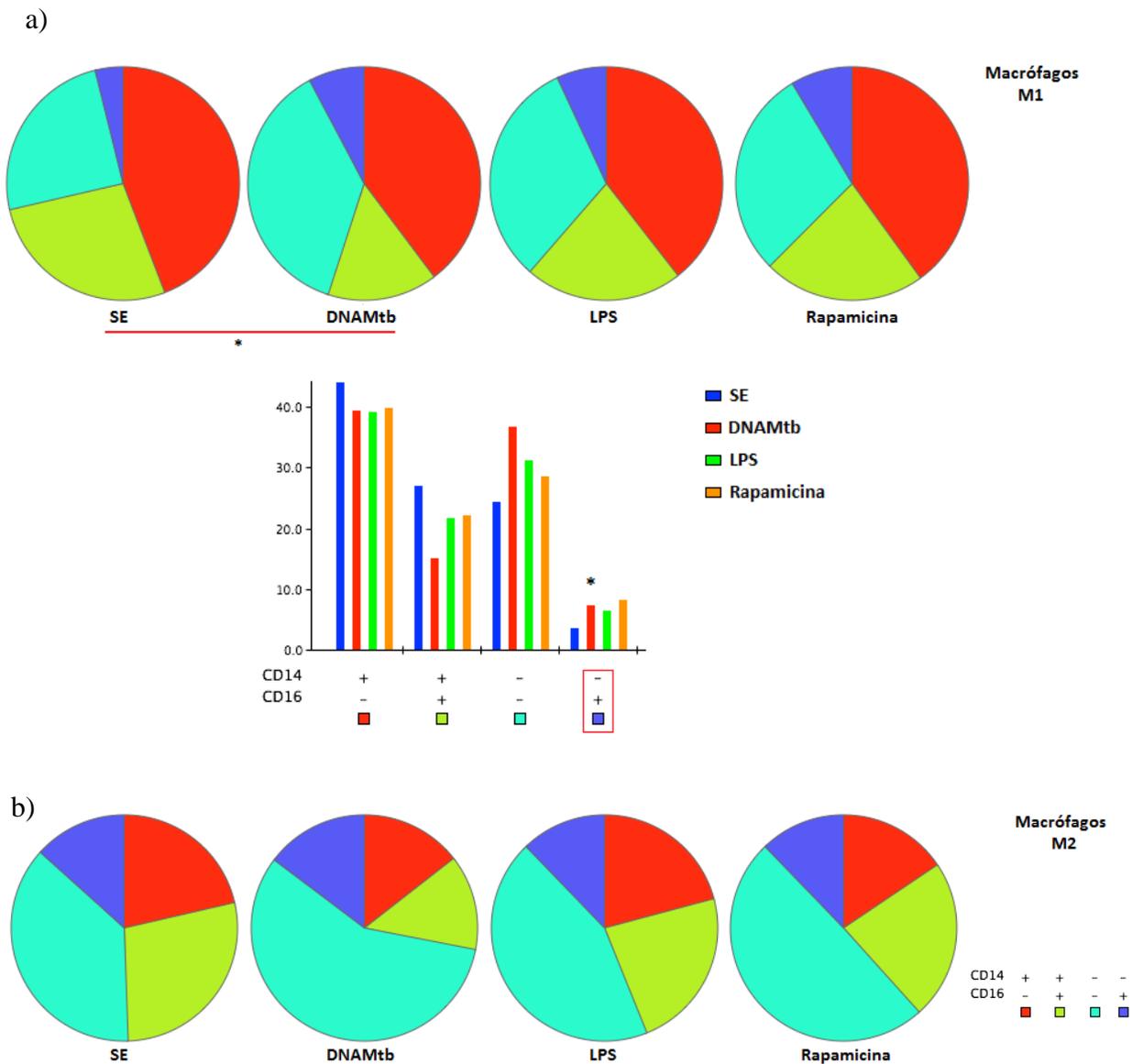
La expresión de CD14 en macrófagos M1 fue significativamente mayor (células CD14+ mediana de 79.3 [rango de 27.6-98.7]) que en macrófagos M2 (mediana de 43.6 [rango de 13.10-82.9]), n=14-25, \*\*\*p<0.0009, Fig. 6a. La expresión de CD14 y CD16 distingue cuatro fenotipos (CD14+CD16-, CD14+CD16+, CD14-CD16- y CD14-CD16+). El porcentaje de células CD14+CD16- fue significativamente diferente entre las dos poblaciones de macrófagos, con mayor expresión en macrófagos M1, mediana de 45.1 (rango de 17.8-62.9) que en M2, con una mediana de 15 (rango de 5.2-41). El porcentaje de células CD14-CD16+, en los macrófagos M1 fue menor, mediana de 3.6 (rango de 0.1-10.6), y en los macrófagos M2 fue mayor, mediana de 14.55 (rango de 0.9-43.6), n=12-21, \*\*\*p<0.002, Fig. 6b.

### **Efecto de la estimulación con DNAMtb la expresión de CD14 y CD16 de macrófagos M1 y M2**

Después de evaluar el fenotipo inicial de los macrófagos, evaluamos si la estimulación con DNAMtb podía modificar ese fenotipo. En macrófagos M1 hubo diferencias significativas a la estimulación con DNAMtb, observándose un aumento en el porcentaje de células CD14-CD16+ respecto al de células sin estimular, n=13, \* p<0.02, Fig. 7a. Mientras que en macrófagos M2 no hubo diferencias significativas de los fenotipos en respuesta a ningún estímulo, n=13, Fig.7b.



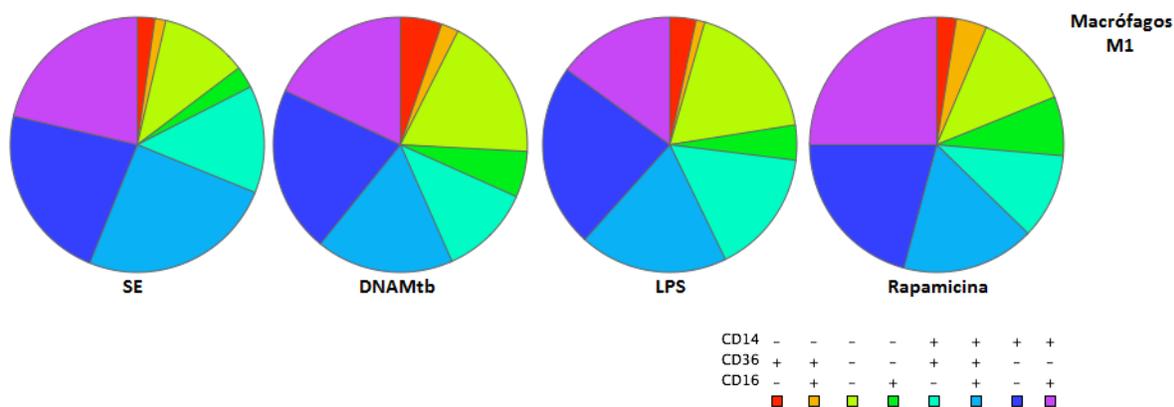
**Figura 6.** Expresión basal en el porcentaje de CD14 y CD16 en macrófagos M1 y M2. a) Porcentaje de CD14+ en macrófagos M1 y M2. b) Porcentaje basal de los cuatro fenotipos de CD14 y CD16 en ambas poblaciones de macrófagos, presentados en una gráfica de columnas y en gráficas de pastel para la distribución de los cuatro fenotipos de CD14 y CD16 una mejor representación de las moléculas expresadas en cada tipo celular. Los datos fueron adquiridos por citometría de flujo, la estrategia de análisis de expresión de estas moléculas por citometría de flujo se muestra en el Apéndice 5, n=12-25, \*\*\*p<0.002.



**Figura 7.** Evaluación de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14 y CD16 de macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1 (a) y M2 (b) fueron estimulados con 10µg/ml de DNA de Mtb H37Rv, 100ng/ml de LPS, y 100ng/ml de Rapamicina durante 24h. Las gráficas de pastel representan la distribución de los cuatro fenotipos de CD14 y CD16 en ambas poblaciones de macrófagos. La gráfica de barras en M1 (a) muestra la distribución de los cuatro fenotipos de CD14 y CD16 respecto a cada estimulación. Los datos fueron adquiridos por citometría de flujo, la estrategia de análisis de expresión de estas moléculas por citometría de flujo se muestra en el Apéndice 5, n=13, \*p<0.02.

## Efecto de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14, CD36 y CD16 en macrófagos M1 y M2

No se observaron diferencias en el porcentaje de subpoblaciones con expresión diferencial de estas moléculas en los macrófagos M1 estimulados con DNAMtb, rapamicina y LPS (Fig.8), al igual que no hubo diferencias en los macrófagos M2 (datos no mostrados). La estrategia de análisis de expresión de estas moléculas por citometría de flujo se muestra en el Apéndice 6.



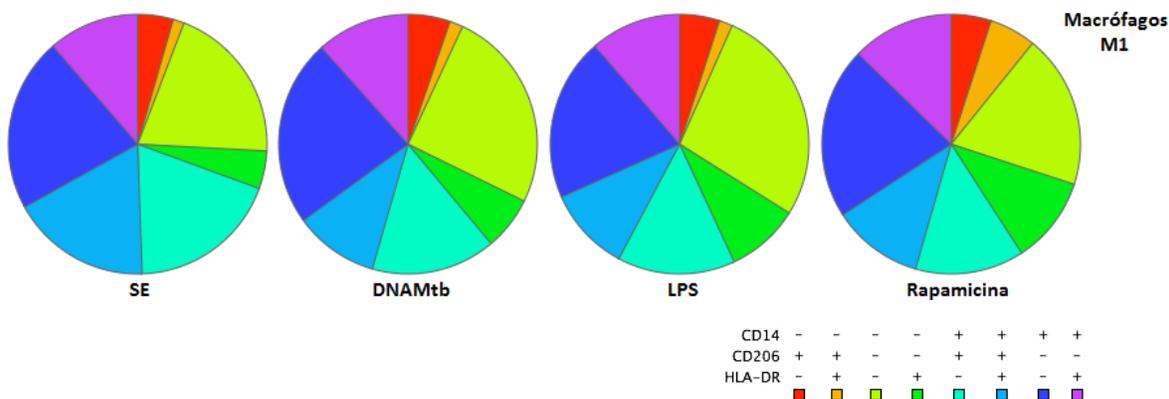
**Figura 8.** Evaluación de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14, CD36 y CD16 en macrófagos M1. Los macrófagos fueron estimulados con 10µg/ml de DNA de Mtb H37Rv, 100ng/ml de LPS, y 100ng/ml de Rapamicina durante 24h. El porcentaje de su expresión fue cuantificada por citometría de flujo. La estrategia de análisis de expresión de estas moléculas se muestra en el Apéndice 6, n=15.

## Efecto de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14, CD206 y HLA-DR en macrófagos M1 y M2

El CD206 es el receptor de manosa, facilita la endocitosis y fagocitosis. El HLA-DR es esencial en la presentación de antígenos exógenos, el aumento en su expresión se relaciona a actividad autofágica.

Los distintos estímulos no modificaron las proporciones de macrófagos M1 que expresan distintas combinaciones de CD14, CD206 y HLA-DR (Fig. 9), al igual que no hubo

diferencias en los macrófagos M2 (datos no mostrados). El análisis de expresión de estas moléculas por citometría de flujo se muestra en el Apéndice 6.



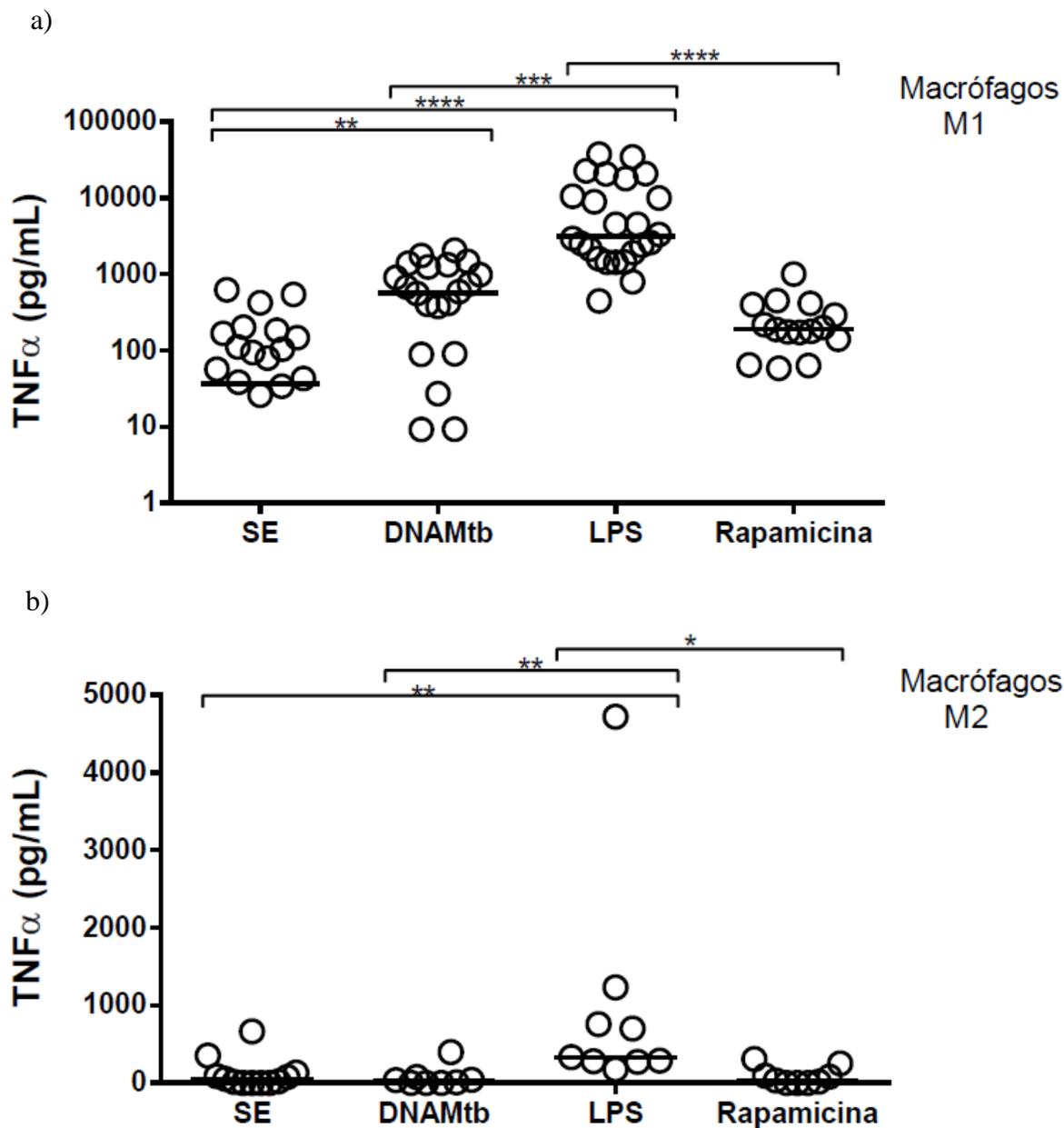
**Figura 9.** Evaluación de la estimulación con DNAMtb en la expresión de CD14, CD206 y HLA-DR en macrófagos M1. Los macrófagos fueron estimulados con 10µg/ml de DNA de Mtb H37Rv, 100ng/ml de LPS, y 100ng/ml de Rapamicina durante 24h. Su expresión fue cuantificada por citometría de flujo. La estrategia de análisis de expresión de estas moléculas se muestra en el Apéndice 6, n=17.

### 3. Producción de TNF-α

**Los macrófagos M1 responden a la estimulación con DNAMtb con producción moderada de TNF-α.**

Una vez que se demostró que el DNAMtb no modificó el fenotipo de los macrófagos M1 y M2, se evaluó si éstos eran capaces de activar la producción de TNF-α. En macrófagos con fenotipo M1, el DNAMtb induce la producción significativa de TNF-α comparado con el de las células sin estimular (mediana de 572.5pg/ml [rango de 0-2048pg/ml]) y tratadas con rapamicina (189pg/ml [rango de 58.21-997.4pg/ml]). La producción de TNF-α inducida es significativamente menor comparada con LPS (3105pg/ml [rango de 443.3-37000pg/ml]), el cual es un potente inductor de esta citocina, n=15-28 \*\*\*\*p<0.0001, \*\*p<0.002, Fig. 10a. En macrófagos M2 solo se indujo la producción de TNF-α por LPS comparada con el de las células sin estimular (mediana de 333.6pg/ml [rango de 175.1-4714pg/ml], con rapamicina

se obtuvo una mediana de 35.9pg/ml [rango de 0-310.7pg/ml], y con DNAMtb, una mediana de 24.7pg/ml [rango de 0-398.3pg/ml]), n=8-12, \*\*p<0.002, Fig. 10b.



**Figura 10.** Producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos M1 (a) y M2 (b). Las células fueron estimuladas durante 24h con 10 $\mu$ g/ml DNAMtb H37Rv, 100ng/ml de LPS, y 500ng/ml de rapamicina. La producción de TNF- $\alpha$  se determinó por ELISA en los sobrenadantes. n=8-28. \*\*\*\*p<0.0001, \*\*\*p<0.001, \*\* p<0.002, \* p<0.05.

### **El oligodesoxinucleótido inhibidor (ODN-I) disminuye la producción de TNF- $\alpha$ inducida por DNAMtb en macrófagos M1.**

Para evaluar si el TNF- $\alpha$  inducido por DNAMtb en macrófagos depende de la estimulación del TLR9, se utilizó un inhibidor, el ODN-I (oligodesoxinucleótido sintético inhibidor con secuencias no metiladas CpG), el cual bloquea la respuesta dependiente de TLR9.

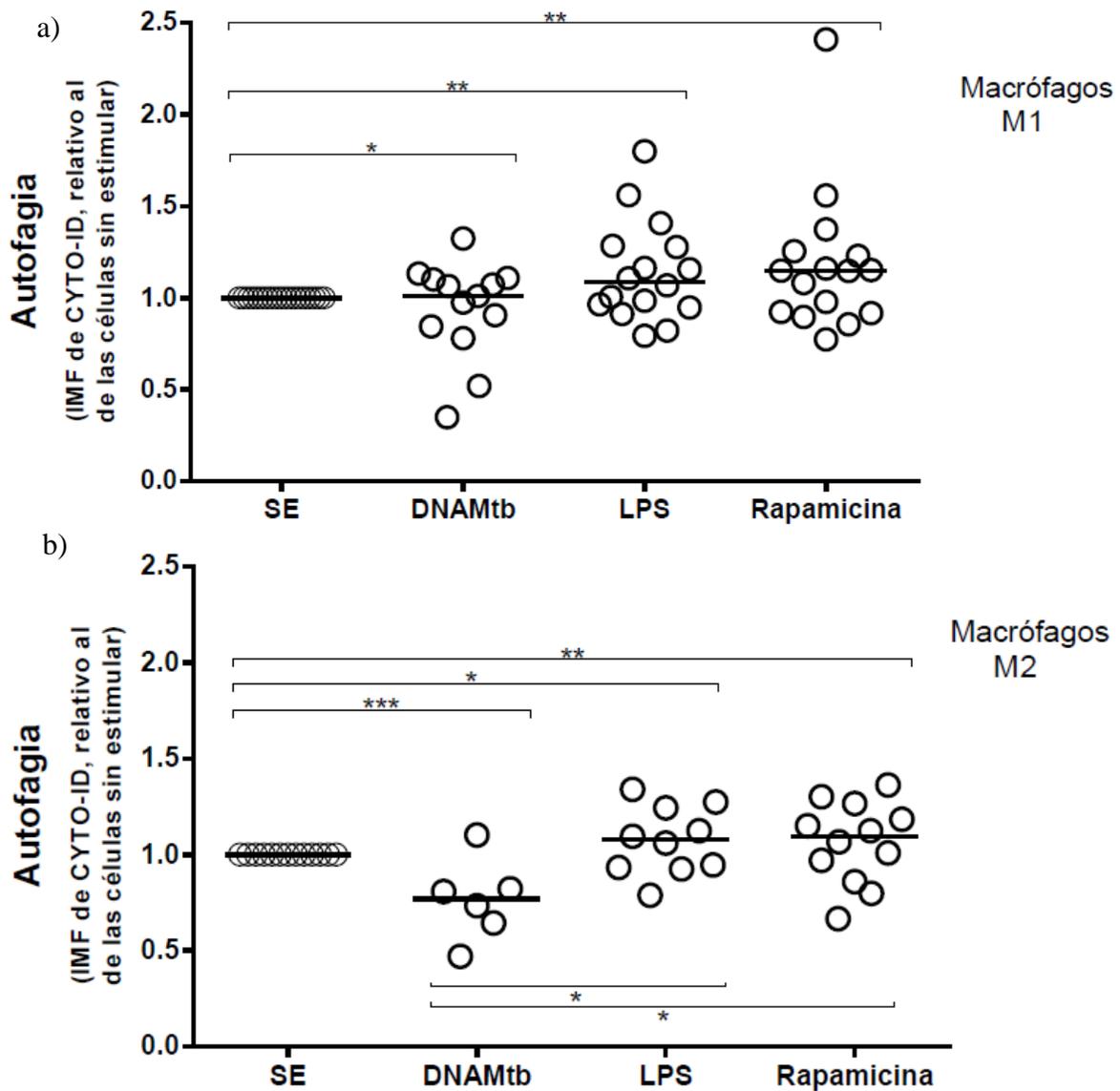
Se estimularon células M1 y M2 durante 24h con LPS, DNAMtb, y ODN-I + DNAMtb. La producción de TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos M1 a la estimulación con DNAMtb disminuyó por adición del oligonucleótido bloqueador de TLR9 (mediana de 572.1pg/ml [rango de 0-2048pg/ml]) a la estimulación con DNAMtb y 71.74pg/ml [rango de 0-782.9pg/ml] en presencia del inhibidor de TLR9, n=5-28, \*\*\*p<0.001, Fig. 11a. En macrófagos M2 la producción de TNF- $\alpha$  no se modificó en respuesta a ningún estímulo, Fig. 11b.

### **4. Evaluación de la inducción de Autofagia por estimulación con DNAMtb en macrófagos M1 y M2**

Se ha reportado que la infección de macrófagos murinos con Mtb induce autofagia, pero no la inducción de autofagia por DNAMtb en macrófagos humanos. La autofagia puede detectarse mediante el uso de CYTO-ID, éste es un colorante acidotrópico que detecta vesículas autofágicas completamente cerradas, ya que el proceso debe haber terminado para poder detectarlo. Si el proceso se mide fuera de tiempo (8-18 horas) no se verán las vesículas, y si éste es incipiente tampoco. La estrategia de análisis de autofagia por citometría de flujo se muestra en el Apéndice 4.

En macrófagos M1, la estimulación con DNAMtb indujo autofagia respecto a células sin estimular en base al aumento de la intensidad media de fluorescencia (IMF) (mediana de 1.009 [rango de 0.3475-1.323]), al igual que por estimulación con rapamicina (mediana de 1.147 [rango de 1.147-2.41]) y LPS (mediana de 1.087 [rango de 0.791-1.8]), n=13-19, Fig. 12a.



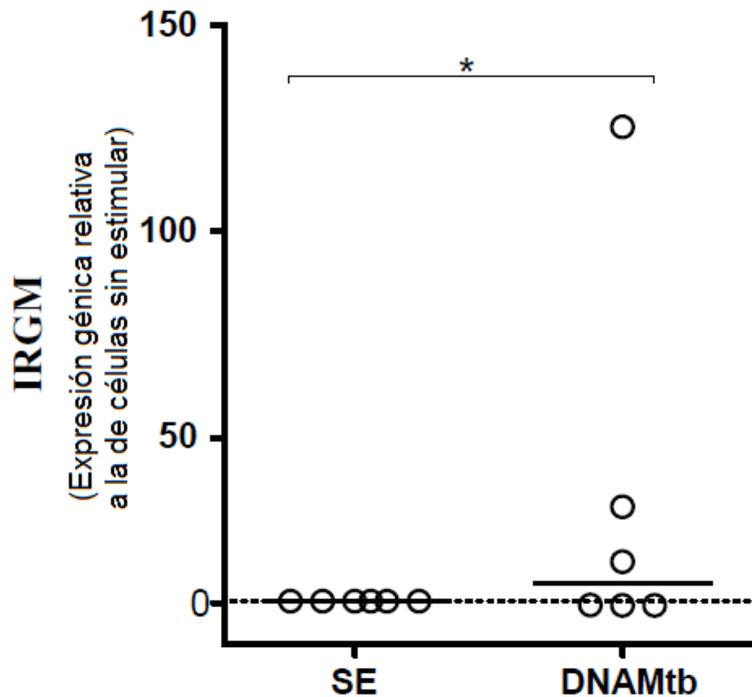


**Figura 12.** Evaluación de autofagia por estimulación con DNAMtb en macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1 (a) y M2 (b) fueron estimulados con 10mg/ml de DNAMtb, 100ng/ml de LPS y 500ng/ml de rapamicina durante 24h. La autofagia se determinó por citometría de flujo con la sonda CYTO-ID, n=7-19, \*p<0.02, \*\*p<0.007, \*\*\*p<0.0005.

### 5. Expresión génica de IRGM en macrófagos M1 por estimulación con DNAMtb

Para comprobar la inducción de autofagia por los macrófagos M1 se evaluó la expresión génica de IRGM, una GTPasa de macrófagos humanos que es inducida durante el proceso de

autofagia. La expresión del gen IRGM a la inducción de DNAMtb tuvo diferencias significativas respecto al de células sin estimular, con una mediana de 5.578 (rango de 0.00353-121.4), n=6 \*p<0.02, Fig. 13.

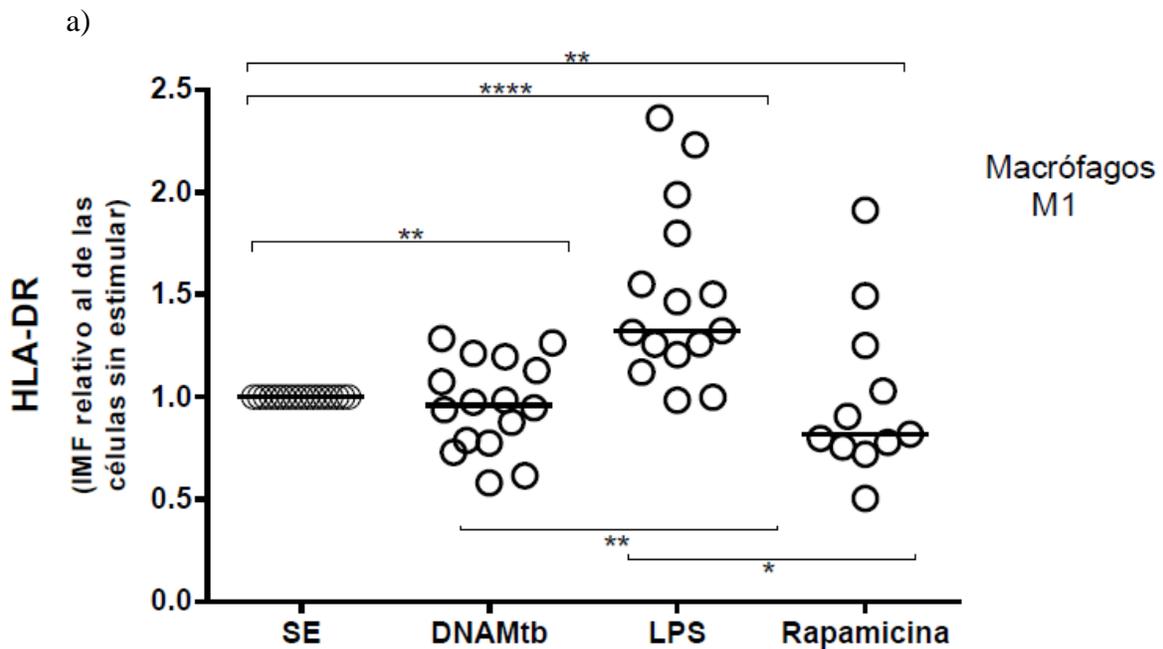


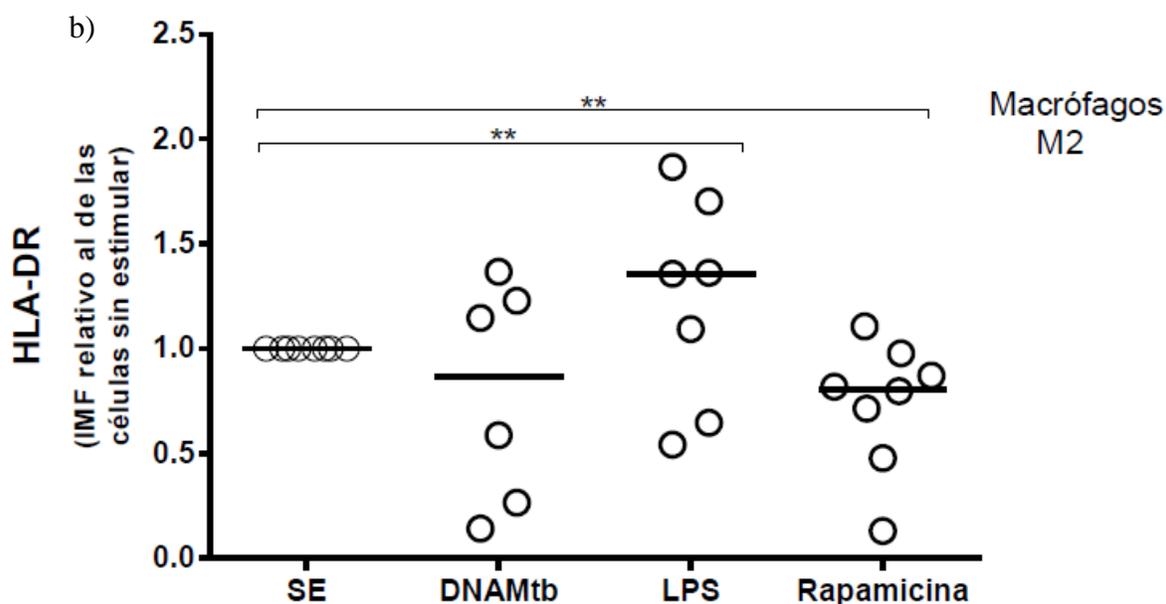
**Figura 13.** Expresión génica de IRGM en macrófagos M1 por estimulación con DNAMtb. Las células fueron estimuladas con 10mg/ml de DNAMtb durante 24h. A partir de los lisados celulares se preparó cDNA para la cuantificación de la expresión génica de IRGM por PCR en tiempo real, método del Ct comparativo, n=6 \*p<0.02.

## 6. Evaluación de HLA-DR ante la estimulación con DNAMtb en macrófagos M1 y M2

HLA-DR, el acrónimo de antígeno leucocitario humano (por sus siglas en inglés: *Human Leukocyte Antigen*), es la designación genética para el MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de ser humano de clase II. Se expresa en macrófagos, linfocitos T activados, linfocitos B, células dendríticas, epiteliales y endoteliales, es esencial en la presentación de antígenos exógenos. Se ha reportado que la autofagia induce un aumento en la expresión de clase II.

En macrófagos M1 hubo una disminución significativa en la expresión de HLA-DR a la estimulación con DNAMtb (mediana de 0.9603 [rango de 0.5793-1.285]) y rapamicina (mediana de 0.8185 [rango de 0.5046-1.912]) respecto a las células sin estimular. Y con estimulación de LPS hubo un incremento en la expresión de HLA-DR (mediana de 1.324 [rango de 0.9844-2.362]),  $n=11-17$ ,  $**p<0.009$ ,  $****p<0.0001$ , Fig. 14a. En macrófagos M2 no hubo diferencias significativas con respecto a la estimulación con DNAMtb, pero si una disminución significativa a la estimulación con rapamicina (mediana de 0.807 [rango de 0.129-1.106]), y un aumento en la expresión de HLA-DR respecto al LPS (mediana de 1.357 [rango de 0.549-1.868]),  $n= 6-8$ ,  $**p<0.07$ , Fig. 14b.





**Figura 14.** Evaluación de HLA-DR ante la estimulación con DNAMtb en macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1 (a) y M2 (b) fueron estimulados con 10µg/ml de DNA de Mtb H37Rv, 100ng/ml de LPS, y 100ng/ml de rapamicina durante 24h. La expresión de HLA-DR fue cuantificada por citometría de flujo, n=6-17, \*\*p<0.07, \*\*\*\*p<0.0001.

## DISCUSIÓN

*Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno intracelular que ha desarrollado eficientes mecanismos de evasión para contrarrestar los procesos inmunes del huésped. Es el mejor ejemplo de supervivencia y replicación bacteriana dentro de los fagocitos al lograr un estado latente en el ambiente hostil de los macrófagos (Barry *et al.*, 2009; Borrero *et al.*, 2011; Yuk *et al.*, 2012; Simeone *et al.*, 2012; Goletti *et al.*, 2013;).

Un mecanismo esencial para mantener la homeostasis mediante la degradación de proteínas, eliminación de orgánulos celulares dañados y patógenos intracelulares como Mtb es la autofagia (Shin, *et al.*, 2010; Watson *et al.*, 2012; Deretic, 2012). Se ha demostrado que algunas micobacterias, incluyendo Mtb y el bacilo Calmette-Guérin de *Mycobacterium bovis*

(BCG) contienen motivos CpG, potentes inmunoestimuladores de la respuesta inmune innata (Bafica, et al., 2005; Saitoh and Akira, 2010). Y que en infección de macrófagos murinos por BCG se activa la autofagia (Gutiérrez *et al*, 2004), evidenciando el papel de la autofagia en la eliminación de patógenos intracelulares. Por esta razón utilizamos el DNA de Mtb como PAMP, en la infección de macrófagos humanos.

Para evaluar la autofagia, como mecanismo innato ante infección intracelular, se emplearon macrófagos humanos diferenciados de monocitos polarizados a los fenotipos M1 y M2. Los macrófagos M1 presentan un fenotipo proinflamatorio, y los macrófagos M2 un fenotipo antiinflamatorio (Buendía Monserrat, datos no publicados). Antes de abordar el estudio de autofagia definimos las poblaciones de macrófagos en estudio a través de la detección de marcadores de diferenciación; esto con el propósito de establecer no sólo si el DNAMtb puede inducir autofagia sino en qué tipo de macrófagos lo puede hacer. Esta distinción es particularmente necesaria porque en el proceso de polarización *in vitro* no todas las células se diferencian y al final del proceso tenemos una mezcla heterogénea de macrófagos. Primero evaluamos el porcentaje de células que expresan CD14 y CD16. El 80% de los macrófagos M1 son CD14+, mientras que solo el 40% de los M2 lo son. También se encontraron diferencias significativas en la expresión del fenotipo CD14+CD16-, con un 45% para macrófagos M1 y solo el 15% para los macrófagos M2.

Se ha reportado que la mayor representación de los monocitos de sangre periférica son CD14+CD16- y que estos median respuestas inflamatorias (Subimerb *et al*. 2010), punto a nuestro favor para tomar en cuenta a los macrófagos M1 como nuestro mejor modelo de infección en posteriores investigaciones. Este fenotipo fue el predominante cuando se estimularon las células con DNAMtb en los macrófagos M1.

Por definción, los macrófagos M1 son CD14+CD16+CD36- y CD14+CD206-HLA-DR+, los M2 son CD14-CD16-CD36+ y CD14-CD206+HLA-DR-/+. Cuando investigamos si la estimulación con DNAMtb podía inducir una modificación del fenotipo de los macrófagos observamos que no lo hace. La falta de modificación en el fenotipo es importante porque la respuesta permanece pro-inflamatoria y no se modifica hacia un fenotipo regulador anti-inflamatorio cuando se utiliza DNAMtb como estímulo. Esto significa que estas células

permanecen con su capacidad de activar mecanismos antimicrobianos, lo cual es de gran utilidad si pensamos en la posible utilización de este PAMP como adyuvante o inmunomodulador. Una ventaja adicional es la generación de una producción de TNF- $\alpha$  moderada.

La producción de TNF- $\alpha$  es esencial para el control de Mtb en los seres humanos y en animales experimentales, al activar a los macrófagos que mataran a las micobacterias intracelulares (Hristodorov *et al.*, 2012) pero una producción excesiva puede ser perjudicial. Nosotros encontramos que en los macrófagos denominados M2 no hubo producción de TNF- $\alpha$  ante la estimulación con DNAMtb, confirmando la actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria de estas células. Mientras que en los macrófagos M1, si hubo respuesta a la estimulación con DNAMtb con una producción significativa de TNF- $\alpha$ , respecto a macrófagos sin estimulación, y además la producción fue cinco veces menor que la inducida por el LPS, el cual se conoce como potente inmunoestimulador. Este resultado es positivo en nuestro modelo experimental, puesto que se conoce que la producción excesiva de TNF- $\alpha$  contribuye a la inmunopatología de las infecciones (Simeone *et al.*, 2012; Mansilla and Colombo, 2013).

Sabiendo que teníamos células respondedoras a la estimulación por DNAMtb, evaluamos la autofagia, encontrando que nuestras células eran capaces de activar dicho mecanismo, al igual que con estimulación por rapamicina (control positivo de autofagia), respecto a macrófagos sin estimulación con el PAMP. Para confirmar la actividad de autofagia, se evaluó la expresión génica de IRGM, el cual está relacionado con la autofagia (Levine, *et al.*, 2011). IRGM es una GTPasa con actividad antimicrobiana, perteneciente a la familia p47 (homólogo de ratón, LRG-47). En ratones IRGM<sup>-/-</sup> muestran mayor susceptibilidad a patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes* y *Toxoplasma gondii*. La proteína Irgm 1 (relacionada con la inmunidad de guanosina trifosfato p47, también llamada LRG47) es crítica en la inducción de autofagia inducida por IFN $\gamma$  frente a Mtb (Limbergen *et al.* 2009). Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la expresión génica de IRGM en macrófagos M1 al ser estimulados con DNAMtb, comparados con macrófagos sin estimular. Estudios posteriores serán necesarios para establecer con precisión el mecanismo

de autofagia inducido por DNAMtb y las implicaciones del mismo a nivel de patogénesis de la infección por Mtb; mientras, administrando de manera exógena este componente microbiano puede ser un buen inmunomodulador.

La actividad autofágica se relaciona con un aumento en la expresión de HLA. Sin embargo, nuestras células al ser estimuladas tanto por DNAMtb y rapamicina no aumentan el número de moléculas de clase II (HLA-DR), al contrario hay una disminución significativa de su expresión ante ambas estimulaciones. Resultado inesperado, porque un aumento en la presentación de antígenos exógenos por clase II se ha reportado tanto en inducción de autofagia como en reconocimiento por TLR9 (Carvalho *et al.* 2011; Deretic, 2012). Sin embargo, podemos suponer que al ser ocupadas porciones de membrana plasmática, y de otros organelos, para la generación del autofagosoma hay una internalización de estos receptores, y por tanto disminuye su presencia en la superficie. También es posible que al estar cercanas al sitio de degradación que representa el autofagosoma se favorezca la presentación antigénica pero nuestra metodología no nos permitió evaluar esta hipótesis.

Estos resultados indican que nuestro modelo es adecuado para la evaluación de la estimulación con DNAMtb en macrófagos humanos, y también nos indican que no todas nuestras células son capaces de responder de la misma forma al PAMP, tanto en la producción de TNF- $\alpha$  como en la actividad autofágica. Para su mejor caracterización, podrían emplearse microscopía electrónica o de fluorescencia, la cual nos permitiría visualizar el proceso de autofagia y corroborar dicho mecanismo como modulador de la respuesta innata.

Un análisis exhaustivo de los mecanismos involucrados en esta respuesta contribuirá a esclarecer aspectos cruciales de:

- 1) La patogénesis de la tuberculosis.
- 2) El uso de componentes de DNAMtb como adyuvante de vacunas.
- 3) La activación de autofagia como blanco terapéutico contra Mtb.

## CONCLUSIÓN

- El reconocimiento del DNA de *Mycobacterium tuberculosis* por macrófagos humanos con fenotipo M1 induce una respuesta innata hacia un fenotipo proinflamatorio, con producción moderada de TNF- $\alpha$ .
- La autofagia ocurre ante la estimulación por DNAMtb en macrófagos humanos M1, por definición macrófagos proinflamatorios y antimicrobianos.
- Se necesitan esclarecer los mecanismos intracelulares en la activación de autofagia ante la estimulación con DNAMtb.

## BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Bafica, Andre; Scanga, Charles A.; Feng, Carl G.; Leifer, Cynthia; Cheever, Allen and Sher, Alan. 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *JEM*, Vol. 202(12), 1715–1724
- ❖ Barry, Clifton E.; Boshoff, Helena; Dartois, Véronique; Dick, Thomas; Ehrt, Sabine; Flynn, JoAnne, Schnappinger, Dirk; Wilkinson, Robert J. and Young, Douglas, 2009. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature Microbiology*, Vol. 7: 845-855
- ❖ Bellot, Gregory L.; Liu, Dan and Pervaiz, Shazib. 2013. ROS, autophagy, mitochondria and cancer: Ras, the hidden master? *Mitochondrion* Vol.13, 155–162
- ❖ Benoit, Marie; Desnues, Benoît and Mege, Jean-Louis, 2008. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology*, 181: 3733-3739
- ❖ Borrero, Reinier; Álvarez, Nadine; Reyes, Fátima; Sarmiento, María Elena y Acosta, Armando, 2011. *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. *Vacci Monitor*, Vol.20:1, 34-38
- ❖ Blasius, A. & Beutler, B. 2010. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity Review*. 32: 305-315

- ❖ Cartes, Parra Juan Carlos, 2013. Breve Historia de la Tuberculosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, LXX: 605, 145-150
- ❖ Carvalho *et al.* 2011. Toll-Like Receptor 9 Is Required for Full Host Resistance to *Mycobacterium avium* Infection but Plays No Role in Induction of Th1 Responses. *Infection and immunity*, Vol. 79, N. 4: 1638–1646
- ❖ Cooper, Edwin L., 2001. Immune Response: Evolution. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-8
- ❖ Deretic, Vojo. 2011. Autophagy in Immunity and Cell-Autonomous Defense Against Intracellular Microbes. *Immunol Rev.*, Vol. 240(1), 92-104
- ❖ Deretic, Vojo. 2012. Autophagy: An Emerging Immunological Paradigm. *The Journal of Immunology*, 189: 15–20
- ❖ Dye, C. and Williams, B.G., 2010. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* 328, 856–861
- ❖ Erbel, Christian; Rupp, Gregor; Helmes, Christian M.; Tyka, Mirjam; Linden, Fabian, *et al.*, 2013. An *In vitro* Model to Study Heterogeneity of Human Macrophage Differentiation and Polarization. *Journal of Visualized Experiments*, Vol.76, 1-8
- ❖ Ernst, Joel D., 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Immunology*, Vol.12: 581-591
- ❖ Galli, Stephen J.; Borregaard, Niels and Wynn, Thomas A., 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, Vol.12: 1035-1044
- ❖ Goletti, D. *et al.* 2013. Autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* infection: A passepartout to flush the intruder out? *Cytokine Growth Factor Rev.* XXX: 1-9
- ❖ Gordon, Siamon, 2007. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 117:1, 89-93
- ❖ Gutierrez, M. G.; S. S. Master; S. B. Singh; G. A. Taylor, *et al.*, 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119: 753–766.
- ❖ Gordon, Siamon, 2003. Alternative Activation of Macrophages. *Nature Immunology*, Vol. 3: 23-35
- ❖ Harari, Alexandre; Rozot, Virginie; Enders, Felicitas Bellutti; Perreau, Matthieu; Stalder, Jessica Mazza, *et al.*, 2011. Dominant TNF- $\alpha$ + *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cell response discriminate between latent infection and active disease. *Nature Medicine*, Vol.17:3, 372-377

- ❖ Hristodorov, Dmitrij; Mladenov, Radoslav; Huhn, Michael; Barth, Stefan and Thepen, Theo, 2012. Macrophage-Targeted Therapy: CD64-Based Immunotoxins for Treatment of Chronic Inflammatory Diseases. *Toxins*, Vol.4: 676-694
- ❖ Juarez *et al.* 2010. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respiratory Research*. 11, 2: 1-13
- ❖ Kapetanovic, Ronan; Fairbairn, Lynsey; Downing, Alison; Beraldi, Dario; Sester, David, *et al.*, 2013. The impact of breed and tissue compartment on the response of pig macrophages to lipopolysaccharide. *BioMed Central Genomics*, Vol.14: 581
- ❖ Kasperkovitz *et al.* 2010. TLR9 Is Actively Recruited to *Aspergillus fumigatus* Phagosomes and Requires the N-Terminal Proteolytic Cleavage Domain for Proper Intracellular Trafficking. *The Journal of Immunology*, 185: 7614–7622
- ❖ Kasperkovitz, P. *et al.* 2011. Toll-Like Receptor 9 Modulates Macrophage Antifungal Effector Function during Innate Recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Infection and Immunity*, Dec. Vol.79, N.12: 4858–4867
- ❖ Kim, Joungmok; Chul, Kim Young; Fang, Chong; C. Russell, Ryan; Kim, Hee Jeong *et al.* 2013. Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy. *Cell*, Vol. 152, 290-303
- ❖ Kittan N. A; Allen R. M; Dhaliwal A.; Cavassani K. A.; Schaller M., *et al.*, 2013. Cytokine Induced Phenotypic and Epigenetic Signatures Are Key to Establishing Specific Macrophage Phenotypes. *PLoS One* 8:10
- ❖ Knuefermann *et al.* 2007. CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respiratory Research*, Vol. 8:72, 1-9
- ❖ Kumagai, Yutaro and Akira, Shizuo. 2012. Nucleic Acid-Sensing TLR Signaling Pathways. *Landes Bioscience*, 40-57
- ❖ Lamb, A. Christopher; Yoshimori, Tamotsu and Tooze, Sharon, 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews*, Vol. 14, 759-774
- ❖ Levine, Beth; Mizushima, Noboru and Virgin, Herbert W., 2011. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, Vol. 469:7330, 323-335
- ❖ Limbergen, J. Van; Stevens, C.; Nimmo, E.R.; Wilson, D.C. and Satsangi, J. 2009. Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal Immunology*, Vol. 2:4, 315-330
- ❖ Mantovani, Alberto; Biswas, Subhra K.; Galdiero, Maria Rosaria; Sica, Antonio and Locati, Massimo, 2012. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *Journal of Pathology*, 229: 176–185
- ❖ Mansilla, Pareja Maria Eugenia and Colombo, Maria I., 2013. Autophagic clearance of bacterial pathogens: molecular recognition of intracellular microorganisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 3:54, 1-14

- ❖ Modlin, L. Robert and Bloom, R. Barry, 2013. TB or not TB: That is no longer the question. *State of the Art Review* Vol.5-213, 1-15
- ❖ Patrick, M. et al. 2009. *Microbiología Médica* (6a edición). España, pp 277-290
- ❖ Pereira, Leanne; Girardi, John Paul and Bakovic, Marica. 2011. Forms, Crosstalks, and the Role of Phospholipid Biosynthesis in Autophagy. *International Journal of Cell Biology*, Vol. 2012, 1-10
- ❖ Plüddeman, Annette Mukhopadhyay, Subhankar and Gordon Siamon, 2011. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunological Reviews*, Vol. 240: 11-24
- ❖ Philips, Jennifer A. and Ernst, Joel D., 2012. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, Vol.7: 353-384
- ❖ Saitoh, Tatsuya and Akira, Shizuo. 2010. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *JCB*, Vol. 189(6), 925-935
- ❖ Sharon, D. Ricardo; Harry van Goor and Allison A. Eddy, 2008. Macrophage diversity in renal injury and repair. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.118, 3522-3530
- ❖ Shin, Dong-Min; Jeon, Bo-Young; Lee, Hye-Mi; Jin, Hyo Sun; Yuk, Jae-Min, *et al.*, 2010. Mycobacterium tuberculosis Eis Regulates Autophagy, Inflammation, and Cell Death through Redox-dependent Signaling. *PLoS Pathogens*, Vol. 6:12, 1-15
- ❖ Sima, Corneliu and Glogauer, Michael, 2013. Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontology 2000*, Vol. 63: 80–101
- ❖ Simeone, R.; Bobard, A.; Lippmann, J.; Bitter, W.; Majlessi L., *et al.* 2012. Phagosomal Rupture by Mycobacterium tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death. *PLoS Pathogens*, Vol. 8:2, 1-13
- ❖ Smith, Kendall A., 2011. Edward Jenner and the small pox vaccine. *Frontiers in Immunology*, Vol.2: 21, 1-6
- ❖ Subimerb, C.; Pinlaor, S.; Lulitanond, V.; Khuntikeo, N.; Okada, S.; McGrath, M. S. and Wongkham S. 2010. Circulating CD14+CD16+ monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clinical and Experimental Immunology*, Vol. 161: 471–479
- ❖ Suzuki *et al.* 2005. Impaired Toll-like Receptor 9 Expression in Alveolar Macrophages with No Sensitivity to CpG DNA. *Am J Respir Crit Care Med* Vol. 171: 707–713
- ❖ Watson, Robert *et al.* 2012. Extracellular *M. tuberculosis* DNA Targets Bacteria for Autophagy by Activating the Host DNA-Sensing Pathway. *Cell*. 150, 803–815
- ❖ Xie, Zhiping; Nair, Usha and Kilonsky, Daniel J., 2008. Atg8 Controls Phagophoro Expansion during Autophagosome Formation. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 19: 3290-3298

- ❖ Yu, Xiaowen; Li, Chunmei; Hong, Weiling; Pan Weihua and Xie, Jianping. 2013. Autophagy during Mycobacterium tuberculosis infection and implications for future tuberculosis medications. *Cellular Signalling* Vol.25, 1272–1278
- ❖ WHO. Global tuberculosis report 2013. <http://www.who.int/tb/data>

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1

**Tabla de las proteínas involucradas en los principales pasos de la autofagia: nucleación, elongación y cierre del autofagosoma.**

Complejo de la proteína	Función del complejo proteico en la autofagia	Proteína específica	Propiedades generales	Funciones inmunológicas de defensa del huésped
<b>Nucleación, paso para la formación del autofagosoma</b>				
Complejo ULK	Complejo negativamente regulado por mTORC1 de manera dependiente de nutrientes. Después de la inducción de la autofagia, este complejo se transloca a estructuras autofágicas tempranas. Aunque FIP200 y ATG13 son conocidos por ser fosforilados por ULK1, sus sustratos siguen siendo desconocidos. FIP200 y ATG101 pueden tener	ULK1/2	Proteína quinasa fosforilada por mTORC1	Antibacterial*; antiviral
		ATG13	Fosforilada por mTORC1	Desconocida
		FIP200	Andamios para ULK1/2 y ATG13	Mantiene los números de células madre hematoyéticas fetales

	funciones similares a Atg17 de levadura a pesar de que no muestran similitud de secuencia con estas proteínas.	ATG101	Interactúa con ATG13	Desconocida
Complejo Clase III PI(3)K	Beclin 1 es negativamente regulada por BCL2 y BCL-XL a través de su unión directa. Este complejo produce PtdIns(3), probablemente sobre el retículo endoplasmático. Vps34, VPS15 y beclin 1 son compartidas con el complejo UVRAG, que parece funcionar a finales vía endocítica. Rubicon regula negativamente la fusión autofagosoma-lisosoma mediante la interacción con el complejo UVRAG.	VPS34	Quinasa PI(3)	Antiviral*; Maduración del fagosoma
		VPS15	Miristoiladas	Desconocida
		Beclin 1	Únicamente la protein BH3 interactúa con BCL2 y BCL-XL	Antibacterial*; antiviral*; aclaramiento de cuerpos apoptóticos; disminución de inflamación en tumores; regula la inducción del centro germinal; maduración del fagosoma; interactúa con la señalización de adaptadores TLR.
		ATG14	Subunidad específica de autofagia	Desconocida
		AMBRA1	Interactúa y activa a Beclin1	Desconocida
		UVRAG	Un homólogo de VPS38; interactúa con el complejo (HOPS) clase C	Desconocida
		Rubicon	Interactúa con Beclin1	Desconocida
Otros	DFCP1 forma un omegasoma sobre el retículo endoplasmático, donde se ensamblan otras proteínas ATG. ATG9, WIPI and VMP1 están presentes en la membrana autofágica. ATG9 también está en otros compartimentos como los endosomas y el aparato de Golgi.	ATG2	Interactúa con Atg18 de levadura	Antiviral*
		ATG9	Proteína transmembranal.	Antiviral*; inhibe el señalamiento del sistema inmune innato
		WIPI1-4	Proteínas de union PtdIns(3)P	Desconocida
		DFCP1	Unión a proteínas del retículo endoplasmático PtdIns(3)P	Desconocida
		VMP1	Proteína transmembranal.	Desconocida
<b>Paso de Elongación</b>				

Sistema de conjugación ATG12	El dímero ATG12-ATG5-ATG16L1 es importante para la conjugación LC3-PE. Este complejo está presente en el lado exterior de la membrana de aislamiento y es esencial para la elongación correcta de la membrana de aislamiento.	ATG12	Semejante a la ubiquitina, conjugada a ATG5	Antiviral*; antibacterial; presentación de antígenos, inhibe la producción de IFN tipo I
		ATG7	Enzima tipo-E1	Antiviral*,*; antibacterial*; presentación de antígenos, maduración del fagosoma; mantiene el número de células T; función del sistema inmune de células epiteliales; inhibe la producción de IFN tipo I; inhibe la producción de citocinas proinflamatorias.
		ATG10	Enzima tipo-E2	Desconocida
		ATG5	Conjugado por ATG12	Antibacterial*; antiparasitario; presentación de antígenos; maduración del fagosoma; aclaramiento de cuerpos apoptóticos; mantiene el número de células T y células B; función del sistema inmune de células epiteliales; inhibe y/o incrementa la producción de IFN tipo I.
		ATG16L1	Homodímero, interactúa con ATG5	Antibacterial; presentación de antígenos, alelo de riesgo de la enfermedad de Crohn; función del sistema inmune de células epiteliales; inhibe la producción de citocinas proinflamatorias.
	Formación de conjugados de LC3-PE y su desconjugación por ATG4 es importante para el aislamiento, elongación y/o cierre de la membrana. LC3 está presente tanto en la	LC3 (GATE16, GABARAP)	Semejante a la ubiquitina, conjugados con PE	Antiviral*; antibacterial*; presentación de antígenos; adaptador para sustratos de autofagia selectiva de microbios (xenofagia).

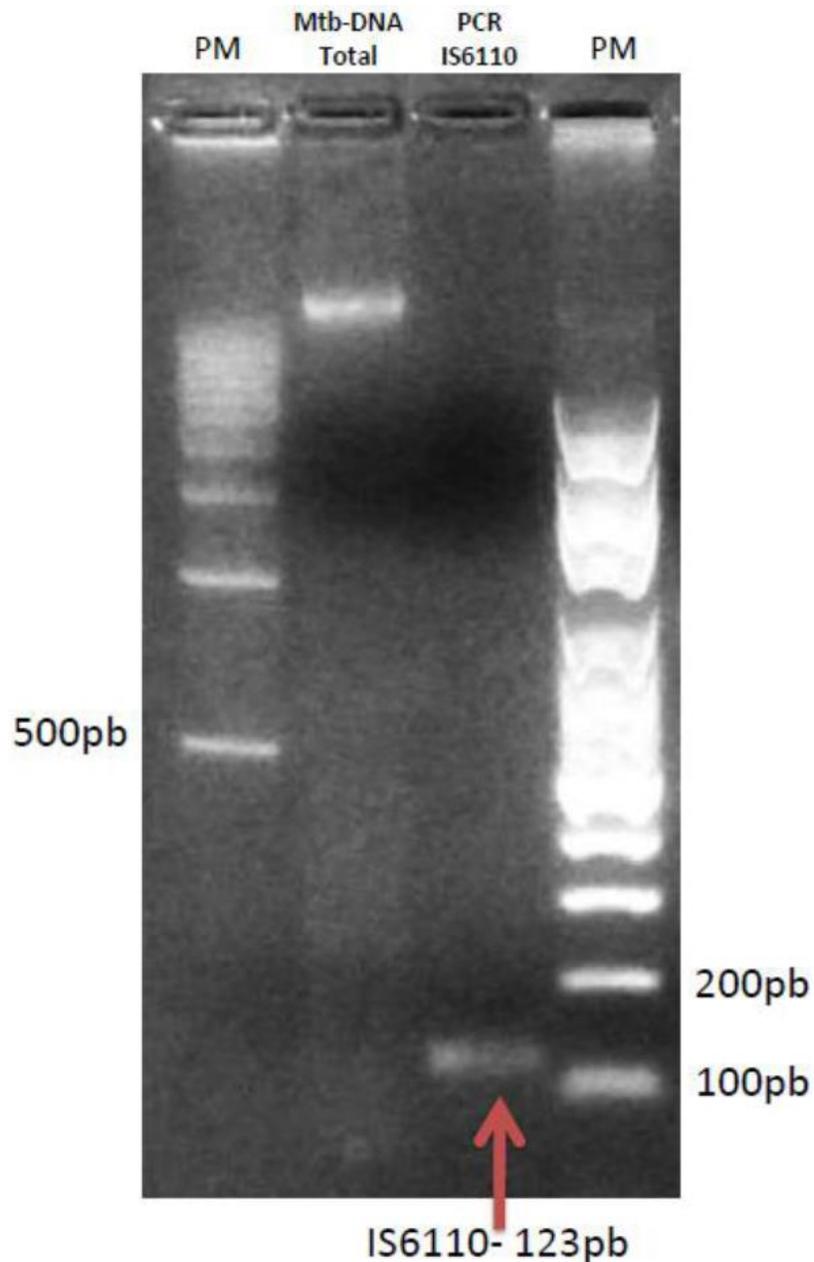
Sistema de conjugación LC3	membrana interna y externa de los autofagosomas, y también sirve como un adaptador para sustratos selectivos tales como p62, NBR1, NDP52 y la proteína de levadura Atg32.	ATG4A–D	Hidrolasa carboxilo terminal LC3, enzima desconjugante.	Antiviral*
		ATG7	Enzima tipo-E1	Antiviral*; antibacterial*; presentación de antígenos; maduración del fagosoma; mantiene el número de células T; función del sistema immune de células epiteliales; inhibe la producción de IFN tipo I; inhibe la producción de citocinas proinflamatorias.
		ATG3	Enzima tipo-E2	Antiviral*

\*Función observada en organismos modelo (como; *Dictyostelium discoideum*, *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*). Tabla modificada de Levine *et al.*, 2011.

## APÉNDICE 2

### DetECCIÓN DEL DNAMtb POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Se observa una banda muy compacta que amplifica el marcador genético del DNA de Mtb H37Rv cepa IS6110 utilizado. La secuencia IS6110 de 123pb fue detectada por PCR de punto final y analizada en un gel de agarosa al 1.5% (la pureza se cuantificó por espectrofotometría, registrándose el índice A260/280 de 1.65).

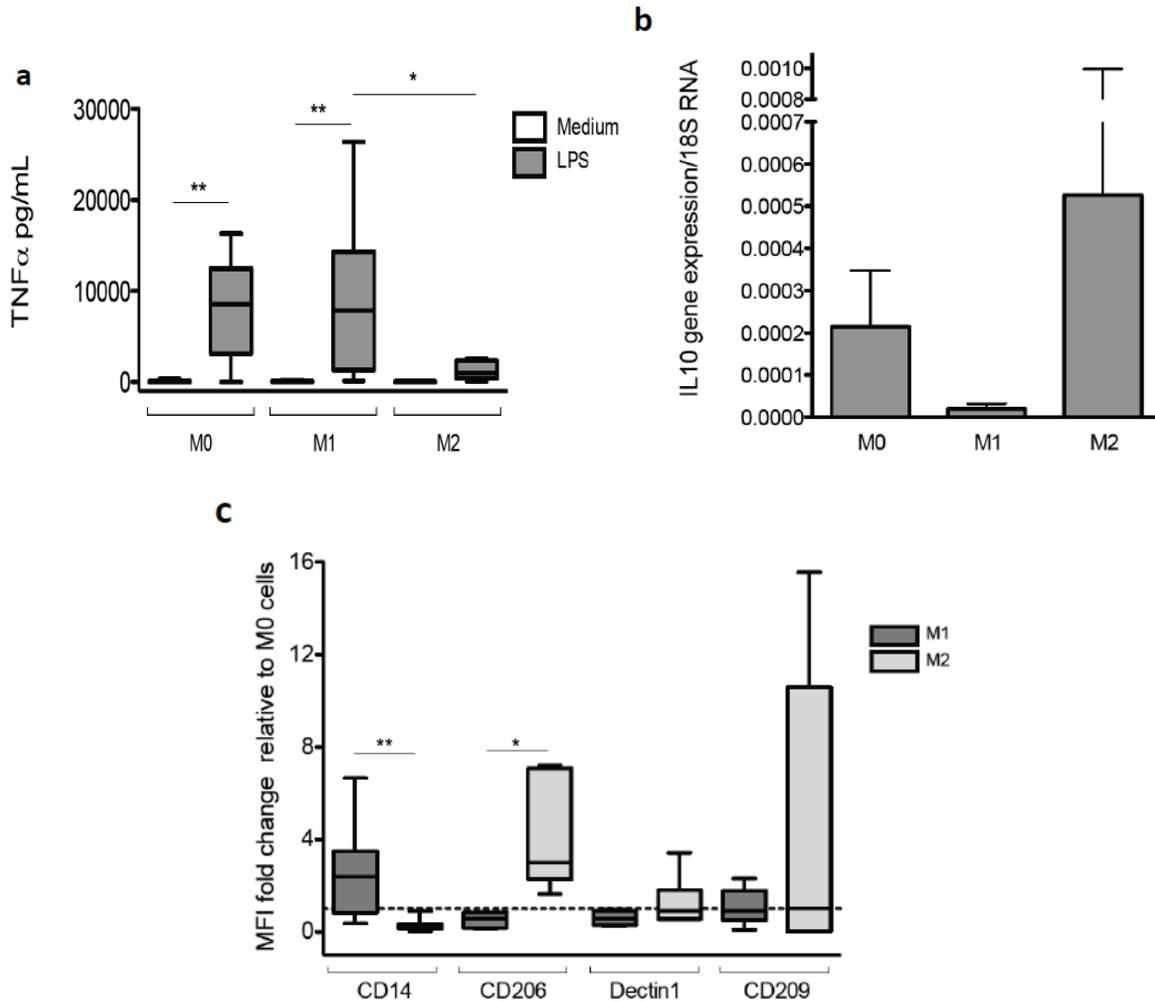


### APÉNDICE 3

#### Caracterización del fenotipo funcional de macrófagos M1 y M2.

Los macrófagos se diferenciaron a partir de monocitos en placas de baja adherencia en ausencia de citocinas (M0), en presencia de IFN $\gamma$  (M1) o de IL4+IL10 (M2). Por definición, las células M1 son pro-inflamatorias y producen TNF- $\alpha$  al ser estimuladas con LPS y las M2 no (porque son anti-inflamatorias) (a, n=8). Así mismo durante la polarización las M2 producen IL-10 y las M1 no (b, n=3). Las moléculas CD14 y CD206 se expresan de manera diferencial en ambas poblaciones de macrófagos (c, n=8). \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Buendía

Montserrat, datos no publicados usados con permiso). Estos resultados garantizan que con este protocolo de polarización se obtienen macrófagos M1 y M2.



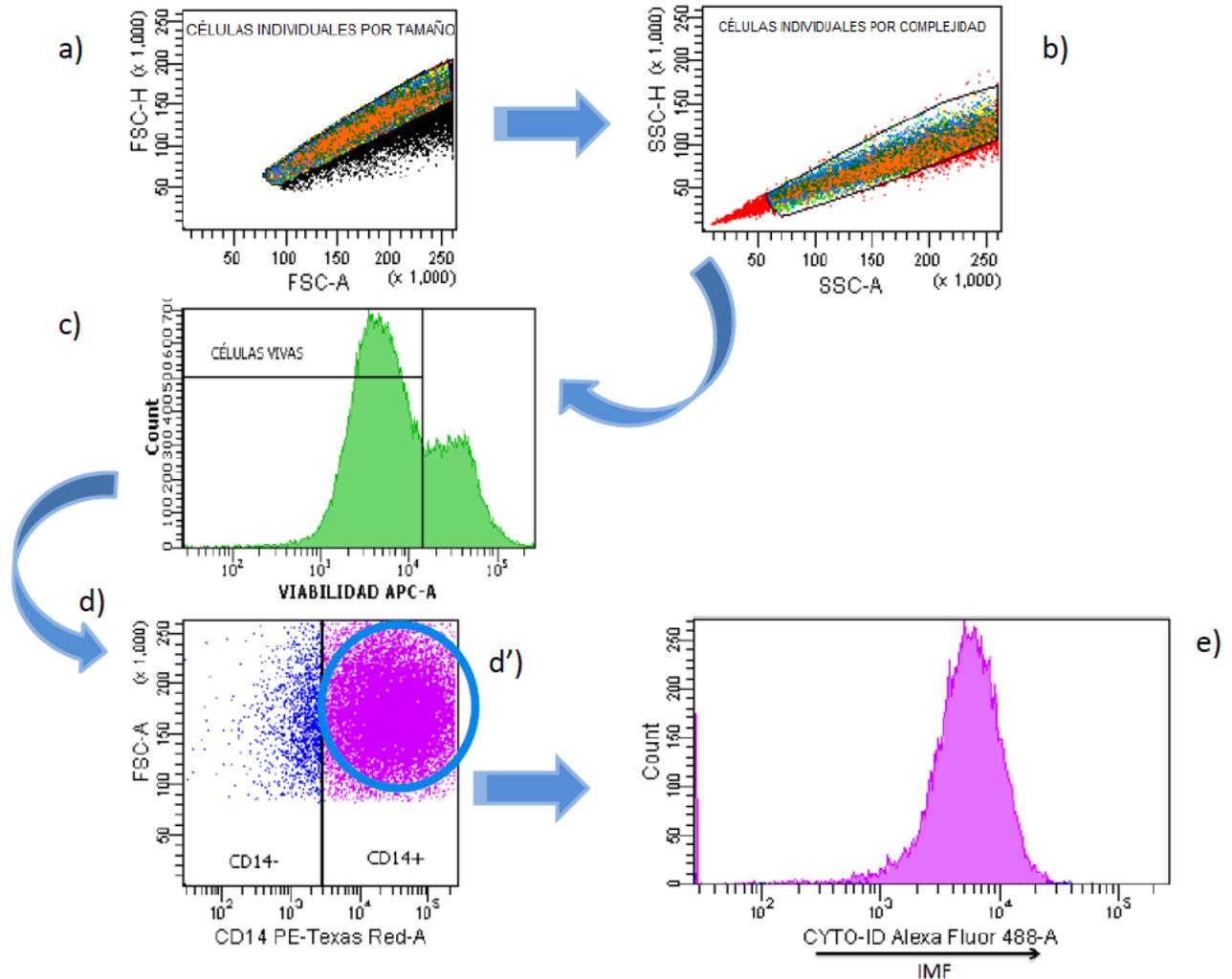
**Figuras del fenotipo funcional de los macrófagos polarizados.** a) Producción de TNF- $\alpha$  por estimulación con LPS en macrófagos M0, M1 y M2, detección por ELISA. b) expresión génica de IL-10 por qPCR en macrófagos M0, M1 y M2. c) Cambio en la intensidad media de fluorescencia de los marcadores CD14, CD206, Dectin1 y CD209 en macrófagos M1 y M2 relativo al de macrófagos M0.

#### APÉNDICE 4

##### Estrategia del análisis de autofagia por citometría de flujo.

La autofagia se cuantificó con el método de detección de vesículas autofágicas, sonda CYTO-ID. 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 de las negativas (utilizando un control de células sin tinción), para macrófagos diferenciados M1 se tomó el porcentaje de CD14<sup>+</sup> (d') y para macrófagos diferenciados M2 se tomó el

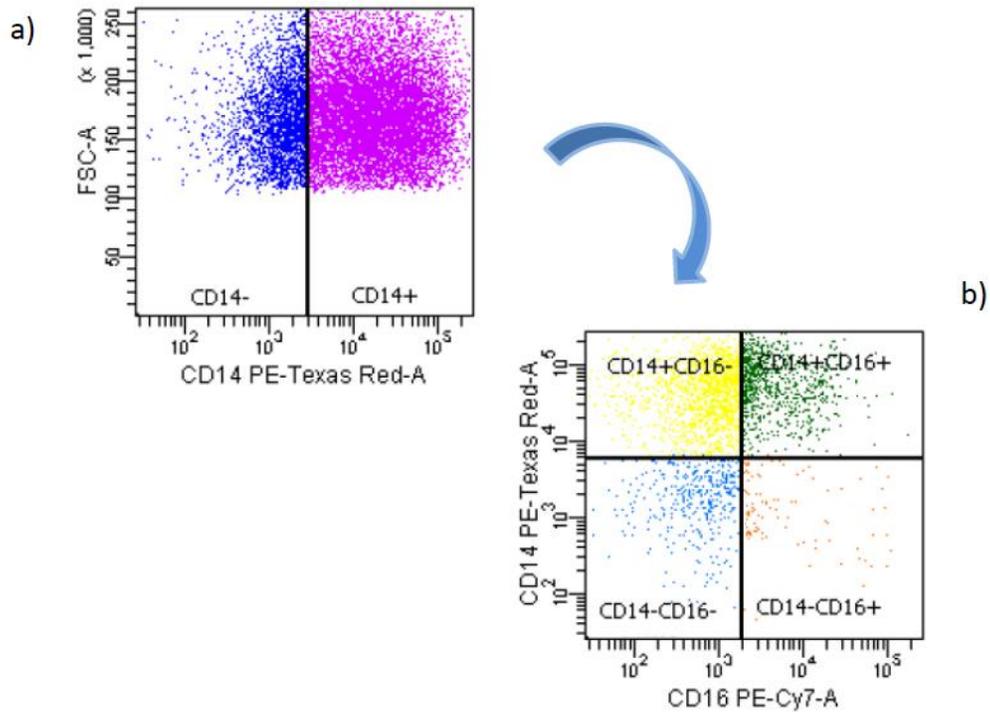
porcentaje CD14- [datos no mostrados], e) finalmente se cuantificó la Intensidad Media de Fluorescencia relativo al de células sin estimular (de acuerdo a un histograma con la sonda CYTO-ID).



## APÉNDICE 5

### Estrategia de análisis para evaluar la expresión de las moléculas CD14 y CD16 en macrófagos M1 y M2 por citometría de flujo.

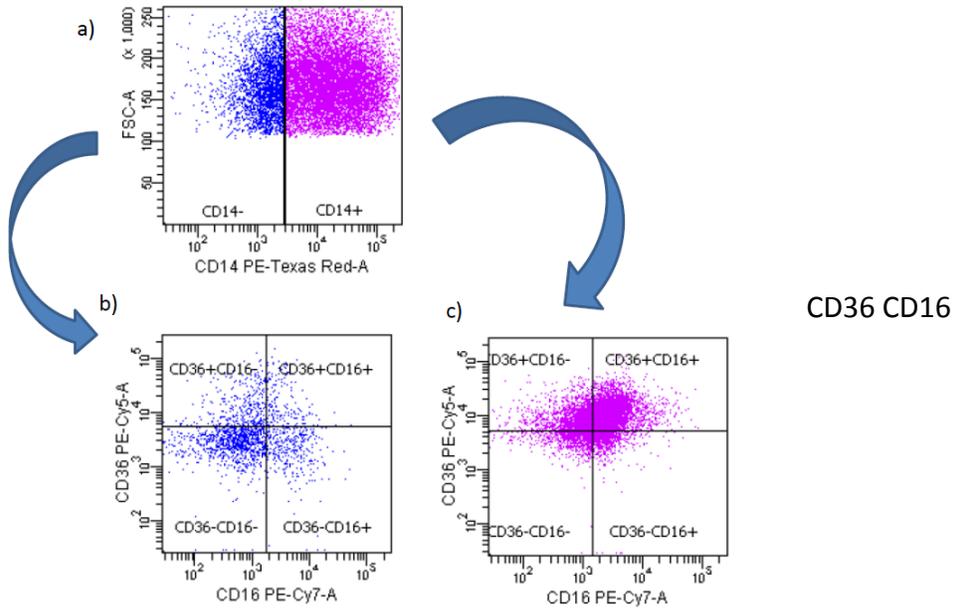
Primero fueron seleccionadas las células individuales de acuerdo a su tamaño, y granularidad, y de éstas fueron seleccionadas solamente las células vivas para el análisis posterior (como se muestra en el apéndice 4). a) Las células vivas se separaron de acuerdo al marcador CD14 en negativas y positivas, b) después se analizaron las poblaciones CD14 CD16 en positivas y negativas. El porcentaje obtenido se utilizó para el análisis posterior.



## APÉNDICE 6

### Estrategia para la identificación de macrófagos M1 y M2 basados en la expresión de CD36 CD16 y CD206 HLA-DR por citometría de flujo.

Primero fueron seleccionadas las células individuales vivas (como se muestra en el apéndice 4). a) Las células vivas se separaron de acuerdo al marcador CD14 en negativas y positivas. b y c) De cada población seleccionada se hizo una región con los dobles marcadores (CD36 CD16 o CD206 HLA-DR). Y el porcentaje obtenido se utilizó para el análisis posterior.



CD206 HLA-DR

