



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

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LAS LIPOXINAS (LXA4), RESOLVINAS (RVD1 Y RVD2) Y  
PROTECTINAS (PDX Y MAR1) EN LA RESPUESTA HACIA *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* EN MACRÓFAGOS HUMANOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**RUIZ HUERTA ANDY DOREY**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.  
**DR. SIGIFREDO PEDRAZA SÁNCHEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**MÉXICO, CD. MX., AGOSTO, 2017**



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.





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

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LAS LIPOXINAS (LXA4), RESOLVINAS (RVD1 Y RVD2) Y  
PROTECTINAS (PDX Y MAR1) EN LA RESPUESTA HACIA *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* EN MACRÓFAGOS HUMANOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**RUIZ HUERTA ANDY DOREY**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.  
**DR. SIGIFREDO PEDRAZA SÁNCHEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**MÉXICO, CD. MX., AGOSTO, 2017**

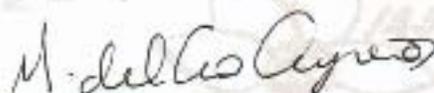
Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de abril de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RUIZ HUERTA ANDY DOREY** con número de cuenta 306226487, con la tesis titulada **"EFECTO DE LAS LIPOXINAS (LXA4), RESOLVINAS (RvD1 Y RvD2) Y PROTECTINAS (PDX Y MaR1) EN LA RESPUESTA HACIA *Mycobacterium tuberculosis* EN MACRÓFAGOS HUMANOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL**:

Presidente: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN  
Vocal: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ  
Secretario: DR. SIGIFREDO PEDRAZA SÁNCHEZ  
Suplente: DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ  
Suplente: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 30 de junio de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por haberme aceptado y permitido cursar mis estudios de maestría. Por apoyar la enseñanza y mejora de todos los académicos mexicanos, por las facilidades que brinda y por la aptitud y calidad humana de todos sus integrantes.

Al CONACYT por la beca otorgada durante los dos años que cursé mis estudios de maestría.

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

A la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal, quien ha seguido paso a paso mi formación profesional, por brindarme su amistad incondicional, sus conocimientos, su apoyo para trabajar en el laboratorio todo este tiempo. Gracias por no perder esa alegría por la ciencia, y al mismo tiempo contagiarla.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, por haber aceptado ser parte de mi comité, por el gusto y dedicación que pone cada día en hacer investigación, y por sus sugerencias en la mejora de este trabajo.

Al Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez, por sus comentarios atinados en la revisión y mejora de este manuscrito, por su ambición de mejorar la ciencia que se hace en nuestro país y alentar a sus estudiantes para lograrlo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Gracias a mi familia, porque sé que siempre estarán apoyándome cuando sea necesario, porque me han enseñado a tratar de ser una mejor persona, y aunque no se los diga, los quiero mucho, ahora también lo saben por escrito.

Gracias por todo papá, gracias gusanoides (Susan y Jorge) por los buenos y malos momentos, saben que siempre estaré para lo que sea, y gracias por cuidar a March, Riu y Mimas en mi ausencia.

Gracias Shurupcito bebé<sup>5</sup> (5, por el momento) por todos los buenos momentos a tu lado, os mega infiamo muchísimo. Gracias por apoyarme y ser el mejor Shurup.

Gracias Rossy, porque su apoyo y consejo es invaluable, espero pasemos muchas más aventuras juntas (como bañar al Oso en algún momento).

Agradezco tu paciencia Esme, tu amistad y tu amor a la ciencia, gracias por el apoyo que me has brindado a lo largo de mi trayectoria académica.

Agradezco por sus enseñanzas doctora Miriam, por su entrega a la investigación y por destinar parte de su valioso tiempo en la mejora de mi trabajo.

Agradezco su valioso tiempo doctor Sigifredo, por su aceptación en la participación de este proyecto y por sus sugerencias en la mejora del mismo, gracias por su amistad y su buen consejo.

Gracias Martha Torres, por haberme permitido ser parte de su gran grupo de trabajo, y porque es una gran investigadora a seguir.

Gracias Yola, por tu impresionante dedicación a la investigación, porque motivas a los demás a seguir adelante.

Gracias Tere, porque además de ser una gran investigadora siempre tienes tiempo de compartir una gran sonrisa y un buen consejo.

Gracias Silvia, porque siempre estás ahí, con un consejo meditado, con una nueva idea, y con tus poderes mágicos para la ciencia.

Gracias Carmelita, por tu valiosa e invaluable ayuda, gracias por tu paciencia, tu tiempo y por el mejor apoyo en los análisis estadísticos.

Gracias Clau, eres una excelente amiga, investigadora y persona, gracias por todos tus consejos y platicas amenas, las valoro mucho.

Gracias Fer, por toda tu ayuda en mis inmunohistoquímicas, extracciones nucleares y western blots, eres una gran persona, maestro e investigador.

Gracias Manuel, eres una excelente persona y un gran amigo, prometo algún día ser tan inteligente como tú, mientras tanto sigo trabajando en ello.

Gracias Rosita, por compartir su desayuno y sus ocurrencias, gracias por apoyarnos desde muy temprano.

Gracias amigos fantásticos (Reni y Omar), los voy a extrañar como ya lo hago, me hicieron recordar que siempre hay tiempo para el cine, aunque nunca fueron conmigo sigo esperando que llegue ese día.

Gracias a los “chicos” de Viro, siempre hacen que el día sea agradable.

Gracias David, eres una persona increíble y un gran amigo, debes de saber que estaré siempre ahí para lo que sea, algún día espero ser tan dedicada como tú.

Gracias Alan, Víc, Susan, Francisco M., su apoyo es invaluable, sus palabras son un respiro para tomar un descanso breve y seguir.

Gracias amigos, gracias por estar ahí, Luis Fernando, Susan, David, Gabriel, Edgar, Dante, Adriana, Arisbel, Rebeca, Víc, José Luis, Luis Alberto, Sindy, Sandy, Orlando, Alonso, Alan, Carlos Z., Rossy, Diego, Gaby, Jorge, Karina, Luis, Manuel, Marco Antonio, Marichuy, Memo, Nancy, Nané, Renato, Omar, Serrano, Francisco M., José A., y si alguno no está por aquí, puede reclamarme y le debo un café, saben que se les quiere. Espero sigamos compartiendo momentos increíbles.

A las personas que ya no están pero que siempre seguirán en mi mente.

A cada persona que ha estado junto a mí, por regalarme un instante, un motivo y una nueva visión de vida. Gracias.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas por el apoyo otorgado a la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal para la realización del proyecto.

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

## **DEDICATORIA**

*A todos los que además de una sonrisa, incondicionalmente me regalaron su tiempo y apoyo, y aunque no lo sepan, los momentos más importantes de mi vida los he pasado con cada uno de ustedes.*

*Gracias.*



*Lo que nos mantiene unidos es este agradable viaje...*

# ÍNDICE

Página

**LISTA DE FIGURAS Y TABLAS**.....i

**LISTA DE ABREVIATURAS**.....iii

**RESUMEN**.....1

**ABSTRACT**.....3

## **INTRODUCCIÓN**

*Mycobacterium tuberculosis*.....5

Epidemiología.....5

Patogénesis de la tuberculosis.....7

Inflamación.....9

Resolución de la inflamación.....10

Avances en el conocimiento de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.....15

**JUSTIFICACIÓN**.....20

**HIPÓTESIS**.....21

## **OBJETIVOS**

Objetivo general.....22

Objetivos particulares.....22

## **MÉTODOLOGÍA**

1.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica .....23

2.- Obtención de monocitos por perlas magnéticas (Miltenyi).....23

3.- Diferenciación de monocitos a macrófagos .....24

4.- Descongelamiento y disgregación de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	24
5.- Infección de macrófagos humanos .....	24
6.- Estimulación con los SPM .....	25
7.- Cuantificación de TNF- $\alpha$ por ELISA.....	25
8.- Cuantificación de prostaglandinas y lipoxinas por ELISA.....	26
9.- Extracción de RNA y cDNA.....	27
10.- Expresión génica de BPI, LCN2, LL37 y COX-2 por PCR en tiempo real (qPCR).....	27
11.- Translocación nuclear de Nrf2.....	28
12.- Extracción de proteínas nucleares.....	28
13.- Análisis estadístico.....	29

## RESULTADOS

1. Actividad antiinflamatoria de los SPM en estudio sobre el macrófago humano.....	30
1.1 Los SPM disminuyen la producción de TNF- $\alpha$ en macrófagos estimulados con LPS.....	30
1.2 La estimulación con SPM causa la translocación nuclear de Nrf2.....	31
2. Los SPM disminuyen la producción de TNF- $\alpha$ en macrófagos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv .....	32
3. Producción de PGE2 en macrófagos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv .....	33
4. Producción de LXA4 en macrófagos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv.....	34
5. La resolvina RvD1 y la protectina Mar1 aumentan la actividad bactericida del macrófago humano infectado con <i>Mtb</i> H37Rv .....	35
6. Expresión de BPI, LL37 y LCN2 en macrófagos infectados con H37Rv.....	36
7. Expresión de COX-2 en macrófagos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv .....	38
8. Efecto global de la estimulación con RvD1 y Mar1 en macrófagos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv .....	39

<b>DISCUSIÓN</b> .....	43
<b>CONCLUSIONES</b> .....	47
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	48
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO 1</b>	
Estrategia del análisis de evaluación de la pureza de monocitos.....	52
<b>ANEXO 2</b>	
Porcentaje de viabilidad celular a las 6 y 24 horas de estimulación con distintas concentraciones de SPM.....	53
<b>ANEXO 3</b>	
Evaluación del tiempo de incubación para detectar niveles suficientes de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4 en sobrenadantes de cultivo.....	54
<b>ANEXO 4</b>	
Curva estándar de TNF- $\alpha$ .....	55

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Página

Figura 1: Tasas de incidencia mundial de la tuberculosis estimadas para el 2015.....	7
Figura 2: Resolución de la inflamación .....	11
Figura 3: Biosíntesis de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación.....	12
Figura 4: Propuesta para evaluar la actividad de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación.....	19
Figura 5: Actividad antiinflamatoria de los SPM sobre macrófagos humanos estimulados con LPS.....	30
Figura 6: Porcentaje de viabilidad de los macrófagos al añadirles los SPM .....	31
Figura 7: Translocación nuclear de Nrf2.....	32
Figura 8: Efecto de los SPM sobre la producción de TNF- $\alpha$ en infección por Mtb H37Rv.....	33
Figura 9: Efecto de los SPM sobre la producción de PGE2 en infección por Mtb H37Rv.....	34
Figura 10: Efecto de los SPM sobre la producción de LXA4 en infección por Mtb H37Rv.....	35
Figura 11: Efecto de los SPM sobre la infección por Mtb H37Rv.....	36
Figura 12: Expresión génica relativa de BPI y LL37 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv.....	37
Figura 13: Expresión génica relativa de COX-2 en macrófagos humanos infectados con Mtb H37Rv.....	38
Figura 14: Efecto global de la RvD1 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv.....	39
Figura 15: Efecto de la RvD1 en macrófagos humanos infectados con Mtb H37Rv.....	40
Figura 16: Efecto global de la MaR1 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv.....	41
Figura 17: Efecto de la MaR1 en macrófagos humanos infectados con Mtb H37Rv .....	42

Tabla 1: Acciones específicas de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación por célula blanco .....	13
Tabla 2: Concentración y acción de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación .....	16

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA: ácido araquidónico
- ALX: receptor de lipoxinas
- ARE: elemento de respuesta antioxidante (*antioxidant response element*)
- BCG: bacilo Calmette-Guérin de *Mycobacterium bovis*
- BPI: proteína bactericida aumentadora de la permeabilidad (*bactericidal permeability-enhancing protein*)
- CCL: ligandos de quimiocina (*chemokines ligand*)
- CMKLR1: receptor chemerin tipo quimiocina 1 (*chemerin chemokine-like receptor 1*)
- COX-2: ciclooxigenasa tipo 2
- CTGF: factor de crecimiento del tejido conectivo (*connective tissue growth factor*)
- DAMP: patrones moleculares asociados a daño (*molecular patterns associated to danger*)
- DHA: ácido docosahexaenoico
- DNA: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- EIA: inmunoensayo enzimático (*enzyme immunoassay*)
- ELISA: ensayo inmunoenzimático (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- EPA: ácido eicosapentaenoico
- FPR2: receptor formilo peptídico 2 (*formyl peptide receptor 2*)
- GM-CSF: factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)
- GPR32: receptor 32 acoplado a proteína G (*G protein-coupled receptor 32*)
- IFN $\gamma$ : interferón gamma
- IL: interleucina
- IMF: intensidad media de fluorescencia
- iNOS: óxido nítrico sintasa inducible (*inducible nitric oxide synthase*)

LPS: lipopolisacárido

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

LTC4: cisteinil leucotrieno 4

LXA4: lipoxina A4

MaR1: maresina 1 (*maresin 1*)

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos

MDM: macrófagos diferenciados de monocitos

MDP: muramil dipéptido

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

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

MMP3: matriz metalopeptidasa 3 (*matrix metalloproteinase 3*)

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

mRNA: RNA mensajero

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

MQ: macrófago

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

M1: macrófago tipo pro-inflamatorio

M2: macrófago tipo antiinflamatorio

NF- $\kappa$ B: 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

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

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

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

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

PDX: protectina DX

PGE2: prostaglandina E2

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

PMN: leucocitos polimorfonucleares

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

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

RNA: ácido ribonucleico

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

RPM: revoluciones por minuto

RvD1: resolvina D1

RvD2: resolvina D2

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SLR: receptores tipo scavenger

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

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 pro-inflamatorias

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

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

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

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

UFC: unidades formadoras de colonias

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

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

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

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

## RESUMEN

### **Efecto de las lipoxinas (LXA4), resolvinas (RvD1 y RvD2) y protectinas (PDX y MaR1) en la respuesta hacia *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos humanos**

La resolución de la inflamación es un proceso fisiopatológico complejo que depende de la producción de lípidos oxigenados derivados de los ácidos grasos poli-insaturados esenciales, entre los que se encuentran las lipoxinas, resolvinas y protectinas, denominados mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (SPM, del inglés Specialized Proresolving Lipid Mediators); la actividad de los SPM en el control de procesos infecciosos respiratorios regula la respuesta inflamatoria, evitando el daño por necrosis asociado a la inflamación y disminuyendo la carga microbiana. En el caso de la tuberculosis, infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que afecta principalmente a los pulmones, el papel de los SPM está pobremente caracterizado, por lo que nosotros evaluamos el efecto modulador de los SPM en macrófagos humanos infectados con la cepa virulenta de Mtb H37Rv.

Los macrófagos humanos fueron diferenciados a partir de monocitos (MDM), obtenidos de paquetes leucocitarios del banco de sangre del INER. La infección de los macrófagos humanos se hizo a un MOI de 5 (de cinco bacterias por macrófago) para evaluar el efecto de los SPM por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) posterior a los 21 días de infección. La producción de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4 se determinó por ELISA, usando como control positivo al LPS. La expresión génica de COX-2, BPI y LL37 se cuantificó por PCR en tiempo real.

Nuestros resultados indican que los macrófagos humanos son blanco de los SPM en estudio; lipoxina A4 (LXA4), resolvinas D1 y D2 (RvD1 y RvD2) y protectinas (PDX y MaR1). Estos modifican la producción de TNF- $\alpha$  y activan la translocación del factor nuclear Nrf2.

Sin embargo sólo la RvD1 y MaR1 disminuyen significativamente la producción de TNF- $\alpha$  al mismo tiempo que aumentan la actividad bactericida del macrófago humano. Además de

que ambos SPM incrementan la expresión génica de BPI (proteína bactericida aumentadora de la permeabilidad) que ejerce múltiples acciones en la eliminación de bacterias.

Si pensamos en la posibilidad de estimular la producción de estos mediadores antiinflamatorios en pacientes con tuberculosis esto podría representar un enorme beneficio para los pacientes, especialmente en la fase progresiva-tardía de la enfermedad por lo que podemos preguntarnos ¿cuánto influye el control de la inflamación en el desarrollo de la enfermedad y qué características de la progresión de la tuberculosis dependen del equilibrio de la misma? 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 los SPM como blanco terapéutico.

## **ABSTRACT**

### **Effect of lipoxins (LXA4), resolvins (RvD1 and RvD2) and protectins (PDX and MaR1) in the response to *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages**

The resolution of inflammation is a complex pathophysiological process that depends on the production of oxygenated lipids derived from essential polyunsaturated fatty acids, including lipoxins, resolvins and protectins, called specialized pro-resolving lipid mediators (SPM), their activity in the control of respiratory infectious processes regulates the inflammatory response, avoiding necrosis damage associated with inflammation and reducing the microbial load. In the case of tuberculosis, infection caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that mainly affects the lungs the role of SPM is poorly characterized, so its effect modulating the infection in human macrophages will be studied.

Human macrophages were differentiated from monocytes (MDM), obtained from leukocyte packets from the INER blood bank. Infection of human macrophages was performed at a MOI of 5 (five bacteria per macrophage) to evaluate the effect of SPM by Count of Colonizing Units (CCU) after 21 days of infection. The production of TNF- $\alpha$ , PGE2 and LXA4 was determined by ELISA using LPS as the positive control. The gene expression of COX-2, BPI and LL37 was quantified by real-time PCR.

Our results indicate that human macrophages are targets of the SPM under study: Lipoxin A4 (LXA4), resolvins D1 and D2 (RvD1 and RvD2) and protectins (PDX and MaR1). They modify the production of TNF- $\alpha$  and activate the translocation of nuclear factor Nrf2.

However, only RvD1 and MaR1 significantly decrease TNF- $\alpha$  production while increasing the bactericidal activity of the human macrophage. In addition, both SPMs increase the gene expression of BPI (bactericidal permeability-enhancing protein) which exerts multiple actions on the elimination of bacteria.

If we think about the possibility of stimulating the production of these anti-inflammatory mediators in patients with tuberculosis this could represent a huge benefit for patients, especially in the late-progressive phase of the disease, so we can ask ourselves, how much control does the inflammation have in the development of the disease and what characteristics of the tuberculosis progression depends on its balance? A comprehensive analysis of the mechanisms involved in this response will contribute to clarify crucial aspects of tuberculosis pathogenesis and the use of SPM as a therapeutic target.

# **Efecto de las lipoxinas (LXA4), resolvinas (RvD1 y RvD2) y protectinas (PDX y MaR1 en la respuesta hacia *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos humanos**

---

## **INTRODUCCIÓN**

### ***Mycobacterium tuberculosis***

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es el principal agente causante de la tuberculosis en el humano (Modlin and Barry, 2013) y afecta principalmente el sistema respiratorio (tuberculosis pulmonar), pero puede diseminarse indirectamente por el canal linfático a los nódulos linfáticos regionales y luego por el torrente circulatorio hacia cualquier parte del cuerpo y perjudicar otros órganos y tejidos (tuberculosis extrapulmonar: pleural, ganglionar, osteoarticular, gastrointestinal, peritoneal, miliar, meníngea, etc.) (Barry *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Borrero *et al.*, 2011; Cartes, 2013; Modlin and Barry, 2013).

Mtb pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. Es un bacilo perteneciente a las bacterias aerobias grampositivas, con dimensiones de 0,2 a 0,5µm de ancho y de 1 a 4 µm de longitud, inmóvil, no esporula ni forma cápsulas, y es resistente a la decoloración alcohol-ácida cuando se tiñen con fucsina básica fenicada (tinción de Ziehl-Neelsen o tinción de BAAR). Su crecimiento es muy lento (con un tiempo de duplicación de 12 horas). Presenta un alto porcentaje de guaninas y citosinas (entre un 60 y 71 %). Resiste a la acción de ácidos, álcalis, y a la desecación, propiedades importantes para su transmisión al permitir la sobrevivencia del bacilo en el esputo expectorado seco. Presenta lípidos altamente hidrofóbicos que le confieren resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos fijadores de complemento (Cole *et al.* 1998; Patrick *et al.* 2009).

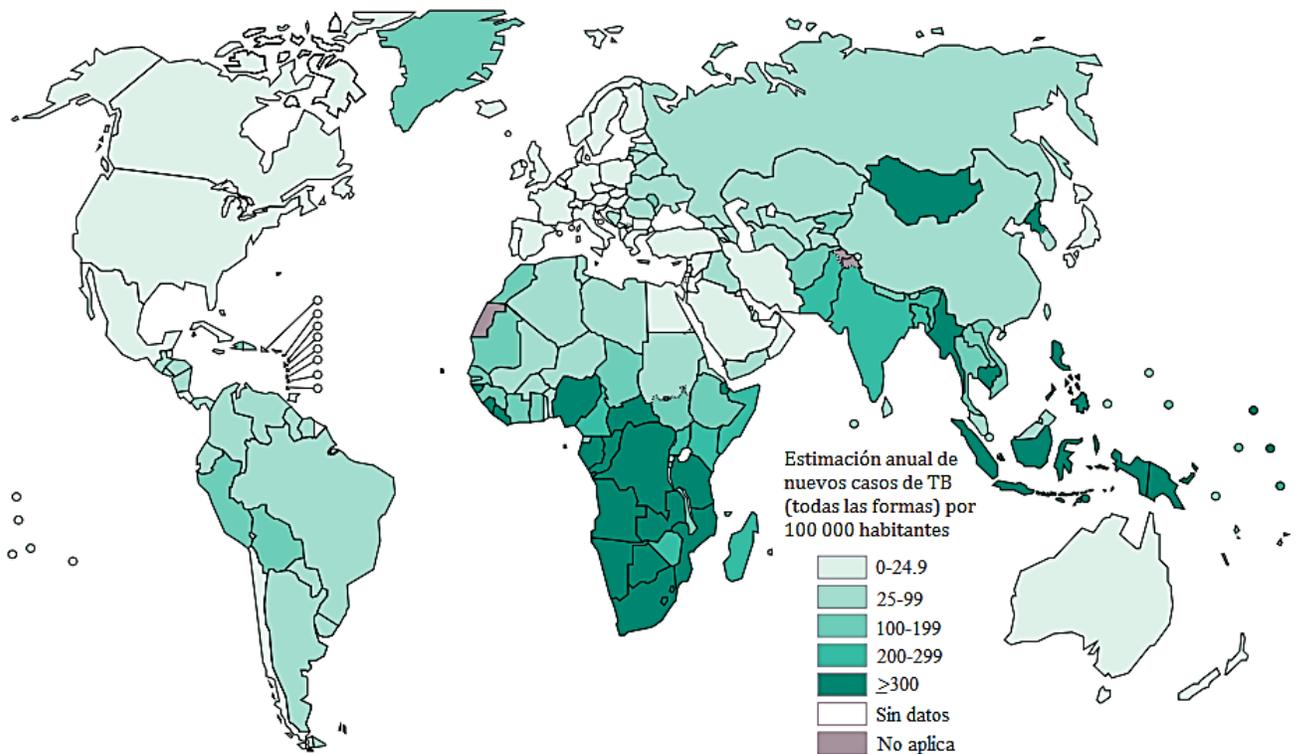
### **Epidemiología**

La tuberculosis es la segunda causa de mortalidad después del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) entre las enfermedades infectocontagiosas de naturaleza crónica. Afecta a seres humanos de todas las edades. La enfermedad es causada por micobacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC: *M.*

*tuberculosis, M. africanum, M. canetti, M. bovis, M. microti, M. caprae, M. orygis y M. pinnipedii*). A lo largo de un año, un enfermo con tuberculosis puede infectar alrededor de quince personas por contacto estrecho (a través de la inhalación de gotitas de aerosol que se liberan en el aire de la tos o estornudo de los sujetos infectados), pero sólo del cinco al diez por ciento de los infectados desarrollarán la enfermedad dependiendo de su estado inmunológico (por ejemplo individuos inmunodeprimidos por infección, por diabetes, enfermedades autoinmunes o SIDA), de factores individuales como edad, género, susceptibilidad genética y factores socioeconómicos (pobreza o situación de calle) (Cole, *et al.*, 1998; Dye and Williams, 2010; Cartes, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por Mtb y que los movimientos poblacionales han modificado el perfil epidemiológico de esta enfermedad. Para México se reportaron 22 299 nuevos casos de tuberculosis con 18 508 frotis positivos diagnosticados en el 2015 (por baciloscopía de BAAR). En la Figura 1 se muestran las tasas de incidencia de la tuberculosis para el 2015 por cada cien mil habitantes (WHO. Global tuberculosis report, 2015).

El alto costo, la baja efectividad y la poca disponibilidad en los medicamentos para eliminar la tuberculosis, así como la reciente aparición de tuberculosis multifarmacoresistente (TB-MDR) y la tuberculosis extensivamente resistente (TB-XDR) han llevado a la necesidad de comprender los mecanismos inmunes implicados en la protección y la patogénesis de la enfermedad para poder proponer nuevas estrategias terapéuticas (Harari *et al.*, 2011; Philips and Ernst, 2012; Ernst, 2012; WHO. Global tuberculosis report, 2015).



**Figura 1.** Tasas de incidencia mundial de la tuberculosis estimada para el 2015 (Modificado de WHO. Global tuberculosis report, 2015).

### Patogénesis de la tuberculosis

La exposición al bacilo de *Mtb* cuando las microgotas que lo contienen alcanzan los alvéolos pulmonares desencadenan un reconocimiento por receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o señales endógenas asociadas a daño tisular (DAMP) que activan la primera línea de defensa del hospedero. La respuesta inmune innata que subsecuentemente se activa incluye diferentes componentes celulares (células epiteliales, monocitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales [*Natural Killer* o NK]), sistemas de activación (el complemento y factores de coagulación), la participación de diversas citocinas (como por ejemplo 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).

Ante la infección inicial por Mtb, los macrófagos alveolares producen mediadores solubles de la inflamación y péptidos antimicrobianos, que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos al pulmón. Los neutrófilos ayudan a restringir el crecimiento de Mtb activando moléculas antimicrobianas efectoras (Martineau *et al.*, 2007). Sin embargo, Mtb se ha adaptado de forma efectiva a un ciclo de vida que le permite persistir de manera latente dentro de los fagosomas que lo contienen gracias a que posee mecanismos de evasión de la respuesta inmune que interfieren con los mecanismos bactericidas del macrófago. Estos mecanismos incluyen la inhibición de la respuesta del macrófago como la fusión del fagosoma con el lisosoma, la producción de óxido nítrico (NO), citocinas, quimiocinas y/o la translocación de NFκB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Behar *et al.*, 2010; Verrall *et al.*, 2013).

Las múltiples citocinas que son liberadas al ambiente tisular inmediatamente después de la infección por Mtb (TNF-α, IFN tipo I y II, IL-1α e IL1β, etc.) determinan un estado de “hiperinflamación” que se asocia a daño celular a pesar de sus efectos protectores (Cooper, et al., 2011; Dorhoi and Kaufmann 2014). Además, una respuesta inflamatoria excesiva puede ejercer “presión” sobre las bacterias y modificar su fisiología, de acuerdo a un estudio en ratones, reduciendo la efectividad de los antibióticos (Liu et al., 2016). Esta “hiperinflamación” causa daño al parénquima pulmonar con la consecuencia del deterioro en las funciones respiratorias del paciente.

En trabajos previos (Juárez, 2012; Juárez, 2014; Juárez, 2016) se ha observado que cuando los macrófagos alveolares son infectados con la cepa virulenta de Mtb y son tratados con MDP (muramil dipéptido), Tri-DAP (L-Ala-γ-D-Glu-meso-ácido diaminopimélico) y loperamida, se induce actividad inmunomoduladora en la que la respuesta pro-inflamatoria está disminuida, y sin embargo se logra el control del crecimiento intracelular de Mtb en forma significativa. Lo anterior nos sugirió que la respuesta antiinflamatoria podría participar a distintos niveles en el proceso infeccioso y que probablemente la presencia de otros mediadores antiinflamatorios podría tener un efecto en el control de la infección al mismo tiempo que se elimina el exceso de inflamación, por lo que vale la pena conocer el papel que la resolución de la inflamación juega en la infección por Mtb.

## **Inflamación**

La inflamación es la primera respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado por patógenos o por sustancias extrañas de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Es un proceso fisiológico complejo conservado a lo largo de la evolución que involucra diversos eventos coordinados, desde procesos vasculares, homeostáticos, celulares e inmunes. Se caracteriza por la extravasación de líquido al sitio del daño, que produce edema (tumor), aumento del flujo sanguíneo (rubor), aumento en la temperatura local (calor) y activación de terminales aferentes (dolor), que son los cuatro signos cardinales descritos por el enciclopedista romano Aulo Cornelio Celso. Ocasionalmente puede haber pérdida de la función local (Cinel and Opal, 2009; Medzhitov, 2008; Serhan, 2008; Zumla *et al.*, 2014).

Dependiendo de la duración, la inflamación puede clasificarse en aguda o crónica (Cinel and Opal, 2009; Zumla *et al.*, 2014). La inflamación aguda comprende cambios significativos en los niveles plasmáticos de ciertas proteínas consecuencia de la acción de citocinas pro-inflamatorias, entre las más importantes se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), la interleucina 2 (IL-2), y la interleucina 6 (IL-6). Estas citocinas pueden activar a la proteína C reactiva que se produce en el hígado y que tiene función de opsonina al mismo tiempo que induce la activación parcial de la cascada del sistema del complemento, donde los fragmentos sobre todo, C5a y C3a (llamados anafilatoxinas) tienen capacidad quimiotáctica para granulocitos y monocitos, e inducen la desgranulación de los mastocitos. También participan los interferones de tipo I y II (IFN-I e IFN-II), histamina, bradiquinina y prostaglandinas (Galli *et al.*, 2011; Plüddeman *et al.*, 2011; Deretic, 2012) que son cruciales para controlar, combatir y reparar el daño e incluyen cambios en las propiedades fisicoquímicas del plasma (descenso de la viscosidad y aumento de la velocidad de sedimentación eritrocitaria).

La resolución de la inflamación culmina con la reparación del tejido y el regreso a la función normal para evitar lesión tisular extensa en respuesta a infecciones (Ortega *et al.* 2013). En caso de que no haya una resolución satisfactoria de la inflamación aguda, se desencadena un estado inflamatorio crónico, con repercusiones sistémicas y deletéreas para

el hospedero como la infiltración tisular por agregados de leucocitos (formación de granulomas), la biosíntesis descontrolada de colágeno (fibrosis o cirrosis), o lesiones oxidativas en el ácido desoxirribonucleico (DNA) que suelen dar lugar a una enfermedad degenerativa (Nathan and Ding, 2010).

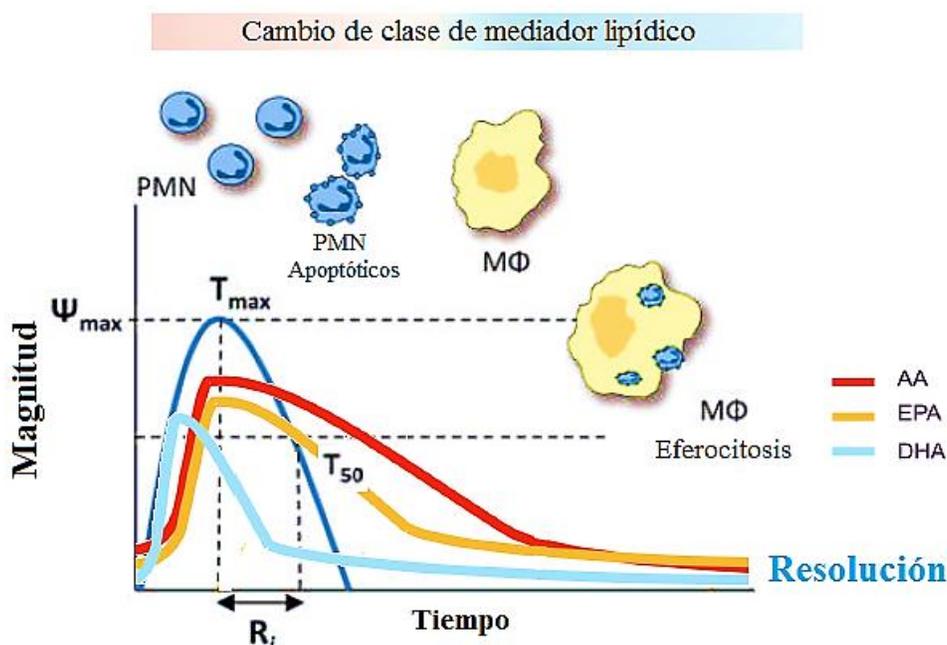
### **Resolución de la inflamación**

La respuesta inflamatoria puede ser definida por el índice de infiltración de neutrófilos en el foco inflamatorio, ya que son las primeras células reclutadas a un sitio perturbado y su función es la eliminación de patógenos y células parenquimatosas muertas. Después de la terminación de su función, los neutrófilos sufren apoptosis y son fagocitados por monocitos que se diferencian en macrófagos, y estos son eliminados por apoptosis. De tal forma que la desaparición del infiltrado neutrofílico aunado al cambio de clase de los mediadores lipídicos indican que se activó el proceso de resolución de inflamación como se muestra en la Figura 2 (Bannenberg and Serhan, 2010; Recchiuti and Serhan, 2012; Spite *et al.*, 2014).

Los mediadores lipídicos son fundamentales en la inducción y en la resolución de la inflamación, que depende de la producción de lípidos oxigenados derivados de los ácidos grasos poli-insaturados esenciales. Al inicio, la fosfolipasa A2 se activa en consecuencia de un incremento de calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ). A partir de los fosfolípidos de membrana esta enzima genera ácido araquidónico (AA) que metaboliza a eicosanoides (ácidos grasos de veinte carbonos) que por la acción de ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) permite la síntesis de prostanoides (prostaglandinas y tromboxanos), y por las lipooxigenasas (LOX) forma leucotrienos y lipoxinas (Bannenberg and Serhan, 2010).

El metabolismo del ácido araquidónico por la vía de COX genera diferentes prostanoides con un recambio metabólico rápido, que actúa generalmente en el entorno cercano de la célula o sobre ella misma mediante la activación de receptores específicos acoplados a proteínas G, los cuales difieren por el agonista que unen con mayor afinidad, la localización tisular y las vías de señalización acopladas. Los niveles de producción de prostaglandinas dependen de la expresión y actividad de las enzimas COX. La COX presenta dos isoformas que catalizan las mismas reacciones, pero con diferentes patrones de expresión: COX-1 se

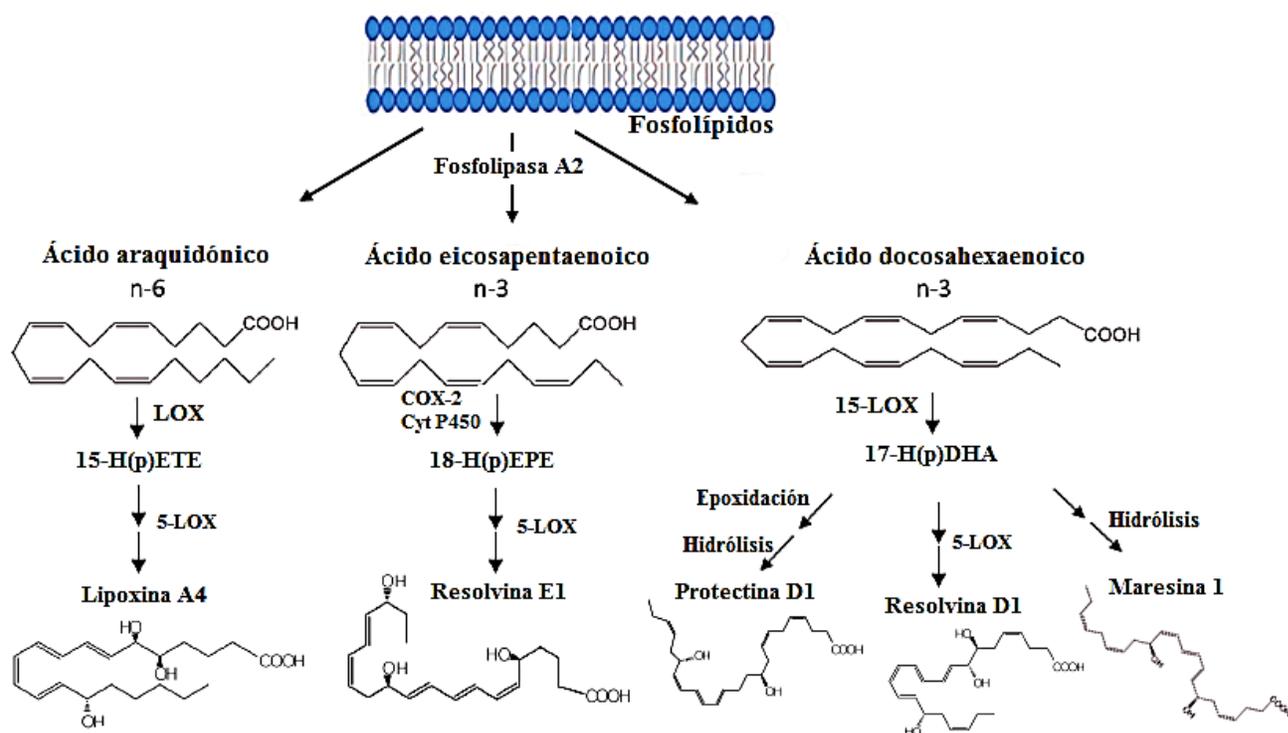
expresa constitutivamente en la mayoría de los tipos celulares y es responsable del mantenimiento de las funciones fisiológicas básicas y de la producción basal de prostanoideos; COX-2 se induce por mediadores inflamatorios y mitógenos y se piensa que es clave en muchos procesos fisiológicos (Smith and Langenbach, 2001).



**Figura 2. Resolución de la inflamación.** La resolución de la inflamación comienza por la disminución del infiltrado neutrofílico y el cambio de clase de los mediadores lipídicos de un fenotipo pro-inflamatorio con la participación de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (que provienen de la síntesis del AA), hacia un fenotipo antiinflamatorio con la participación de mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (que provienen de la síntesis del EPA y del DHA) hasta llegar a la resolución de la respuesta inflamatoria. AA; ácido araquidónico, EPA; ácido eicosapentaenoico, DHA; ácido docosahexaenoico, PMN; neutrófilos,  $\Psi_{max}$ ; máxima infiltración de PMN,  $T_{max}$ : punto de tiempo donde los PMN alcanzan sus niveles máximos,  $T_{50}$ : donde los PMN disminuyen a la mitad,  $R_i$ : intervalo de resolución. Modificado de Spite *et al.*, 2014.

Si la respuesta inflamatoria aguda no se resuelve, el proceso puede conducir a inflamación crónica por estimulación persistente e incapacidad de eliminar al inductor, por respuestas excesivas en magnitud y/o duración, lo que puede generar daño tisular permanente, e

incluso la muerte (García 2008; Cinel and Opal 2009; Buckley et al., 2014). Por lo tanto, es necesario dar por terminada la inflamación. Los SPM se generan después del metabolismo de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 ingeridos con la dieta, son productos derivados del ácido linoléico (C18:  $\Delta^2$ , n-6), ácido araquidónico (AA, C20:  $\Delta^4$ , n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:55,8,11,14,17) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:64,7,10,13,16,19) generados a partir de reacciones enzimáticas mediadas por la acción de las lipooxigenasas (LOX) y/o ciclooxigenasas (COX) e incluyen protectinas y resolvinas de la serie D derivadas del ácido graso omega-3, DHA, las resolvinas de la serie E derivadas del EPA y lipoxinas derivadas del ácido graso omega-6 AA como se muestra en la Figura 3 (Bannenberg and Serhan, 2010; Serhan *et al.* 2008; Spite *et al.* 2010).



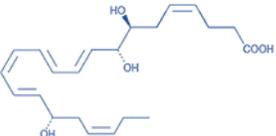
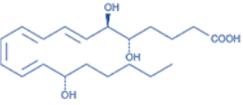
**Figura 3. Biosíntesis de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (SPM).** La biosíntesis de los SPM comienza con la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana gracias a la acción de enzimas de la familia de fosfolipasas A2 se libera AA, EPA o DHA que son sintetizados a través de la acción de la lipooxigenasa (LOX) y/o ciclooxigenasa (COX), y se generan después del metabolismo de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 ingeridos con la dieta. Las lipoxinas se generan a partir del AA; las resolvinas de la serie E se derivan del EPA, las maresinas, protectinas y resolvinas de la serie D se generan a

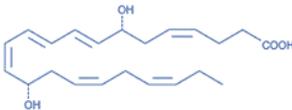
partir del DHA. AA; ácido araquidónico, EPA; ácido eicosapentaenoico, DHA; ácido docosahexaenoico. Modificado de Bannenberg and Serhan 2010.

Los metabolitos finales de esta cascada realizan funciones antiinflamatorias, como reparación tisular y regreso a la homeostasis. En diversas enfermedades inflamatorias crónicas se ha observado que un aumento en la ingesta de ácidos grasos omega-3 y omega-6 puede resolver la enfermedad al mismo tiempo que ayudar al retorno homeostático (Serhan *et al.* 2008; Spite *et al.* 2010).

En la Tabla 1 se muestran las acciones específicas de los SPM en estudio dependiendo de su acción por célula blanco.

**Tabla 1. Acciones específicas de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación por célula blanco**

SPM	Célula blanco	Acción
<p>Resolvin D1</p> 	Neutrófilo	Inhíbe la trans migración celular.
	Macrófago	Inhíbe la liberación de TNF inducida por LPS. Aumenta la fagocitosis de las células apoptóticas y alérgenos.
	Célula dendrítica	Inhíbe la producción de IL 12. Inhíbe la migración celular.
	NK	Expresa receptores CMKLR1.
<p>Lipoxina A4</p> 	Neutrófilo	Inhíbe la quimiotaxis, trans-endotelial y la migración transepitelial. Inhíbe la interacción de neutrófilos-célula epitelial. Inhíbe la generación de anión superóxido y la degranulación.
	Monocito	Estimula la quimiotaxis y adhesión. Inhíbe la generación de peroxinitrito. Reduce IL-8 liberación por las células de individuos con asma.
	Macrófago	Aumenta la fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos (eferocitosis).
	Eosinófilo	Inhíbe la migración y la quimiotaxis. Inhíbe la generación de eotaxina e IL-5.

	NK	Inhíbe la citotoxicidad de las células NK. Aumento de la apoptosis de granulocitos.
	Célula dendrítica	Inhíbe la producción de IL-12
	Célula epitelial	Aumento de la proliferación después de lesión con ácido, bloquea la liberación de IL-6 e IL 8.
	Célula endotelial	Estimula la formación de prostaciclina dependiente de PKC. Bloquea la generación de especies reactivas de oxígeno. Inhíbe la migración de células endoteliales inducida por VEGF.
	Fibroblasto	Inhíbe IL-1 $\beta$ inducida por IL-6, IL-8 y la producción de MMP 3. Inhíbe la proliferación de CTGF inducida.
	Músculo blando	Inhíbe la migración inicial de LTC4.
<p>Maresina 1</p> 	Célula T reguladora	Induce la formación de células T reguladoras y estimula la producción inducida anfirregulina.
	Células epiteliales bronquiales	Inhíbe la producción de citoquinas inducida por "polvo orgánico".
	Macrófago	Aumenta la inmersión de los neutrófilos apoptóticos.

Considerando que los SPM juegan un papel muy importante en el control de enfermedades y en la resolución de la inflamación se mencionarán algunos ejemplos. La administración de resolvina D1 inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias y dirige la polarización de macrófagos murinos de tejido adiposo hacia el fenotipo M2 (antiinflamatorio) (Titos, *et al.* 2011), mientras que la administración sistémica de resolvina E1 en ratones con neumonía causada por *Escherichia coli*, y en un modelo de daño pulmonar agudo asociado a peritonitis, reduce el infiltrado de neutrófilos (al aumentar la apoptosis de los neutrófilos), aumenta la eliminación bacteriana, disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias y aumenta la supervivencia de los hospederos (Seki *et al.* 2010; El Kebir *et al.* 2012).

Las lipoxinas y resolvinas regulan a la baja la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS (lipopolisacárido) en macrófagos humanos y al mismo tiempo incrementan la fagocitosis y

la eliminación de *E. coli* (Palmer *et al.* 2011). La 15-epi-lipoxina A4 tiene un efecto proapoptótico en neutrófilos y es protectora en un modelo murino de daño pulmonar por sepsis, ya que cuando es administrada posterior al estímulo disminuye la patología pulmonar (El Kebir *et al.* 2009).

La protectina D1 reduce la proliferación del virus de influenza H5N1 en células alveolares epiteliales humanas y reduce la mortalidad y la severidad de la enfermedad en un modelo murino. Otros ejemplos se muestran en las tablas 1 y 2 (Morita *et al.* 2013).

### **Avances en el conocimiento de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación en la infección por Mtb**

Se sabe que Mtb es fagocitado por los macrófagos alveolares donde puede residir por mucho tiempo y propagarse. Cuando ocurre la replicación bacteriana exponencial, conduce a la muerte de los macrófagos infectados y de los neumocitos (Repasy *et al.*, 2013; Divangahi *et al.*, 2009; Dorhoi *et al.*, 2014), lo cual facilita la propagación de Mtb a otras células e incluso su difusión a través de la pared alveolar (Kinhikar *et al.*, 2010; Castro-Garza *et al.*, 2002).

En el control de procesos infecciosos respiratorios, los SPM regulan la respuesta inflamatoria, evitan el daño ocasionado por necrosis (que está asociado a inflamación) y disminuyen la carga microbiana. En el caso de la tuberculosis el papel de los SPM está pobremente caracterizado. Trabajos realizados en pez cebra y en ratón sugieren que un exceso de lipoxinas antiinflamatorias es perjudicial durante las infecciones por micobacterias y que pueden aumentar la susceptibilidad a las infecciones crónicas mediante la inhibición de las respuestas inflamatorias necesarias para su erradicación porque los animales son incapaces de producir suficientes cantidades de TNF- $\alpha$  que regulan las respuestas Th1 protectoras (pro-inflamatorias) contra la infección por micobacterias *in vivo* (Tobin *et al.* 2010). En otro trabajo se reportó que ratones deficientes en la 5-lipooxigenasa (5-LO), enzima encargada de la producción de lipoxina, parecen tener un mejor control de la infección por Mtb y los ratones silvestres infectados con Mtb tratados con un inhibidor

de la 5-LO murieron más y tuvieron mayor carga bacteriana, por lo que proponen que los leucotrienos contribuyen al control de la infección por Mtb más que la lipoxina. Estos últimos resultados no sugieren que las lipoxinas son efectivamente perjudiciales en la infección por Mtb; la controversia radica en la interpretación de esos resultados. Los autores sugieren que el descontrol de la infección en ratones deficientes en 5-LO se debe más a su incapacidad de producir leucotrienos (inflamación) que a su incapacidad de producir lipoxina (antiinflamación) (Peres *et al.* 2007). Además, en modelos *in vitro* se ha observado que la cepa virulenta Mtb H37Rv induce la producción de lipoxina (LXA4) en macrófagos murinos para favorecer la necrosis y diseminación bacteriana mientras que inhibe la síntesis de prostaglandinas las cuales favorecen apoptosis para la contención de la infección. Se desconoce la participación de los otros SPM en el proceso infeccioso por Mtb.

**Tabla 2. Concentración y acción de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación**

SPM	Célula o modelo de estudio	Concentración	Acción	Referencia
PD1	Modelos de enfermedad crítica	Nanomolares	Aumenta la defensa del huésped y mejora la supervivencia	Fullerton <i>et al.</i> , 2014
	Eosinófilos humanos	Nanomolares	Fuente importante de PD1, disminuyen las moléculas de adhesión (CD11b y L-selectina), disminuye la quimiotaxis	
	Eosinófilos humanos	Nanomolares	Pacientes con deterioro PD1 contribuyen a la persistencia asmática severa y gravedad de la enfermedad	
	Plasma humano	26.7 pg/ml	Actividad antiinflamatoria	Mas <i>et al.</i> , 2012
	Suero humano	Por debajo de límites de detección en 1 ml de suero		Mas <i>et al.</i> , 2012
PDX	Neutrófilos humanos	Sub-micromolares	Agregación plaquetaria inducida por colágeno, inhibición de la COX-1 y ROS	Balas <i>et al.</i> , 2013
MaR2	Macrófagos humanos	10 pM	Aumenta actividad fagocítica de Zymosan 90%	Serhan <i>et al.</i> , 2015
RvE1		1 nM	Mejora la fagocitosis de los macrófagos	Fullerton <i>et al.</i> , 2014
			Regeneración tisular	Serhan <i>et al.</i> , 2014

	Modelo murino de neumonia		Inhibe la translocación y la activación de NF-kB (p65)	Uddin <i>et al.</i> , 2011
LXA4	Tejido adiposo de ratón (C57BL/6J)	1 nM	Atenúa la inflamación adipocítica, disminuye IL-6 y aumenta expresión de IL-10	Börgeson <i>et al.</i> , 2012
			Re-epiletización de la córnea	Serhan <i>et al.</i> , 2014
	Ratones con infección <i>T. gondii</i>	100 ng/ml	Aumento en suero de ratones	Keinan <i>et al.</i> , 2013
	PMN (leucocitos) humanos	0.1-10 nM	Incubados 20 minutos con leucotrienos, inhibe su actividad inflamatoria	Wan <i>et al.</i> , 2011
RvD3	Ratones		Actividad antiinflamatoria	Dalli <i>et al.</i> , 2012
	PMN (leucocitos) humanos	10 mM	Aumenta actividad fagocítica de Zymosan a las 10 y 100 horas	Dalli <i>et al.</i> , 2012
AT-RvD3	PMN (leucocitos) humanos	1 y 10 pM	Propiedades anti-migratorias	Dalli <i>et al.</i> , 2012
RvD1 y RvD2	Ratones	2 µg/kg-ruta intraperitoneal	Examinado a la primera hora y a las 12 horas-Disminución de CEES	Jordt, 2013
RvD1	Ratones	Picomolares	Aumenta actividad fagocítica	Serhan <i>et al.</i> , 2014
	Ratones	100ng/kg	Disminuye citocinas pro-inflamatorias (por activación con LPS [500 ng/ml])	Serhan <i>et al.</i> , 2015
	Macrófagos humanos	10nM	Detectado en macrófagos humanos, disminuye translocación nuclear NF-kB	Recchiuti <i>et al.</i> , 2014
	Ratones, modelo de peritonitis	300ng/ratón o 15µg/kg	Actividad antiinflamatoria en 4 horas, disminución de infiltración de neutrófilos, disminución de zymosan	Recchiuti <i>et al.</i> , 2014
	Sangre	24.4 pg/ml	Colectada en suero (en 1 ml)	Mas <i>et al.</i> , 2012
		31.4 pg/ml	Colectada en EDTA (en 1 ml)	Mas <i>et al.</i> , 2012
		33 pg/ml	Colectada en heparina (en 1 ml)	Mas <i>et al.</i> , 2012
		40.6 pg/ml	Colectada en citrato (en 1 ml)	Mas <i>et al.</i> , 2012
		Células epiteliales alveolares de	50 nM	En presencia o ausencia de LPS (1 µg/ml) durante 12 horas a 37 °C, disminuye citocinas pro-

	rata		inflamatorias	
MaR1	Macrófagos	Nanomolares	Regeneración tisular	Serhan <i>et al.</i> , 2014
	Macrófagos	1-200 nM	Atenuación de citocinas pro-inflamatorias	Serhan <i>et al.</i> , 2015
	Ratones modelo de peritonitis	1 ng	Actividad antiinflamatoria	Wang <i>et al.</i> , 2016

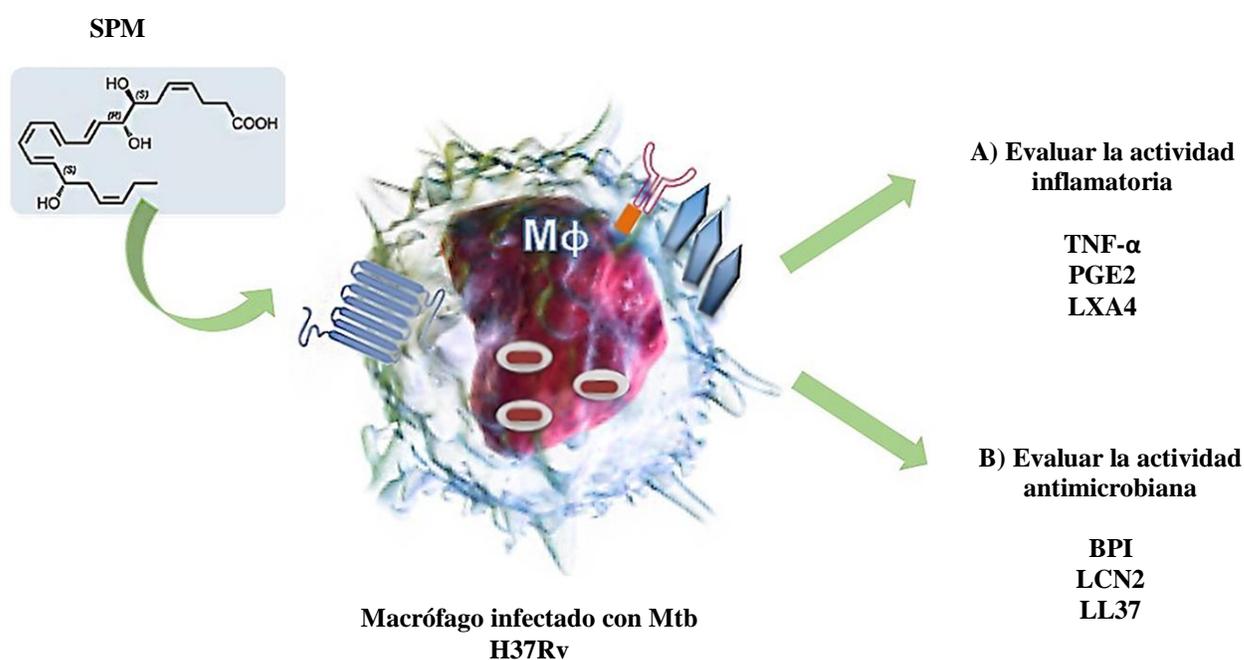
No existen estudios que intenten demostrar el papel de las lipoxinas en un contexto de infección por Mtb de células humanas *in vitro*. No obstante, se ha realizado la búsqueda de lipoxinas y resolvinas en suero o plasma de pacientes con tuberculosis y se ha observado que los pacientes recién diagnosticados tienen niveles altos de prostaglandinas y bajos de lipoxinas comparados con los valores de sujetos sanos y que su relación PGE2/LXA4 correlaciona con la severidad de la enfermedad (Shu *et al.* 2013; Serhan 2015).

En otro estudio en el que se investigó la posibilidad de utilizar los perfiles bioquímicos de moléculas pequeñas en suero como biomarcadores de la tuberculosis se encontró que los pacientes con tuberculosis tienen una disminución no significativa de los ácidos grasos esenciales linoleato (omega-3), DHA y el EPA, y los derivados de estas moléculas esenciales a partir de los cuales se sintetizan los SPM estaban disminuidos significativamente (Weiner *et al.* 2012), lo que sugiere que los pacientes con tuberculosis activa tienen bajos niveles de SPM y concuerdan con la idea de que la presencia de mediadores pro-inflamatorios es perjudicial en este tipo de pacientes. Un estudio piloto de metabolómica/lipidómica realizado con plasma de pacientes con tuberculosis recién diagnosticados encontró que los pacientes tienen aumentados sus niveles de resolvinas de la serie D (RvD1 y RvD2) comparados con sus familiares (convivientes) (Frediani *et al.* 2014).

En un estudio realizado en grandes cohortes de pacientes con tuberculosis y lepra de Vietnam y Nepal, respectivamente, demostraron que pacientes con una mutación en el gen de LTA4H, enzima que participa en la generación de lipoxina, se asocia con protección y baja mortalidad, y se demostró que el desequilibrio entre mediadores pro-inflamatorios y

antiinflamatorios es responsable de la severidad de la enfermedad (Tobin and Ramakrishnan 2013).

De modo que nuestra propuesta es evaluar algunos mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (SPM; RvD1, RvD2, PDX, LXA4 y MaR1) en macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb) y evaluar si pueden inducir cambios en la producción de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4 y en la actividad antimicrobiana (Figura 4).



**Figura 4. Propuesta para evaluar la actividad de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (SPM).** El macrófago será infectado con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb), y posteriormente se les agregaran los SPM en estudio (RvD1, RvD2, PDX, LXA4 y MaR1) para evaluar algunos factores y citocinas inflamatorias y su actividad antimicrobiana.

## JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune (inmunitaria) innata participa en el control de la infección pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y ayuda a detener el progreso de la tuberculosis con la producción de mediadores pro-inflamatorios que son importantes al inicio de la infección, pero si su producción es sostenida contribuye a la severidad de la enfermedad. Se sabe que los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (SPM) contribuyen al control de la inflamación y se piensa que pueden participar en la activación de mecanismos bactericidas, por lo que en este trabajo proponemos investigar el efecto que tienen los SPM como la lipoxina A4 (LXA4), las resolvinas D1 y D2 (RvD1 y RvD2) y las protectinas (PDX y MaR1) en macrófagos humanos en respuesta a la infección experimental por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb).

## **HIPÓTESIS**

Los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (LXA4, RvD1, RvD2, PDX y MaR1) tienen un efecto protector en el proceso infeccioso por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) al regular negativamente la expresión de TNF- $\alpha$  y activar los mecanismos bactericidas del macrófago humano para controlar la infección.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la participación de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación LXA4 (lipoxina), RvD1, RvD2 (resolvinas), PDX y MaR1 (protectinas) en la activación del macrófago humano durante la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).

### Objetivos particulares

- 1.-Evaluar la contribución de cada SPM en estudio sobre la producción de TNF- $\alpha$ , prostaglandina E2 (PGE2) y lipoxina A4 (LXA4) por el macrófago humano infectado con Mtb H37Rv (Mtb, cepa virulenta).
- 2.-Determinar el efecto de los SPM sobre la actividad bactericida del macrófago infectado con Mtb H37Rv.
- 3.-Investigar la capacidad de los SPM para inducir la expresión génica de los péptidos antimicrobianos BPI (proteína bactericida aumentadora de la permeabilidad), LL37 (catelicidina) y LCN2 (lipocalin 2).

## **METODOLOGÍA**

### **1.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

Las células fueron aisladas de paquetes leucocitarios obtenidos del banco de sangre del INER, la sangre se diluyó a una relación 1:1 con medio RPMI 1640 (Lonza) y fueron separadas por medio de un gradiente de densidad en una solución separadora de linfocitos (Lonza) a una relación de 1:3 (solución separadora: sangre diluida), después fueron centrifugadas durante 45 minutos (1200 rpm (revoluciones por minuto), 25 °C), para recuperar el anillo leucocitario por aspiración con una pipeta de transferencia y se colocó en un nuevo tubo cónico de 50 ml (Falcon). Los residuos de la solución separadora de linfocitos se eliminaron de las células llevando el volumen a 50 ml con medio RPMI, se centrifugó 10 minutos (1500 rpm, a 25 °C, tres veces). Finalmente, el botón celular se resuspendió en RPMI suplementado con 10 % de suero humano (Valley Biomedical Inc.), 200 mM de L-glutamina (Lonza) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Lonza).

### **2.- Obtención de monocitos por perlas magnéticas (Miltenyi)**

Se obtuvieron monocitos purificados por separación inmunomagnética, a partir de células mononucleares de sangre periférica, PBMC (del inglés Peripheral Blood Mononucleated Cell), como se describe a continuación. Después de la obtención de los PBMC y su resuspensión en medio RPMI, se centrifugaron 10 minutos (2000 rpm, a 4 °C), el sobrenadante fue eliminado y el botón celular se resuspendió cuidadosamente. Por cada  $10^7$  células totales se les agregó 80µl de buffer Miltenyi (PBS 0.5 %, BSA-2 mM, EDTA-0.5, pH de 7.2) y 20 µl de perlas conjugadas con anticuerpo anti CD14 humano (Miltenyi Biotech) incubándose durante 15 minutos a 4 °C en obscuridad. Posteriormente las células fueron lavadas con 2 ml de buffer Miltenyi (por cada  $10^7$  células totales), centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos (temperatura ambiente) y resuspendidas en 1 ml de buffer Miltenyi. Durante este paso se preparó la columna, se humedeció con 3 ml de buffer Miltenyi. Se tomó la suspensión celular y se resuspendió cuidadosamente con una micropipeta de 1000 µl colocándose sobre el filtro, y se agregó 3 ml de buffer Miltenyi. El filtro se retiró y la columna fue lavada con 3 ml de buffer Miltenyi para la recuperación de las células acopladas a las perlas magnéticas que se recuperaron en un tubo limpio.

Obtenida la población CD14<sup>+</sup>, se centrifugó 15 minutos (1200 rpm, a 4 °C). El sobrenadante se descartó y se agregó 5 ml de medio RPMI con 10 % de suero humano, se realizó el conteo de los monocitos 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. La pureza y viabilidad de los MN se determinaron por citometría de flujo y se observó que el 97.38±1.26% de las células fue CD14<sup>+</sup> y la viabilidad fue de 99.4 ±0.2% (media±ES) (Apéndice 1).

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

Los monocitos obtenidos por las perlas magnéticas se incubaron en una placa de 24 pozos (1X10<sup>6</sup> células/pozo) (Costar) a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> durante siete días para su diferenciación a macrófagos (MDM; macrófagos diferenciados de monocitos) realizando un cambio de medio de cultivo a los 3 días para eliminar las células no adherentes y otro a los siete días para tener medio fresco con volúmenes precisos en el momento de realizar las estimulaciones.

### **4.- Descongelamiento y disgregación de *M. tuberculosis* H37Rv**

El vial con Mtb H37Rv se descongeló dentro del gabinete de bioseguridad, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Después se le agregó 1 ml de medio RPMI suplementado con 30 % de suero humano con complemento. Para la obtención de bacilos individuales se adicionaron 5 perlas de cristal de 3 mm y se agitó vigorosamente en un agitador vórtex, durante 5 minutos. La suspensión de Mtb se centrifugó a 2000 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recolectó el sobrenadante y se pasó a otro vial donde se ajustó el número de bacilos a 1X10<sup>7</sup> bacterias/ml. A partir de esta suspensión se realizaron los cálculos correspondientes para los ensayos de la infección de los macrófagos (razón de 5 bacterias por macrófago).

### **5.- Infección de macrófagos humanos**

Los MDM (1X10<sup>6</sup>/pozo cuando se trató de placas de 24 pozos y 2X10<sup>5</sup>/pozo cuando se trató de placas de 96 pozos) se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb), a razón de 5

bacterias por macrófago (MOI 5) durante una hora en medio RPMI con 30% de suero humano complementado. Al término de este tiempo los pozos se lavaron tres veces con medio RPMI para eliminar las bacterias que no fueron fagocitadas. Se adicionó medio fresco con RPMI suplementado con 10 % de suero humano (1 o 0.2 ml para placas de 24 o 96 pozos, respectivamente). En este medio nuevo se hicieron las estimulaciones con SPM. Se incluyeron controles de la dosis de infección determinada por el método de unidades formadoras de colonias (UFC).

### **6.- Estimulación con los SPM**

Se realizaron estudios piloto de la toxicidad de los SPM sobre los macrófagos utilizando el ensayo Cell Titer (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ocupando diferentes concentraciones de SPM (para RvD1, RvD2, PDX y LXA4 se utilizaron las concentraciones: 0.1 nM, 1 nM, 10 nM y 100 nM, para MaR1 se utilizaron las concentraciones de 10nM, 150 nM, 300 nM y 600 nM) y dos tiempos (a las 6 y a las 24 horas) de acuerdo a concentraciones utilizadas en la literatura (Apéndice 2). Al mismo tiempo se determinó el tiempo de incubación para detectar niveles suficientes de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4 mediante ELISA (a las 24, 48 y 72 horas). Las células se estimularon con 200 ng/ml de LPS (Sigma) como control positivo para la producción de TNF- $\alpha$ , y se incubaron hasta la recuperación de sobrenadantes para la determinación posterior de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4 (Apéndice 3).

El tiempo final para la recuperación de sobrenadantes en el estudio fue de 24 horas, y las concentraciones de los SPM fueron de 100 nM/ml para RvD1, RvD2, PDX, LXA4, y de 150 nM/ml para MaR1.

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

En los sobrenadantes de los cultivos se midió el TNF- $\alpha$ , mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y cada muestra se ensayó por duplicado.

Las placas de ELISA (Placas Maxisorp F96, Nunc) se incubaron a 4 °C toda la noche con anticuerpo de captura diluido (Anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, Pharmingen, San José, CA)

1:500 con PBS (Lonza, Walkersville, MD) 50 µl por pozo. Se lavó 3 veces con PBS 0.01 M, pH 7.2; Tween-20 al 0.05 % para eliminar el anticuerpo de captura. Se adicionó 100 µl de Superblock (Pierce, Rockford, IL) por pozo, incubándose 30 minutos a 37 °C. Se agregó solución de lavado (3 veces) para eliminar los restos del Superblok y se adicionaron las muestras, 50 µl por pozo. Se incubaron a 37 °C durante 2 horas, se agregó solución de lavado como antes, y se agregó el anticuerpo conjugado anti-TNF- $\alpha$  humano biotinado (Pharmingen) diluido 1:1000 en PBS 0.01 M pH 7.2; Tween-20 al 0.05 %, BSA 2 %, 50 µl por pozo, incubándose 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 6 veces y se eliminaron los restos de TNF- $\alpha$  biotinado. Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con estreptoavidina-fosfatasa alcalina (Jackson) diluida 1:2000 en PBS 0.01 M pH 7.2; Tween-20 al 0.05 %, BSA 2 %, 50 µl 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), 50 µl por pozo, dejando desarrollar el color en oscuridad durante 15 minutos. La reacción se paró con NaOH 1 M. La absorbancia se cuantificó a 405 nm usando un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation). Las concentraciones de TNF- $\alpha$  se calcularon a partir de la curva estándar (Apéndice 4). Los resultados de las mediciones respectivas se midieron con el programa Ascent Software versión 2.6

## **8.- Cuantificación de prostaglandinas y lipoxinas por ELISA**

Las prostaglandinas fueron cuantificadas en los sobrenadantes de cultivos mediante el ensayo inmunoenzimático (EIA) y cada muestra se ensayó por duplicado, utilizándose el kit Prostaglandin E2 EIA (Biomedical Research, Oxford) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las lipoxinas fueron cuantificadas en los sobrenadantes de cultivos mediante el ensayo inmunoenzimático (EIA) y cada muestra se ensayó por duplicado, utilizándose el kit Lipoxin A4 EIA (Biomedical Research, Oxford) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para ambas la absorbancia se cuantificó a 650 nm usando un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation) o a 450 nm si la reacción fue detenida con 1N de HCl. Las concentraciones de prostaglandinas y lipoxinas se calcularon a partir de la curva estándar.

### **9.- Extracción de RNA y cDNA**

La obtención del RNA se realizó de las células lisadas con 350 µl del buffer de lisis (RTL), utilizando el kit de extracción RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. 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) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

### **10.- Expresión génica de BPI, LCN2, LL37 y COX-2 por PCR en tiempo real (qPCR)**

Se analizó la expresión del mRNA de BPI, LCN2, LL37 y COX-2, y el gen constitutivo 18S ribosomal (validado para su uso como gen de referencia).

El cDNA template se diluyó 1:5 con agua DEPC, y se realizó la mezcla de reacción utilizando el master Mix (2X Universal Master MixTaqMan, esta mezcla contiene la enzima DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y los desoxirribonucleósidos-trifosfato dTTP, dATP, dCTP y dGTP), para cada uno de los ensayos pre-diseñados: BPI (Hs01552756\_m1), LCN2 (Hs01008571\_m1), LL37 o CAMP (HS00189038\_m1), y COX-2 o PTGS2 (Hs000153133\_m1) marcados con FAM y 18S rRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA) marcado con VIC. Se mezclaron en un tubo y posteriormente se pusieron por duplicado en una placa de 96 pozos (Applied Biosystems), se agregó 20 µl por pozo. La placa fue sellada con plástico adhesivo óptico (Applied Biosystems). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador StepOne PlusSystem (Applied Biosystems), las temperaturas de amplificación empleadas fueron 50 °C 2 minutos, 95 °C 10 minutos y posteriormente 40 ciclos a 95 °C – 30 segundos y 62°C -1 minuto.

Los resultados se analizaron empleando el método del Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ). Los valores de expresión de los genes de interés se normalizaron empleando el método  $\Delta Ct$ , que consiste en calcular valores de expresión relativa como diferencias entre un factor de normalización, que en este caso es la media geométrica de la expresión del gen de referencia, y los valores de Ct medio de cada gen. Posteriormente se sumó una constante y se obtuvo un valor de expresión relativo para cada gen en cada muestra, en el que un incremento de 1 supone el doble de expresión.

### **11.- Translocación nuclear de Nrf2**

La translocación del factor nuclear Nrf2 (factor relacionado a NF-E2, factor nuclear (derivado de eritroide 2) tipo 2 (NF-E2L2)) se realizó utilizando un kit de ELISA de unión al DNA del factor de transcripción (TransAM Nrf2, USA, California). El kit contiene una placa de 96 pocillos a los que se han inmovilizado varias copias de un oligonucleótido específico de doble cadena que contiene el elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés antioxidant response element) (5'-3' GTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-). Cuando se añade el extracto nuclear, el factor de transcripción activado de interés se une específicamente a este oligonucleótido en su sitio de unión consenso y se detecta mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra Nrf2, la adición del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) proporciona una lectura colorimétrica sensible que es fácilmente cuantificable por espectrofotometría (450 nm), utiliza un anticuerpo incluido que es específico para la forma unida-activa del factor de transcripción en estudio.

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

La proteína nuclear se obtuvo de MDM por diferenciación en placas de 24 pozos de ultra baja adherencia ( $1 \times 10^6$  células/pozo) (Corning Incorporated, Costar) como se indicó anteriormente. Al final de la diferenciación, las células fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) una hora antes de la adición de los SPM (RvD1, RvD2, PDX, LXA4 a 100 nM/ml y MAR1 a 150 nM/ml). Las células se removieron de las placas con ayuda de un poco de buffer 1mM de EDTA (ácido etilendiamino tetra acético) (Corning Incorporated, Costar) y

se comprobó la viabilidad de las mismas con azul de tripano. Se transfirieron a tubos cónicos de polipropileno de 14 ml (5 millones de células por condición), se centrifugaron dos veces por 5 minutos a 1500 rpm a 4 °C y se procedió a la extracción de proteínas nucleares. Todo el procedimiento se realizó en frío. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se agitó brevemente en vórtex, se resuspendió en 1 ml de PBS frío pipeteando suavemente y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Después se centrifugó 5 minutos a 3500 rpm a 4 °C, y se volvió a resuspender en 1 ml de PBS frío pipeteando suavemente para después centrifugar a 3500 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante completamente usando las pipetas p100-p10. El botón celular se resuspendió en un buffer hipotónico para la obtención del extracto citoplásmico (HEPES [4-(2-hidroxiethyl)-1-ácido piperazinetanosulfónico] 20 mM pH 7.9, NaCl [Cloruro de sodio] 400 mM, MgCl [Cloruro de Magnesio] 1.5 mM, Glicerol 25 %, EDTA 0.2 Mm, DTT [ditiotreitól] 1 mM fresco y PMSF [fluoruro de fenilmetilsulfonilo] 0.5 mM fresco) y se dejó 1 minuto en hielo, para después centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C.

En este paso se reservó el sobrenadante (que es la fracción citoplasmática) y se colocó en tubos previamente etiquetados, asegurándose de no dejar líquido residual. Se guardarón a -20 °C. El sedimento se resuspende en 20 µl de buffer hipertónico (HEPES 10 mM pH 7.0, KCl [Cloruro de potasio] 10 mM, MgCl 1.5 mM, DTT 1 mM fresco), se incubó por 30 minutos con agitación suave a 4 °C (usando una plataforma angular en el refrigerador). Después se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante (que contiene la proteína nuclear) y se colocó en tubos previamente etiquetados. Los extractos obtenidos se almacenaron en congelación para conservar hasta su uso (-20 °C).

### **13.- Análisis estadístico**

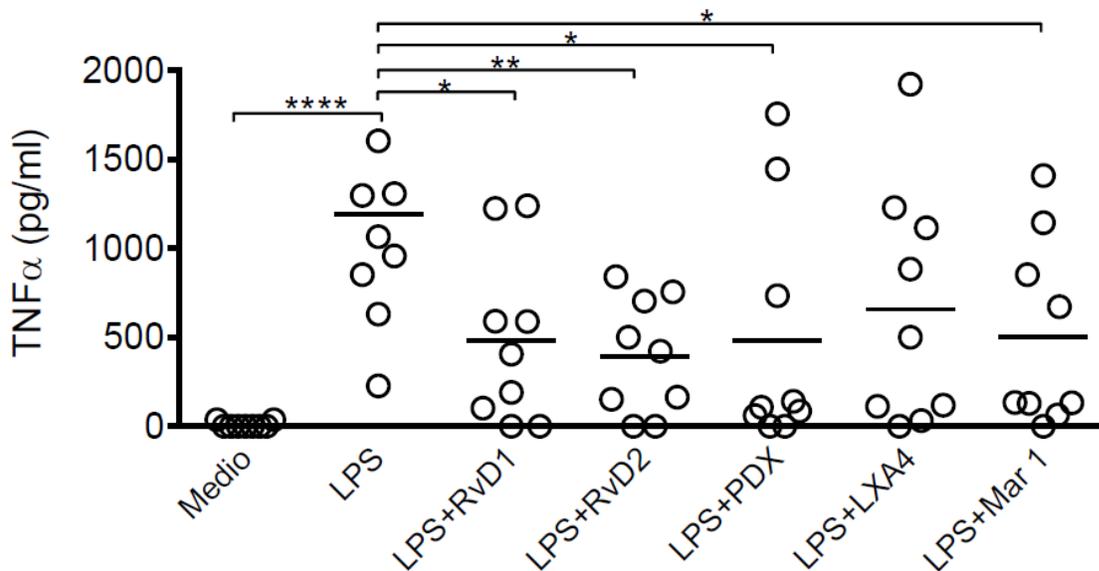
Los datos se analizaron utilizando la ANOVA de Friedman para datos no paramétricos relacionados entre sí, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Todos los valores se expresan como datos individuales y se señala la mediana o en box plots indicando cuartiles y medianas. Se consideró significancia estadística con  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism, versión 6.

## RESULTADOS

### 1. Actividad antiinflamatoria de los SPM sobre el macrófago humano

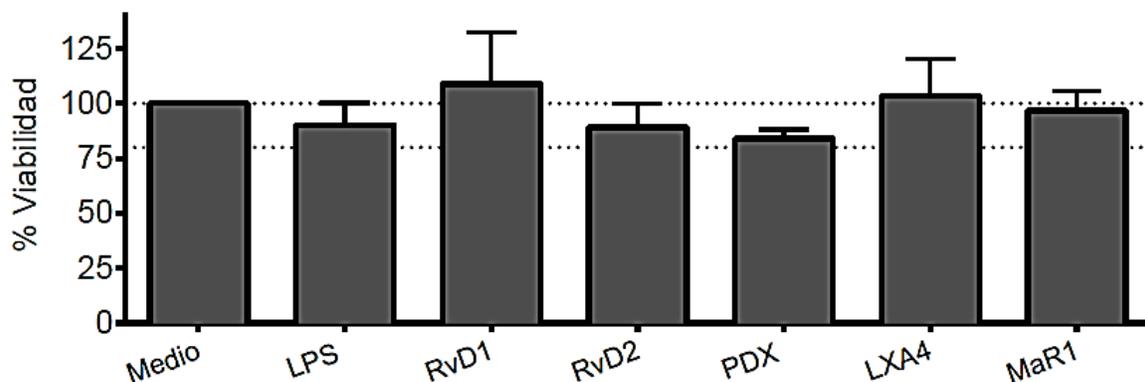
#### 1.1 Los SPM disminuyen la producción de TNF- $\alpha$ en macrófagos estimulados con LPS

Se sabe que el LPS activa la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos y que algunos SPM como la RvD1 y algunas lipoxinas en modelos de inflamación de murinos reducen esa respuesta (Palmer *et al.*, 2011; Serhan *et al.*, 2015). Para establecer que los SPM en estudio ejercen una actividad biológica sobre los macrófagos humanos se determinó la producción de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante. Primero se estimularon los macrófagos con LPS (200 ng/ml) durante dos horas, y después se les añadió los SPM y se evaluó la producción de TNF- $\alpha$  a las 24 horas de cultivo. Observamos una disminución en la producción de TNF- $\alpha$  dependiente de la estimulación con LPS en células estimuladas con los SPM. Encontramos diferencias significativas entre células estimuladas con LPS, y células con los SPM en estudio, \* $p < 0.05$ ,  $n = 9$ , Fig. 4.



**Figura 5. Actividad antiinflamatoria de los SPM sobre macrófagos estimulados con LPS.** Las células fueron estimuladas durante 2 horas con 200 ng/ml de LPS, después se les añadió los SPM: RvD1, RvD2, PDX y LXA4 (100 nM/ml) y Mar1 (150 nM/ml). La producción de TNF- $\alpha$  se determinó por ELISA en los sobrenadantes a las 24 horas,  $n = 9$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.002$ , \* $p < 0.03$ .

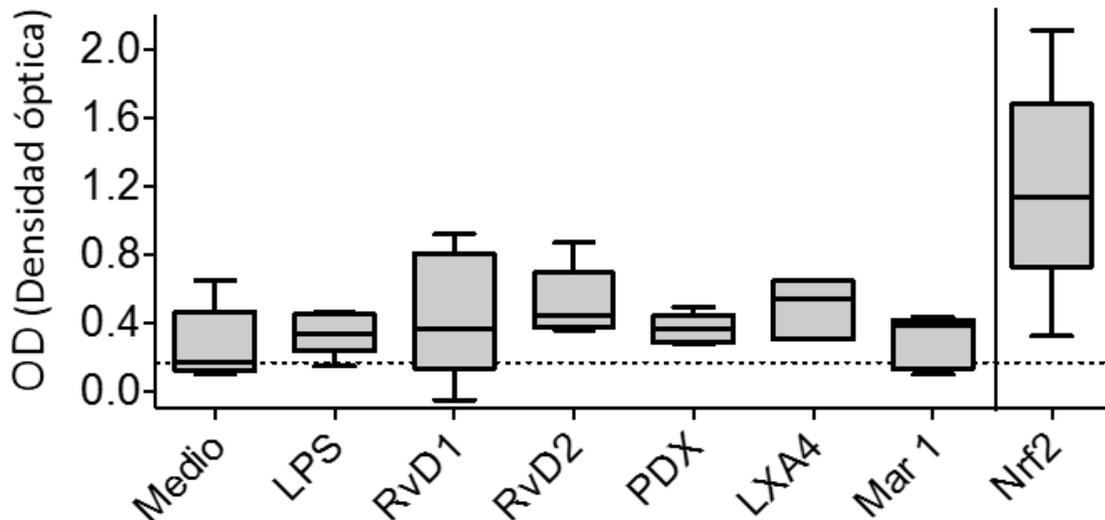
Los SPM no afectan significativamente la viabilidad en las concentraciones utilizadas para estos experimentos. No se observaron diferencias significativas respecto a células sin estimular, con un porcentaje de viabilidad superior al 80% en todos los casos, n=8, Fig. 5.



**Figura 6. Porcentaje de viabilidad de los macrófagos al añadirles los SPM.** Las células fueron estimuladas con 200 ng/ml de LPS o 100 nM/ml de RvD1, RvD2, PDX, LXA4 o 150 nM/ml de MaR1. La prueba de viabilidad se realizó con un kit de detección (Cell Titer) a las 24 horas. No hubo diferencias significativas respecto a las células sin estimular (Medio). Porcentaje de viabilidad mayor al 80 %, n=8.

### 1.2 La estimulación con SPM causa la translocación nuclear de Nrf2

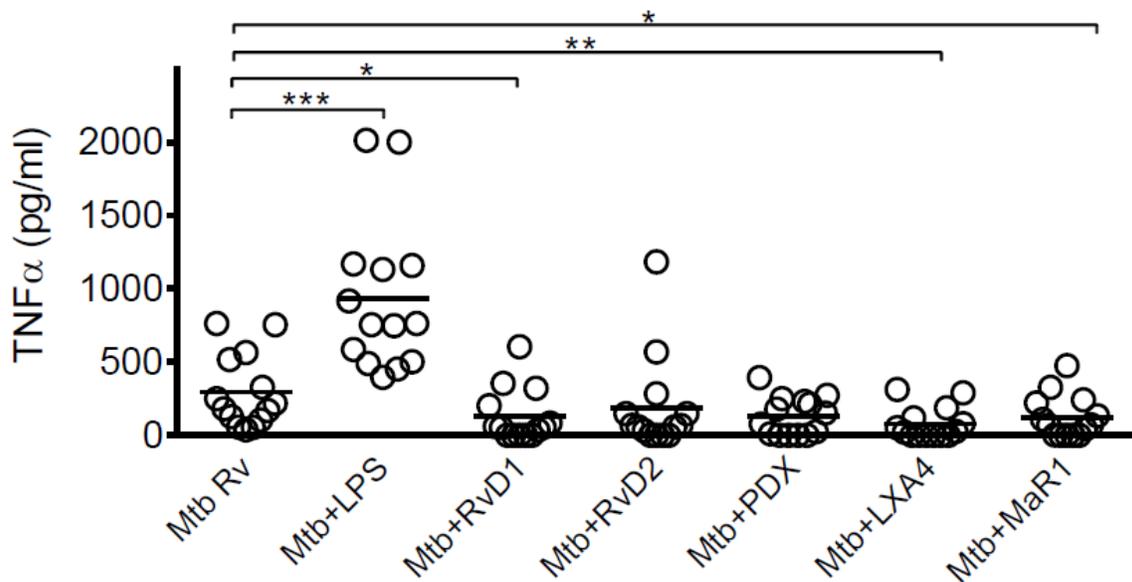
Después de valorar que la disminución en la producción de TNF- $\alpha$  no se debió a que las células estaban muertas, evaluamos si la reducción de TNF- $\alpha$  ocurrió por señalización de los SPM. Para ello determinamos la translocación al núcleo de Nrf2 (factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2, NF-E2). Este factor se ha relacionado en la protección del organismo frente al estrés oxidativo, así como su participación en la regulación positiva de procesos inflamatorios, al bloquear diferentes citocinas como TNF- $\alpha$ , quimiocinas, enzimas pro-inflamatorias como COX-2 e iNOS (vía inhibición de NFkB), etc. La translocación del Nrf2 se evaluó mediante un kit de detección por ELISA. Todos los SPM indujeron la translocación al núcleo de Nrf2, pero no fue significativa respecto al control con LPS, n=6, Fig. 6. Para efectos de validación del sistema de detección, se utilizaron 5  $\mu$ g de Nrf2 purificado en cada corrida de ELISA.



**Figura 7. Translocación nuclear de Nrf2.** Las células fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) una hora antes de la adición de los SPM (RvD1, RvD2, PDX, LXA4 a 100 nM/ml y MAR1 a 150 nM/ml). Se realizó la extracción de proteínas nucleares y se detectó el Nrf2 por un ELISA para Nrf2, n=6. La línea punteada señala la mediana de las células cultivadas sólo con medio.

## 2. Los SPM disminuyen la producción de TNF- $\alpha$ en macrófagos infectados con Mtb H37Rv

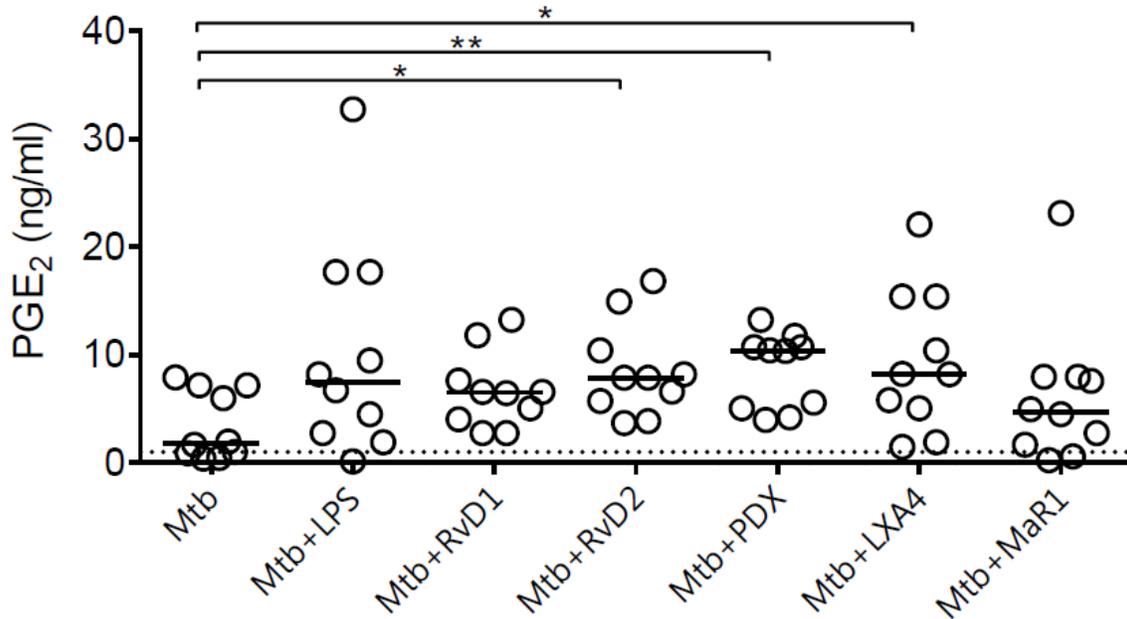
Una vez demostrado que los SPM en estudio ejercen actividad reguladora de la producción de TNF- $\alpha$  en células no infectadas, investigamos si sucede el mismo fenómeno durante la infección por la cepa virulenta de Mtb. La producción de TNF- $\alpha$  se determinó en macrófagos infectados a las 24 horas de cultivo. Solamente RvD1 y LXA4 son capaces de disminuir significativamente la producción de TNF- $\alpha$ . El LPS que es un potente inductor de TNF- $\alpha$ , aumenta significativamente su producción en presencia de la infección, n=14, \*p<0.05, Fig. 7.



**Figura 8. Efecto de los SPM sobre la producción de TNF- $\alpha$  en infección por Mtb H37Rv.** Los macrófagos fueron infectados con Mtb H37Rv con un MOI de 5 durante una hora. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se añadieron los SPM, RvD1, RvD2, PDX, LXA4 (100 nM/ml) y MaR1 (150 nM/ml). Se dejaron en incubación a 37 °C. A las 24 horas se recuperaron los sobrenadantes para la cuantificación de TNF- $\alpha$  por ELISA, n=14, \*p<0.05.

### 3. Producción de PGE2 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv

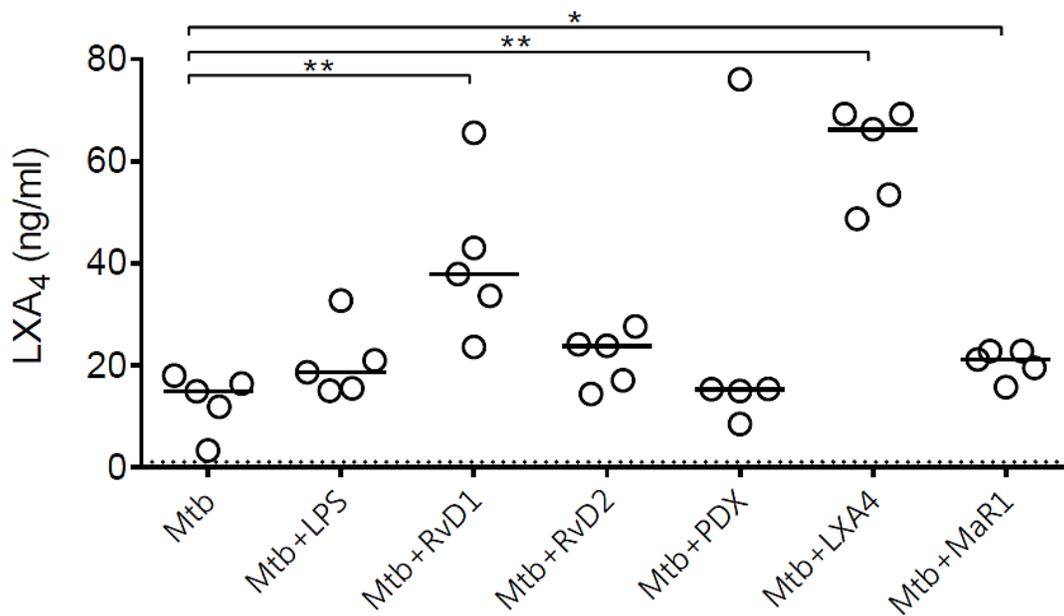
Debido a que la producción de TNF- $\alpha$  inducida por la infección con la cepa virulenta de Mtb es muy baja, cuantificamos la producción de la prostaglandina E2 (PGE2) en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos humanos infectados. La PGE2 está asociada a un proceso pro-inflamatorio, y se sabe que puede amplificar la producción de citocinas pro-inflamatorias (como TNF- $\alpha$ , la interleucina 1 [IL-1], la interleucina 2 [IL-2], quimiocinas, y los interferones de tipo I y II) (Galli, *et al.*, 2011; Deretic, 2012). Observamos que LPS, el control de inducción de la inflamación, induce la producción de grandes cantidades de PGE2 en las células infectadas, pero de los SPM solo RvD2, PDX y LXA4 lo hacen. RvD1 y MaR1 no inducen PGE2, Fig. 8.



**Figura 9. Efecto de los SPM sobre la producción de PGE<sub>2</sub> en infección por Mtb H37Rv.** Los macrófagos humanos fueron infectados con Mtb H37Rv con un MOI de 5 durante una hora. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se adicionaron los SPM, RvD1, RvD2, PDX, LXA4 (100 nM/ml) y MaR1 (150 nM/ml). Se dejaron en incubación a 37 °C. A las 24 horas se recuperaron los sobrenadantes para la cuantificación de PGE<sub>2</sub> por ELISA, n=10, \*p<0.01, \*\*p<0.008.

#### 4. Producción de LXA4 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv

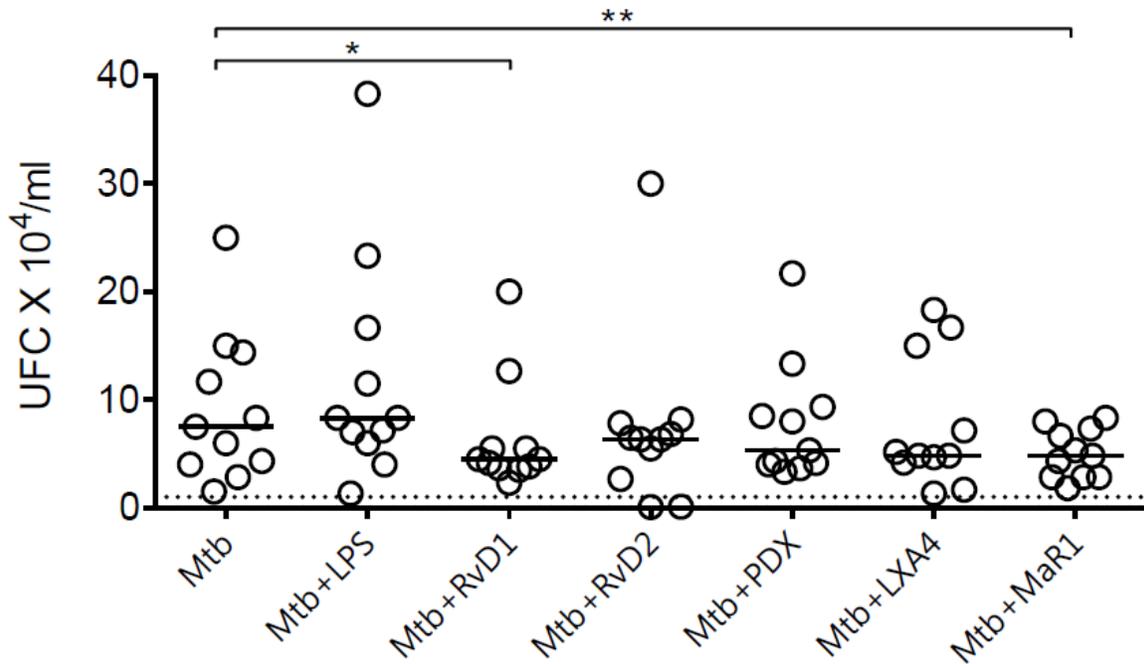
La LXA4 es un potente antiinflamatorio local con una amplia gama de acciones relevantes en la inflamación y en la “hipersensibilidad” inmune, se sabe que inhibe la diapédesis de neutrófilos, así como su actividad neutrofílica (Dorhoi and Kaufmann, 2014). Después de evaluar la producción de dos mediadores pro-inflamatorios, cuantificamos la producción de uno antiinflamatorio, la lipoxina A4 (LXA4), en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos humanos infectados con Mtb H37Rv. Se encontraron cantidades significativas de LXA4 en las células infectadas y estimuladas con RvD1 (n=5, \*p<0.03) y LXA4 (n=5, \*\*p<0.01), Fig. 9.



**Figura 10. Efecto de los SPM sobre la producción de LXA4 en infección por Mtb H37Rv.** Los macrófagos humanos fueron infectados con Mtb H37Rv con un MOI de 5 durante una hora. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se adicionaron los SPM, RvD1, RvD2, PDX, LXA4 (100 nM/ml) y MaR1 (150 nM/ml). Se dejaron en incubación a 37 °C. A las 24 horas se recuperaron los sobrenadantes para la cuantificación de LXA4 por ELISA, n=5, \*\*p<0.007, \*p<0.03.

### 5. La resolvina RvD1 y la protectina Mar1 aumentan la actividad bactericida del macrófago humano infectado con Mtb H37Rv

Está descrito que algunos de los SPM activan mecanismos bactericidas en las células. Por tanto, investigamos si los SPM en estudio activan a los macrófagos infectados con Mtb H37Rv para un mejor control de la infección. Se realizaron infecciones de los macrófagos humanos con Mtb H37Rv en relación de cinco bacterias por macrófago (MOI 5) para evaluar el efecto de los SPM por conteo UFC posterior a los 21 días de infección. Observamos una disminución de la carga bacteriana con RvD1 (una mediana de 4.5 [rango de 2.3-20] UFC/ml) y MaR1 (una mediana de 4.8 [rango de 1.8-8.3] UFC/ml) en comparación con células infectadas (con una mediana de 7.5 [rango de 1.5-25] UFC/ml), n=11, \*p<0.05, Fig. 10.

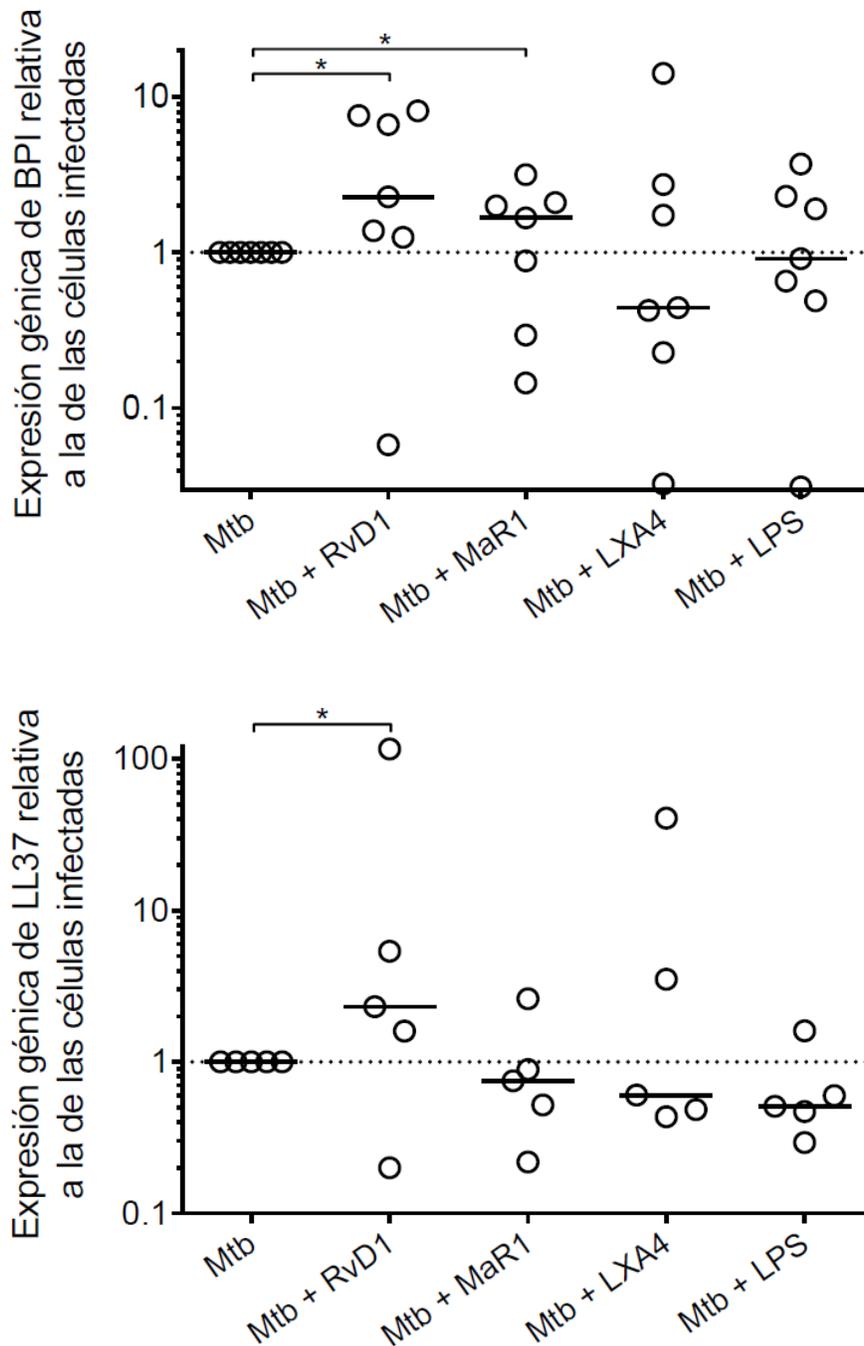


**Figura 11. Efecto de los SPM sobre la infección por Mtb H37Rv.** Los macrófagos humanos fueron infectados con Mtb H37Rv con una MOI de 5 durante una hora. Se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se añadieron los SPM, RvD1, RvD2, PDX, LXA4 (100 nM/ml) y MaR1 (150 nM/ml). Las células permanecieron en cultivo por 3 días y se determinó la carga bacteriana intracelular por el método de Unidades formadoras de colonias (UFC), n=11, \*\*p<0.05, \*p<0.05.

## 6. Expresión de BPI, LL37 y LCN2 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv

Tanto RvD1 como MaR1 disminuyeron el proceso inflamatorio asociado a la infección por Mtb y al mismo tiempo activaron al macrófago para un mejor control de la infección. Para entender el mecanismo por el cual se mejora el control de la infección, evaluamos la expresión génica de dos péptidos antimicrobianos, BPI y LL37. Incluimos como un control negativo a LXA4 y LPS, los cuales no indujeron actividad bactericida.

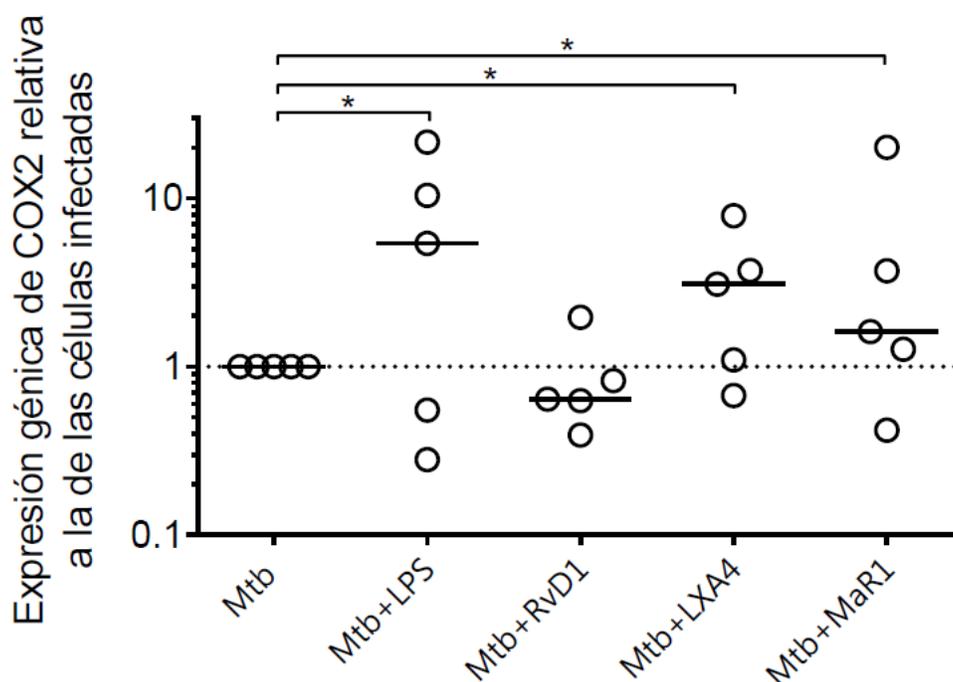
Encontramos sobre expresión de BPI en las células estimuladas con RvD1 (mediana 2.276 [rango de 0.05-8.1] órdenes de magnitud) y MaR1 (mediana de 1.665 [rango de 0.14-3.157] órdenes de magnitud) respecto a macrófagos sólo infectados con Mtb H37Rv, n=7, Fig 11. No hubo expresión génica de LCN2 (datos no mostrados).



**Figura 12. Expresión génica relativa de BPI y LL37 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv.** Los macrófagos fueron infectados con Mtb H37Rv con un MOI de 5 durante una hora. Se les adicionaron los SPM y a las 24 horas se recuperaron los lisados celulares. A partir de estos se preparó el cDNA para la cuantificación de la expresión génica de BPI y LL37 de acuerdo a la abundancia relativa del gen 18S RNA por PCR en tiempo real (qPCR), método del Ct comparativo, se muestran las medianas, n=7, \*p<0.05.

## 7. Expresión de COX-2 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv

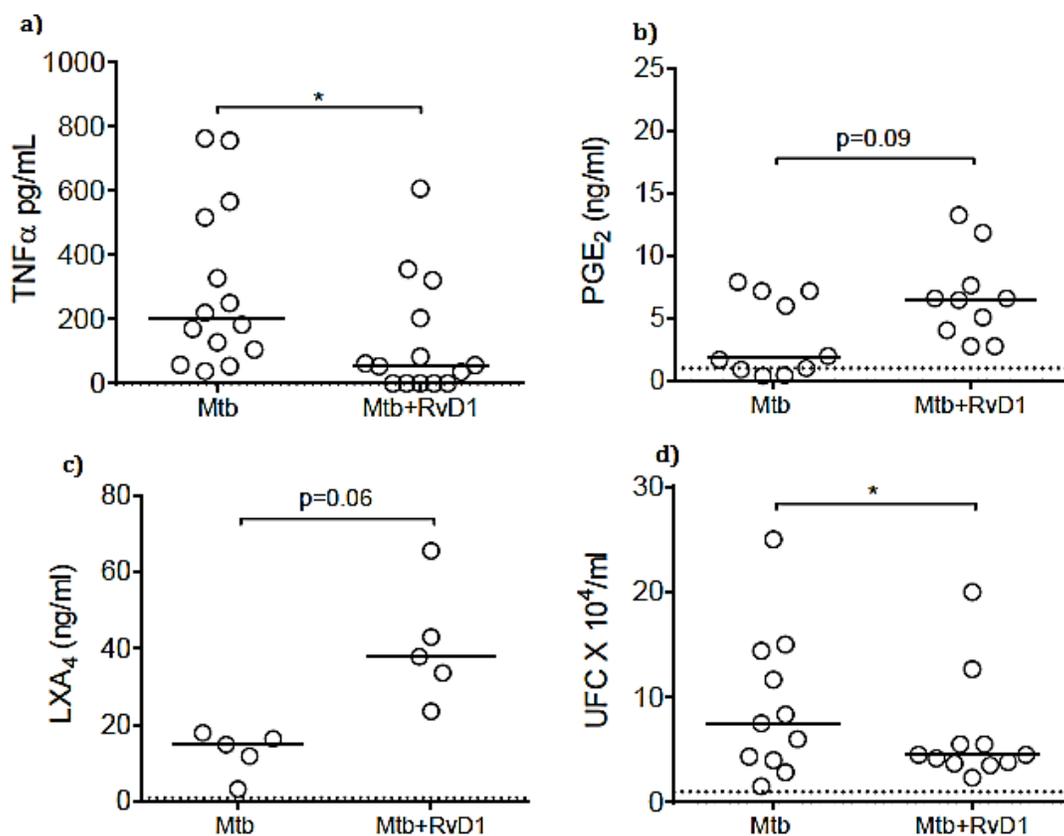
La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es una enzima inducible expresada en condiciones de inflamación en diversas células (monocitos, macrófagos, células endoteliales, sinoviocitos, condrocitos, osteoblastos, etc.) y tejidos, por lo cual fue de nuestro interés evaluar su expresión en los macrófagos humanos infectados con Mtb H37Rv. Encontramos sobreexpresión de COX-2 en células tratadas con MaR1 (mediana de 1.611 [rango de 0.4-20.04] órdenes de magnitud), LXA4 (mediana de 3.08 [rango de 0.6-7.83] órdenes de magnitud), y LPS (mediana de 5.36 [rango de 0.28-21.47] órdenes de magnitud), n=5, Fig. 12.



**Figura 13. Expresión génica relativa de COX-2 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv.** Los macrófagos humanos fueron infectados con Mtb H37Rv con un MOI de 5 durante una hora. Se les adicionaron los SPM y a las 24 horas se recuperaron los lisados celulares. A partir de estos se preparó el cDNA para la cuantificación de la expresión génica de COX-2, de acuerdo a la abundancia relativa del gen 18S RNA por PCR en tiempo real (qPCR), método del Ct comparativo, se muestran las medianas, n=5, \*p<0.05.

## 8. Efecto global de la estimulación con RvD1 y Mar1 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv

Después de observar el efecto global de los SPM sobre los macrófagos humanos infectados con Mtb Rv, re-escribimos aquí los resultados obtenidos para RvD1 y Mar1, que son los que indujeron el control de la infección, para tener un panorama del efecto individual de esos lípidos, Figura 14, 15, 16 y 17.



**Figura 14. Efecto global de la RvD1 en macrófagos infectados con Mtb H37Rv.** Los macrófagos humanos fueron infectados con Mtb H37Rv con un MOI de 5 durante una hora, se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se les añadió 100 nM/ml de RvD1. Se dejaron en incubación a 37°C. A las 24 horas se recuperaron los sobrenadantes para la cuantificación de TNF- $\alpha$  (a), n=14, \*p<0.03, PGE $_2$  (b), n=10 y LXA $_4$  (c), n=5 por ELISA. Las células permanecieron en cultivo por 3 días para la cuantificación de la carga intracelular bacteriana a los 21 días (d), n=11, \*p<0.02.

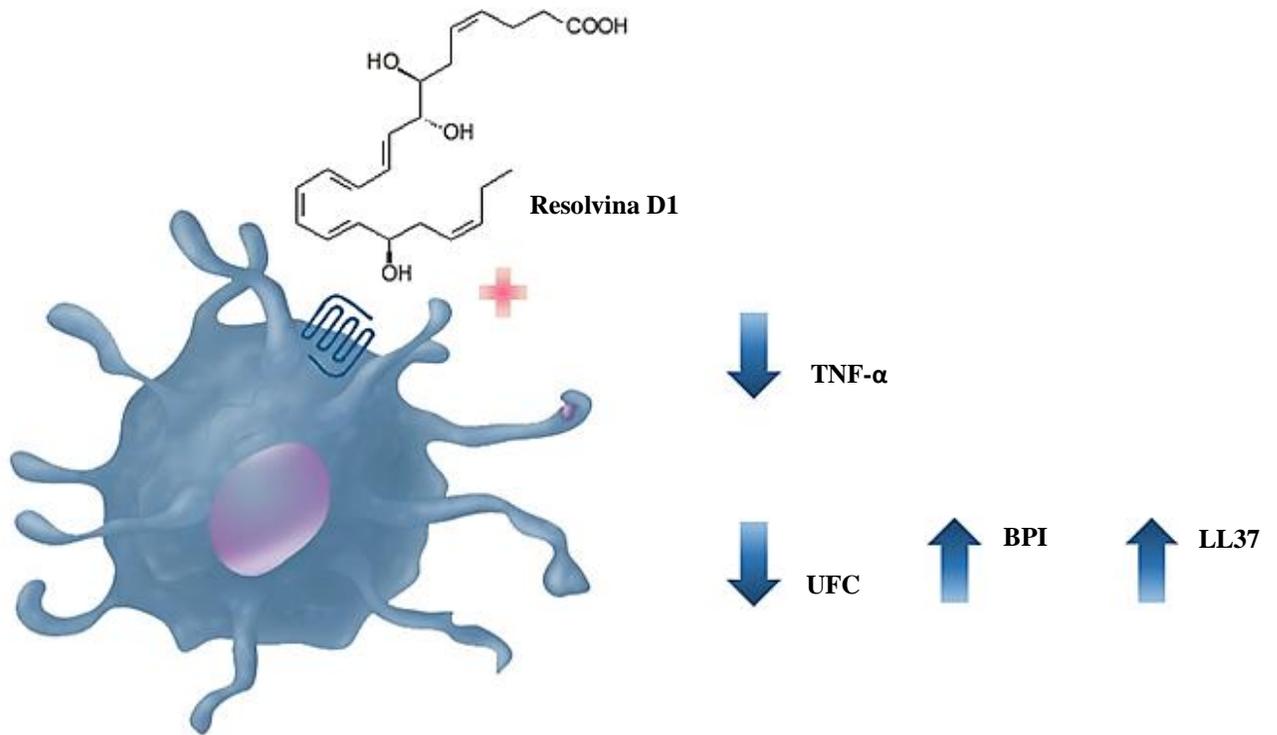
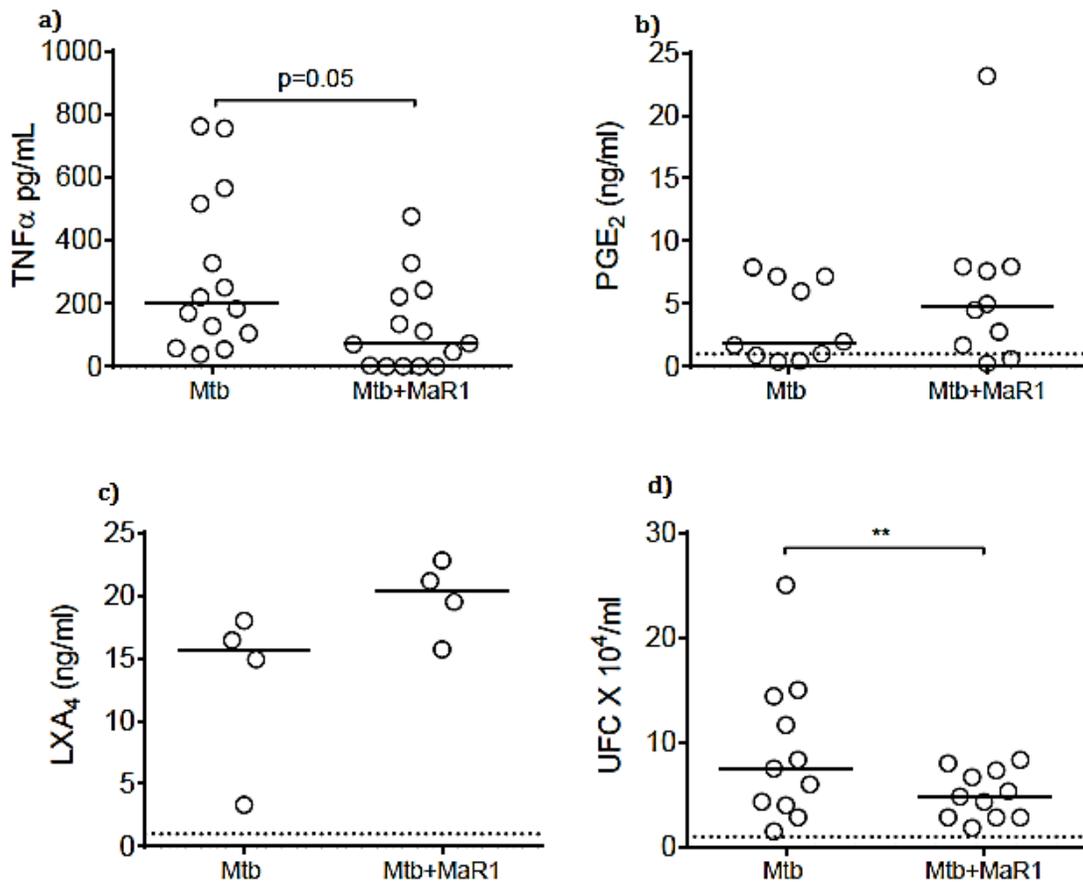
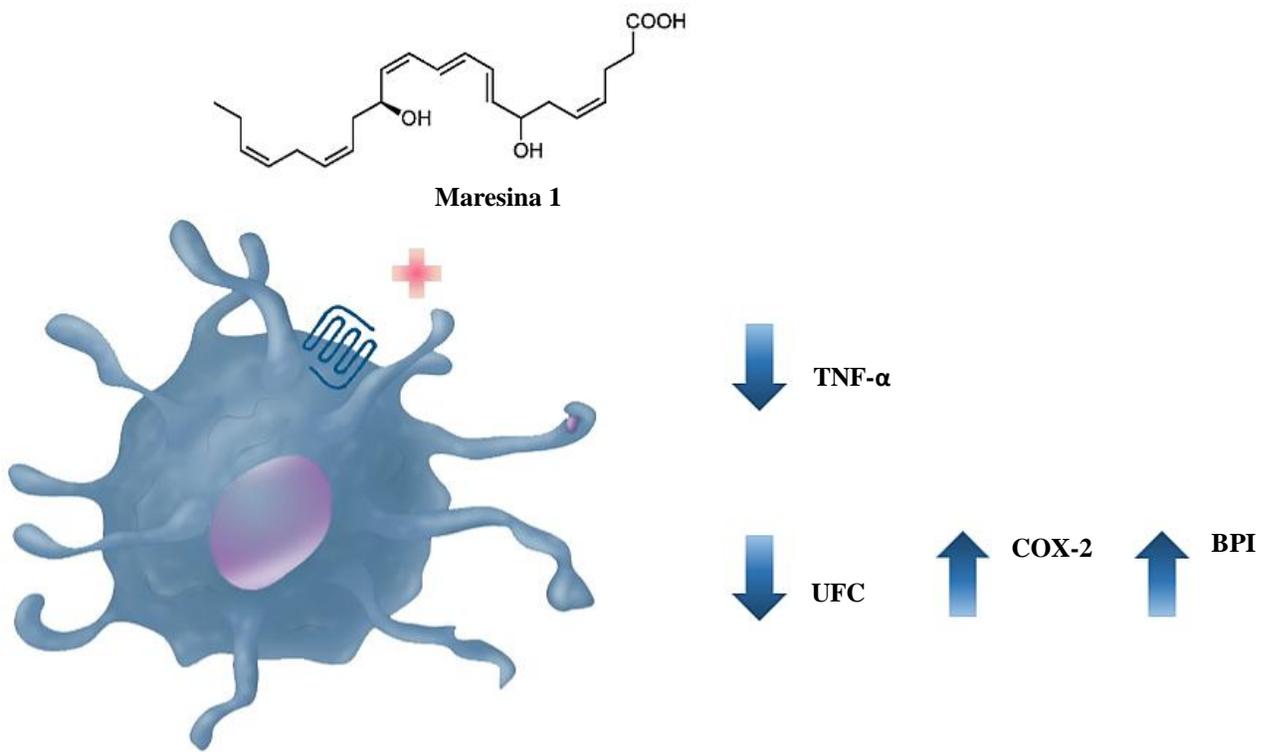


Figura 15. Efecto de la RvD1 en macrófagos humanos infectados con Mtb H37Rv



**Figura 16. Efecto global de la MaR1 en macrófagos con Mtb H37Rv.** Los macrófagos humanos fueron infectados con Mtb H37Rv con un MOI de 5 durante una hora, se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se les añadió 150 nM/ml de MaR1. Se dejaron en incubación a 37 °C. A las 24 horas se recuperaron los sobrenadantes para la cuantificación de TNF- $\alpha$  (a), n=14, PGE2 (b), n=10 y LXA4 (n=4) por ELISA. Las células permanecieron en cultivo por 3 días para la cuantificación de la carga intracelular bacteriana a los 21 días (d), n=11, p\*\*p<0.006.



**Figura 17. Efecto de la MaR1 en macrófagos humanos infectados con Mtb H37Rv**

## DISCUSIÓN

Los mediadores lipídicos pro-resolvedores de la inflamación (MLP) contribuyen tanto al control de la inflamación como a la activación de mecanismos bactericidas. Hasta el momento hay pocos reportes sobre el efecto que tienen los MLP en infección por Mtb. Por esta razón, en este trabajo de tesis nos abocamos a estudiar esos dos aspectos de la infección experimental in vitro de macrófagos humanos, con *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, para determinar el efecto de SPM específicos sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias y sobre la propia actividad bactericida de los macrófagos contra las Micobacterias. Nuestros resultados demostraron que los SPM probados tienen efecto en ambos aspectos inmunológicos, es decir, sobre la producción de citocinas y sobre la actividad bactericida de macrófagos.

Sabemos que los macrófagos murinos son capaces de reconocer a los SPM, y sus actividades biológicas están mediadas por múltiples receptores acoplados a proteínas G (Krishnamoorthy, *et al.* 2010; Serhan and Chiang, 2014), el receptor de RvD2 es DRV2, mientras que la RvD1 tiene como receptor a DRV1 y la LXA4 al receptor CysLT1, pero ambas comparten los receptores GPR32, ALX y FPR2 (Calder, 2012; Spite, *et al.* 2014; Schmid, *et al.* 2016). Por su parte, los SPM están presentes en muy baja concentración en los tejidos biológicos, estas especies no se almacenan en los tejidos, sino que se forman transitoriamente en la demanda y tienen una estabilidad limitada. Los SPM se pueden detectar por ELISA, cromatografía líquida de alta resolución (en sangre, plasma, órganos linfoides, bazo) y microRNAs (PCR). Las concentraciones séricas de eicosanoides se han usado para estratificar el estado inflamatorio en diferentes tipos de pacientes (con enfermedades infecciosas o autoinmunes) y dar un tratamiento personalizado para ayudar a la resolución de la inflamación (Fullerton *et al.*, 2014). De este modo, diferentes SPM tienen distinto efecto resolvidor de la inflamación y actúan a diferentes concentraciones, como se muestra a manera de guía o de ejemplo en la Tabla 2 de esta tesis.

En la infección por Mtb en el humano, la inflamación participa como parte de los mecanismos de defensa y control de la infección pero si no se controla, la inflamación produce daño tisular. Si pensamos en la posibilidad de estimular la producción de los SPM,

esto podría representar un enorme beneficio para el paciente), especialmente en la fase progresiva-tardía de la tuberculosis u otras enfermedades asociadas a procesos inflamatorios; para plantear esa posibilidad podemos preguntarnos ¿cuánto influye el control de la inflamación en el desarrollo de la enfermedad y qué características de la progresión de la tuberculosis dependen del equilibrio de la misma?, y proponer estrategias experimentales (in vitro) u observacionales (in vivo) de estudio para contestar esa pregunta y poder evaluar el papel que juegan los SPM en células infectadas con Mtb.

Para evaluar el papel que los SPM juegan en la infección por Mtb, en este estudio primero comprobamos si los macrófagos humanos respondían a la adición de los SPM en el cultivo y observamos que los SPM disminuyen la producción de TNF- $\alpha$  dependiente de la estimulación con LPS (Figura 5). Estos resultados pueden deberse a una inhibición del factor nuclear NFkB, como lo han propuesto Serhan y colaboradores (Serhan *et al.*, 2015). Quienes demostraron que los leucocitos humanos pueden convertir los ácidos grasos poliinsaturados en derivados cetónicos ( $\alpha/\beta$ ) insaturados y activar la expresión de genes dependientes de Nrf2, lo cual inhibe a NFkB. Hasta el momento, la activación de Nrf2 inhibiendo a NFkB sólo se había demostrado con RvD1 y RvD2, mientras que en el presente trabajo contribuimos en estas observaciones y demostramos que también los SPM MaR1, LXA4 y PDX inducen la translocación de Nrf2 (Figura 7).

En nuestro modelo experimental de infección de macrófagos humanos con Mtb, la medición del TNF- $\alpha$  producido como una citocina prototipo de la inflamación, se justifica porque el TNF- $\alpha$  por sí mismo provoca los signos clínicos cardinales de la inflamación: calor, rubor, tumor y dolor; además, el TNF- $\alpha$  prolonga respuestas inflamatorias al activar a otras células, por ejemplo neutrófilos, células NK y células cebadas, las que responden, liberando otras citocinas, así como diferentes mediadores como eicosanoides, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, que potencian la inflamación, ayudan a la eliminación de microorganismos invasores pero si no se controlan provocan lesiones tisulares (García, 2008; Hristodorov *et al.*, 2012). La producción de TNF- $\alpha$  es esencial para el control de las infecciones tanto en los seres humanos como en modelos animales (Hristodorov *et al.*, 2012), pero su producción excesiva puede llegar a ser perjudicial. De los resultados que

obtuvimos, sólo tres SPM, RvD1, LXA4 y MaR1 disminuyeron la producción de TNF- $\alpha$  respecto a macrófagos infectados sólo con Mtb H37Rv (Figura 8), lo cual es una aportación de este trabajo que implica o que sugiere un uso potencial de esos SPM como adyuvantes en el tratamiento de la tuberculosis en las fases progresivas.

Podemos pensar que si se reduce la producción de TNF- $\alpha$  también se inhibirían los mecanismos microbicidas que ayudan a la eliminación de las micobacterias, sin embargo, eso no pasa así y otros autores, lo mismo que en este trabajo, observamos que los mecanismos antimicrobianos se mantienen, a pesar de que haya una disminución en la producción de TNF- $\alpha$ . Por lo anterior, decidimos evaluar en nuestro sistema, la producción de diferentes péptidos antimicrobianos. Esto lo realizamos mediante PCR en tiempo real, cuantificamos la expresión génica de BPI, un péptido antimicrobiano que ejerce múltiples acciones en la eliminación de bacterias, en especial Gram-negativas, neutraliza el lipopolisacárido bacteriano, además de que tiene una función de opsonina para la fagocitosis de bacterias Gram-negativas por neutrófilos (Levy, 2000), y observamos que RvD1 y MaR1 son capaces de aumentar la expresión génica de BPI con respecto a la infección sólo con Mtb (Figura 12), lo que implica la posible participación de BPI en la eliminación de Mtb por macrófagos humanos.

Después evaluamos la expresión génica de la COX-2, puesto que convierte araquidonato (ácido araquidónico) a prostaglandina E2 (PGE2), que a su vez incrementa la permeabilidad vascular y, con ello, el escape del líquido intravascular hacia el intersticio tisular (edema). Sin embargo, cuando la concentración local de PGE2 incrementa consigue un efecto inhibitor de la COX-2 y de la 5-lipoxigenasa, a la vez que induce la expresión de 15-lipoxigenasa en neutrófilos, papel que posiblemente también puede hacer en los macrófagos (desplazar el metabolismo del araquidonato hacia la formación de lipoxinas). De esta manera, tras varias horas de acciones la señal proinflamatoria inicial de la PGE2 se torna en una señal antiinflamatoria.

La dualidad de la inflamación debe ser analizada en gran detalle para poder proponer nuevas intervenciones terapéuticas. Se tiene que tomar en cuenta que las funciones

respiratorias se deterioran por efecto de la inflamación crónica y junto con el tratamiento de la tuberculosis pulmonar es importante evaluar la necesidad de controlar la inflamación como estrategia de rescate del órgano; no sólo centrarse en la erradicación de Mtb, sino también tener en cuenta los efectos a largo plazo de la quimioterapia sobre la integridad funcional del pulmón y el relativamente bajo potencial de regeneración del parénquima respiratorio.

Considerando el origen dietético de los SPM, podría determinarse su impacto en la tuberculosis y permitir la optimización del tratamiento de la enfermedad en los centros clínicos del sistema de salud por medio de consejería nutricional para pacientes a nivel de clínica o suplementos alimenticios.

## CONCLUSIONES

- Los macrófagos humanos son blanco de los mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (SPM) en estudio (RvD1, RvD2, PDX, LXA4, MaR1) al modificar la producción de TNF- $\alpha$  y activar la translocación del factor nuclear Nrf2.
- La resolvina D1 (RvD1), la lipoxina A4 (LXA4) y la maresina 1 (MaR1) disminuyen significativamente la producción de TNF- $\alpha$  ante la infección de Mtb H37Rv, pero sólo RvD1 y MaR1 aumentan la actividad bactericida del macrófago humano contra *Mycobacterium tuberculosis*.
- La RvD1 incrementa la expresión génica del péptido antimicrobiano LL37, y ambas RvD1 y MaR1 incrementan la expresión génica de otro péptido antimicrobiano, el BPI en macrófagos humanos infectados con Mtb H37Rv. Proponemos que los péptidos antimicrobianos LL37 y BPI participan en la eliminación de la micobacteria por macrófagos humanos.

## LITERATURA CITADA

- ❖ Bannenberg, Gerard and Serhan, Charles N. 2010. Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators in the Inflammatory. Response: An Update. *Biochim Biophys Acta*, 1801(12): 1260–1273
- ❖ 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
- ❖ Basaraba RJ. 2008. Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. *Tuberculosis (Edinb)*, 88 Suppl 1:S35-47
- ❖ Behar SM, Divangahi M, Remold HG. 2010. Evasion Of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: Is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol* 2010, 8:668-74.
- ❖ 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
- ❖ Buckley Christopher D., Gilroy Derek W. and Serhan Charles N. 2014. Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity*, Vol. 40, 315-327
- ❖ Cartes, Parra Juan Carlos, 2013. Breve Historia de la Tuberculosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, LXX: 605, 145-150
- ❖ Castro-Garza J, King CH, Swords WE, Quinn FD. 2002. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. *FEMS Microbiol Lett*, 212:145-149
- ❖ Cinel, Ismail and Opal, Steven. 2009. Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer. *Critical Care Medicine*, Vol. 37, N.1; 291-304
- ❖ Cole, S.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier T.; Churcher C., *et al.* 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 396:190-203.
- ❖ Deretic, Vojo. 2012. Autophagy: An Emerging Immunological Paradigm. *The Journal of Immunology*, 189: 15–20
- ❖ Divangahi M, Chen M, Gan H, *et al.* 2009. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol*, 10:899-906
- ❖ Dorhoi A, Yermeev V, Nouailles G, *et al.* 2014. Type I IFN signaling triggers immunopathology in tuberculosis-susceptible mice by modulating lung phagocyte dynamics. *Eur J Immunol*, 44:2380-2393
- ❖ Dye, C. and Williams, B.G., 2010. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* 328, 856–861

- ❖ El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Wang L, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. 2009. 15-epi-lipoxin A4 inhibits myeloperoxidase signaling and enhances resolution of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 180:311-319.
- ❖ El Kebir D, Gjorstrup P, Filep JG. 2012. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109:14983-14988.
- ❖ Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. 2013. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. *J Pathol*, 231:8-20
- ❖ Frediani JK, Jones DP, Tukvadze N, Uppal K, Sanikidze E, Kipiani M, Tran VT, Hebbar G, Walker DI, Kempker RR, *et al.* 2014. Plasma metabolomics in human pulmonary tuberculosis disease: a pilot study. *PLoS One*, 9:e108854
- ❖ 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
- ❖ García Barreno, Pedro. 2008. Inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, Vol. 102, N. 1, 91-159
- ❖ Gilroy *et al.* 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 3:401-416
- ❖ 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
- ❖ Kinhikar AG, Verma I, Chandra D, *et al.* 2010. Potential role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells. *Mol Microbiol*, 75:92-106
- ❖ Kumar S. Vijaya, Kumar Deka Manoj, Bagga Manish, Kala M. Sasi, Gauthaman K. 2010. A systematic review of different type of tuberculosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14: 831-843
- ❖ Krishnamoorthy Sriram, Recchiuti Antonio, Chiang Nan, Yacoubian Stephanie, Lee Chih Hao, Yang Rong, Petasis Nicos A. and Serhan Charles. 2010. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *PNAS*, Vol. 107, N. 4, 1660–1665
- ❖ Levy Ofer. 2000. A Neutrophil-Derived Anti-Infective Molecule: Bactericidal/Permeability-Increasing Protein. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Vol. 44, N.11, 2925–2931

- ❖ Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA, Hall BM, Nawroly N, 2007. Neutrophil mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest* 17:1988-94.
- ❖ Medzhitov, Ruslan. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454:428-435
- ❖ 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
- ❖ Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, Watanebe T, Sakabe S, Daidoji T, Nakamura S, *et al.* 2013. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell*, 153:112-125
- ❖ Nathan, Carl and Ding, Aihao. 2010. Nonresolving Inflammation. *Cell*, N.140; 871–882
- ❖ Ortega-Gomez *et al.* 2013. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, 5:661-674
- ❖ Palmer CD, Mancuso CJ, Weiss JP, Serhan CN, Guinan EC, Levy O. 2011. 17(R)-Resolvin D1 differentially regulates TLR4-mediated responses of primary human macrophages to purified LPS and live *E. coli*. *J Leukoc Biol*, 90:459-470
- ❖ Peres CM, de Paula L, Medeiros AI, Sorgi CA, Soares EG, Carlos D, Peters-Golden M, Silva CL, Faccioli LH. 2007. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*, 9:483-489
- ❖ 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
- ❖ Recchiuti, Antonio and Serhan, Charles N. 2012. Pro-resolving lipid mediators (SPMs) and their actions in regulating miRNA in novel resolution circuits in inflammation. *Frontiers in Immunology*, Vol. 3, N.298; 1-23
- ❖ Repasy T, Lee J, Marino S, *et al.* 2013. Intracellular bacillary burden reflects a burst size for *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *PLoS Pathog*, 9:3190
- ❖ Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, *et al.* 2010. The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *J Immunol*, 184:836-843
- ❖ Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, 8:349-361
- ❖ Serhan Charles N., Chiang Nan, Dalli Jesmond and Levy Bruce D. 2015. Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Vol. 7, 1-21
- ❖ Smith W.L. and Langenbach R. 2001. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 107; 1491-1495

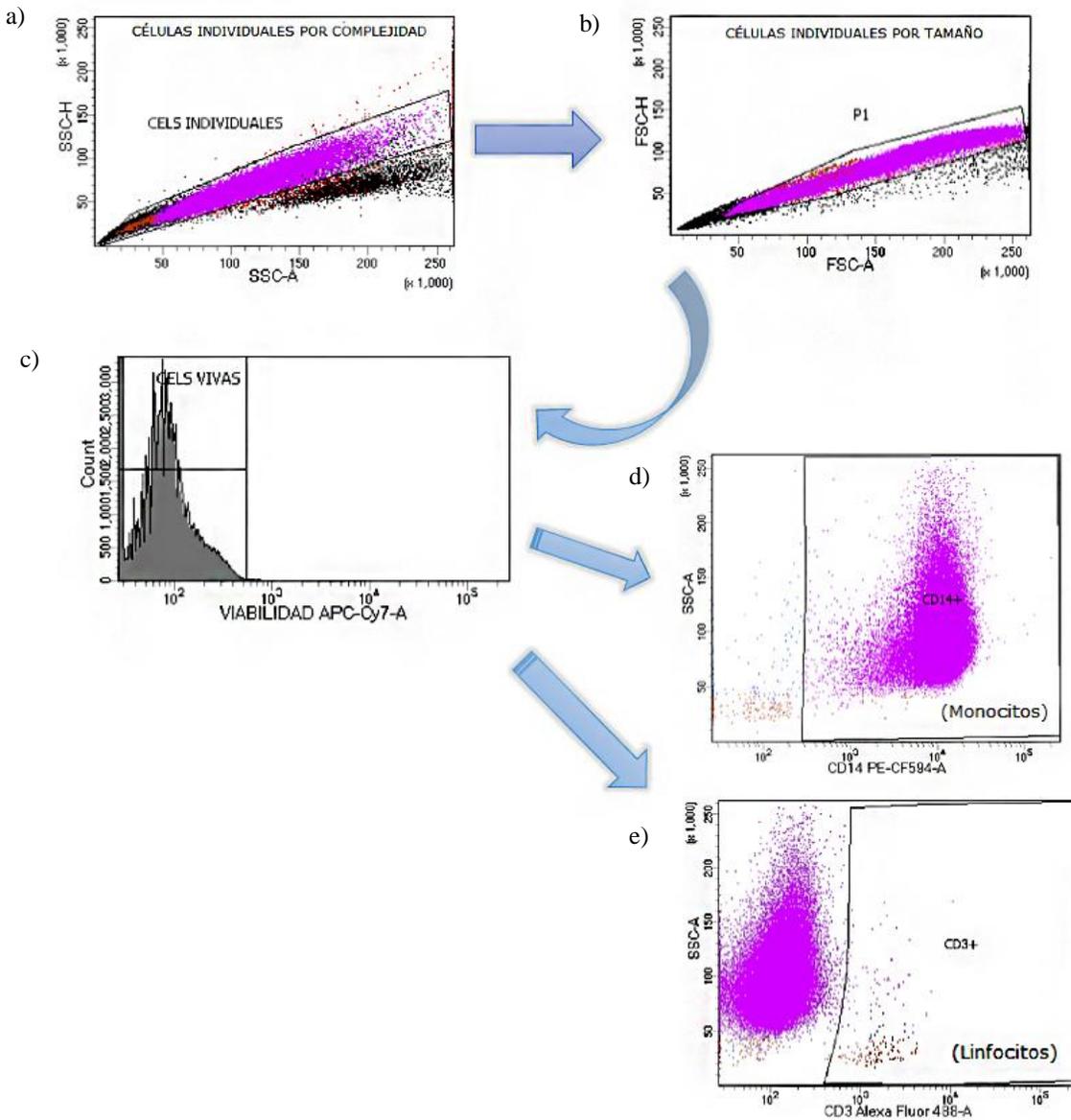
- ❖ Spite M, Serhan CN. 2010. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ Res*, 107:1170-1184
- ❖ Spite Matthew, Clària Joan and Serhan Charles N. 2014. Resolvins, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and their Potential Roles in Metabolic Diseases. *Cell Metabolism*, Vol. 19(1); 21–36
- ❖ Shu CC, Wu MF, Hsu CL, Huang CT, Wang JY, Hsieh SL, Yu CJ, Lee LN, Yang PC. 2013. Apoptosis-associated biomarkers in tuberculosis: promising for diagnosis and prognosis prediction. *BMC Infect Dis*, 13:45.
- ❖ Titos E, Rius B, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Moran-Salvador E, Martinez-Clemente M, Arroyo V, Claria J. 2011. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol*, 187:5408-5418
- ❖ Tobin DM, Vary JC, Jr., Ray JP, Walsh GS, Dunstan SJ, Bang ND, Hagge DA, Khadge S, King MC, Hawn TR, *et al.* 2010 The *lta4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans. *Cell* 2010, 140:717-730
- ❖ Tobin DM, Ramakrishnan L. 2013. TB: the Yin and Yang of lipid mediators. *Curr Opin Pharmacol*, 13:641-645.
- ❖ Weiner J, 3rd, Parida SK, Maertzdorf J, Black GF, Repsilber D, Telaar A, Mohny RP, Arndt-Sullivan C, Ganoza CA, Fae KC, *et al.* 2012. Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active disease are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients. *PLoS One*, Vol. 7, 221
- ❖ WHO. Global tuberculosis report 2015. <http://www.who.int/tb/data>
- ❖ Zumla A, Rao M, Parida K, Keshavjee S, Cassell G, Wallis R, Axelsson-Robertsson R, Doherty M, Andersson J & Maeurer M. 2014. Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies. *Journal of Internal Medicine*, Vol. 277; 373–387

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### Estrategia del análisis de evaluación de la pureza de monocitos

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



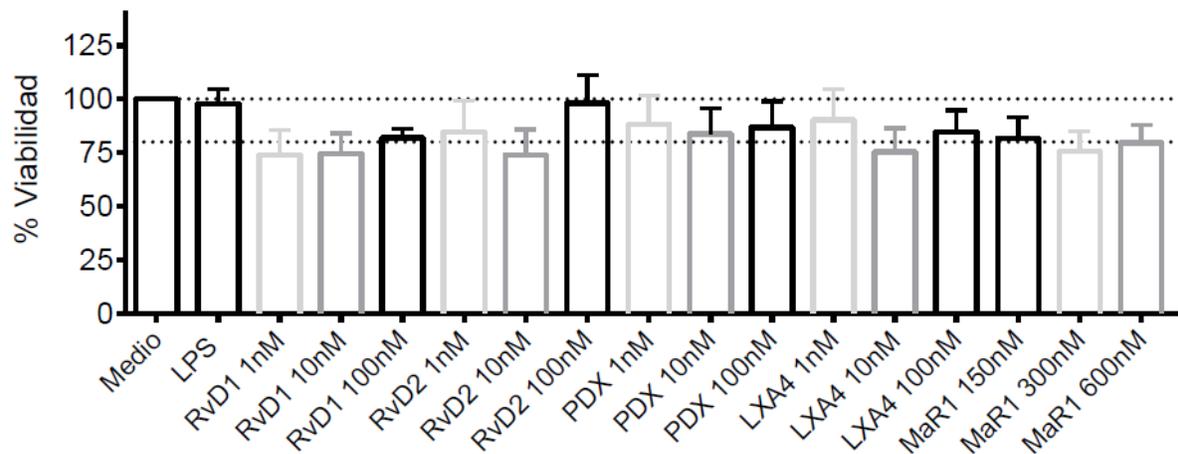
## ANEXO 2

### Porcentaje de viabilidad celular a las 6 y 24 horas de estimulación con distintas concentraciones de SPM

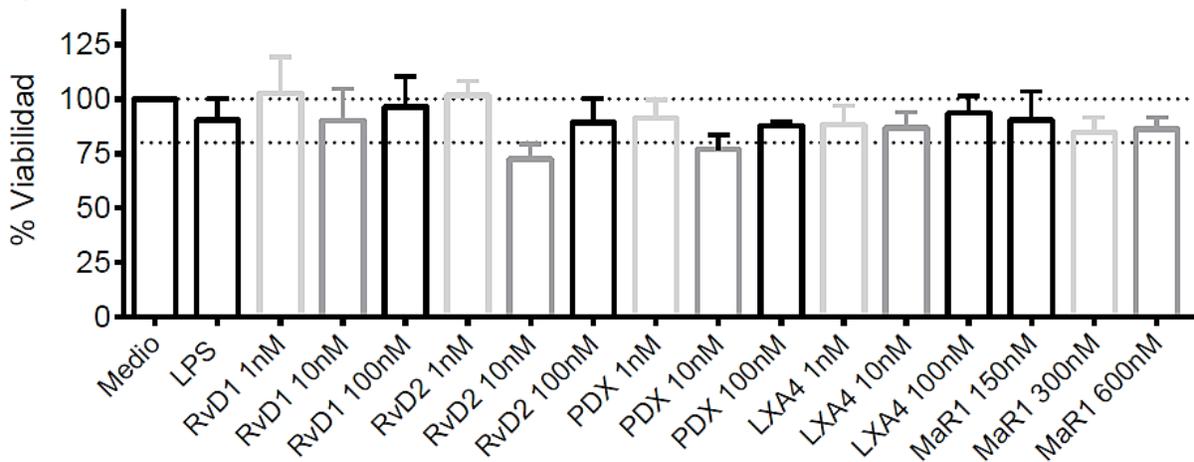
Las células fueron estimuladas con LPS (200 ng/ml) dos horas antes de cada concentración de SPM (RvD1, RvD2, PDX o LXA4: 0.1 (datos no mostrados), 1, 10, o 100 nM, y MaR1: 10 (datos no mostrados), 150, 300, 600 nM), a) a las 6 horas y b) a las 24 horas. El porcentaje de viabilidad se determinó utilizando un kit de detección (Cell Titer), n=8.

Las concentraciones finales utilizadas en el estudio fueron de 100 nM para RvD1, RvD2, PDX y LXA4, y de 150 nM para MaR1.

a) 6 horas



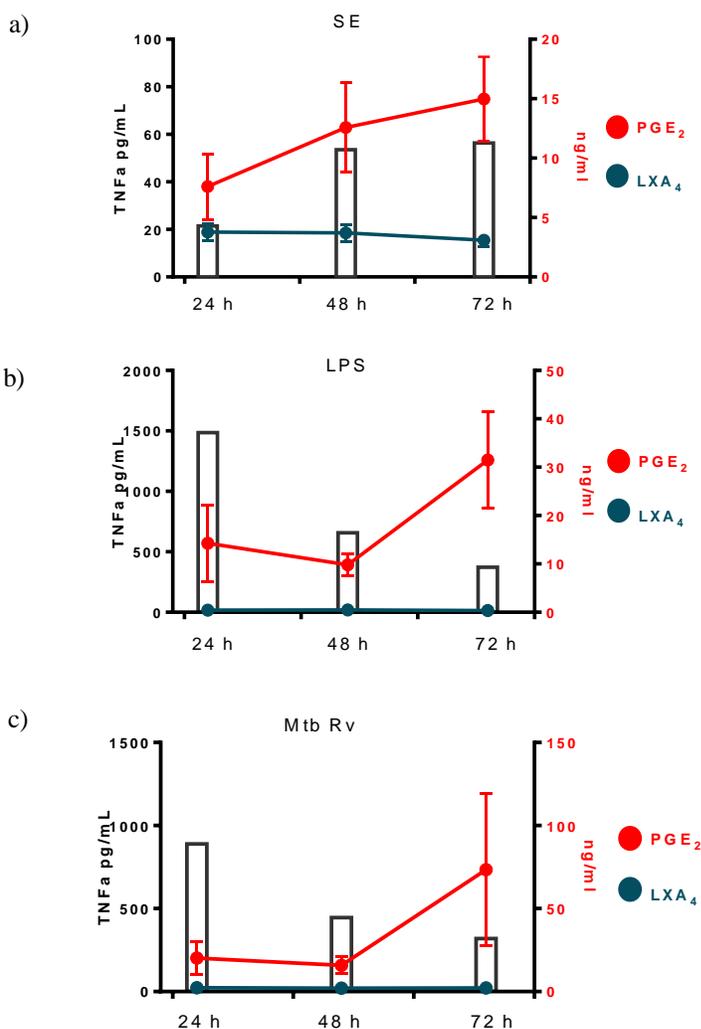
b) 24 horas



### ANEXO 3

#### Evaluación del tiempo de incubación para detectar niveles suficientes de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4 en sobrenadantes de cultivo

La producción de TNF- $\alpha$  fue mayor a las 24 horas, la de PGE2 a las 72 horas, y la LXA4 tuvo una producción muy baja en los tres tiempos, por lo que el mejor tiempo de evaluación fue a las 24 horas, ya que podemos detectar PGE2 y LXA4 sin problema y no perdemos la detección de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivos.



**Producción de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4 a las 24, 48 y 72 horas de infección.** Los macrófagos humanos fueron o no (a) (SE, sin estímulo) estimulados (b) (con 200 ng/ml de LPS) o infectados (c) con Mtb H37 Rv durante una hora (MOI 5, se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se dejaron en incubación a 37 °C). A las 24, 48 y 72 horas se recuperaron los sobrenadantes para la cuantificación de TNF- $\alpha$ , PGE2 y LXA4 por ELISA, se presentan las medias de una n=3.

## ANEXO 4

### Curva estándar de TNF- $\alpha$

El estándar de TNF- $\alpha$  humano (TNF- $\alpha$  humano recombinante, Endogene, RTNFA-50) lo tenemos a una concentración de 4000 pg/ml, para hacer la curva estándar se realizan diluciones como se muestra en la siguiente tabla. El blanco es sólo el diluyente sin el estándar.

Concentración (pg/ml)	Volumen de estándar o dilución	Diluyente ( $\mu$ l)
2000	250 $\mu$ l de stock de TNF- $\alpha$	250
1500	93.75 $\mu$ l de stock de TNF- $\alpha$	156.25
1000	250 de dilución	250
500	250 de dilución	250
250	250 de dilución	250
125	250 de dilución	250
62.5	250 de dilución	250
0 (blanco)	0	250



