



CIENCIA XVUANL  
ANIVERSARIO

## El papel de los receptores TLR2 y CD14 de macrófagos THP-1 en la infección por *M. tuberculosis*

F. HERNÁNDEZ CABRERA<sup>\*\*\*</sup>, A. ROSAS TARACO<sup>\*</sup>, M. SALINAS CARMONA<sup>\*</sup>, J. CASTRO GARZA<sup>\*\*</sup>,  
A. ARCE MENDOZA<sup>\*</sup>



La tuberculosis pulmonar es la enfermedad infecciosa más arraigada en la humanidad, cada año causa más de 2 millones de muertes y se reportan 8 millones de nuevos casos clínicos con incremento de cepas multi y extremadamente resistentes. Aunque mucho se ha investigado sobre los mecanismos de la respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*, no se ha logrado la identificación de marcadores específicos que expliquen la susceptibilidad de algunos individuos a desarrollar tuberculosis, mientras que en otros casos la infección permanece latente o se resuelve favorablemente. La resolución de la infección por *M. tuberculosis* se asocia a la respuesta inmune del tipo Th1, e involucra la producción de citocinas proinflamatorias y mecanismos microbicidas.

Estudios *in vitro* reportan que TNF- $\gamma$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  estimulan la producción de la enzima de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), elevan los niveles de óxido nítrico para favorecer la eliminación intracelular de *M. tuberculosis*,<sup>1-3</sup> mientras que algunos polimorfismos en el receptor de IFN- $\gamma$  incre-

mentan la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar.<sup>4,5</sup> La actividad de virulencia de *M. tuberculosis* se ha relacionado con las moléculas que forman su pared celular y con proteínas secretadas,<sup>6</sup> estos antígenos parecen modular la respuesta inmune en etapas tempranas de la infección a través de los receptores de inmunidad innata de macrófagos alveolares.

Los receptores de inmunidad innata más relevantes que participan en el reconocimiento de *M. tuberculosis* son los receptores Tipo Toll (TLR) de macrófagos. Investigaciones recientes apuntan a los receptores de reconocimiento TLR2 y CD14 como las piezas fundamentales en la respuesta inmune que determinarían el curso de la infección pulmonar causada por micobacterias, ya que estos receptores poseen la mayor capacidad para el reconocimiento de proteínas, glicolípidos y peptidoglicanos de *M. tuberculosis*.<sup>7-11</sup> En etapas tempranas de la infección, TLR2 recluta a CD14 en regiones de la membrana citoplasmática con alto contenido de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>), esto permite que

El presente artículo está basado en la investigación "El papel de los Receptores CD14 y TLR2 de macrófagos THP-1 en la infección por *M. tuberculosis*", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2012, en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2012.

\* Universidad Autónoma de Nuevo León. Departamento de Inmunología-FM.

\*\*Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS.

\*\*\* Universidad Autónoma de Nuevo León, FCFM.  
aya\_mayola@yahoo.com

TLR2 sea reclutado a fagosomas con carga bacteriana en la que *M. tuberculosis* continúa estimulándolo.<sup>12</sup> En esta etapa, los glicolípidos evitan la maduración del fagosoma, inhiben la asociación del fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P) y bloquean el flujo de calcio.<sup>13</sup>

Se ha demostrado que una alta tasa de activación en TLR2, por productos de *M. tuberculosis* (TDM, proteínas LpG y 19kDa) inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de MHCII, además de moléculas coestimuladoras en macrófagos y células dendríticas, atenua la presentación de antígenos.<sup>14-16</sup> En un estudio epidemiológico se identificó una variante de la proteína intracelular TIRAP relacionada con TLR2, que confiere protección contra bacteremias, neumococo invasivo, malaria y tuberculosis,<sup>17</sup> al hacer evidente que la activación de TLR2 por estos patógenos puede ser una desventaja en la respuesta del huésped para eliminar la infección. Otros estudios en humanos muestran que polimorfismos de TLR2 o TLR4 dan un incremento en la susceptibilidad a infecciones microbianas, principalmente influenciado por el balance Th1/Th2.<sup>18-20</sup>

Se ha reportado que el aumento en la expresión de TLR2 y su activación excesiva en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* generan una respuesta Th2, como resultado de la producción de las enzimas supresoras de señalización de citocinas como SOCS1, e IRAK-M, que inhiben la trayectoria de señalización del receptor de interferón gamma (IFN- $\gamma$  R) y de TLRs en macrófagos, así como de la inhibición de los receptores IL-12R, IL-23R e IFN- $\gamma$ R en linfocitos; provoca vías de señalización antiinflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$ ) que promueven la supervivencia y proliferación de los bacilos.<sup>21</sup>

Recientemente se demostró que *M. tuberculosis* restringe la respuesta proinflamatoria de macrófagos, mediante la actividad catalítica de la hidrolasa Hip1 atenuando la activación de TLR2.<sup>22</sup> Más aún,

se ha evidenciado que ratones TLR2-/- presentan una respuesta inflamatoria excesiva con altos niveles de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  y óxido nítrico en espacios alveolares ante la infección por *M. tuberculosis*.<sup>23</sup> Nuestro estudio demuestra la importancia de los receptores TLR2 y CD14 de macrófagos humanos THP-1 en la infección por *M. tuberculosis* (H37Rv), en un modelo Knock Down (KD), evidenciando que *M. tuberculosis* modula la respuesta inmune a través del receptor TLR2, al inhibir la producción de óxido nítrico para favorecer su supervivencia, y utiliza a CD14 para favorecer una rápida internalización en macrófagos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la línea celular THP-1 de monocitos, se realizó la transformación a macrófagos, estimulando químicamente con fobol 12-miristato 13-acetato (PMA) a una concentración final de 10 $\mu$ M, por 48 hrs en medio DMEM, enriquecido con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor. Para inducir el silenciamiento de los genes *tlr2* y *cd14* *in vitro*, los siRNAs duplex (siRNA-TLR2 forward 5'-ACACAAUAGAGGAAGAUUC-3', reverse 5'-GAUUCUCCUCUAUUGUGU-3', siRNA-CD14 forward 5'-AAACGGCUUAGGUUGAGA-3', reverse 5'-UCUCAACCUAGAGCCGUUU-3') fueron transfectados con DARMARECT2<sup>®</sup> por triplicado, en 1x10<sup>6</sup> macrófagos/pozo, con siRNAs a concentración final de 1.8 nM en los grupos de experimentación; silenciamiento de *cd14* (CD14-KD), silenciamiento de *tlr2* (TLR2-KD), silenciamiento de *cd14* y *tlr2* (CD14-KD/TLR2-KD), control de transfección (Liposomas), control negativo de silenciamiento la transfección con un siRNA inespecífico (Dharmacon Control no-ontarget) y células sin transfección. Se utilizó random hexamers (Invitrogen) para la conversión de los transcritos a

cDNA, la amplificación se realizó con SyBR Green Supermix en un equipo CFX96™, y la expresión génica se normalizó con el método  $\Delta\Delta C_t$ , con los oligonucleótidos: TLR2 (forward 5'-GGGTTGAAGCACTGGACAAT-3', reverse 5'-TCCTGTTGTTGGACAGGTCA-3'), CD14 (forward 5'-ACTTGCACCTTCCAGCTTGC-3', reverse 5'-GCCCAGTCCAGGATTGTCAG-3'), y GAPDH (forward 5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3', reverse 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'). La expresión de las proteínas TLR2 y CD14 en la membrana celular de los macrófagos se determinó por citometría de flujo, con anticuerpos monoclonales anti-TLR2-FITC y anti-CD14-PE, con un equipo Beckton Dickinson modelo Calibur, y se empleó el software Cellquest para demostrar la efectividad del silenciamiento y comprobar la ausencia de los receptores TLR2 y CD14 en la membrana de los macrófagos.

Los grupos de experimentación se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv, a una razón de infección 5:1 (bacterias/macrófagos), seis horas después se retiró el sobrenadante del cultivo celular, se lavó dos veces, con el fin de evitar bacterias remanentes no fagocitadas. A las 48hrs después del inicio de la infección, se colectó el sobrenadante y se filtró con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , y se realizaron dos lavados para eliminar las posibles bacterias extracelulares. Posteriormente, las células en monocapa se lisaron con 1ml de agua estéril miliQ libre de RNasas a 0°C, y se centrifugaron a 1000rpm/10 minutos, el sobrenadante de esta centrifugación se guardó en Trizol®, para recuperar el RNA total y el pellet fue resuspendido en 500  $\mu\text{l}$  de medio y sembrado en placas con agar Middlebrook 7H10.

Luego de tres semanas, se midieron las unidades formadoras de colonias (UFC). A partir del sobrenadante de los grupos de experimentación, se hizo la cuantificación de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12,

IFN- $\gamma$ , IL-10 y TGF- $\beta$ ) por ELISA, con kits eBioscience®. Del lisado celular se obtuvo el RNA total con columnas de extracción Qiagen RNAeasy®, y se midió la expresión génica normalizada de las citocinas, tomando como gen constitutivo GAPDH, se utilizó el método  $\Delta\Delta C_t$ , con los siguientes oligonucleótidos; TNF- $\alpha$  (forward 5'-GTGCTTGTTCCTCAGCCTCT-3', reverse 5'-TGGGGAAGTCTTCCCTCTG-3'), IL-12 (forward 5'-GCCCAGCTGCTGAGGAGAGT-3', reverse 5'-TGGGTGGGTCAGGTTTGATG-3'), IFN- $\gamma$  (forward 5'-ACGAGATGACTTCGAAAAGCTG-3', reverse 5'-TTTAGCTGCTGGCGACAGTTC-3'), IL-10 (forward 5'-GGGAGAACCCTGAA GACCCTCA-3', reverse 5'-TGCTCTTGTTTTCA CAGGGAAG-3'), TGF- $\beta$  (forward 5'-AGTGGACATCAACGGGTTC3', reverse 5'-GTCCCTTGCGGAAGTCAATGT3'), GAPDH (forward 5'-GGCCTCCAAG GAGTAAGACC-3', reverse 5'-AGGGGTCT ACATGGCAACTG-3').

La actividad del óxido nítrico se evaluó de manera indirecta, utilizando el reactivo de Griess con los sobrenadantes de los grupos de experimentación. Además, se midió la expresión génica normalizada del gen óxido nítrico sintetasa inducible (*inos*) por RT-PCR en tiempo real.

## RESULTADOS

La optimización del modelo TLR2 Knock Down de macrófagos THP-1 (siRNA-TLR2 y siRNA-CD14) se obtuvo a una concentración de 1.8 nM/siRNA 48 hrs después de su transfección. En estas condiciones se presentó la máxima ausencia de transcritos *tlr2*, con un porcentaje de silenciamiento génico de 93 $\pm$ 2%, mientras que la expresión de la proteína en la membrana celular se inhibió en 98 $\pm$ 4% ( $p < 0.001$ ).

De igual manera, para *cd14* el silenciamiento génico fue de  $94 \pm 2\%$ , y la expresión de CD14 en la membrana celular se suprimió en  $92 \pm 4\%$  ( $p < 0.001$ ). Después de infectar los grupos experimentales por 48 hrs con *M. tuberculosis* H37Rv, las bacterias intracelulares se plaquearon por tres semanas y se midieron las unidades formadoras de colonias (UFC). Los cultivos que involucraban el silenciamiento de TLR2 (siRNA-TLR2, siRNA-CD14/TLR2) mostraron una inhibición del crecimiento bacilar de  $97 \pm 5\%$  ( $p < 0.001$ ), y para el modelo siRNA-CD14 sólo se observó inhibición en el número de UFC del 36% ( $p < 0.05$ ) (figura 1). Estos resultados muestran que probablemente las bacterias fueron eliminadas, ya que no se presentaron UFC en los cultivos de sobrenadantes, tomados a las 6 hrs de infección en macrófagos con siRNA-TLR2. Para determinar si se activó el mecanismo microbicida iNOS/óxido nítrico, se analizó la expresión génica de la enzima iNOS.

### Mecanismo microbicida iNOS/óxido nítrico

La expresión génica de *inos* muestra un incremento significativo de 72% para siRNA-CD14, 116% para siRNA-TLR2 y 172% para siRNA-CD14/TLR2, con respecto al control de infección (figura 2). Por otra parte, la concentración de nitritos aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ), e indica la presencia de óxido nítrico únicamente en macrófagos TLR2-KD infectados por *M. tuberculosis* (figura 3).

Finalmente, los niveles de las citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  presentan un incremento significativo en las muestras que involucran el silenciamiento de TLR2 (siRNA-TLR2) con respecto al control de infección (figura 4 y figura 5), sugieren que la respuesta inmune Th1 prevalece en la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos TLR2-KD.

### DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación permiten establecer que el silenciamiento del receptor TLR2 contribuyó a disminuir el número de UFC en un  $97 \pm 5\%$ , a 48hrs después de la infección. En este tiempo los macrófagos TLR2-KD y CD14-KD/TLR2-KD infectados con *M. tuberculosis* incrementaron significativamente la producción de IFN- $\alpha$ , asociada con la activación de macrófagos para incrementar la producción de iNOS y óxido nítrico. Entonces, la exce-

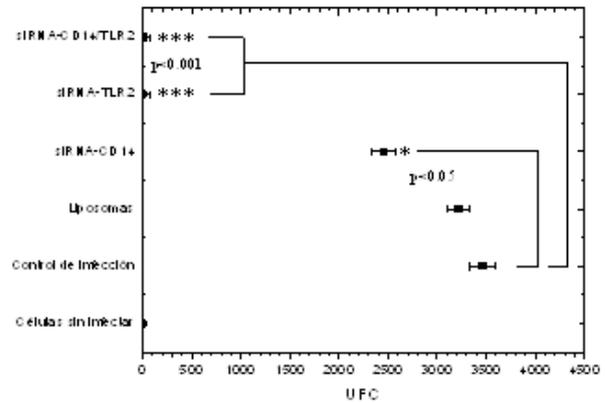


Fig. 1. Reducción significativa de las UFC para muestras TLR2-KD.

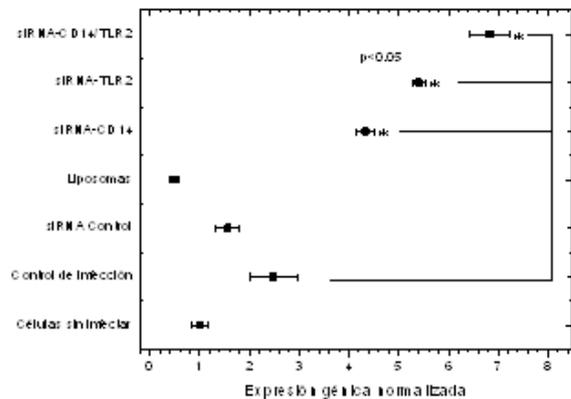


Fig. 2. Incremento significativo en los transcritos de *inos* en los grupos con silenciamiento génico.

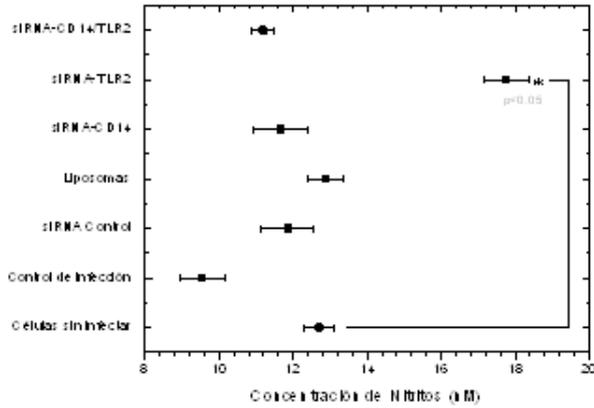


Fig. 3. La actividad del óxido nítrico se observó sólo en el grupo de macrófagos TLR2-KD.

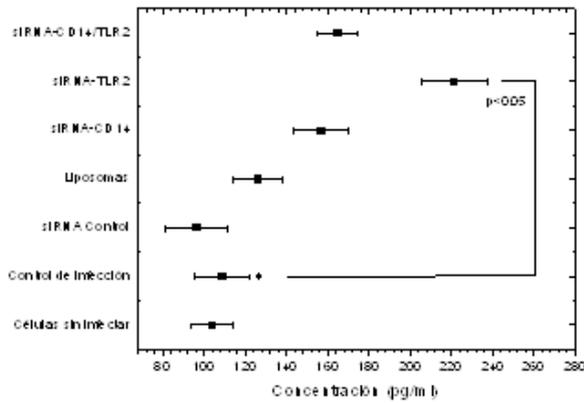


Fig. 4 Incremento significativo de la citocina TNF-α en el grupo de macrófagos TLR2-KD.

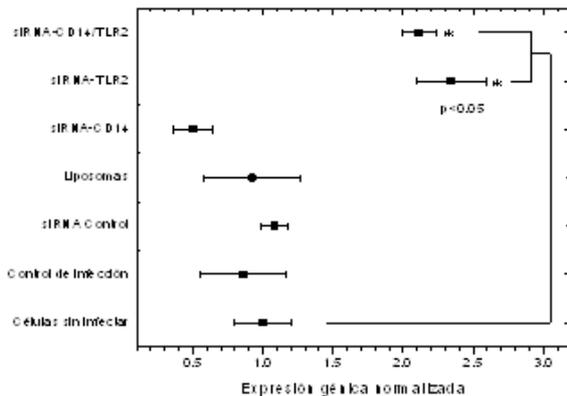


Fig. 5. Aumento significativo en la expresión de *ifn-γ* en los grupos de macrófagos con silenciamiento en *tlr2*.

siva activación de TLR2 puede ser una desventaja en la respuesta inmune del huésped para eliminar la infección, e indica que el receptor TLR2 representa un fino sintonizador del balance inmunológico Th1/Th2 y, en consecuencia, es una pieza fundamental para el establecimiento de la infección por *M. tuberculosis*, la modulación de TLR2 por factores de virulencia de *M. tuberculosis* ajusta las condiciones para facilitar su supervivencia y multiplicación. Por esta razón, al inhibir la expresión del receptor TLR2 la infección por *M. tuberculosis* activa vías alternas que permiten la respuesta proinflamatoria y el mecanismo microbicida iNOS/óxido nítrico.

## RESUMEN

La tuberculosis pulmonar es la forma clínica más frecuente de la infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). La aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR) y extremadamente drogoresistentes (XDR) de Mtb hace necesaria la exploración de nuevas alternativas para el control de la tuberculosis, entre ellas la inmunoterapia. El bacilo de la tuberculosis infecta a macrófagos, interaccionando con los receptores de superficie para inhibir los mecanismos microbicidas y permitir su supervivencia. El objetivo de esta investigación fue evaluar el papel de los receptores de inmunidad innata TLR2 y CD14 de macrófagos THP-1 en la infección por *M. tuberculosis*. Se utilizó un modelo Knock Down (KD) *in vitro*, silenciando los genes *tlr2* y *cd14* de macrófagos de la línea celular THP-1, y se infectaron con *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) a razón de 5:1. El silenciamiento del receptor TLR2 reflejó un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IFN-γ), lo que activó el mecanismo microbicida iNOS/óxido nítrico para disminuir en más de 95% las UFC (p<0.001). El silenciamiento del receptor CD14 produjo una disminución de 29%

en el conteo de UFC con respecto al control, aunque sin actividad del mecanismo microbicida. Estos resultados sugieren que *M. tuberculosis* utiliza al receptor TLR2 de macrófagos para evadir la respuesta inmune, y que la presencia de CD14 es importante para establecer la rápida internalización del bacilo. Los resultados obtenidos proporcionan la base de nuevas estrategias de tratamientos moleculares, y silencian genes temporalmente para favorecer una respuesta inmune efectiva que resuelva la infección causada por *M. tuberculosis*.

**Palabras clave:** Silenciamiento, Receptores, Macrófagos, *M. tuberculosis*, UFC (Unidades Formadoras de Colonia).

## ABSTRACT

Pulmonary tuberculosis is the most common clinical form of infection caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). The emergence of multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) requires the exploration of new alternatives for the control of tuberculosis, including immunotherapy. The tubercle bacillus infects macrophages by interacting with surface receptors to inhibit the mechanisms allowing their survival and microbicides. The aim of this investigation was to assess the role of innate immunity receptors TLR2 and CD14 on THP-1 macrophage infection with *M. tuberculosis*. We used an in vitro Knock Down (KD) model, silencing genes TLR2 and CD14 from the macrophage cell line THP-1, and were infected with *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) at a ratio of 5:1. TLR2 receptor silencing reflected an increase in the expression of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ), which activated the microbicidal mechanism iNOS / nitric oxide, decreasing CFUs by more than 95% (p

<0.001). Silencing CD14 receptor produced a 29% decrease in CFU counts compared to the control, though with inactivity of the microbicide mechanism. These results suggest that *M. tuberculosis* uses macrophage TLR2 receptor to evade the immune response, and that the presence of CD14 is important for establishing the rapid internalization of bacillus. The results provide the basis for new molecular treatment strategies, temporarily silencing genes to promote an effective immune response to resolve the infection caused by *M. tuberculosis*.

**Keywords:** Mute, Receivers, macrophages, *M. tuberculosis*, CFU (Colony Forming Units).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ingo Fricke, Daniell Mitchell, Mycobacteria Induce IFN-Production in Human Dendritic Cells via Triggering of TLR2 *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 5173–5182.
2. Lammas, D.A., J.L. Casanova, and D.S. Kumararatne. 2000. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon-g (IFN-g) pathway. *Clin. Exp. Immunol.* 121: 417–425.
3. Nicholson S, Bonecini-Almeida M. da G., Lapa e Silva, *et al.* Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996;183:2293-2302.
4. Newport M.J., Huxley C.M., Huston S., et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* 1996;335:1941–9.
5. Dorman S.E., Holland S.M.. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J ClinInvest.* 1998;101:2364–9.
6. Daffé, M. and Etienne, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* its implications for pathogenicity. *Tuberc.*

- Lung Dis. (1999). 79, 153–169.
7. Sugawara, I., H. Yamada, C. Li, S. Mizuno, O. Takeuchi, and S. Akira. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol. Immunol.* 2003. 47: 327–336.
  8. Dong-Min Shin, Jae-Min Yuk, Hye-Mi Lee, Sang-Hee Lee, Ji Woong Son, Clifford V. Harding, Jin-Man Kim, Robert L. Modlin, and Eun-Kyeong Jo, Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signaling, *Cell Microbiol.* 2010 November ; 12(11): 1648–1665.
  9. Means, T.K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D.T. Golenbock, and M.J. Fenton. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.* 163: 6748–6755.
  10. Catharina W. Wieland, Gerritje J.W. van der Windt, W. Joost Wiersinga, Sandrine Florquin and Tom van der Poll, CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis. 2008. Blackwell Publishing Ltd, *Immunology*, 125, 272–279.
  11. Bernardo, J., A. Billingslea, R. Blumenthal, K. Seetoo, E. Simons, and M. Fenton. 1998. Differential Responses of Human Mononuclear Phagocytes to Mycobacterial Lipoarabinomannans: Role of CD14 and the Mannose Receptor. *Infect Immun.* 66: 28 -35.
  12. Gregory M. Barton and Jonathan C. Kagan, A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization, *Nature Reviews, Immunology*, Volume 9, agust 2009.
  13. Isabelle Vergne, Jennifer Chua, Hwang-Ho Lee, Megan Lucas, John Belisle, and Vojo Deretic, Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis, *PNAS*, March 15, 2005 , Vol. 102, No. 11, 4033–4038.
  14. Celestine Kan-Sutton, Chinnaswamy Jagannath, and Robert L. Hunter Jr. Trehalose 6,62-dimycolate on the surface of *Mycobacterium tuberculosis* modulates surface marker expression for antigen presentation and costimulation in murine macrophages *Microbes Infect.* 2009 January ; 11(1): 40–48.
  15. Adam J. Gehring, Karen M. Dobos, Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): A Novel TLR-2 Ligand That Inhibits Human Macrophage Class II MHC Antigen Processing, *The Journal of Immunology*, 2004; 173: 2660–2668.
  16. Rish K. Pai, Marilyn Convery, Thomas A. Hamilton, W. Henry Boom, and Clifford V. Harding, Inhibition of IFN- $\gamma$ -Induced Class II Transactivator Expression by a 19-kDa Lipoprotein from Mycobacterium tuberculosis: A Potential Mechanism for Immune Evasion. *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 175-184.
  17. Khor C., Chapman S.J., Vannberg F.O. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nature Genet.* 2007 Apr;39(4):523-528.
  18. Bafica A., Scanga C.A., Feng C.G., Leifer C., Cheever A., Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med.* 2005 Dec 19;202(12):1715-24.
  19. Marina A. Dobrovolskaia, Andrei E. Medvedev, Karen E. Thomas, Natalia Cuesta, Vladimir Toshchakov, Tianbo Ren, Michael J. Cody, Suzanne M. Michalek, Nancy R. Rice and Stefanie N. Vogel, Induction of In Vitro Reprogramming by Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 Agonists in Murine Macrophages: Effects of TLR “Homotolerance” Versus “Heterotolerance” on NF-kB Signaling Pathway Components. *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 508-519.
  20. Brett Verstak, Kamalpreet Nagpal, Stephen P. Bottomley, Douglas T. Golenbock, Paul J. Hertzog, and Ashley Mansell, MyD88 Adapter-like (Mal)/TIRAP Interaction with TRAF6 Is Critical for TLR2- and TLR4-mediated NF-kB Proinflammatory Responses, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 284, No. 36, pp. 24192–24203, September 4, 2009.
  21. Berit Carow, Xiang qun Ye, Silencing suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in macrophages improves Mycobacterium tuberculosis control in an IFN- $\gamma$

- dependent manner, JBC Papers in Press. Published on May 27, 2011 as Manuscript M111.238287.
22. Madan-Lala R., Peixoto K.V., Re F., Rengarajan J. Mycobacterium tuberculosis Hip1 dampens macrophage proinflammatory responses by limiting toll-like receptor 2 activation, *Infect Immun.* 2011 Dec;79(12):4828-38.
  23. Drennan, M.B., D. Nicolle, V.J. Quesniaux, M. Jacobs, N. Allie, J. Mpagi, C. Fremond, H. Wagner, C. Kirschning, and B. Ryffel. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. *Am. J. Pathol.* 2004. 164: 49–57.
  24. Peterson, P., G. Gekker, S. Hu, W. Sheng, W. Anderson, R. Ulevitch, P. Tobias, K. Gustafson, T. Molitor, and C. Chao. CD14 Receptor-Mediated Uptake of Nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by Human Microglia. *Infect. Immun.* 1995. 63(4): 1598-1602.
  25. Raju C. Reddy, Gina H. Chen, Michael W. Newstead, Tom Moore, Xianying Zeng, Kazuhiro Tateda, Theodore J. Standiford, Alveolar Macrophage Deactivation in Murine Septic Peritonitis: Role of Interleukin 10. *Infection and immunity*, Mar. 2001, p. 1394–1401.
  26. Shawn J. Green, Libia F. Scheller, Michael A. Marietta, Matthew C. Seguin, Francis W. Klotz, Mike Slayter, Barbara J. Nelson and Carol A. Nacy. Nitric Oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens *Immunology Letters*, 43 (1994) 87-94.
  27. Zhou R., Wei H., Sun R., Tian Z., Recognition of double-stranded RNA by TLR3 induces severe small intestinal injury in mice. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4548-56.

*Recibido: 1 de septiembre de 2012*

*Aceptado: 1 de septiembre de 2012*