

Reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* por TLR2 y TLR9 en macrófagos alveolares y monocitos humanos

Esmeralda Juárez,* Ma. del Carmen Sarabia,* Dante Escobedo,‡ Eduardo Sada,* Martha Torres* ✉

Departamento de Investigación en Microbiología, INER,* Servicio de Broncoscopía, INER‡
Trabajo recibido: 09-VII-2010; aceptado: 09-IX-2010

RESUMEN. Antecedentes: Los receptores tipo *Toll* (TLR) participan en la respuesta inmune inicial hacia patógenos, sin embargo, su papel en la respuesta de los macrófagos alveolares (MA) humanos hacia *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), aún está pobremente estudiada. En este trabajo se investigó esta función en los compartimentos pulmonar y sistémico.

Métodos: Se determinó la expresión de TLR2 y TLR9 en monocitos (MN) y MA estimulados con los antígenos micobacterianos lipoarabinomana y ADN de *M. tuberculosis*, así como en el proceso infeccioso con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* utilizando la técnica de citometría de flujo. La producción de citocinas proinflamatorias ligando-específicas y postinfección se determinó por ELISA.

Resultados: La infección por *M. tuberculosis*, o la estimulación con sus antígenos, modula la expresión de TLR2, pero no la de TLR9 en MN e inducen la producción de TNF- α e IL6 ligando-específica. En MA no hay modificaciones en la expresión de ambos receptores.

Conclusiones: La expresión y función de TLR2 y TLR9 a consecuencia de la infección por *M. tuberculosis* es distinta en los fagocitos alveolares y sistémicos. Es posible que la expresión y función de los TLR en el sistema de defensa pulmonar innato sea relevante no sólo en la generación de la respuesta inmediata, sino en la capacidad de controlar la infección por *M. tuberculosis*.

Palabras clave: TLR, macrófagos alveolares, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT. Background: Toll-like receptors (TLR) contribute to initial immune response to pathogens, however, their precise role in human alveolar macrophages response towards *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) remains poorly characterized. The aim of this study was to investigate this process in the alveolar and systemic compartments.

Methods: TLR2 and TLR9 expression was determined in monocytes and alveolar macrophages stimulated with mycobacterial lipoarabinomannan and DNA or infected with the virulent strain of *M. tuberculosis* by flow cytometry. Ligand-specific and infection-induced production of proinflammatory cytokines was assessed by ELISA.

Results: *M. tuberculosis* infection as well as stimulation with *M. tuberculosis* antigens modulated TLR2 but not TLR9 expression in monocytes and induced specific TNF- α and IL6 release. Alveolar macrophages did not modulated TLR2 nor TLR9 expression.

Conclusions: Expression and function of TLR2 and TLR9 after exposure to *M. tuberculosis* is different between alveolar and systemic phagocytes. TLRs role in pulmonary defense may be relevant in the generation of immediate response as well as in control of *M. tuberculosis* infection.

Key words: TLR, alveolar macrophages, *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

El pulmón es un órgano continuamente expuesto a retos aerogénicos, como partículas, alérgenos y microorganismos.¹ En el espacio alveolar se localizan principalmente macrófagos alveolares (MA), y en menor proporción células dendríticas y linfocitos. Ante la llegada de microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) al espacio alveolar, los MA son responsables de la fagocitosis y eliminación de los patógenos, así como de la producción de cito-

quinas proinflamatorias y quimiocinas para la activación y reclutamiento de monocitos (MN) y linfocitos al sitio de infección.² El reconocimiento de patógenos por los MA se realiza a través de una variedad de receptores de reconocimiento de patrones moleculares, entre los que se encuentran los receptores tipo *Toll* o TLRs (del inglés *Toll like receptor*)^{3,4} que son elementos centrales de la inmunidad innata.

Los TLR son moléculas transmembranales que reconocen estructuras microbianas particulares, como lípidos, lipoproteínas y ADN. Posterior al reconocimiento de estas estructuras se induce la traslocación al núcleo

del factor nuclear NF- κ B para la transcripción de genes de la respuesta inmune, como citocinas, que participan en la respuesta inflamatoria y en la diferenciación de células T, de manera que estos receptores juegan un papel primordial, tanto en el inicio de la respuesta innata como en la generación de la inmunidad adaptativa.^{5,7}

Se han identificado 13 diferentes TLR en mamíferos, los cuales difieren entre sí en el ligando que reconocen y su patrón de expresión en las diferentes células; tanto TLR2 como TLR9, presentes en los MA, son relevantes en el reconocimiento de antígenos de *M. tuberculosis*.^{5,8} La importancia de TLR2 en el reconocimiento de *M. tuberculosis*, se describió en estudios realizados en macrófagos y células dendríticas murinas en donde demostraron que el reconocimiento de lipoarabinomana (LAM), y la lipoproteína de 19 KDa de *M. tuberculosis* por TLR2 induce la producción y liberación de quimiocinas, especies reactivas de nitrógeno y citocinas como TNF- α , IL1, IL12 e IL18; además, los macrófagos de ratones deficientes en TLR2 tienen disminuida su producción de las citocinas IL12p40, TNF α e IL6 en respuesta a la infección *in vitro* con *M. tuberculosis*.⁹⁻¹² Por otro lado, se observó que el TLR9 también es necesario en la respuesta inmune murina hacia *M. tuberculosis*, pues después del reconocimiento de ADN micobacteriano se induce la producción de IFN- γ e IL12 y la migración de los linfocitos CD4⁺ al sitio de infección.^{5,13} Estudios *in vivo* demostraron que los ratones deficientes de TLR2 y TLR9 presentan una marcada susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* con disminución de la sobrevivencia.¹⁴

Recientemente, nuestro grupo reportó que en MA humanos, la expresión de TLR2 es baja comparada con la de los monocitos y que no se induce la producción de IL-6 y TNF- α en respuesta a Pam3Cys (ligando específico). También reportamos que TLR9 se expresa abundantemente en ambos tipos celulares y la activación con su ligando específico induce autorregulación de su expresión y la producción significativa de TNF- α e IL6.¹⁵

Estudios genéticos recientes señalan que polimorfismos en los genes de TLR2 y TLR9 confieren susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* en poblaciones caucásica, americana y africana,¹⁶ lo que señala la importancia de investigar el papel que estos receptores tienen en el reconocimiento de *M. tuberculosis* en células pulmonares humanas.

En el presente trabajo investigamos en ensayos *in vitro* el efecto de la infección con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* y la estimulación con LAM y DNA micobacteriano (ADN-*M. tuberculosis*) en la regulación de la expresión de TLR2 y TLR9 en la superficie del macrófago y en la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL6.

MATERIAL Y MÉTODOS

Grupo de estudio

Se incluyeron 8 sujetos sanos residentes de la Ciudad de México sin evidencia clínica o radiológica de padecer enfermedades respiratorias o inmunosupresoras, con serología negativa para HIV-1 con un intervalo de edad entre 18-50 años dispuestos a otorgar su consentimiento por escrito para participar en este estudio. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

Preparación de las células bronquioloalveolares

A cada sujeto se le tomó una muestra de sangre de 180 mL y se le realizó un lavado bronquioloalveolar (LBA) utilizando un broncoscopio óptico Olympus instilando 180 mL de solución salina en el lóbulo medio después de anestesia local de vías aéreas superiores con lidocaína al 2%.¹⁷ El LBA fue centrifugado a 1,200 rpm, por 15 min a 4°C. Las células fueron resuspendidas a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio completo (RPMI-1640, Lonza, 50 μ g/mL de sulfato de gentamicina, 200 mM L-glutamina y 10% de suero humano inactivado). La viabilidad de las células fue mayor al 98% (exclusión de azul de tripano). El $95 \pm 2.6\%$ de las células fueron MA identificados por citometría de flujo basado en tamaño, granularidad y expresión de HLA-DR.

Preparación de monocitos

Las células mononucleares de sangre periférica fueron separadas por centrifugación sobre Lymphoprep (Lonza, Basel, Switzerland). Posteriormente, los MN fueron obtenidos por selección positiva utilizando microperlas magnéticas CD14⁺ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los MN se lavaron y resuspendieron en medio completo. La viabilidad fue $> 98\%$ en todos los casos y el $91.4 \pm 1.9\%$ fueron células CD14⁺.

Preparación de M. tuberculosis H37Rv para la infección in vitro

La cepa tipo *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC, Manassas, VA) fue crecida durante 21 días en medio líquido 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI), suplementado con 10% de ADC (Difco) y 2% de glicerol a 37°C en agitación continua (100 rpm). Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 3000 rpm y resuspendidas en medio

fresco 7H9 suplementado. Se hicieron alícuotas y se conservaron a -70°C hasta su uso. La concentración bacteriana se determinó por unidades formadoras de colonias (UFC).

Infección por M. tuberculosis H37Rv de monocitos y MA in vitro

En tubos de polipropileno (Falcon) se colocaron 1×10^6 células resuspendidas en medio completo, se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv, a una razón de infección de 10 bacterias por cada macrófago/monocito (MOI 10:1) durante 1 h a 37°C en 5% CO_2 . Las bacterias no fagocitadas se eliminaron por lavados, y las células infectadas se incubaron por 24 h más. El sobrenadante se recolectó para la determinación de TNF- α e IL6 y en las células se determinó la expresión de TLR2 y TLR9 por citometría de flujo.

Preparación de ADN de M. tuberculosis

El 1×10^9 de UFC de *M. tuberculosis* H37Rv se digirieron con una solución de lisis (2 mg/mL proteinasa K, 50mM TRIS-1mM EDTA-0.5% Tween 20) durante toda la noche a 56°C . El ADN-*M. tuberculosis* se extrajo con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y se precipitó con acetato de sodio-etanol 1:30. La concentración del ADN se calculó por espectrofotometría y con el ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus (Pyrogen Plus, Cambrex) no se detectó LPS como contaminante.

Activación con antígenos micobacterianos

Se incubaron 1×10^6 MN y MA en presencia de $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN de *M. tuberculosis* durante 24 h o de $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de LAM durante 30 min a 37°C en tubos de polipropileno de fondo redondo para evitar la adherencia de las células. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación para determinación de citocinas y en las células se determinó la expresión de TLR2 y TLR9 por citometría de flujo.

Detección de TLR2 y TLR9 en membrana plasmática por citometría de flujo

Se utilizaron 2×10^5 células para cada tinción. Los MN y macrófagos se pre-incubaron 10 min a temperatura ambiente (TA) con RPMI-50% de suero hiperinmune de conejo para bloquear los receptores Fc y evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Sin eliminar el medio de bloqueo se añadieron los anticuerpos anti TLR2, anti TLR9 y sus correspondientes isotipos IgG1 de ratón e IgG2 de rata, todos acoplados a ficoeritrina

y todos de eBioscience; cada tinción se realizó en tubos independientes y se incubaron 20 min adicionales (TA). Finalmente se lavaron con PBS (Lonza), se fijaron con 1% de paraformaldehído y se almacenaron a 4°C hasta la adquisición de 20,000 eventos en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). Debido a que el macrófago es una célula que posee un nivel basal de autofluorescencia, se ajustó el voltaje de los detectores de fluorescencia del citómetro de flujo hasta el punto que permite la discriminación entre la señal específica y la autofluorescencia. Los datos fueron analizados con el programa CELL-Quest (Becton Dickinson). El isotipo correspondiente para cada TLR se utilizó para establecer el porcentaje de células positivas y para calcular la razón del índice medio de fluorescencia RIMF = (fluorescencia media del TLR-fluorescencia media del isotipo)/fluorescencia media del isotipo.

Determinación de TNF- α e IL6

La concentración de estas citocinas en los sobrenadantes de los cultivos se determinó por la técnica de ELISA utilizando los anticuerpos específicos para TNF- α (endogene) o para IL6 (R&D). La detección se hizo utilizando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch) para TNF- α , y estreptavidina-peroxidasa (R&D) para IL6 se reveló con los sustratos correspondientes, sustrato de fosfatasa (sigma) o tetrametilbenzidina (sigma) y la lectura se realizó a 405 nm para TNF- α y a 450 nm para IL6. Los resultados se presentan como la media de los duplicados en pg/mL .

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para pares de muestras relacionadas. Se consideró significancia estadística cuando fue $p < 0.05$. Se utilizó el programa SPSS ver. 14 (Mapinfo, NY).

RESULTADOS

Los MN y MA modulan su expresión de TLR2 en respuesta a la infección con M. tuberculosis

Los MN y macrófagos se incubaron en presencia de *M. tuberculosis* y en medio de cultivo solo, como condición de control durante 24 h y se determinó la proporción de células que expresan TLR2 en su membrana plasmática (TLR2⁺). En ausencia de infección, el 6.4% de los MN y el 1.3% de los MA eran TLR2⁺; en respuesta a la infección con la cepa virulenta de *M. tuberculosis*, el porcentaje de MN TLR2⁺ aumentó a 14% mientras

que el porcentaje de MA TLR2⁺ no se modificó (figura 1A). La razón de la intensidad media de fluorescencia (RIMF), considerada como un indicador del número de receptores presente en la membrana celular, cambió de

2.1 en MN sin infección a 3.9 posterior a la infección. Los MA mostraron una RIMF 0.9 sin infección y de 1.1 después de la infección (figura 1B).

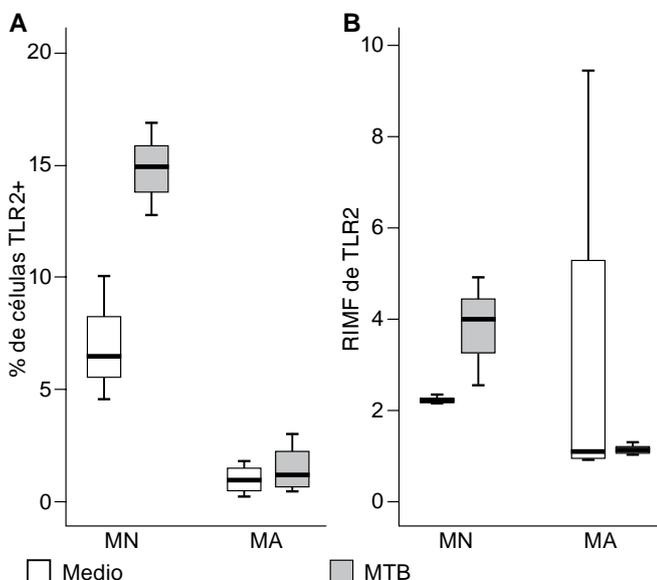


Figura 1. Expresión de TLR2 en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*. Los MN y MA fueron infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* (MOI 10) durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se eliminaron por lavados y las células permanecieron 24 h adicionales a 37°C. El porcentaje de células que expresan TLR2 en membrana plasmática (A) y la densidad de receptores, medida por la razón media de fluorescencia RMFI (B) se determinaron por citometría de flujo. n = 4.

Modulación de la expresión de TLR2 en respuesta al componente específico de *M. tuberculosis* LAM

Tanto el porcentaje de MN TLR2⁺ como la densidad de receptores en los mismos aumentó en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*; por lo tanto, investigamos si esta respuesta se debe, en parte, al reconocimiento del ligando específico de *M. tuberculosis* LAM. Se determinó la expresión de TLR2 en respuesta a LAM a diferentes tiempos. La expresión de TLR2 disminuyó en los MN y en los MA a los 30 min (figura 2). En incubaciones durante más tiempo no encontramos cambios respecto a la expresión en células no estimuladas (1, 2, 3, 6, 9, 18 y 24 h, datos no mostrados).

Expresión de TLR9 en MN y MA en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*

La proporción de células que poseen TLR9 en su membrana plasmática (TLR9⁺) fue semejante en ambos tipos celulares (29% MN y 28% para MA) y no se modificó como respuesta a la infección por *M. tuberculosis* (26% MN y 31% macrófagos). Debido a que TLR9 reconoce motivos de ADN hipometilados, las células se estimularon con ADN-*M. tuberculosis*. La mediana del porcentaje de MN TLR9⁺ disminuyó al 12%, aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa; el

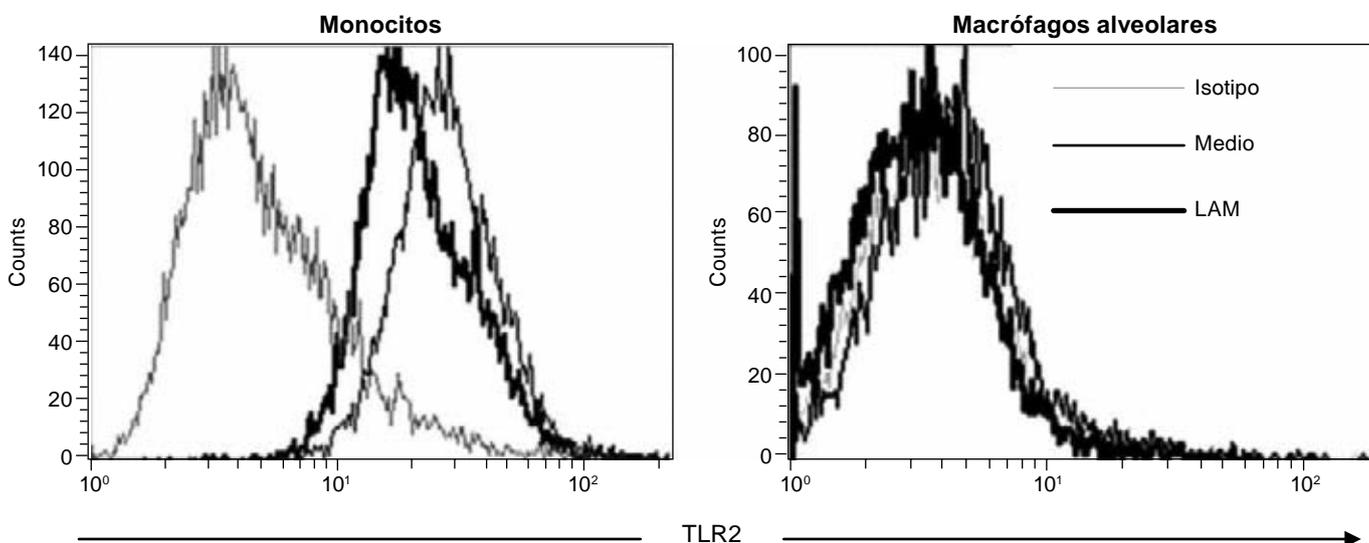


Figura 2. Expresión de TLR2 en respuesta a la estimulación con LAM de *M. tuberculosis*. Los MN y MA fueron estimulados con 5 μ g/mL de LAM durante 30 min y la modulación de la expresión membranal de TLR2 se determinó por citometría de flujo. Histogramas representativos de tres experimentos independientes.

porcentaje de MA TLR9+ no cambió (22%). La razón de la intensidad media de fluorescencia fue semejante entre ambos (2.9 para MN y 2.5 para MA) y no se modificó en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* (3.4 en MN y 4.6 en macrófagos) ni al ADN-*M. tuberculosis* (2.5 en ambos). La figura 3 muestra los porcentajes de MN (A) y MA (B) que expresan TLR2, y se muestran histogramas representativos.

Los MN y MA producen citocinas proinflamatorias en respuesta a la infección por M. tuberculosis

Los MN y los MA producen TNF- α e IL6 en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*. La producción de TNF- α e IL6, tanto por MN como por MA aumentó significativamente a las 24 h postinfección (tabla 1, $p < 0.05$). Cuando las células fueron estimuladas con ligandos purificados, los MN mostraron producción ligando-específica de TNF- α e IL6 dependiente de TLR2 y TLR9; los MA, en cambio, solamente respondieron a la estimulación por el ligando de TLR9.

DISCUSIÓN

El desarrollo de una respuesta innata apropiada en el pulmón requiere del reconocimiento de antígenos microbianos por los MA. En este trabajo investigamos la expresión de TLR2 y TLR9 en los MA en respuesta a la infección *in vitro* con la cepa virulenta de *M. tuberculosis*, tanto en MN como en MA humanos.

Nuestros resultados muestran que la expresión de TLR2 es mayor en MN en comparación con MA, estos resultados son consistentes con los previamente reportados (referencia 15). Además, observamos que la expresión de TLR2 en MN aumenta en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*; en cambio, la expresión de TLR2 disminuye ante la activación ligando-específica (LAM). Esta diferencia en la modulación de la expresión podría deberse a que la infección, en la que se presentan simultáneamente numerosos antígenos, es capaz de activar otros mecanismos y otros receptores que podrían regular el incremento en la expresión de TLR2; mientras que la activación por el ligando específico regula solamente una

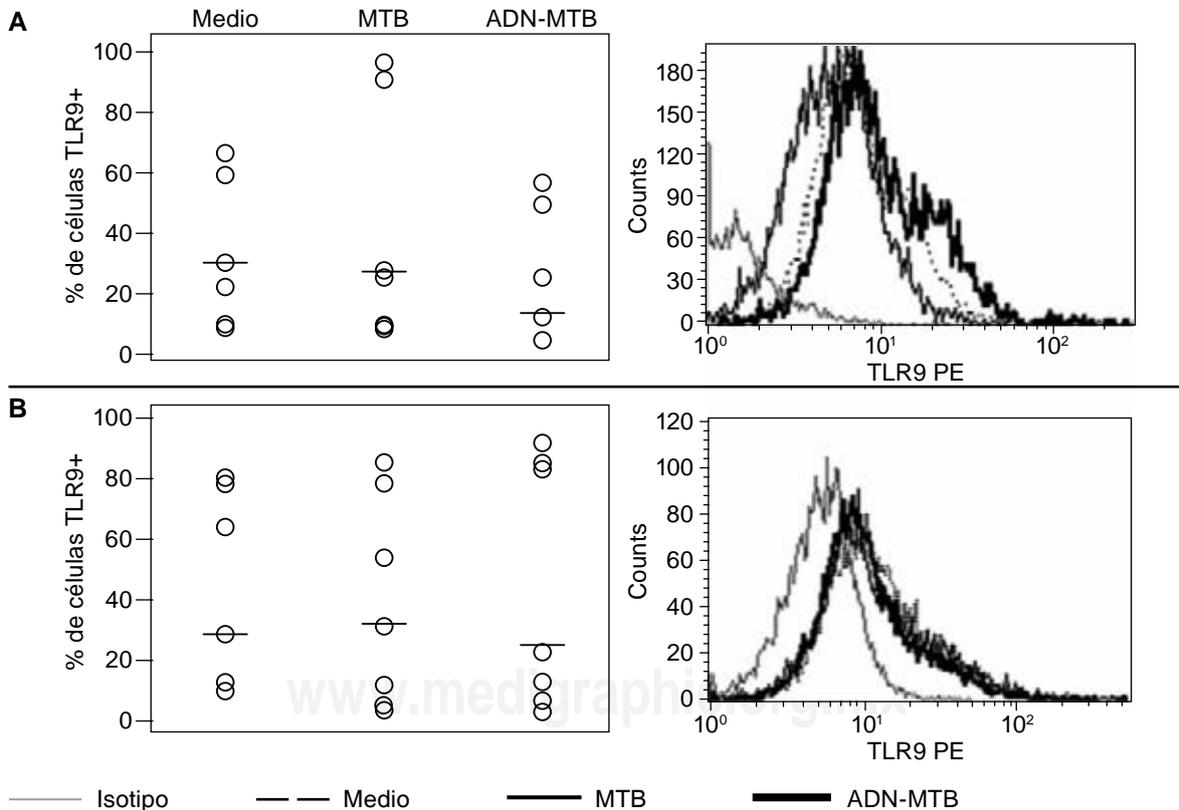


Figura 3. Expresión de TLR9 en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*. Los MN (panel A) y MA (panel B) fueron infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* (MOI 10) durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se eliminaron por lavados. Las células infectadas o estimuladas con 5 μ g/mL de ADN de *M. tuberculosis* se incubaron 24 h a 37°C. El porcentaje de células que expresan TLR9 en membrana plasmática se determinó por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos, n = 7.

Tabla 1. Producción de citocinas proinflamatorias por monocitos y macrófagos alveolares.

	TNF- α		IL6	
	MN	MA	MN	MA
Medio	385 \pm 116	777 \pm 284	934 \pm 196	1,332 \pm 1,052
<i>M. tuberculosis</i>	*4,487 \pm 1,749	*4,457 \pm 1,055	*10,691 \pm 2,602	*8,741 \pm 2,874
ADN- <i>M. tuberculosis</i>	*1,779 \pm 560	*2,049 \pm 421	*4,485 \pm 1,921	*5,142 \pm 2,153
LAM	*861 \pm 319	225 \pm 112	Nd	Nd

Concentración en pg/mL, se presenta la media + error estándar; * $p < 0.05$ comparado con el medio; Nd: no determinado; MN: monocitos; MA: macrófagos; LAM: lipoarabinomana.

vía de señalización.¹⁸ Finalmente, los MN responden a la infección o a la activación de TLR2 con producción de TNF- α e IL6. En contraste, los MA muestran muy baja expresión del TLR2 y no observamos incremento en su expresión ni en respuesta a la infección ni con la activación por LAM; los MA producen TNF- α e IL6 en respuesta a la infección, pero no lo hacen en respuesta al ligando específico de TLR2 sugiriendo que otros mecanismos de reconocimiento de patógenos están activos en el MA, pero el de TLR2 no y esto es consistente con su bajo nivel de expresión. Una respuesta análoga se ha observado en el modelo murino, pues los fagocitos sistémicos responden a la estimulación de TLR2 por *M. tuberculosis* o a su antígeno de 19KDa con inhibición de la señalización del IFN γ ; en cambio, los MA no lo hacen.¹⁹ La respuesta diferencial entre MA y sistémicos podría estar relacionada con la función específica que cada tipo celular ejerce y a su microambiente, el cual puede influir en el umbral de activación de la respuesta inmune innata. En el caso del pulmón, por estar tan expuesto a estimulación constante, la respuesta innata está controlada por efecto de las células epiteliales y dendríticas locales para impedir la inflamación patológica.^{20,21}

En el presente trabajo no se observó un patrón de modulación de la expresión de TLR9 ni con la infección con *M. tuberculosis* ni con el ADN-*M. tuberculosis* en MN ni en los MA; aunque, sí observamos producción de TNF- α e IL6 dependiente del reconocimiento del ADN de las micobacterias. Dado que la localización de TLR9 es preferentemente intracelular, es posible que el reconocimiento de *M. tuberculosis* y del ADN-*M. tuberculosis* ocurra en vesículas citoplásmicas y que la expresión membranal de este receptor no experimente cambios mayores, sino que éstos ocurran en la membrana fagosomal.²²

Limitaciones del estudio

Este trabajo se realizó en un grupo de estudio pequeño debido a la dificultad de obtener células alveolares humanas primarias; además, la cantidad de células

obtenidas en un LBA no permite realizar experimentos adicionales que serían útiles para identificar los mecanismos específicos de la regulación de la expresión de los TLR en el contexto de inmunidad local.

CONCLUSIONES

Los receptores TLR difieren entre sí, tanto en la especificidad de reconocimiento como en el patrón de expresión en las diferentes células del sistema inmune; aquí, observamos que la expresión y función de TLR2 y TLR9 a consecuencia de la infección por *M. tuberculosis* es distinta en los fagocitos alveolares y sistémicos. Se sabe que estos receptores altamente conservados también establecen un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa,²³ por lo que se requieren futuras investigaciones para esclarecer el papel que los TLR ejercen en la respuesta inmune pulmonar global, el control de la infección de manera temprana, y definir los mecanismos que regulan la respuesta inflamatoria en el pulmón.

REFERENCIAS

- Guth AM, Janssen WJ, Bosio CM, Crouch EC, Henson PM, Dow SW. *Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2009;296:L936-L946.
- Sibille Y, Reynolds HY. *Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury*. Am Rev Respir Dis 1990;141:471-501.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol 2005;23:901-944.
- Mukhopadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. *The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors*. Immunology 2004;112:521-530.
- Roach JC, Glusman G, Rowen L, et ál. *The evolution of vertebrate toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci 2005;102:9577-9582.
- Iwasaki A, Medzhitov R. *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol 2004;5:987-995.

7. Akira S, Takeda K, Kaisho T. *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol 2001;2:675-680.
8. Schluger NW, Rom WN. *The host immune response to tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:679-691.
9. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. *Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages*. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:14459-14463.
10. Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, et al. *Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin peptidoglycan*. Infect Immun 2003;71:4238-4249.
11. Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. *The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors*. J Immunol 1999;163:6748-6755.
12. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. *Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors*. Science 1999;285:732-736.
13. Ito T, Schaller M, Hogaboam CM, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel SL. *TLR9 activation is a key event for the maintenance of a mycobacterial antigen-elicited pulmonary granulomatous response*. Eur J Immunol 2007;37:2847-2855.
14. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, 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;202:1715-1724.
15. Juárez E, Núñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. *Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes*. Respir Res 2010;11:2.
16. Velez DR, Wejse C, Stryjewski ME, et al. *Variants in Toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans*. Hum Genet 2010;127:65-73.
17. Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA. *Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages*. J Immunol 1994;152:743-753.
18. Hopkins PA, Pridmore AC, Ellmerich S, et al. *Increased surface Toll-like receptor 2 expression in superantigen shock*. Crit Care Med 2008;36:1267-1276.
19. Kincaid EZ, Wolf AJ, Desvignes L, et al. *Codominance of TLR2-dependent and TLR2-independent modulation of MHC class II in Mycobacterium tuberculosis infection in vivo*. J Immunol 2007;179:3187-3195.
20. Raz E. *Organ-specific regulation of innate immunity*. Nat Immunol 2007;8:3-4.
21. Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. *Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract*. Nat Rev Immunol 2008;8: 142-152.
22. Ewald SE, Lee BL, Lau L, et al. *The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor*. Nature 2008;456:658-662.
23. Akira S, Takeda K, Kaisho T. *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol 2001;2:675-680.

✉ **Correspondencia:**

Dra. Martha Torres,
Departamento de Investigación en Microbiología,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan 4502,
colonia Sección XVI. México, D.F., 14080
Correo electrónico: marthatorres98@yahoo.com

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.