

RESEARCH ARTICLE

# The Role of High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis

Rogelio Hernández-Pando<sup>1</sup>, Jorge Barrios-Payán<sup>1</sup>, Dulce Mata-Espinosa<sup>1</sup>, Brenda Marquina-Castillo<sup>1</sup>, Diego Hernández-Ramírez<sup>2</sup>, Oscar Adelmo Botasso<sup>3</sup>, Estela Isabel Bini<sup>1,3\*</sup>

**1** Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", México City, 14000, México, **2** Immunology Department, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", México City, 14000, México, **3** Institute of Experimental and Clinic Immunology, Rosario, IDICER, CONICET, School of Medical Sciences, Santa Fe 3100, Rosario, 2000, Argentina

\* [estelabini@yahoo.com.ar](mailto:estelabini@yahoo.com.ar)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Hernández-Pando R, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Hernández-Ramírez D, Botasso OA, et al. (2015) The Role of High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. PLoS ONE 10(7): e0133200. doi:10.1371/journal.pone.0133200

**Editor:** Patricia T. Bozza, Fundação Oswaldo Cruz, BRAZIL

**Received:** November 20, 2014

**Accepted:** June 24, 2015

**Published:** July 22, 2015

**Copyright:** © 2015 Hernández-Pando et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are available within the paper.

**Funding:** Estela Isabel Bini was awarded with a travelling fellowship from DMM Company of Biologists, England. This work was supported by the Bilateral International Project Argentina/México, CONICET/CONACYT, number 190527.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

### Background

The high mobility group box 1 (HMGB1) is the prototype of alarmin protein released by stressed or dying cells. The redox state of this protein confers different functions in the regulation of inflammation and immune response.

### Aim

Determine the kinetics, cellular sources and function of HMGB1 in experimental tuberculosis.

### Methods

BALB/c mice were infected with *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. At different time points, HMGB1 was quantified in bronchial lavage fluid (BALF) and in lungs was determined its cellular sources by immunohistochemistry. HMGB1 was blocked with specific antibodies or recombinant HMGB1 was administered during early or late infection. Bacilli burdens, inflammation and cytokines expression were determined.

### Results

The maximal concentration of HMGB1 in BALF was at day one of infection. Bronchial epithelium and macrophages were the most important sources. At day 7 to 21 the oxidized HMGB1 was predominant, while during late infection only the reduced form was seen. Blocking HMGB1 during early infection produced significant decrease of bacilli burdens and high production of pro-inflammatory cytokines, while the opposite was seen when HMGB1 was administered. Blocking HMGB1 activity or administrated it in high amounts during late infection worsening the disease.

## Conclusions

HMGB1 is liberated during experimental tuberculosis and promotes or suppresses the immune response and inflammation depending on the redox state.

## Introduction

Tuberculosis (TB) is a respiratory chronic infection which produces profound abnormalities in the immune system [1]. Both innate and acquired immunity are essential participants in the growth control of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). During early infection, innate immunity senses the presence of the pathogen after the participation of a number of pattern-recognition receptors that detect mycobacterial components through pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), being the Toll-like receptors (TLRs) the best studied of these pattern detectors. Interestingly, besides recognizing PAMPs, the immune system has evolved to detect endogenous danger signals or by analogy damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are released by dying cells or are actively secreted by stressed cells and contribute to regulate the inflammatory response [2]. Actually DAMPs act as 'warning' signals that alert innate and adaptive immunity. The nuclear DNA-binding molecule high mobility group box 1 (HMGB1) is a prototype DAMP protein that may play a role in modulating the inflammatory responses after the cell damage induced by Mtb [3].

HMGB1 is a non-histone nuclear protein that is comprised of 215 amino acids that are arranged in two box structures (A box and B box) and a C terminal tail with glutamic and aspartic aminoacids. HMGB1 contains three cysteine residues, two in box A, (C23 and C45), and one in box B (C106) that are redox sensitive, and two nuclear localization sequence (NSL) located one in the box A and the other one in box B, both contain lysine residues. Hyperacetylation of the lysines located in NSLs determines the nuclear translocation to cytoplasm and subsequent secretion [4]. Thus, acetylation is decisive for intracellular shuttling of HMGB1 from the nucleus to cytoplasm and subsequent release from monocytes, macrophages [5, 6] and other cell types [4].

In the nucleus, HMGB1 can bind DNA, especially molecules with certain sequences or a bent structure, contributing to organize chromosome architecture and regulate transcription [7, 8]. In the cytoplasm, HMGB1 is involved in autophagy and PKR/inflammasome activation [4]. HMGB1 is susceptible to extensive post-translational modifications: acetylations, methylations, glycosylations, phosphorylations, ADP-ribosylations, and reversible and terminal cysteine oxidation [4, 9, 10, 11]. HMGB1 can enter endosomal vesicles for eventual secretion after immune activation or other type of stimulus. When cells die by necrosis or apoptosis, HMGB1 also translocates to the extracellular milieu [3, 12], and its immunological effect is different. When HMGB1 is liberated by necrotic cells induces strong pro-inflammatory stimulus, as demonstrated in models of sepsis [13], while HMGB1 released during apoptosis could diminish immunological activity, due to the oxidation of key cysteine residues occurring during redox disturbances in stressed cells [14].

Recent analysis based in mass spectrometry, molecular techniques and immunological readouts have allowed the functional characterization of HMGB1, which depends on the redox modifications of cysteine residues and lysine acetylation [4]. Concerning to the cysteine residues and depending on the redox state, HMGB1 can be in "all thiol" form with all cysteines reduced; "disulfide HMGB1" with a disulfide bond between C23 and C45, and C106 remaining in the reduced thiol form; and the "oxidized HMGB1" with the three cysteines oxidized [15, 16,

[17]. The “all thiol” HMGB1 acts as a chemotactic mediator [4], after binding to other chemokines (CXCL-12), it stimulates leukocyte recruitment [15, 18]. The “disulfide” HMGB1 is a cytokine-stimulating factor, it is released by necrotic and pyroptotic cells, and binds to MD-2 in the TLR4/MD-2 complex inducing TNF $\alpha$  release and NF $\kappa$ B activation acting as a proinflammatory factor [4, 17], while oxidized HMGB1 is released by apoptotic cells and induces immunosuppressing /antiinflammatory effects [15, 16, 17, 4].

Considering that along the course of TB there are necrotic, apoptotic and stressed cells which should release HMGB in different redox states, the contribution of this alarmin in the immunopathology of TB could be important. The present study is aimed to evaluate the kinetics, cellular sources and function of HMGB1 in a model of pulmonary TB in BALB/c mice.

## Materials and Methods

### Experimental model of pulmonary TB

The experimental model of progressive pulmonary TB has been described elsewhere [19]. Briefly, the reference Mtb strain H37Rv was grown in 7H9 medium with OADC enrichment. Mid log-phase cultures were used. Male BALB/c mice, 6–8 weeks old, were anaesthetized in a gas chamber using sevoflurane and infected through endotracheal instillation with  $2.5 \times 10^5$  live bacilli. All the animal work was done according to the guidelines of the Mexican Constitution law NOM 062-200-1999, and approval of the Ethical Committee for Experimentation in Animals of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition in Mexico, permit number: 224.

### Quantification of HMGB1 by ELISA and determination of reduced or oxidized HMGB1 by western blotting in bronchial lavage fluid (BALF)

Groups of four animal infected as described below were euthanized by ex-sanguination after anesthetized with intraperitoneal penthotal; BALF was performed with  $5 \times 1$  ml of PBS on 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 60 days after infection. Another group of uninfected animals was included as a control group. After concentrate the BALF, total proteins from mice were determined separately and HMGB1 concentrations were determined by ELISA using a commercial kit (IBI International, REF: ST 51011).

The presence of reduced or oxidized HMGB1 was determined in BALF, because depending on this is its pro or anti-inflammatory activity [2, 20]. HMGB1 oxidation produced a shift in the protein emigration which can be detected in gradient polyacrylamide gels and western-blotting [20]. Equal amounts of BALF proteins from each time point were separated on a non-reducing (4 to 20%) Bis-Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, CA), transferred to nitrocellulose membrane and incubated with anti-HMGB1 Rabbit anti-Human Monoclonal Antibody (LS-B11655-LSBio) diluted 1/1000. The blot was developed by chemiluminescence (ECL-plus; Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Control blots were processed without incubation with the primary antibodies.

### Preparation of lung tissue for immunohistochemistry and morphometry

Lungs from infected and non infected mice were fixed by perfusion with 100% ethanol via the trachea and embedded in paraffin. Sections  $5\mu$  thick were deparaffinized, the endogenous peroxidase quenched and incubated with anti-HMGB1 Rabbit anti-Human Monoclonal Antibody diluted 1/250 in PBS (LS-B11655-LSBio), followed by incubation with goat anti-rabbit IgG labeled with peroxidase. The same antibodies used in the western-blot study were used in the immunohistochemistry experiment. Bound antibodies were detected with diaminobenzidine.

For quantification, three different mice lungs per time-point in two different experiments were evaluated. Ten random microscopy fields were selected. At x200 magnification, at least 1200 negative or positive cells from the airways epithelial cells and alveolar and interstitial macrophages were counted using an image analyser (Leica Q-win, Cambridge UK) [19]. Due to the results obtained with the administration of recombinant HMGB1 during early and late infection, immunohistochemistry to detect foxP3 and IL-10 were also performed using polyclonal specific antibodies (Santa Cruz Biotechnology), following the same described procedure.

The subcellular localization of HMGB1 was determined by immunoelectronmicroscopy using antibodies labeled with colloidal gold. Lungs from three mice from days 1, 7 and 60 days after infection were perfused with 4% (v/v) paraformaldehyde dissolved in 0.2 M Sørensen buffer (1 vol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2 vol NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) for 4 h at 4°C. Tissue fragments were dehydrated and embedded in LR-white hydrosoluble resin (London Resin Company, London, UK). Sections from 70 to 90 nm on nickel grids were incubated overnight with monoclonal rabbit anti-HMGB1 antibodies diluted 1/20. Then, the grids were incubated with goat anti-rabbit antibodies conjugated with 5 nm gold particles (Sigma Co., St Louis, MO), contrasted with uranium salts (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) and examined with the electron microscope. As negative controls, the primary antibody was substituted by normal rabbit serum.

### Real-time PCR analysis of cytokines in lung homogenates

One lung lobe, from three different mice per group in two independent experiments, was used to isolate mRNA using the RNeasy minikit (Qiagen). Quality and quantity of RNA were evaluated through spectrophotometry (260/280) on agarose gels. Reverse transcription of the mRNA was performed using 5 µg RNA, oligo (dT), and the Omniscript kit (Qiagen, Inc.). Real-time PCR was carried out using the 7500 real time PCR system (Applied Biosystems) and Quantitect SYBR green Mastermix kit (Qiagen). Standard curves of quantified and diluted PCR product, as well as negative controls, were included in each PCR run. Specific primers for genes encoding acidic ribosomal protein (RLP0) as house-keeping gene, tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), gamma interferon (IFN $\gamma$ ), interleukin 17 (IL-17) and interleukin 10 (IL-10) were designed using the program Primer Express (Applied Biosystems) [21]. Cycling conditions were: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 34 s. Data are shown as copies of cytokine-specific mRNA/10<sup>6</sup> copies of RLP0 mRNA.

### Effect of blocking HMGB1 with specific antibodies or administration of recombinant HMGB during early TB infection

In order to study the contribution of HMGB1 to the inflammatory and immune response during early TB, infected mice were treated with chicken blocking antibodies against HMGB1 (Chicken Anti-HMGB1 Polyclonal Antibody, Cat N° 326052233 Shino Teste Corporation, Japan), administrating 15 µg/100 µl PBS by intratracheal route, on days 1, 3, 6, 9 and 12 after infection and groups of three mice in two independent experiments were euthanized at days 1, 7, 14 and 28 post-infection. Control mice received the same amount of isotype chicken antibodies (IgY, Shino TesteC, Kanawaga Japan). The lungs were processed for bacilli loads determination by colony forming units counting; the measurement of inflammatory infiltrates in square microns in different lung compartments (around venules, bronchioles and alveolar-capillary interstitium), granuloma size and percentage of lung surface affected by pneumonia were determined using automated morphometry (Q Win, Leica, Milton Keynes, UK). Pneumonia corresponded to lung areas with widening of alveolar capillary interstitium due to abundant

inflammatory infiltrate and intra-alveolar proteinaceous material intermixed with inflammatory exudates, where numerous macrophages are located. In order to quantify pneumonia, the total lung area was measured, then all the areas affected by pneumonia were determined and the percentage of affected lung surface area was calculated. Cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-17 and IL-10) gene expression was determined by RT-PCR as previously described [21].

In other group of mice the bacilli burdens and the inflammatory and immunological responses were evaluated after intratracheal administration of recombinant HMGB1 (Human, His-tagged, recombinant, Baculovirus, ATGEN Cat N° HMG0801). Since day one of infection and each other day during the first month of infection, mice received by intratracheal route 30ng/ml of recombinant HMGB suspended in PBS. Control group received the same amount of human albumin in the same indicated days. Groups of three mice in two independent experiments were euthanized on days 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days post-infection and their lungs were processed as described above. The amount of administered HMGB1 was the same than the maximal detected by ELISA, trying to maintain a constant high concentration of this protein during early infection.

### Effect of blocking HMGB1 with specific antibodies or administration of recombinant HMGB1 during late disease

Groups of mice after 60 days of infection were treated with blocking antibodies against HMGB1, 15  $\mu$ g/100 $\mu$ l administered intratracheally each other day during three weeks and mice were euthanized one month later. Other group of mice was treated with 30ng of recombinant HMGB1 suspended in 50 $\mu$ l of PBS, administered each other day by intratracheal route during two months. Control group received the same amount of IgY or human albumin instead of blocking antibodies or recombinant HMGB-1 respectively. Animals were euthanized after two months of treatment and their lungs were studied as described above.

### Statistical Analysis

Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Differences among groups were evaluated by the Anova test, whereas the Student t test was used for further analysis among group differences. An associated probability lower than 0.05, was considered significant.

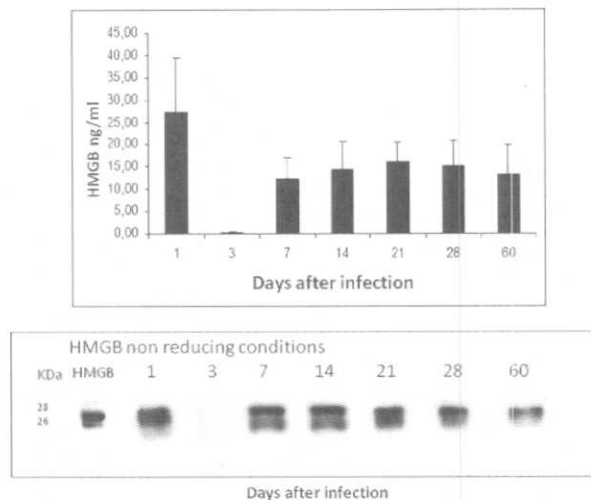
## Results

### Kinetics of HMGB1 in BALF during the course of progressive pulmonary TB

The quantification of HMGB1 in BALF by ELISA showed the highest concentration on day one of infection, followed by a sharp decrease on day three. After one week and until two months of infection there was a constant concentration of HMGB1 in BALF, from 10 to 15ng/ml (Fig 1). HMGB1 detection by Western-blot in BALF showed a strong band on day one post-infection, which almost disappear on day 3; from day 7 to 21 the double band corresponding to the oxidized form of HMGB1 was clearly detected, while during progressive disease only the single band corresponding to the reduced form was observed (Fig 1). HMGB-1 was not detected in BALF from non-infected animals by ELISA or Western-blot studies (data not shown).

### Cellular sources and subcellular localization of HMGB1 determined by immunohistochemistry

Lung sections from non-infected mice showed occasional bronchial epithelial cells with scarce cytoplasmic immunostaining. In contrast, during the early phase of the infection the most



**Fig 1. Kinetics of HMGB1 production during the course of experimental pulmonary tuberculosis.** BALB/c mice were infected with a high dose of *M. tuberculosis* strain H37Rv, groups of four animal per indicated time point were euthanized and their lungs were processed for the determination of HMGB1 in bronchioalveolar lavage proteins by ELISA (top panel), and identification of the reduced (one band) or oxidized (double bands) forms of HMGB1 (bottom panel). As control reduced recombinant human HMGB1 is shown.

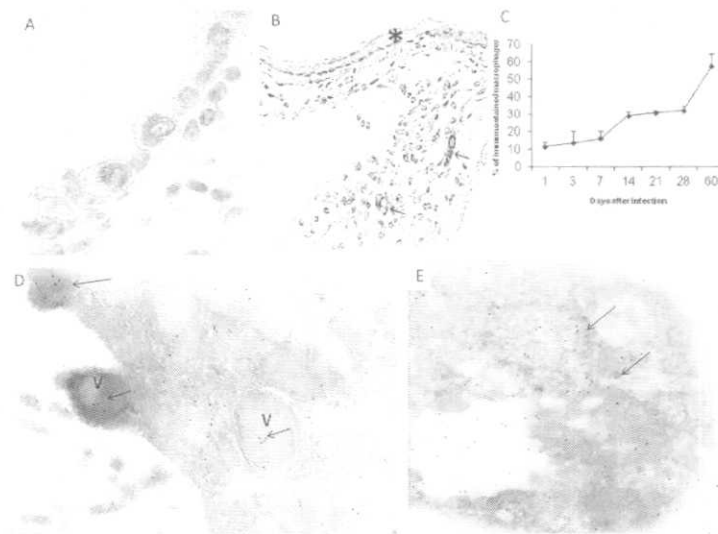
doi:10.1371/journal.pone.0133200.g001

common HMGB1 immunostained cells were the bronchial epithelium with a constant 70–80% of positive cells determined by automated morphometry (Fig 2A), while at late disease occasional epithelial cells showed scarce immunoreactivity (Fig 2B). Alveolar and interstitial macrophages also showed HMGB1 immunostaining during early infection and progressively increased, being 10 +/- 3% on day one to 30 +/- 5% on day 60 of infection in the pneumonic areas (Fig 2C); occasional positive cells were found in granulomas. HMGB1 immunostained macrophages showed the morphology of activated cells: very large cells with abundant eosinophilic cytoplasm and big nucleus with prominent nucleoli.

The immunoelectronmicroscopy study showed in the bronchial epithelial cells some nuclear labeling and cytoplasmic vesicles with specific labeling; some of these vacuoles were connected to the apical membrane (Fig 2D). On days 1 and 7 of infection, numerous apoptotic macrophages were seen with strong labeling (Fig 2E).

### Effect of blocking HMGB1 or recombinant HMGB1 administration during early infection

In order to study the contribution of HMGB1 to immunopathology during early *M. tuberculosis* infection (first month), infected mice were treated with HMGB1 blocking antibodies during the first three weeks of infection. These animals showed similar lung bacilli loads than control mice treated with irrelevant isotype chicken antibodies after one week of infection. Then, significant lower bacilli burdens were seen in animals treated with blocking antibodies (Fig 3A). In comparison with control mice, animals that received HMGB1 blocking antibodies showed higher inflammation in the alveolar-capillary interstitium during the first week of infection. Then, on days 14 and 28, higher inflammation in all lung compartments was developed by control mice, probably as a consequence of the higher bacilli burdens (Fig 3B). The size of granulomas was similar in both treated and non-treated mice. Focal areas of pneumonia that affected 10 +/- 3% of the total lung surface area was observed in control animals on day 28 of infection,



**Fig 2. Cellular sources of HMGB1 determined by immunohistochemistry.** (A) Lung section from a mouse after one day of infection, there is strong HMGB1 immunostaining in the cytoplasm of bronchial epithelial cells. (B) After 60 days of infection, the bronchial epithelium show scarce immunoreactivity (asterisk), while macrophages in the pneumonic areas show strong immunostaining (arrows). (C) The morphometric study shows a progressive increase of macrophages with HMGB1 immunostaining. (D) Immunoelectronmicroscopy micrograph from a bronchial epithelial cell after one day of infection, there are several submembranal vesicles (V) with HMGB1 detected with antibodies labeled with colloidal gold (arrows). (E) An apoptotic macrophage from day seven of infection shows many black dots that correspond to HMGB1 detected with specific antibodies labelled with colloidal gold (arrows).

doi:10.1371/journal.pone.0133200.g002

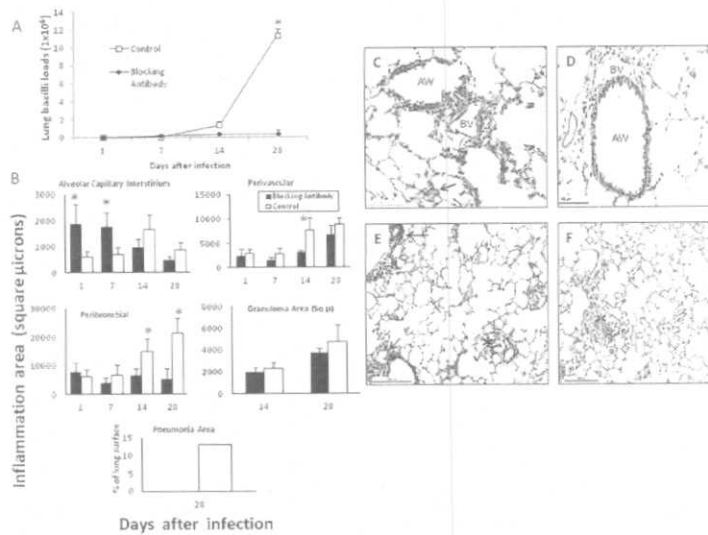
while treated mice did not show pneumonia, probably as a consequence of the high bacterial elimination produced by the HMGB1 blocking antibodies administration (Fig 3C–3F).

The determination of cytokines expression showed in animals treated with HMGB1 blocking antibodies lower expression of the pro-inflammatory cytokines IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-17 during the first week of infection, while at day 14 the expression of these proinflammatory cytokines increased and the transcription of IL-10 was significant lower than control mice. At day 28 similar cytokines expression was seen in both groups (Fig 4).

In comparison with control animals that received human albumin, mice that received HMGB1 by the intratracheal route showed a significant increase of bacilli burdens after one week of infection (Fig 5A). These treated animals also showed a decrease of inflammation in all lung compartments, being significant in the alveolar-capillary interstitium during the first week of infection (Fig 5B). Similar granuloma size was measured in both groups, but animals that received HMGB1 developed significant more pneumonia on day 28 of infection (Fig 5B and 5C). In comparison with the control group, mice treated with recombinant HMGB1 showed significant lower expression of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-17 in all time points and significant higher IL-10 expression at 14, 21 and 28 days of infection (Fig 6), with numerous immunostained cells with antibodies against foxP3 and IL-10 (Fig 5I and 5J).

### Effect of blocking HMGB1 or recombinant HMGB1 administration during late disease

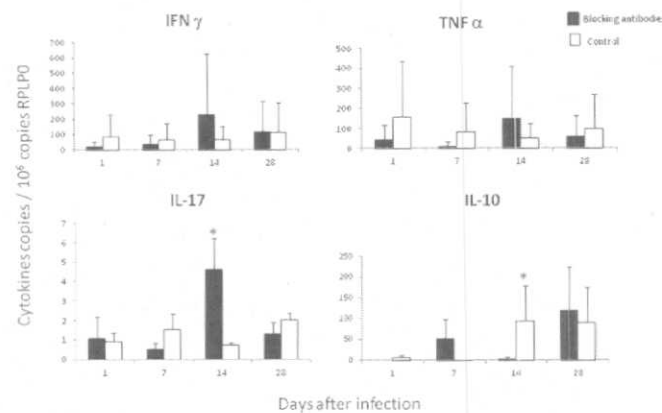
During late active disease, numerous macrophages showed HMGB1 immunostaining and mild concentrations in BALF of this protein in its reduced proinflammatory form were seen (Figs 1 and 2). In order to study the contribution of HMGB1 to the evolution of TB during late



**Fig 3. Effect of blocking HMGB1 during early infection on bacilli loads and inflammation.** (A) Groups of infected BALB/c mice with *M.tuberculosis* strain H37Rv were treated with blocking specific antibodies against HMGB1 administered each other day since the first day of infection and during three weeks (solid symbols); control animals received isotype irrelevant chicken antibodies (white symbols). (B) The lungs from three mice per each sacrifice day were used to determine the area in square microns occupied by inflammatory cells in the indicated lung compartment, in mice treated with HMGB1 blocking antibodies (black bars) and control group (white bars). Asterisks represent statistical significance ( $p < 0.05$  student T test). (C) Representative lung micrograph from a mouse treated with blocking HMGB1 antibodies after one week of infection, there are numerous lymphocytes around blood vessels (BV), airways (AW) and alveolar-capillary interstitium (arrow). (D) In contrast, control mouse show lower inflammation in the same lung compartments after 7 days of infection. (E) After one month of infection, the lung of mouse treated with blocking antibodies shows high inflammatory response around blood vessels (arrows) and in the interstitium (asterisk) but there is not pneumonia. (F) In comparison, the lung of control mouse show focal patches of pneumonia (asterisk). (All figures H/E staining, scale bar = 100 $\mu$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0133200.g003

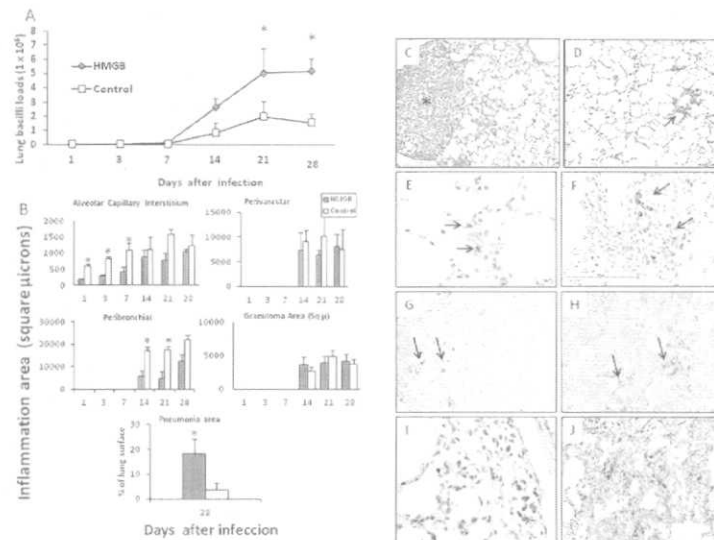
progressive phase, specific blocking antibodies were administered after two months of infection and during one month. In comparison with the control group, animals that received blocking



**Fig 4. Effect of blocking HMGB1 during early infection on cytokines expression.** Quantitative expression of mRNA for the indicated cytokines was determined by real-time PCR in lungs from mice treated with HMGB1 blocking antibodies (black bars) or control animals (white bars). Data are expressed as means and standard deviations for four different animals at each time point. Asterisks represent statistical significance ( $P < 0.05$  Student T test).

doi:10.1371/journal.pone.0133200.g004





**Fig 5. Effect of administrate recombinant HMGB1 during early infection on bacilli burdens and inflammation.** (A) Groups of infected BALB/c mice with *M.tuberculosis* strain H37Rv were treated with recombinant human HMGB1 administered each other day by intratracheal route since the first day of infection and during three weeks (solid symbols); control animals received human albumin (white symbols). (B) The lungs from three mice per each sacrifice day were used to determine the area in square microns occupied by inflammatory cells in the indicated lung compartment in mice that received by intratracheal route recombinant human HMGB1 (black bars) or human albumin (control group, white bars). Asterisks represent statistical significance ( $p < 0.05$  student T test). Representative micrographs of lungs from mice treated with recombinant HMGB1 or control animals: (C) After 28 days of infection, treated mouse with recombinant HMGB1 show areas of pneumonia (asterisk). (D) In contrast, control mouse at the same time of infection show perivascular inflammation (arrow), without pneumonic areas. (E) Occasional cells show foxP3 immunostaining around blood vessels (arrows) in control mice at 7 days of infection. (F) In comparison, more inflammation and foxP3 immunostained cells (arrows) are seen in mice treated with recombinant HMGB1 at 14 days of infection. (G) Control mouse show some foxP3 immunostained cells in the pneumonic areas after 60 days of infection (arrows). (H) The same areas show some IL-10 immunostained cells (arrows). (I) The lung of a mouse treated with recombinant HMGB1 during late infection show more foxP3 immunostained cells around blood vessel and in the pneumonia areas (J).

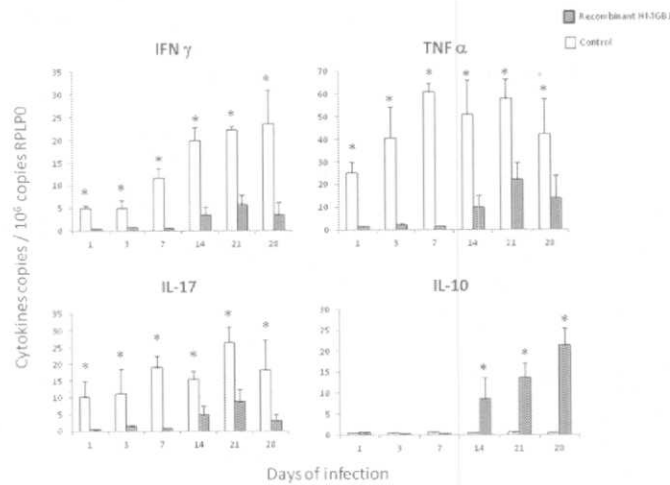
doi:10.1371/journal.pone.0133200.g005

HMGB1 antibodies after 60 days of infection showed a significant increase of pulmonary bacilli burdens (Fig 7A), lower expression of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL17, high expression of IL-10 (Fig 7C), and higher but not significant pneumonia (39+/3% vs 32+/3%).

In order to study the course of the infection during late TB with similar high concentrations of HMGB than those found during early infection, a high concentration of recombinant HMGB1 was administered after 60 days of infection by intratracheal route during one month. In comparison with control mice, animals that received recombinant HMGB1 showed fivefold higher bacilli loads (Fig 7B), the double of pneumonia and significant lower expression of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-17, while the expression of IL-10 was significantly higher (Fig 7D). Treated mice also showed numerous foxP3 and IL-10 immunostained cells than control animals (Fig 5I and 5J).

## Discussion

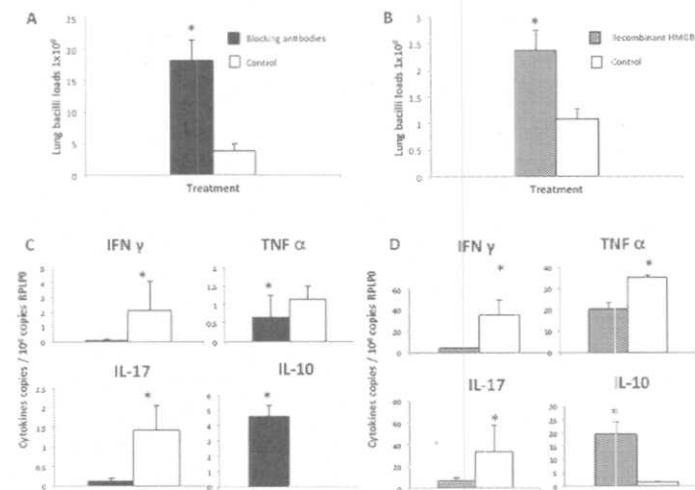
HMGB1 is highly conserved with >99% amino acid identity between murine and human molecules. HMGB1 is extensively modified posttranslationally [8, 22, 23]. Acetylation and phosphorylation induce HMGB1 translocation from the nucleus to the cytoplasm and increase its secretion by inflammatory cells [5]. HMGB1 is passively released from necrotic cells and is



**Fig 6. Effect of the intratracheal administration of recombinant HMGB1 during early infection on cytokines expression.** Quantitative expression of mRNA for the indicated cytokines was determined by real-time PCR in lungs from mice that received recombinant human HMGB1 (black bars) or control animals (white bars). Data are expressed as means and standard deviations for four different animals at each time point. Asterisks represent statistical significance (P 0.05 Student T test).

doi:10.1371/journal.pone.0133200.g006

actively secreted by stressed and inflammatory cells, binding with high affinity to several receptors, such as RAGE, TLR-2, TLR-4, TLR-9, and CD24 as a negative signaling molecule [24, 25]. In a previous study, was demonstrated that the infection *in-vitro* of macrophages and



**Fig 7. Effect of the administration of blocking antibodies against HMGB1 or recombinant human HMGB1 during late disease on pulmonary bacilli loads and cytokines expression.** (A) Bacilli burdens in lungs of mice after 60 days of infection treated during one month with HMGB1 blocking antibodies (black bars) or isotype chicken antibodies as a control (white bars). (B) Pulmonary bacilli loads of BALB/c mice after 60 days of infection with *M. tuberculosis* strain H37Rv treated during one month with recombinant human HMGB1 (grey bars) or human albumin as a control (white bars) (6 mice per group). (C) Quantitative expression of mRNA of cytokines determined by real-time PCR in lungs from mice after 60 days of infection and treated with HMGB1 blocking antibodies administered each other day during one month and control non-treated animals. (D) Cytokines transcription during late disease in mice treated with recombinant human HMGB1 or non-treated control animals. Asterisks represent statistical significance between control (white bars) and treated groups (grey bars) (p<0.05 student T test).

doi:10.1371/journal.pone.0133200.g007

monocytes with mycobacteria induced HMGB1 release, and some mycobacterial proteins such as 65kD HSP induced its maximum release. This study also reported HMGB1 released in lungs during infection with Mtb in guinea pigs, and concluded that HMGB1 may act as a signal of cellular injury that enhances immune response [26]. Our study confirms and extends these results by the demonstration that during progressive pulmonary TB in BALB/c mice, there is an active and high secretion of HMGB1 during early infection, followed by a mild and constant production during late disease, but our results suggest that this protein has different activity regulating the immune and inflammatory response depending of the infection phase.

Active secretion of HMGB1 has been demonstrated in many cell types, such as monocytes, macrophages, dendritic cells (DC), hepatocytes, endothelial cells, glial cells and neurons [3]. Our ELISA assay in BALF did not show HMGB-1 in non-infected mice, while a rapid and high secretion of HMGB1 raising its highest level after the first day of infection was seen followed by a sharply decrease on day three and increased again on day seven; but it was three fold lesser than day one and this mild concentration was maintained constantly until late disease. Thus, it seems that preformed HMGB1 is rapidly liberated particularly from the airways epithelium which showed the strongest HMGB1 immunostaining during early infection; also the immunoelectronmicroscopy study indicated active secretion, as suggested by the observation that some cytoplasmic vesicles with labeled HMGB1 were fused to the apical membrane liberating the protein to the extracellular space. Numerous activated and apoptotic macrophages showed HMGB1 immunostaining during early infection. Thus, elements of the innate immunity such as bronchial epithelium and macrophages are the most important source of HMGB1 during early TB infection, and airways epithelium should be added to the list of cells that can actively secrete this protein.

Particularly when HMGB1 is liberated from necrotic cells and after binding to RAGE and Toll-4 receptors, it induces maturation of dendritic cells (DC) and secretion of IL-12 and IFN $\gamma$  that polarizing toward a Th1 phenotype [27]. Interaction with TLR4 is required for HMGB1 activation of cytokine release from macrophages. Stimulation of neutrophils and monocytes with HMGB1 induces cytokine release and promotes migration into inflamed tissue [28], as well as endothelium activation [29]. All these activities could be related to an efficient Mtb elimination. Interestingly, HMGB1 is also released by apoptotic cells inducing immune tolerance [14, 30, 31]. During apoptosis, HMGB1 is oxidized on Cys106 in Box B, a process that requires caspase activity and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) [14]. This oxidized HMGB1 is unable to interact with RAGE and Toll-4 receptors, avoiding its pro-inflammatory activity [32]. Oxidized HMGB1 can also induce immune-modulation by the recruitment and activation of T regulatory cells [33].

The oxidation of HMGB1 in the cysteine residue 106 produced a shift in the protein emigration, which can be detected in gradient polyacrylamide gels and western-blotting [20]. We detected oxidized HMGB1 in BALF on days 7, 14 and 21 postinfection, when in this model there are numerous activated and apoptotic macrophages [34]. Thus, it seems that during early Mtb infection, there is an oxidative environment in the lung that favoring the production of the oxidized HMGB1 with immune-toleragenic activity. This was confirmed by the administration of specific blocking antibodies since the first day of infection. Blocking HMGB1 activity during the first week of infection induced lower expression of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  and IL-17, denoting certain HMGB1 pro-inflammatory activity, but on day 14, when the oxidized form of HMGB1 was produced and its activity was blocked, a significant decrease in pulmonary bacilli loads was seen in coexistence with higher expression of pro-inflammatory cytokines. As expected, the opposite response was observed when recombinant human HMGB1 was administered during early infection, inducing a significant increase of bacilli loads, in coexistence with low expression of proinflammatory cytokines and a striking high expression of IL-10 and numerous Treg

cells in the infected lungs, which confirm the efficiency of HMGB1 in the recruitment and activation of this cell type [35]. We observed numerous IL-10 immunostained macrophages, suggesting that high concentrations of HMGB1 could also stimulate the production of this anti-inflammatory cytokine by macrophages.

During late disease, on day 28 and 60 of infection, there are extensive areas of pneumonia, the bronchial epithelium in these zones showed an accentuated decrease of HMGB1 immunostaining and macrophages were the most common and intense immunoreactive cells. During advanced disease, there was mild concentration of HMGB1 in BALF and the oxidized form was not detected. The administration of blocking antibodies at day 60 of infection induced a significant increase of pulmonary bacilli burdens, in coexistence with lower expression of proinflammatory cytokines. These results suggest that the mild production of reduced HMGB1 during late disease has proinflammatory activity and contributes in the control of bacilli growth. Interestingly, the administration of recombinant HMGB1 in high concentrations, similar than found at day one of infection, induced significant higher bacilli loads, more extensive tissue damage, lower expression of proinflammatory cytokines with high expression of IL-10, in coexistence with numerous T regulatory cells, suggesting that not only the type of HMGB1, reduced or oxidized, but also the amount of the protein is important to regulate the immune response and its interaction with specific subtypes of T cells. Indeed, T regulatory cells express on their cell membrane more RAGE than T conventional cells, and HMGB1 induces the migration and prolonging survival of T-regulatory cells, as well as enhance IL-10 release [35]. In addition, HMGB1 can directly suppress IFN $\gamma$  release by effector T cells and inhibits its proliferation via TLR-4 in the setting of chronic inflammatory states [33, 35, 36], such as produced by Mtb infection.

In conclusion, HMGB1 is liberated during experimental TB and can modify the fate of the immune response, promoting or suppressing inflammation depending on redox state and its concentration. During early infection there is a highly oxidizing environment produced by numerous activated macrophages that actively produce ROS and NO [37], and apoptotic macrophages that liberate oxidized HMGB1, that temporally suppress excessive inflammation and decrease protective immunity. During late disease, the oxidative environment decreases as a consequence of lesser macrophage activation with lower ROS and NO production as well as lesser macrophage apoptosis [34, 37], HMGB1 is produced in lesser amount and it is not oxidized contributing to the control of bacilli growth. Thus, HMGB1 is a redox-sensitive protein that is affected by the oxidative environment which modulates its pathophysiological signals and contribution to the control of inflammation and immune response against mycobacterial infection.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RHP EIB. Performed the experiments: JBP DME BMC DHR EIB. Analyzed the data: RHP OAB EIB. Contributed reagents/materials/analysis tools: RHP OAB EIB. Wrote the paper: RHP EIB.

### References

1. Rook GAW, Hernández Pando R. (1996) The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Rev Microbiol* 50: 259–284.
2. Rubartelli A, Lotze MT. (2007) Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* 28: 429–36.
3. Pisetsky D. (2011) Cell death in the pathogenesis of immune-mediated diseases: The role of HMGB1 and DAMP-PAMP complexes. *Swiss Med Wkly* 141: w13256. doi: 10.4414/smw.2011.13256 PMID: 21877298

4. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. (2013) The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *Journal of Leukocyte Biology* 93: 865–873. doi: [10.1189/jlb.1212662](https://doi.org/10.1189/jlb.1212662) PMID: [23446148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23446148/)
5. Bonaldi T., Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. (2003) Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22: 5551–5560. PMID: [14532127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14532127/)
6. Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundbäck P, et al. (2012) Novel role of PKR in inflammatory activation and HMGB1 release. *Nature* 488: 670–674. doi: [10.1038/nature11290](https://doi.org/10.1038/nature11290) PMID: [22801494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22801494/)
7. Bustin M, Lehn DA, Landsman D. (1990) Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim.Biophys.Acta* 1049: 231–43. PMID: [2200521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2200521/)
8. Bustin M, Reeves R. (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acids Res MolBiol* 54: 35–100.
9. Andersson U., Tracey K. J. (2011) HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu.Rev. Immunol.* 29: 139–162. doi: [10.1146/annurev-immunol-030409-101323](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101323) PMID: [21219131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21219131/)
10. Stros M. (2010) HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim.Biophys.Acta* 1799:101–113. doi: [10.1016/j.bbagr.2009.09.008](https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.09.008) PMID: [20123072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20123072/)
11. Yang H., Tracey K. J. (2010) Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim.Biophys.Acta* 1799: 149–156. doi: [10.1016/j.bbagr.2009.11.019](https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.11.019) PMID: [19948257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19948257/)
12. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191–5. PMID: [12110890](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12110890/)
13. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285: 248–51. PMID: [10398600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10398600/)
14. Kazama H, Ricci JE, Herdon JM. (2008) Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* 29: 21–32. doi: [10.1016/j.immuni.2008.05.013](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.013) PMID: [18631454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18631454/)
15. Wu AH, He L, Long W, Zhou Q, Zhu S, Wang P, et al. (2014) Novel Mechanisms of Herbal Therapies for Inhibiting HMGB1 Secretion or Action. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015: 1–11.
16. Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, et al. (2012) Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *Journal of Experimental Medicine* 209: 1519–28. doi: [10.1084/jem.20120189](https://doi.org/10.1084/jem.20120189) PMID: [22869893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22869893/)
17. Yang H, Lundbäck P, Ottosson L, Erlandsson-Harris, Venereau E, Bianchi ME, et al. (2012) Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of High Mobility Group Box-1 (HMGB1). *Molecular Medicine* 18: 250–59. doi: [10.2119/molmed.2011.00389](https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00389) PMID: [22105604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22105604/)
18. Schiraldi M, Ruccia A, Muñoz LM, Livotti E, Celona B, Venereau E, et al. (2012) HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med* 209: 551–63.
19. Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. (1996) Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89: 26–33. PMID: [8911136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8911136/)
20. Hoppe G, Talcott KE, Bhattacharya SK, Crabb JW, Sears JE. (2006) Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp Cell Res* 312: 3526–3538. PMID: [16962095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16962095/)
21. Hernández-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V, et al. (1997) Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 90:607–17. PMID: [9176116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9176116/)
22. Ito I, Fukazawa J, Yoshida M. (2007) Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem* 282: 16336–44.
23. Youn JH, Shin JS. (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 177: 7889–97. PMID: [17114460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17114460/)
24. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, et al. (1995) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin: mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270: 25752.
25. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al (2004) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 279: 7370–77.

26. Grover A, Taylor J, Trout J, Keyser A, Sommersted K, Schenkel A, et al. (2008) Mycobacterial infection induces the secretion of high-mobility group box 1 protein. *Cellular Microbiology* 10: 1390–1404. doi: [10.1111/j.1462-5822.2008.01135.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01135.x) PMID: [18331466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18331466/)
27. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. (2004) High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 173:307–313. PMID: [15210788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15210788/)
28. Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, et al. (2007) A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J* 26: 1129–39. PMID: [17268551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17268551/)
29. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al (2003) Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 101:2652–60. PMID: [12456506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12456506/)
30. Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. (2006) The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1318–25. PMID: [16855214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16855214/)
31. Jiang W, Bell CW, Pisetsky DS. (2007) The relationship between apoptosis and high-mobility group protein 1 release from murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid. *J Immunol* 178: 6495–503. PMID: [17475879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17475879/)
32. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, et al. (2010) A critical cysteine is required for HMGB1 binding to TLR4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 11943–47.
33. Wild CA, Bergmann C, Fritz G, Schuler P, Hoffmann TK, Lotfi F, et al. (2012) HMGB1 conveys immunosuppressive characteristics on regulatory and conventional T cells. *Int Immunol* 24: 485–94.
34. Rios Barrera V, Campos Peña V, Aguilar Leon D, Lascrain LR, Meraz-Rios MA, Moreno J, et al. (2006) Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: Their relationship to mycobacterial virulence. *Eur J Immunol* 36:345–353. PMID: [16421947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16421947/)
35. Zhang L, Dong YY, Dong YQ, Yu N, Sheng Z. (2008) Relationship between high-mobility group box1 protein release and T-cell suppression in rats after thermal injury. *Shock* 30: 449–455. doi: [10.1097/SHK.0b013e3181672495](https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181672495) PMID: [18277947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18277947/)
36. Li G, Liang X, Lotze MT. (2013) HMGB1: the central cytokine for all lymphoid cells. *Frontiers in Immunology* 4: 68. doi: [10.3389/fimmu.2013.00068](https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00068) PMID: [23519706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23519706/)
37. Hernández-Pando R, Schön T, Orozco EH, Serafin M, Estrada GI. (2001) Expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* 53: 257–265. PMID: [11665849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11665849/)

## **Estudio de la proteína high mobility group B (HMGB) desde las dos vertientes de la interrelación patógeno hospedero.**

### **Descripción de la propuesta**

El sistema inmune innato detecta los "sensores microbianos" llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [1], quienes son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), lo cual facilita la identificación del microorganismo e induce la respuesta inmune [2]. Además de los PAMPs, también existen los patrones moleculares asociados al daño (DAMP), los cuales son factores endógenos normalmente presentes dentro de las células que en situaciones de estrés celular o daño se liberan al espacio extracelular y activan eventos inflamatorios [3]. La necrosis se da habitualmente en circunstancias de lesión extrema cuando la apoptosis no se puede llevar a cabo y una consecuencia importante es la ruptura de la membrana plasmática y el escape del material intracelular. Los DAMPs prototípicos incluyen proteínas del estrés térmico [4] y una proteína asociada a la cromatina llamada HMGB1 por su nombre en inglés "High Mobility Group B" [5]. Muchos DAMPs parecen interactuar con varios receptores celulares (TLR2, TLR4, TLR9) [6], lo cual induce una variada gama de efectos. Además de los receptores Toll, los DAMPs son reconocidos por receptores específicos, el más destacado es el receptor para productos finales de glicosilación (RAGE). Es un receptor transmembrana expresado por diversos tipos de células [7-9] que detectan productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) surgidos de la glicosilación no enzimática y la oxidación de proteínas y lípidos. Estos productos se acumulan en situaciones de gran estrés oxidativo y en la inflamación intensa. Las proteínas HMGB revisten gran interés debido a su participación en importantes procesos tanto dentro del núcleo como en el medio extracelular, ya que al ser liberada actúa como proteína pro-inflamatoria. Existen pocos estudios sobre la contribución de la HMGB en la inflamación y daño tisular producido por parásitos o bacterias intracelulares. *Trypanozoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, es una parasitosis de gran importancia en Latinoamérica. Es de interés que en los tripanosomas existan homólogos de la HMGB [10-11], el grupo del Dr. Serra y la Dra. Cribb del Instituto de Biología de Rosario, en la UNR han purificado la HMGB de *T. cruzi* (*TcHMGB*) la cual presenta, al igual que las HMGBs de mamíferos, dos dominios HMG box con capacidad de unirse al ADN, pero carece del extremo ácido típico de estas proteínas y presenta en cambio un dominio amino terminal que parece ser único en tripanosomas, de gran interés por su potencialidad como posible blanco terapéutico o diagnóstico [12], a juzgar por experimentos preliminares donde hemos visto que esta proteína se expresa y probablemente se secreta en los tejidos del hospedero.

Otra enfermedad infecciosa de gran importancia es la Tuberculosis. Estudios *in vitro* han demostrado que el bacilo tuberculoso induce la secreción de HMGB por macrófagos por la activación de receptores TLR2 y ésta induce la producción de citocinas pro-inflamatorias [13]. En el mismo estudio se encontró que cobayos infectados con *M. tuberculosis* producen mayor cantidad de HMGB-1, aunque su contribución *in vivo* en la inflamación y respuesta inmunológica no fue estudiada. Resultados preliminares en el modelo experimental de Tuberculosis, del laboratorio del Dr. Hernández Pando, muestran una alta producción de HMGB durante la fase inicial de la infección, primordialmente por parte de las células epiteliales y macrófagos y

liberación por secreción activa. En el presente proyecto se propone profundizar en el estudio de la estructura bioquímica de la HMGB de *T cruzi* y el tipo de respuesta inmunológica que induce, así como la contribución de la HMGB de mamífero en la inmunopatología y control del crecimiento bacilar en la Tuberculosis experimental.

**Objetivo general:**

Estudiar las características bioquímicas e inmunológicas de la proteína HMGB de *Trypanosoma cruzi* y evaluar la contribución de la HMGB de mamífero en la inducción de la inflamación, respuesta inmunológica y control del crecimiento bacteriano en la tuberculosis experimental.

**Objetivos específicos:**

- 1.- Producir de forma recombinante los diferentes dominios de la *TcHMGB*, analizar si la localización subcelular y secreción de estas es afectada por la acetilación.
- 2.- Evaluar la capacidad inmunogénica de la HMGB de *T cruzi* en células en cultivo y en ratones al administrarla por vía intraperitoneal determinando en sangre y bazo subpoblaciones de células T, linfocitos B y macrófagos así como su capacidad de inducir citocinas proinflamatorias TNF, IL-1, IL-6 e IL-12 y anti-inflamatorias IL-10 y TGF.
- 3.- Profundizar el estudio de las características bioquímicas de la HMGB de *T cruzi*, focalizando la atención sobre las posibles funciones del dominio único de las HMGBs de trpanosomas.
- 4.- Profundizar el estudio de las características bioquímicas de la HMGB de *T cruzi*, focalizando la atención sobre las posibles funciones del dominio único de las HMGBs de trpanosomas.
- 5.- Bloquear con anticuerpos específicos administrados por vía intratraqueal la actividad de la HMGB producida durante la infección temprana con *M. tuberculosis* en ratones BALB/c.
- 6.- Cuantificar por morfometría automatizada la inflamación del intersticio alveolo-capilar, perivascular, peribronquial, tamaño de granulomas y porcentaje de área afectado por neumonía en los ratones a los que se les bloqueo la actividad de la HMGB y compararlo con animales control.
- 7.- Determinar por la cuantificación de unidades formadoras de colonia la cantidad de bacterias vivas en los pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis* a los que se les bloqueo la actividad de la HMGB y compararlo con animales control.
- 8.- Estudiar la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IFN y las anti-inflamatorias IL-4, IL-10, TGF en los pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis* en los que se bloquee la actividad de la proteína HMGB y compararlo con animales control infectados pero no tratados con el anticuerpo bloqueador.
- 9.- Estudiar por inmunohistoquímica la expresión cinética del receptor RAGE durante el curso de la tuberculosis pulmonar progresiva y analizar por inmunoelectromicroscopía su posible actividad receptora para *M. tuberculosis*.
- 10.- Estudiar in vitro la capacidad de la HMGB de inducir la producción de radicales libres de oxígeno y las citocinas TNF, IL-1, IL-12 y TGF en macrófagos y neumocitos tipo II incubados con la proteína sola o en coexistencia con *M. tuberculosis*.



" 01/2014 J "

**Resultados esperados:**

En relación con la tripanosomiasis, se espera que la proteína HMGB del parásito se secrete activamente, presumiblemente luego de su acetilación tal como se ha descrito en otros organismos, y que tenga un efecto modulador de la respuesta inmunológica.

Con respecto a la tuberculosis, debido a que la HMGB de mamífero tiene la capacidad de inducir inflamación de forma similar al de citocinas como el TNF, se espera que contribuya en la inflamación inicial y formación de granulomas en los pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis* y que al bloquearla la inflamación disminuya y la capacidad de eliminar a la bacteria también decremente. Es posible, por lo tanto, que la administración exógena de HMGB pueda inducir la reactivación de la respuesta inmune protectora durante la fase avanzada de la enfermedad, cuando la producción de citocinas proinflamatorias disminuye y la carga bacilar y daño tisular aumenta.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

# ACUSE

2017 "Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

CDMX 30 de marzo del 2017.

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO  
Depto. Patología Experimental  
Presente

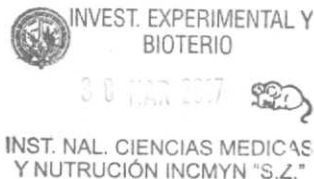
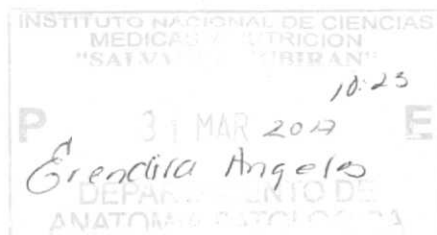
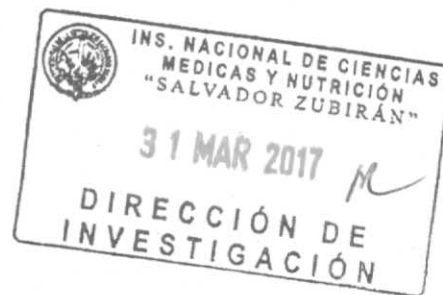
Estimada Dr. Hernández:

Por este medio solicito a usted el informe final del protocolo "ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP B (HMGB) DESDE LAS DOS VERTIENTES DE LA INTERRELACIÓN PATÓGENO HOSPEDERO", con registro CINVA: PAT-1021-13/15-1, concluido el pasado 28 de febrero del 2017.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la CINVA



C.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala.- Director de Investigación y Presidente de la CINVA  
MVZ Mariela Contreras Escamilla.- Jefa del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx



"2017, AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 28 de febrero de 2017.

Dra. Norma Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la CINVA  
Presente

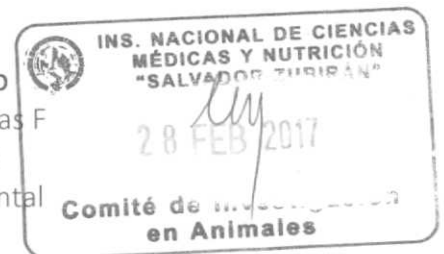
Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "Estudio de la proteína high mobility group B (HMGB) desde las dos vertientes de la interrelación patógeno hospedero", con No. de Registro Clave: PAT-1021-13/ 15-1, CINVA 1021 debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Rogelio Hernández Pando  
Investigador en Ciencias Médicas F  
Departamento de Patología  
Sección de Patología Experimental



Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

C.c.p: Dr. Gerardo Gamba Ayala – Director de Investigación  
Dra. Ma. Elena Flores Carrasco – Encargada del Depto. de Invest. Exp. Y Bioterio



Instituto Nacional de Ciencias  
Médicas y Nutrición  
**Salvador Zubirán**

(2448)  
INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE  
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 08/07/2013

CLAVE: PAT-1021-13/15-1

TÍTULO: Estudio de la proteína high mobility group B (HMGB) desde las dos vertientes de la interrelación patógeno hospederero.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: HERNANDEZ PANDO ROGELIO

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
CONACYT	\$ 140,000.00

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 15/07/2013 al 28/08/2015

	Trimestre 1	Trimestre 2	Trimestre 3	Trimestre 4
Primer año	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 140,000.00	\$ 0.00

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 0.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)			
Materiales	\$ 0.00	FIRMAS	
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)			
Animales	\$ 0.00	Investigador responsable	Jefe de Departamento
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)			
Estudios	\$ 0.00	Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viáticos	\$ 140,000.00	Director de Investigación	Director General
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00	Fecha de resolución	
		25-SEP-2013	

01/2014 P  
CFEI

"010/2014 f"

costo directos de publicación, sobregiro)		
Suscripciones	\$ 0.00	
libros, revistas, software, periódicos, etc)		
Varios	\$ 0.00	
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)		
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00	
Fondo de apoyo		\$0.00
15% de la cantidad total del proyecto		
Total :	\$ 140,000.00	



Sistema Integral



Instituto Nacional de Ciencias  
Médicas y Nutrición  
Salvador Zubirán

Folio del registro: PAT-1021-13/15-1

Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

#### Formato Único de Registro

##### (0) Comentarios

---

**Título del proyecto:** Estudio de la proteína high mobility group B (HMGB) desde las dos vertientes de la interrelación patógeno hospedero.

**Tipo de proyecto:** Investigación Experimental

**Antecedentes:** Con el propósito de controlar la infección por un agente patógeno, el sistema inmune detecta estructuras moleculares conservadas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), producidos exclusivamente por los microorganismos (1). Los PAMPs, son "sensores microbianos" o "alertas" para el hospedador y son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (RRPs). Algunos de estos RRP son los receptores de tipo Toll (Toll-like receptors) 2 y 4 (TLR2 y TLR4) que se encuentran en la superficie de las células del sistema inmune innato. En contraste, otros RRP, como el TLR7, se hallan dentro de las células. El reconocimiento de los PAMPs por los RRP facilita la toma del patógeno por las células del hospedador o la señalización requerida para inducir una respuesta inmune apropiada (2). Como contraparte de los PAMPs también existen patrones moleculares asociados al daño (DAMP), los cuales son factores endógenos normalmente presentes dentro de las células y por ende no reconocidos por el sistema inmune en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en situaciones de estrés celular o daño, estas moléculas pueden ser liberadas al espacio extracelular y activan eventos inflamatorios. Así los DAMPs pueden ser interpretados como señales de daño potencial al hospedero (3). La necrosis celular se da habitualmente en circunstancias de daño extremo (por ejemplo isquemia o traumatismo) cuando la apoptosis no puede llevarse a cabo. Una consecuencia importante de la muerte por necrosis es la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, y con ello el escape del material intracelular. Los DAMPs prototípicos que derivan de las células necróticas incluyen proteínas del estrés calórico (4) y una proteína asociada a la cromatina llamada HMGB1 (por su nombre en inglés "High Mobility Group B 1") (5), entre los más conocidos. Muchos DAMPs, en particular los mencionados, parecen interactuar con varios receptores celulares (TLR2, TLR4, TLR9, y RAGE) (6), lo cual da pie para pensar en una variada gama de efectos sobre el hospedero en función de la noxa que desencadena el proceso en cuestión. Además de los receptores tipo Toll, los DAMPs son reconocidos por receptores específicos. El más saliente de todos ellos es el receptor RAGE, el cual reconoce productos finales de glicosilación avanzada (AGEs). Estos AGEs, se acumulan en situaciones de gran estrés oxidativo y en enfermedades con un marcado componente inflamatorio como consecuencia de la glicosilación no enzimática y la oxidación de proteínas y lípidos. RAGE es un receptor transmembrana expresado por células inmunes, endoteliales, cardiomiocitos y neuronas (7-9). Las proteínas HMGB han ganado gran interés debido a su participación en importantes procesos, tanto dentro del núcleo, por sus efectos sobre la estructura de la cromatina, como en el medio extracelular debido a su capacidad de actuar como proteína pro-inflamatoria. Existen pocos estudios relacionados con la contribución en la inflamación y daño tisular producido por estas proteínas en infecciones por parásitos o bacterias intracelulares. Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, una parasitosis de gran importancia en nuestra región pues existen en Latinoamérica más de 20 millones de personas infectadas. Es de interés que existan homólogos de la proteína HMGB en parásitos. En el caso de los tripanosomas esto fue propuesto hace más de una década (10, 11), y recientemente esto se demostró por primera vez por el grupo de los Dres Serra y Cribb del Instituto de Biología Molecular y Celular de la

Universidad de Rosario Argentina. El ortólogo de la proteína HMGB de tripanosomas (TcHMGB) presenta, al igual que las HMGBs de mamíferos, dos dominios HMG box con capacidad de unirse a estructuras distorsionadas del ADN. Sin embargo, carece del extremo ácido típico de estas proteínas y presenta en cambio, un dominio amino terminal que parece ser único de las HMGBs de tripanosomas, el cual resulta particularmente interesante por su potencialidad como posible blanco terapéutico (12). Con anticuerpos policlonales específicos para TcHMGB hemos observado por inmunofluorescencia que la proteína se concentra en el núcleo en los tres estadios del ciclo de vida del parásito en cultivos in vitro, consistente con sus funciones como componente de la cromatina. Por otra parte, mediante inmunohistoquímica en tejido muscular estriado de un modelo murino de tripanosomiasis, se verificó que el parásito allí localizado produce TcHMGB y por inmunoelectromicroscopia se verificó que esta proteína se encuentra localizada en vacuolas, lo cual sugiere actividad secretoria. Hasta el momento, no se ha estudiado cual es la capacidad que tiene esta proteína de inducir inflamación y que tipo de respuesta inmune produce. Otra enfermedad infecciosa de gran importancia clínica y epidemiológica es la tuberculosis, enfermedad esencialmente pulmonar producida por *Mycobacterium tuberculosis* una bacteria intracelular facultativa. Estudios in vitro han demostrado que *Mycobacterium tuberculosis* entero o subcomponentes, particularmente la proteína de choque térmico de 65kD, son capaces de inducir la secreción de HMGB-1 en macrófagos o monocitos, aparentemente como consecuencia de la activación de receptores Toll-2, y que esta HMGB-1 secretada es capaz de inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF e IL-1 (13). En el mismo estudio, se encontró que cobayos infectados por aerosol con *M. tuberculosis* también producían mayor cantidad de HMGB-1, aunque la contribución de esta proteína in vivo no fue estudiada, argumentando que no se pueden obtener animales knock-out de HMGB-1 debido a que esta proteína es esencial durante el desarrollo embrionario. Como parte del trabajo de Tesis Doctoral de la Lic. Estela Bini de la Universidad de Rosario en el laboratorio del Dr. Hernandez Pando se estudió, en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva la cinética de expresión de HMGB-1 por RT-PCR y su concentración en lavados bronquiales por ELISA. Se observó una activa e importante producción de esta proteína durante la fase inicial de la infección, particularmente durante la primera semana. Mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra HMGB-1, se vio que las células epiteliales y los macrófagos son las principales células productoras y por inmunoelectromicroscopia se detectó que la proteína estaba principalmente localizada en vesículas citoplasmáticas, lo cual sugiere una secreción activa más que liberación pasiva por necrosis. El laboratorio de parasitología molecular en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario en Argentina dirigido por el Dr. Esteban Serra, del cual forma parte la Dra. Cribb, tiene una vasta experiencia en técnicas de biología molecular, y en la expresión y purificación de proteínas recombinantes, en donde se puede producir la proteína HMGB para estudiar más sobre su actividad biológica en la regulación genética del parásito y su contribución en la inflamación. Por su parte, el laboratorio del Dr. Hernandez Pando en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición en México tiene una larga experiencia en modelos experimentales en general y en particular de tuberculosis pulmonar, en donde se podrá continuar el estudio de la contribución de la proteína HMGB en tuberculosis y el papel de la TcHMGB en la activación de la respuesta inmunológica in vivo. Son por lo tanto dos laboratorios con experiencia y actividades diferentes pero altamente complementarias para estudiar la contribución de esta proteína en la biología y respuesta inmunológica de dos enfermedades infecciosas importantes.

#### **Definición del problema:**

El sistema inmune innato detecta los "sensores microbianos" llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [1], quienes son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), lo cual facilita la identificación del microorganismo e induce la respuesta inmune [2]. Además de los PAMPs, también existen los patrones moleculares asociados al daño (DAMP), los cuales son factores endógenos normalmente presentes dentro de las células que en situaciones de estrés celular o daño se liberan al espacio extracelular y activan eventos inflamatorios [3]. La necrosis se da habitualmente en circunstancias de lesión extrema cuando la apoptosis no se puede llevar a cabo y una consecuencia importante es la ruptura de la membrana plasmática y el escape del material intracelular. Los DAMPs prototípicos incluyen proteínas del estrés térmico [4] y una proteína asociada a la cromatina llamada HMGB1 por su nombre en inglés "High Mobility Group B" [5]. Muchos DAMPs parecen interactuar con varios receptores celulares (TLR2, TLR4, TLR9) [6], lo cual induce una variada gama de efectos. Además de los receptores Toll, los DAMPs son reconocidos por receptores específicos, el más destacado es el receptor para productos finales de glicosilación (RAGE). Es un receptor transmembrana expresado por diversos tipos de células [7-9] que detectan productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) surgidos de la glicosilación no enzimática y la oxidación de proteínas y lípidos. Estos productos se acumulan en situaciones de gran estrés oxidativo y en la inflamación intensa. Las proteínas HMGB revisten gran interés debido a su participación en importantes procesos tanto dentro del núcleo como en el medio extracelular, ya que al ser liberada actúa como proteína pro-inflamatoria. Existen pocos estudios sobre la contribución de la HMGB en la inflamación y daño tisular producido por parásitos o bacterias intracelulares. *Tripanozoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, es una parasitosis de gran importancia en Latinoamérica. Es de interés que en los tripanosomas existan homólogos de la HMGB [10-11], el grupo del Dr. Serra y la Dra. Cribb del Instituto de Biología de Rosario, en la UNR han purificado la HMGB de *T. cruzi* (TcHMGB) la cual presenta, al igual que las HMGBs de mamíferos, dos dominios HMG box con capacidad de unirse al ADN, pero carece del extremo ácido típico de estas proteínas y presenta en cambio un dominio amino terminal que parece ser único en tripanosomas, de gran interés por su potencialidad como

posible blanco terapéutico o diagnóstico [12], a juzgar por experimentos preliminares donde hemos visto que esta proteína se expresa y probablemente se secreta en los tejidos del hospedero. Otra enfermedad infecciosa de gran importancia es la Tuberculosis. Estudios in vitro han demostrado que el bacilo tuberculoso induce la secreción de HMGB por macrófagos por la activación de receptores TLR2 y ésta induce la producción de citocinas pro-inflamatorias [13]. En el mismo estudio se encontró que cobayos infectados con *M. tuberculosis* producen mayor cantidad de HMGB-1, aunque su contribución in vivo en la inflamación y respuesta inmunológica no fue estudiada. Resultados preliminares en el modelo experimental de Tuberculosis, del laboratorio del Dr. Hernández Pando, muestran una alta producción de HMGB durante la fase inicial de la infección, primordialmente por parte de las células epiteliales y macrófagos y liberación por secreción activa. En el presente proyecto se propone profundizar en el estudio de la estructura bioquímica de la HMGB de *T. cruzi* y el tipo de respuesta inmunológica que induce, así como la contribución de la HMGB de mamífero en la inmunopatología y control del crecimiento bacilar en la Tuberculosis experimental.

**Justificación:**

Las enfermedades infecciosas parasitarias y bacterianas son una importante causa de mortalidad y morbilidad en los países en vías de desarrollo como los latinoamericanos. Su control depende en gran parte de un conocimiento profundo de la biología de los agentes infecciosos y del tipo de respuesta inmunológica que participa en su control y eliminación. El análisis de proteínas relacionadas con la regulación de la expresión genética en parásitos como *T. cruzi* tiene gran importancia porque pueden ser blancos de nuevos agentes terapéuticos, además de que como es el caso de la TcHMGB pueden ser proteínas con un cierto grado de exclusividad y su detección en suero de pacientes pueden contribuir en el diagnóstico o como marcadores de la enfermedad, lo cual justifica plenamente su estudio. Por su parte, la producción y liberación de HMGB por el hospedero como consecuencia de la infección por *M. tuberculosis*, es de interés en la caracterización de la respuesta inflamatoria e inmunológica mediada por moléculas hasta ahora no consideradas de primera instancia como elementos de la respuesta inmunológica. El conocimiento en detalle de estos nuevos actores moleculares contribuirá a un mejor entendimiento de elementos que eventualmente pueden también ser utilizados como agentes inmunoterapéuticos o marcadores de enfermedad, lo cual justifica su estudio en modelos experimentales para posteriormente trasladar ese conocimiento a la enfermedad humana.

**Hipótesis:**

En relación con la tripanosomiasis, se espera que la proteína HMGB del parásito se secreta activamente, presumiblemente luego de su acetilación tal como se ha descrito en otros organismos, y que tenga un efecto modulador de la respuesta inmunológica. Con respecto a la tuberculosis, debido a que la HMGB de mamífero tiene la capacidad de inducir inflamación de forma similar al de citocinas como el TNF, se espera que contribuya en la inflamación inicial y formación de granulomas en los pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis* y que al bloquearla la inflamación disminuya y la capacidad de eliminar a la bacteria también decremente. Es posible, por lo tanto, que la administración exógena de HMGB pueda inducir la reactivación de la respuesta inmune protectora durante la fase avanzada de la enfermedad, cuando la producción de citocinas proinflamatorias disminuye y la carga bacilar y daño tisular aumenta.

Fecha estimada de inicio: 15/07/2013

Fecha estimada de término: 28/08/2015

Comisión a la que somete

¿Incluye documentos anexos?: Si

---

**Investigadores participantes**

**(0) Comentarios**

---

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Hernandez Pando, Rogelio	Investigador responsable	1	Si
Barrios Payan, Jorge Alberto	Investigador asociado	2	No
Mata Espinosa, Dulce Adriana	Investigador asociado	3	No



Marquina Castillo, Brenda Noemi	Investigador asociado	4	No
BINI, ESTELA ISABEL	Investigador invitado	5	No

### Población vulnerable

#### (0) Comentarios

Población vulnerable vinculado al protocolo

Otra población::

NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

### Objetivos

#### (0) Comentarios

Objetivo:

Estudiar las características bioquímicas e inmunológicas de la proteína HMGB de Trypanosoma cruzi y evaluar la contribución de la HMGB de mamífero en la inducción de la inflamación, respuesta inmunológica y control del crecimiento bacteriano en la tuberculosis experimental.

Tipo de objetivo:

General

Objetivo:

1.- Producir de forma recombinante los diferentes dominios de la TcHMGB, analizar si la localización subcelular y secreción de estas es afectada por la acetilación. 2.- Evaluar la capacidad inmunogénica de la HMGB de T cruzi en células en cultivo y en ratones al administrarla por vía intraperitoneal determinando en sangre y bazo subpoblaciones de células T, linfocitos B y macrófagos así como su capacidad de inducir citocinas proinflamatorias TNF, IL-1, IL-6 e IL-12 y anti-inflamatorias IL-10 y TGF. 3.- Profundizar el estudio de las características bioquímicas de la HMGB de T cruzi, focalizando la atención sobre las posibles funciones del dominio único de las HMGBs de trpanosomas 4.- Profundizar el estudio de las características bioquímicas de la HMGB de T cruzi, focalizando la atención sobre las posibles funciones del dominio único de las HMGBs de trpanosomas. 5.- Bloquear con anticuerpos específicos administrados por vía intratraqueal la actividad de la HMGB producida durante la infección temprana con M. tuberculosis en ratones BALB/c. 6.- Cuantificar por morfometría automatizada la inflamación del intersticio alveolo-capilar, perivascular, peribronquial, tamaño de granulomas y porcentaje de área afectado por neumonía en los ratones a los que se les bloqueo la actividad de la HMGB y compararlo con animales control. 7.- Determinar por la cuantificación de unidades formadoras de colonia la cantidad de bacterias vivas en los pulmones de ratones infectados con M. tuberculosis a los que se les bloqueo la actividad de la HMGB y compararlo con animales control. 8.- Estudiar la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IFN y las anti-inflamatorias IL-4, IL-10, TGF en los pulmones de ratones infectados con M. tuberculosis en los que se bloquee la actividad de la proteína HMGB y compararlo con animales control infectados pero no tratados con el anticuerpo bloqueador. 9.- Estudiar por inmunohistoquímica la expresión cinética del receptor RAGE durante el curso de la tuberculosis pulmonar progresiva y analizar por inmunoelectromicroscopia su posible actividad receptora para M. tuberculosis. 10.- Estudiar in vitro la capacidad de la HMGB de inducir la producción de radicales libres de oxígeno y las citocinas TNF, IL-1, IL-12 y TGF en macrófagos y neumocitos tipo II incubados con la proteína sola o en coexistencia con M. tuberculosis.

Tipo de objetivo:

Específico (s)

---

## Metodología: Diseño general

### (0) Comentarios

---

#### Metodología gral:

1.- En Tripanosomiasis: Síntesis y purificación de proteínas recombinantes Debido a que no están disponibles comercialmente, las proteínas específicas del parásito requieren de su purificación a partir de cultivos axénicos. Alternativamente, es posible obtenerlas recombinantes con buenos rendimientos y puresas. Con el objetivo de estudiar la función del dominio específico de la TcHMGB, se obtendrán versiones truncadas correspondientes a los distintos dominios de la proteína, expresadas como proteínas recombinantes en *E. coli* y purificadas mediante cromatografía de afinidad. También se construirán vectores que permitan expresar los mismos dominios en epimastigotes de *T. cruzi*, para poder realizar estudios *in vivo*. Por último, se construirá un vector que permita expresar en epimastigotes de *T. cruzi*, proteínas con un fragmento adicional de poliHistidina para purificarlas por cromatografía de afinidad a Níquel, de esta forma las proteínas estarán sometidas a las mismas modificaciones post-traduccionales que las proteínas endógenas del parásito, además se evitará la posible contaminación con LPS que es un inconveniente para los estudios inmunológicos. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar y clonar las secuencias para: 1) el extremo amino terminal (aminoácidos 1-110 "N-term"), 2) el primer dominio HMG box (aminoácidos 110-190, Box1), 2) el segundo dominio HMG box (aminoácidos 190-270 Box2), 3) los dos dominios HMGBbox (aminoácidos 110-270 C-term). Se obtendrán epimastigotes de *T. cruzi* transfectantes que expresen las proteínas como fusión a distintas proteínas fluorescentes usando diversos vectores. En caso de no obtenerse parásitos transfectantes con estos vectores, se utilizará el vector inducible por tetraciclina pTeINDEX (14).2.-Análisis de las posibles funciones del dominio adicional que presentan las HMGBs de tripanosomas Después de confirmar que la proteína TcHMGB y sus versiones truncadas se expresan correctamente como fusiones a las proteínas fluorescentes por western blot, se analizará mediante microscopía de fluorescencia la localización subcelular de cada uno de sus dominios. El análisis bioinformático predice la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) en el dominio amino terminal que es único de tripanosomas, nuestros resultados preliminares sugieren que la eliminación de este dominio dirige la proteína al citoplasma, resultados que necesitamos corroborar.3.- Estudio de la acetilación de la HMGB de *T. cruzi* y su posible influencia sobre su localización subcelular y secreción. Una de nuestras hipótesis es que la acetilación de TcHMGB, ya sea en las lisinas correspondientes a la NLS o en otras, esta implicada en la relocalización núcleo-citoplasma y su eventual secreción al medio extracelular. Para verificar esto se tratará a los cultivos con inhibidores de desacetilasas (Trichostatina A y Nicotinamida) y se analizará si existen diferencias en cuanto a la localización subcelular de cada una de las versiones truncadas de TcHMGB, comparado con cultivos control sin tratar. También se estudiará la secreción de las proteínas, puesto que además de localizarse en vacuolas, resultados preliminares mostraron un aumento en la cantidad de TcHMGB en el sobrenadante de cultivos tratados con inhibidores de desacetilasas. Para corroborar esto se realizarán estudios con inhibidores de acetilasas utilizando las cepas transfectantes que sobre-expresen las proteínas como fusiones a proteínas fluorescentes (15).4.- Estudio de la capacidad inmunogénica de la HMGB de *T. cruzi* Inicialmente se realizará estimulación *in vitro* de macrófagos con TcHMGB recombinante en diferentes concentraciones (0, 5, 10, 30, 100 y 300 µg/ml) y por diferentes periodos de tiempo (0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 horas). Posteriormente se colectarán células y sobrenadantes para determinar por RT-PCR y ELISA respectivamente las citocinas proinflamatorias TNF, IL-1, IL-6 e IL-12 y anti-inflamatorias IL-10 y TGF. Ensayos similares se realizarán administrando la proteína HMGB de *T. cruzi* completa y sus subdominios en el peritoneo de ratones Balb/c y C57Bl que son sensibles y resistentes respectivamente a la infección con *T. cruzi*; y en diferentes tiempos se obtendrá el líquido peritoneal, suero y bazo para determinar la concentración de las citocinas mencionadas anteriormente, además de evaluar por citometría de flujo en sangre y bazo las subpoblaciones de células T, linfocitos B y macrófagos determinando en estos moléculas de activación. 5.- En tuberculosis: Evaluación de la contribución de la proteína HMGB en la inflamación, respuesta inmunológica y proliferación bacteriana en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar: Ratones Balb/c machos de 8 semanas se infectaran con una dosis alta de la cepa de referencia H37Rv por vía intratraqueal (16). Como se mencionó en los antecedentes en este modelo existe una elevada producción de HMGB durante la primera y segunda semana de la infección. Con el objetivo de evaluar su contribución en el proceso inflamatorio, respuesta inmunológica y control del crecimiento bacilar, a grupos de ratones se les administrará anticuerpo bloqueador anti-

HMGB por vía intratraqueal, desde el primer día de infección y durante 18 días tres veces por semana. Grupos de seis animales se sacrificarán los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 postinfección. Para determinar la cantidad de bacterias vivas, cuatro pulmones, derecho o izquierdo, del mismo número de animales se congelarán en nitrógeno líquido para posteriormente homogeneizarlos y sembrarlos en cajas de cultivo con medio de crecimiento sólido, las unidades formadoras de colonia se contarán en el día 21. Otros cuatro pulmones del mismo número de animales por tiempo de sacrificio se perfundirán con alcohol etílico absoluto e incluirán en parafina para obtener cortes histológicos en los cuales se determinará por morfometría automatizada la inflamación intersticial, perivascular y peribronquial, así como la extensión de daño tisular (neumonía) y tamaño de granulomas. Finalmente, para evaluar la respuesta inmunológica se determinará la expresión de citocinas por RT-PCR en tiempo real. Cuatro pulmones en cada tiempo de sacrificio se homogeneizarán y de ellos se purificará el RNA total. Después de convertirlo en cDNA, se cuantificará la expresión de las citocinas IFN, TNF, IL-4, IL-10 y la enzima iNOS. Para confirmar los resultados del bloqueo con anticuerpos anti-HMGB y evaluar la posible capacidad de esta proteína de tener actividad inmunoterapéutica, se administrará HMGB recombinante murina por vía intratraqueal cada tercer día durante 18 días empezando a partir del primer día de la infección. Los animales se sacrificarán y los pulmones se procesarán de la misma manera descrita en el párrafo anterior.

6.- Evaluación de la participación del receptor RAGE en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental: Como fue mencionado en la sección de antecedentes, la proteína HMGB tiene a RAGE como uno de sus principales receptores. Es de interés notar que este receptor se expresa en forma constitutiva y abundantemente en el epitelio alveolar. Existen además algunas observaciones en pacientes que sugieren que RAGE podría ser también receptor para la micobacteria. Con el objetivo de estudiar estos aspectos, se determinará la expresión y localización de RAGE durante el curso de la tuberculosis murina, por RT-PCR e inmunohistoquímica. Se realizará también inmunoelectromicroscopía para evaluar la potencial capacidad de este receptor para interactuar con la bacteria. En caso de tener resultados positivos que indiquen que RAGE contribuye en la captura y eliminación de la bacteria, se realizarán experimentos bloqueando RAGE con su forma antagónica soluble administrándolo por vía intratraqueal de la misma forma a la anteriormente descrita para la HMGB.

7.- Experimentos in vitro: Nuestros resultados preliminares muestran abundante HMGB en el lavado bronquial de animales tuberculosos durante las dos primeras semanas post-infección, lo que sugiere que esta proteína esencialmente participa como un componente de la inmunidad innata. Siendo los macrófagos y el epitelio bronquio-alveolar sus dos representantes más importantes en el pulmón, se realizarán experimentos in vitro con una línea celular de macrófagos (THP-1) y de neumocitos tipo II, a los cuales se les incubará con la proteína HMGB en ausencia o presencia de M. tuberculosis y en los sobrenadantes se determinarán citocinas (TNF, IL-1, IL-12, TGF) y radicales libres de oxígeno.

---

#### Metodología: Criterios de selección

##### (0) Comentarios

Criterios de selección del protocolo: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

---

#### Beneficio (s) del estudio

##### (0) Comentarios

Beneficio: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Tipo de beneficio:

---

**Metodología: Desenlace y variables**

**(0) Comentarios**

---

Metodología de desenlace y variables: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

---

**Manejo de confidencialidad**

**(0) Comentarios**

---

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

---

**Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto**

**(0) Comentarios**

---

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

---

**Riesgo (s) del estudio**

**(0) Comentarios**

---

Molestias generadas por el estudio: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Complicaciones del procedimiento: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten:  
Otro tipo de riesgo:

---

**Consentimiento informado**

**(0) Comentarios**

---

Hoja de informe al paciente: [NO APLICA.EVALUACIÓN K9CATH.docx](#)

Carta de consentimiento informado: [NO APLICA.EVALUACIÓN K9CATH.docx](#)

---

Declaración de los investigadores

**(0) Comentarios**

---

Archivo CEI 04 Declaración de  
investigadores::

[dec invest PAT1021.pdf](#)

---

© 2009 Portal INNSZ Instituto Nacional  
de Ciencias Medicas y Nutricion  
Salvador Zubiran Vasco de Quiroga 15,  
Colonia Seccion XVI, Tlalpan  
C.P.14000, Mexico D.F., MEXICO  
Telefono: (52 55) 5487 0900

© 2009 LATIS. All rights Reserved.  
LATIS development, The power of the  
information

### Objetivo general:

Estudiar las características bioquímicas e inmunológicas de la proteína HMGB de *Trypanosoma cruzi* y evaluar la contribución de la HMGB de mamífero en la inducción de la inflamación, respuesta inmunológica y control del crecimiento bacteriano en la tuberculosis experimental.

### Antecedentes

Con el propósito de controlar la infección por un agente patógeno, el sistema inmune detecta estructuras moleculares conservadas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), producidos exclusivamente por los microorganismos (1). Los PAMPs son “sensores microbianos” o “alertas” para el hospedador y son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (RRPs). Algunos de estos RRP son los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*) 2 y 4 (TLR2 y TLR4) que se encuentran en la superficie de las células del sistema inmune innato. En contraste, otros RRP, como el TLR7, se hallan dentro de las células. El reconocimiento de los PAMPs por los RRP facilita la toma del patógeno por las células del hospedador o la señalización requerida para inducir una respuesta inmune apropiada (2).

Como contraparte de los PAMPs también existen patrones moleculares asociados al daño (DAMP), los cuales son factores endógenos normalmente presentes dentro de las células y por ende no reconocidos por el sistema inmune en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en situaciones de estrés celular o daño, estas moléculas pueden ser liberadas al espacio extracelular y activan eventos inflamatorios. Así los DAMPs pueden ser interpretados como señales de daño potencial al hospedero (3). La necrosis celular se da habitualmente en circunstancias de daño extremo (por ejemplo isquemia o traumatismo) cuando la apoptosis no puede llevarse a cabo. Una consecuencia importante de la muerte por necrosis es la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, y con ello el escape del material intracelular. Los DAMPs prototípicos que derivan de las células necróticas incluyen proteínas del estrés calórico (4) y una proteína asociada a la cromatina llamada HMGB1 (por su nombre en inglés “High Mobility Group B 1”) (5), entre los más conocidos. Muchos DAMPs, en particular los mencionados, parecen interactuar con varios receptores celulares (TLR2, TLR4, TLR9, y RAGE) (6), lo cual da pie para pensar en una variada gama de efectos sobre el hospedero en función de la noxa que desencadena el proceso en cuestión.

Además de los receptores tipo Toll, los DAMPs son reconocidos por receptores específicos. El más saliente de todos ellos es el receptor RAGE, el cual reconoce productos finales de glicosilación avanzada (AGEs). Estos AGEs, se acumulan en situaciones de gran estrés oxidativo y en enfermedades con un marcado componente inflamatorio como consecuencia de la glicosilación no enzimática y la oxidación de proteínas y lípidos. RAGE es un receptor transmembrana expresado por células inmunes, endoteliales, cardiomiocitos y neuronas (7-9)

Las proteínas HMGB han ganado gran interés debido a su participación en importantes procesos, tanto dentro del núcleo, por sus efectos sobre la estructura de la cromatina, como en el medio extracelular debido a su capacidad de actuar como proteína pro-inflamatoria. Existen pocos estudios relacionados con la contribución en la inflamación y daño tisular producido por estas proteínas en infecciones por parásitos o bacterias intracelulares. *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, una parasitosis de gran importancia en nuestra región pues existen en Latinoamérica más de 20 millones de personas infectadas. Es de interés que existan homólogos de la proteína HMGB en parásitos. En el caso de los tripanosomas esto fue propuesto hace más de una década (10, 11), y recientemente esto se demostró por primera vez por el grupo de los Dres Serra y Cribb del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad de Rosario Argentina. El ortólogo de la proteína HMGB de tripanosomas (TcHMGB) presenta, al igual que las HMGBs de mamíferos, dos dominios HMG box con capacidad de unirse a estructuras distorsionadas del ADN. Sin embargo, carece del extremo ácido típico de estas proteínas y presenta en cambio, un dominio amino terminal que parece ser único de las HMGBs de tripanosomas, el cual resulta particularmente interesante por su potencialidad como posible blanco terapéutico (12). Con anticuerpos policlonales específicos para TcHMGB hemos observado por inmunofluorescencia que la proteína se concentra en el núcleo en los tres estadios del ciclo de vida del parásito en cultivos *in vitro*, consistente con sus funciones como componente de la cromatina. Por otra parte, mediante inmunohistoquímica en tejido muscular estriado de un modelo murino de tripanosomiasis, se verificó que el parásito allí localizado produce TcHMGB y por inmunoelectromicroscopía se verificó que esta proteína se encuentra localizada en vacuolas, lo cual sugiere actividad secretoria. Hasta el momento, no se ha estudiado cual es la capacidad que tiene esta proteína de inducir inflamación y que tipo de respuesta inmune produce.

Otra enfermedad infecciosa de gran importancia clínica y epidemiológica es la tuberculosis, enfermedad esencialmente pulmonar producida por *Mycobacterium tuberculosis* una bacteria intracelular facultativa. Estudios *in vitro* han demostrado que *Mycobacterium tuberculosis* entero o subcomponentes, particularmente la proteína de choque térmico de 65kD, son capaces de inducir la secreción de HMGB-1 en macrófagos o monocitos, aparentemente como consecuencia de la activación de receptores Toll-2, y que esta HMGB-1 secretada es capaz de inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF e IL-1 (13). En el mismo estudio, se encontró que cobayos infectados por aerosol con *M. tuberculosis* también producían mayor cantidad de HMGB-1, aunque la contribución de esta proteína *in vivo* no fue estudiada, argumentando que no se pueden obtener animales knock-out de HMGB-1 debido a que esta proteína es esencial durante el desarrollo embrionario. Como parte del trabajo de Tesis Doctoral de la Lic. Estela Bini de la Universidad de Rosario en el laboratorio del Dr. Hernandez Pando se estudió, en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva la cinética de expresión de HMGB-1 por RT-PCR y su concentración en lavados bronquiales por ELISA. Se observó una activa e importante producción de esta proteína durante la fase inicial de la infección, particularmente durante la primera semana. Mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra HMGB-1, se vio que las células epiteliales y los macrófagos son las principales células productoras y por inmunoelectromicroscopía se detectó que la proteína estaba principalmente localizada en vesículas citoplasmáticas, lo cual sugiere una secreción activa más que liberación pasiva por necrosis.

El laboratorio de parasitología molecular en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario en Argentina dirigido por el Dr. Esteban Serra, del cual forma parte la Dra.

Cribb, tiene una vasta experiencia en técnicas de biología molecular, y en la expresión y purificación de proteínas recombinantes, en donde se puede producir la proteína HMGB para estudiar más sobre su actividad biológica en la regulación genética del parásito y su contribución en la inflamación. Por su parte, el laboratorio del Dr Hernandez Pando en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición en Mexico tiene una larga experiencia en modelos experimentales en general y en particular de tuberculosis pulmonar, en donde se podrá continuar el estudio de la contribución de la proteína HMGB en tuberculosis y el papel de la TcHMGB en la activación de la respuesta inmunológica *in vivo*. Son por lo tanto dos laboratorios con experiencia y actividades diferentes pero altamente complementarias para estudiar la contribución de esta proteína en la biología y respuesta inmunológica de dos enfermedades infecciosas importantes.

### **Justificacion.**

Las enfermedades infecciosas parasitarias y bacterianas son una importante causa de mortalidad y morbilidad en los países en vías de desarrollo como los latinoamericanos. Su control depende en gran parte de un conocimiento profundo de la biología de los agentes infecciosos y del tipo de respuesta inmunológica que participa en su control y eliminación. El análisis de proteínas relacionadas con la regulación de la expresión genética en parásitos como *T. cruzi* tiene gran importancia porque pueden ser blancos de nuevos agentes terapéuticos, además de que como es el caso de la TcHMGB pueden ser proteínas con un cierto grado de exclusividad y su detección en suero de pacientes pueden contribuir en el diagnóstico o como marcadores de la enfermedad, lo cual justifica plenamente su estudio.

Por su parte, la producción y liberación de HMGB por el hospedero como consecuencia de la infección por *M. tuberculosis*, es de interés en la caracterización de la respuesta inflamatoria e inmunológica mediada por moléculas hasta ahora no consideradas de primera instancia como elementos de la respuesta inmunológica. El conocimiento en detalle de estos nuevos actores moleculares contribuirá a un mejor entendimiento de elementos que eventualmente pueden también ser utilizados como agentes inmunoterapéuticos o marcadores de enfermedad, lo cual justifica su estudio en modelos experimentales para posteriormente trasladar ese conocimiento a la enfermedad humana.

### **Metodología**

#### **1.- En Tripanosomiasis: Síntesis y purificación de proteínas recombinantes**

Debido a que no están disponibles comercialmente, las proteínas específicas del parásito requieren de su purificación a partir de cultivos axénicos. Alternativamente, es posible obtenerlas recombinantes con buenos rendimientos y purezas. Con el objetivo de estudiar la función del dominio específico de la TcHMGB, se obtendrán versiones truncadas correspondientes a los distintos dominios de la proteína, expresadas como proteínas recombinantes en *E. coli* y purificadas mediante cromatografía de afinidad. También se construirán vectores que permitan expresar los mismos dominios en epimastigotes de *T. cruzi*, para poder realizar estudios *in vivo*. Por último, se construirá un vector que permita expresar en epimastigotes de *T. cruzi*, proteínas con un fragmento adicional de poliHistidina para purificarlas por cromatografía de afinidad a Níquel., de esta forma las proteínas estarán sometidas a las mismas modificaciones post-traduccionales que las proteínas endógenas del parásito, además se evitara la posible contaminación con LPS que es un inconveniente para los estudios inmunológicos. Se



diseñaron oligonucleótidos para amplificar y clonar las secuencias para: 1) el extremo amino terminal (aminoácidos 1-110 "N-term"), 2) el primer dominio HMG box (aminoácidos 110-190, Box1), 2) el segundo dominio HMG box (aminoácidos 190-270 Box2), 3) los dos dominios HMGbox (aminoácidos 110-270 C-term). Se obtendrán epimastigotes de *T. cruzi* transfectantes que expresen las proteínas como fusión a distintas proteínas fluorescentes usando diversos vectores. En caso de no obtenerse parásitos transfectantes con estos vectores, se utilizará el vector inducible por tetraciclina pTcINDEX (14).

## **2.-Análisis de las posibles funciones del dominio adicional que presentan las HMGBs de tripanosomas**

Después de confirmar que la proteína TcHMGB y sus versiones truncadas se expresan correctamente como fusiones a las proteínas fluorescentes por western blot, se analizará mediante microscopía de fluorescencia la localización subcelular de cada uno de sus dominios. El análisis bioinformático predice la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) en el dominio amino terminal que es único de tripanosomas, nuestros resultados preliminares sugieren que la eliminación de este dominio dirige la proteína al citoplasma, resultados que necesitamos corroborar.

## **3.- Estudio de la acetilación de la HMGB de T cruzi y su posible influencia sobre su localización subcelular y secreción.**

Una de nuestras hipótesis es que la acetilación de TcHMGB, ya sea en las lisinas correspondientes a la NLS o en otras, esta implicada en la relocalización núcleo-citoplasma y su eventual secreción al medio extracelular. Para verificar esto se tratará a los cultivos con inhibidores de desacetilasas (Trichostatina A y Nicotinamida) y se analizará si existen diferencias en cuanto a la localización subcelular de cada una de las versiones truncadas de TcHMGB, comparado con cultivos control sin tratar. También se estudiará la secreción de las proteínas, puesto que además de localizarse en vacuolas, resultados preliminares mostraron un aumento en la cantidad de TcHMGB en el sobrenadante de cultivos tratados con inhibidores de desacetilasas. Para corroborar esto se realizarán estudios con inhibidores de acetilasas utilizando las cepas transfectantes que sobre-expresen las proteínas como fusiones a proteínas fluorescentes (15).

## **4.- Estudio de la capacidad inmunogénica de la HMGB de T cruzi**

→ Inicialmente se realizará estimulación in vitro de macrófagos con TcHMGB recombinante en diferentes concentraciones (0, 5, 10, 30, 100 y 300 µg/ml) y por diferentes períodos de tiempo (0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 horas). Posteriormente se colectarán células y sobrenadantes para determinar por RT-PCR y ELISA respectivamente las citocinas proinflamatorias TNF, IL-1, IL-6 e IL-12 y anti-inflamatorias IL-10 y TGF.

Ensayos similares se realizarán administrando la proteína HMGB de *T. cruzi* completa y sus subdominios en el peritoneo de ratones Balb/c y C57Bl que son sensibles y resistentes respectivamente a la infección con *T. cruzi*; y en diferentes tiempos se obtendrá el líquido peritoneal, suero y bazo para determinar la concentración de las citocinas mencionadas anteriormente, además de evaluar por citometría de flujo en sangre y bazo las subpoblaciones de células T, linfocitos B y macrófagos determinando en estos moléculas de activación.

## **5.- En tuberculosis: Evaluación de la contribución de la proteína HMGB en la inflamación, respuesta inmunológica y proliferación bacteriana en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar:** Ratones Balb/c machos de 8 semanas se infectaran con una dosis alta de la cepa de referencia H37Rv por vía intratraqueal (16). Como se mencionó en los antecedentes en este modelo existe una elevada producción de HMGB durante la primera y segunda semana de la infección. Con el objetivo de evaluar su contribución en el proceso inflamatorio, respuesta inmunológica y control del

→ crecimiento bacilar, a grupos de ratones se les administrará anticuerpo bloqueador anti-HMGB por vía intratraqueal, desde el primer día de infección y durante 18 días tres veces por semana. Grupos de seis animales se sacrificarán los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 postinfección. Para determinar la cantidad de bacterias vivas, cuatro pulmones, derecho o izquierdo; del mismo número de animales se congelarán en nitrógeno líquido para posteriormente homogeneizarlos y sembrarlos en cajas de cultivo con medio de crecimiento sólido, las unidades formadoras de colonia se contarán en el día 21. Otros cuatro pulmones del mismo número de animales por tiempo de sacrificio se perfundirán con alcohol etílico absoluto e incluirán en parafina para obtener cortes histológicos en los cuales se determinará por morfometría automatizada la inflamación intersticial, perivascular y peribronquial, así como la extensión de daño tisular (neumonía) y tamaño de granulomas. Finalmente, para evaluar la respuesta inmunológica se determinará la expresión de citocinas por RT-PCR en tiempo real. Cuatro pulmones en cada tiempo de sacrificio se homogenizarán y de ellos se purificará el RNA total. Después de convertirlo en cDNA, se cuantificará la expresión de las citocinas IFN, TNF, IL-4, IL-10 y la enzima iNOS.

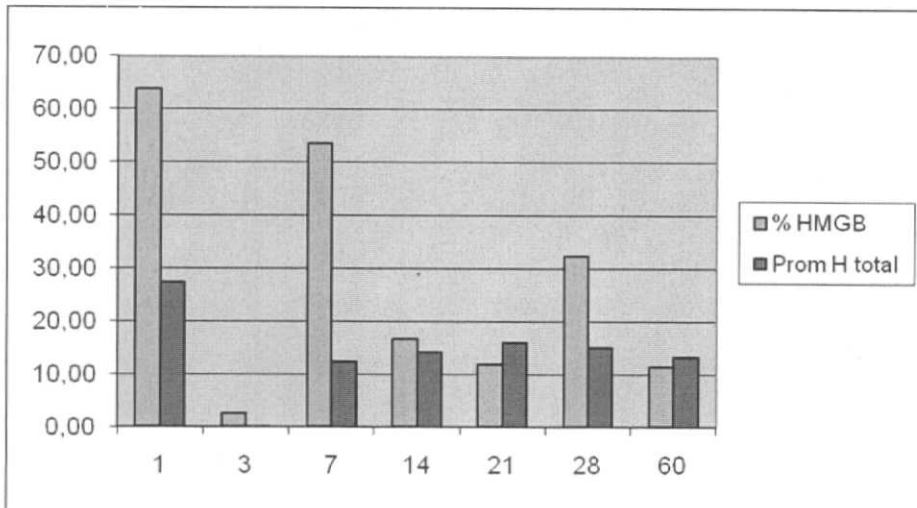
← Para confirmar los resultados del bloqueo con anticuerpos anti-HMGB y evaluar la posible capacidad de esta proteína de tener actividad inmunoterapéutica, se administrará HMGB recombinante murina por vía intratraqueal cada tercer día durante 18 días empezando a partir del primer día de la infección. Los animales se sacrificarán y los pulmones se procesarán de la misma manera descrita en el párrafo anterior.

**6.- Evaluación de la participación del receptor RAGE en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental:** Como fue mencionado en la sección de antecedentes, la proteína HMGB tiene a RAGE como uno de sus principales receptores. Es de interés notar que este receptor se expresa en forma constitutiva y abundantemente en el epitelio alveolar. Existen además algunas observaciones en pacientes que sugieren que RAGE podría ser también receptor para la micobacteria. Con el objetivo de estudiar estos aspectos, se determinará la expresión y localización de RAGE durante el curso de la tuberculosis murina, por RT-PCR e inmunohistoquímica. Se realizará también inmuno-electronmicroscopía para evaluar la potencial capacidad de este receptor para interaccionar con la bacteria. En caso de tener resultados positivos que indiquen que RAGE contribuye en la captura y eliminación de la bacteria, se realizarán experimentos bloqueando RAGE con su forma antagónica soluble administrándolo por vía intratraqueal de la misma forma a la anteriormente descrita para la HMGB.

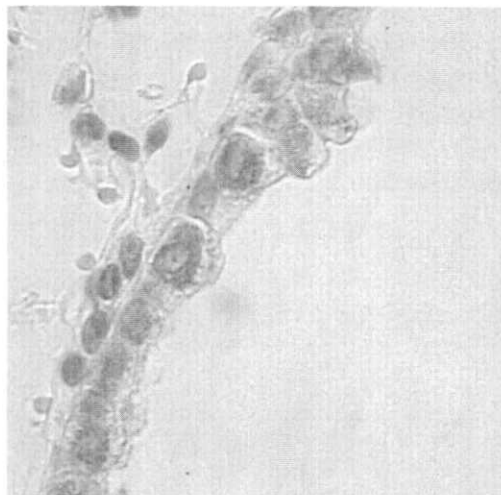
**7.- Experimentos *in vitro*:** Nuestros resultados preliminares muestran abundante HMGB en el lavado bronquial de animales tuberculosos durante las dos primeras semanas post-infección, lo que sugiere que esta proteína esencialmente participa como un componente de la inmunidad innata. Siendo los macrófagos y el epitelio bronquio-alveolar sus dos representantes más importantes en el pulmón, se realizarán experimentos *in vitro* con una línea celular de macrófagos (THP-1) y de neumocitos tipo II, a los cuales se les incubará con la proteína HMGB en ausencia o presencia de *M. tuberculosis* y en los sobrenadantes se determinarán citocinas (TNF, IL-1, IL-12, TGF) y radicales libres de oxígeno.

## Referencias

- 1-Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300, (2002)
- 2-Andrews T, Sullivan KE. Infections in patients with inherited defects in phagocytic function. *Clin Microbiological Reviews* 16, 597-621, (2003).
- 3-Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991-1045 (1994).
- 4-Quintana, F. J. & Cohen, I. R. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J. Immunol.* 175, 2777-2782 (2005).
- 5- Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195 (2002).
- 6-Tian, J. et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature Immunol.* 8, 487-496 (2007).
- 7- Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R. & Coyle, A. J. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 367-388 (2010).
- 8- Shang, L. et al. RAGE modulates hypoxia/reoxygenation injury in adult murine cardiomyocytes via JNK and GSK-3 $\beta$  signaling pathways. *PLoS ONE* 5, e10092 (2010).
- 9- Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu. Rev. Immunol.* 29:139-62 (2011)
- 10- Morales, M., Onate, E., Imschenetzky, M., Galanti, N. HMG-like chromosomal proteins in *Trypanosoma cruzi*, *J. Cell Biochem.*, 50(3), pp. 279-284, (1992).
- 11- Erondú, N. E., Donelson, J. E. Differential expression of two mRNAs from a single gene encoding an HMG1-like DNA binding protein of African trypanosomes, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 51(1), pp. 111-118. (1992)
- 12- Cribb, P., Perozzi, M., Villanova, G. V., Trochine, A., Serra, E. Characterization of TcHMGB, a high mobility group B family member protein from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 41(11):1149-56. (2011)
- 13- Grover A, Taylor J, Troudt J, Keyser A, Sommersted K, Schenkel A, Izzo AA. Mycobacterial infection induces the secretion of high-mobility group box 1 protein. *Cell Microbiol.* 10 (6). 2008
- 14.- Taylor MC, Kelly JM (2006) pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol.* 6;6:32.
- 15.- Batista M, Marchini FK, Celedon PA, Fragoso SP, Probst CM, Preti H, Ozaki LS, Buck GA, Goldenberg S, Krieger MA. (2010). A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol.* 13;10:259.
- 16- Rivas-Santiago C, Rivas-Santiago B, Aguilar León D, Castañeda-Delgado J, Hernández Pando R. Induction of  $\beta$ -Defensins by L-isoleucine as novel immunotherapy in experimental murine tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology* 2011, 164: 80-89.



Cuantificación de HMGB por ELISA en lavados bronquiales. Ratones Balb/c infectados con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv fueron sacrificados en los tiempos indicados e inmediatamente se le realizaron lavados bronquiales, en los cuales se determino la concentración total de proteínas por la tecnica de Bradford y por ELISA la cantidad de HMGB, se muestra el porcentaje de HMGB en comparacion con la proteina total, existe una alta concentración de HMGB durante la primera semana post-infeccion.



Detección por inmunohistoquímica de la proteína HMGB en el pulmon de un raton con un día de infección con *M tuberculosis*, existe intensa inmunotincion del epitelio bronquial

"010/2014 f"

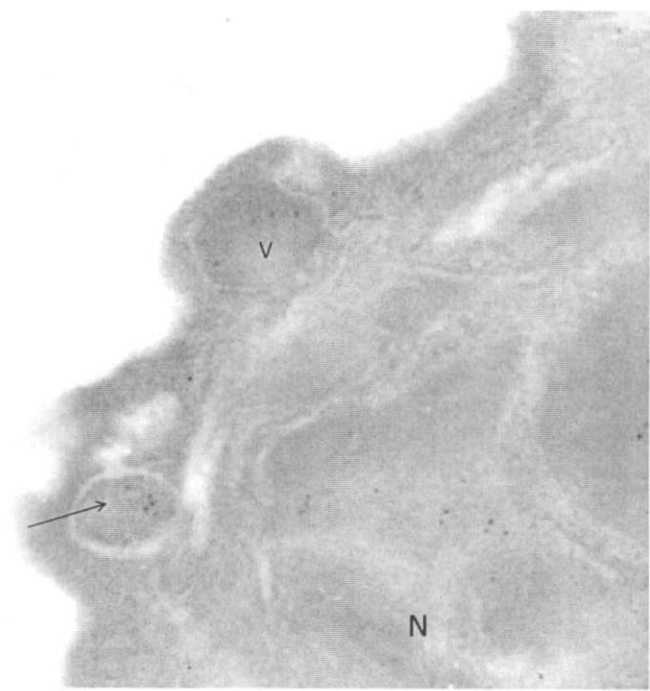
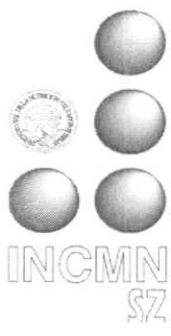


Imagen representativa del estudio de inmunoelectronmicroscopia para localizar subcelularmente HMGB. Célula del epitelio bronquial de un ratón con 7 días de infección, los puntos negros (flecha) corresponden a la HMGB identificada con anticuerpos específicos rebelados con anticuerpos secundarios marcados con partículas de oro coloidal (puntos negros). Existe HMGB en el nucleo celular (N) y en vesciculas (V) lo cual indica que la proteína se esta exportando sin que exista necrosis celular

"010/2014 f"



# INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

México, D.F. a 09 de agosto de 2013

## DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

### TÍTULO DEL PROYECTO: ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP B (HMGB) DESDE LAS DOS VERTIENTES DE LAS INTERRELACION PATÓGENO HOSPEDERO

Clave de Registro: PAT-1021-13/15-1

Los investigadores que participamos en el proyecto arriba mencionado sometemos voluntariamente a evaluación dicho proyecto ante la Comisión de Investigación en Animales y declaramos libremente:

- Que conocemos todos los aspectos del estudio y contamos con la capacidad de llevarlo a buen término.
- Que la revisión minuciosa de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización y nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad.
- Que conocemos los riesgos potenciales a los que exponemos al personal técnico, investigadores y los animales mismos involucrados en el proceso experimental, que se encuentran tanto en contacto directo como indirecto en el lugar donde se realiza la investigación. Por lo anterior, se establecen en el protocolo las medidas precautorias necesarias.
- Que pondremos el bienestar de los animales sujetos de investigación y la seguridad del personal en contacto con ellos por encima de cualquier otro objetivo.
- Que nos conduciremos de acuerdo con EL PRINCIPIO GENERAL DE LAS TRES R's descrito en el Manual del Usuario del SISTEMA ELECTRÓNICO DE REGISTRO DE PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN: Comisión de Investigación en Animales, numeral 13 ([http://132.247.8.50/latis\\_invp/archivos/Manual.pdf](http://132.247.8.50/latis_invp/archivos/Manual.pdf)). Asimismo, nos someteremos a los estándares de comportamiento ético y científico aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud y el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud de México, La NOM 062-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (publicada por SAGARPA en el Diario Oficial, 22 de agosto del 2001), y los lineamientos para el buen uso de los animales recopilados por el Consejo Internacional para La Ciencia de los Animales de Laboratorio en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (ICLAS-WHO, <http://www.iclas.org/harmonization.htm>).

Nombre del investigador	Firma
DR. ROGELIO HERNANDEZ PANDO	
DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYAN	
DRA. DULCE A. MATA ESPINOSA	
DRA. BRENDA NOEMI MARQUINA CASTILLO	