

Lej 1



Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y
Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

ALCANIZACION INTRALISOSOMAL DE MACROFAGOS EN
PRESENCIA DE PROTEINAS DE Mycobacterium Tuberculosis

T E S I S

Que para obtener el título de
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta :

MARINA CHICUREL HELBING



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PG
I INTRODUCCION	4
1. Factores de virulencia de <u>Mycobacterium tuberculosis</u>	6
2. Mecanismos bacteriostáticos y bactericidas del macrófago	9
3. Interacción entre el hospedero y <u>M. tuberculosis</u> : el granuloma	10
A. Interacción general bacteria-célula mononuclear	11
4. Relación intracelular bacteria-macrófago	14
5. El pH intracelular y la relación bacteria-macrófago	16
6. Perturbación del pH intracelular por otros parásitos (antecedentes)	19
7. Técnicas empleadas para la medición del pH intracelular (antecedentes)	20
II OBJETIVO Y JUSTIFICACION	25
III MATERIAL Y METODOS	28
1. Reactivos	28
2. Equipo	28
3. Células	28
4. Bacterias	29
5. Medios de cultivo	29
6. Cultivos bacterianos	29
7. Preparación del extracto de proteínas a partir de filtrados de cultivo micobacteriano (CFPE)	30
8. Condiciones de cultivo celular	30

9. Registros espectrofluorométricos	31
10. Curva de calibración	32
11. Condiciones de incubación con CFPE	32
12. Condiciones de incubación con otras proteínas	33
13. Análisis de los resultados	33
IV RESULTADOS	34
1. Efectos de CFPE de <u>Mycobacterium tuberculosis</u> sobre el pH lisosomal de macrófagos J774	34
2. Efectos de CFPE sobre el pH lisosomal de macrófagos de la línea P388D.1	36
3. Dependencia de la alcalinización en la concentración de CFPE	37
4. Efectos de otras proteínas sobre el pH lisosomal de macrófagos J774A.1	37
V DISCUSION Y CONCLUSIONES	39
1. Interpretación de los resultados	41
VI PERSPECTIVAS	47
VII REFERENCIAS	49

I. INTRODUCCION

Más del 50% de los seres vivos son parásitos. El estudio de estos organismos es, por lo tanto, de importancia fundamental en el desarrollo de las ciencias biológicas. La investigación de las interacciones hospedero-parásito ha contribuido al entendimiento de caminos, estrategias y direcciones de la evolución en paralelo, componente básico en el proceso evolutivo de cualquier especie y probablemente en el origen de los principales grupos de organismos que ahora conocemos como lo propone la teoría endosimbiótica de L. Margulis (1).

Algunos de los parásitos que muestran mayor grado de coevolución con su hospedero, son aquellos que se han especializado a tal grado que sólo son capaces de sobrevivir asociados a su hospedero correspondiente: los parásitos obligados: estos organismos han descartado por completo la forma de vida libre en su ciclo vital. Este grupo sólo se presenta en la naturaleza fuera del ser vivo que coloniza, restringida a formas incapaces de multiplicarse, asociados a su descarga por procesos infectivos. Además, existen parásitos que están en asociación particularmente estrecha con sus hospederos: los parásitos intracelulares. A su vez, dentro de este grupo restringido, encontramos aquellos que tienen como nicho ecológico células del sistema inmune. Es decir, parásitos cuyos hospederos son células que surgieron como resultado de miles de años de evolución precisamente para proteger al organismo hospedero de invasores extraños. Es aparente, pues, que el estudio de estos organismos resulta no sólo interesante sino de gran trascendencia

biológica.

La bacteria Mycobacterium tuberculosis es miembro de este grupo. Es parasitaria de humanos y de otros vertebrados superiores, incluyendo animales de importancia económica como el ganado bovino. Además es de tipo obligado: sólo se ha encontrado, fuera de seres vivos, en aguas de desperdicio y en polvo de hospital (2). Es un parásito intracelular que reside y se reproduce dentro de los macrófagos de su hospedero. No sólo sobrevive, siendo capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas regulares de manera eficaz en un ambiente tan relativamente hostil para un agente invasor de su naturaleza, sino que además dicho ambiente le resulta necesario para la perpetuación de su especie. La interacción desarrollada de estos dos organismos es muy estrecha y, por lo tanto, se presta como modelo de investigación; sin embargo, todavía existe una ventaja adicional en su estudio: la enfermedad que causa este microorganismo, principalmente la tuberculosis pulmonar, representa un grave problema de salud tanto en México como en varios países en el mundo. Aproximadamente 3 millones de personas mueren, y se reportan 300,000 casos nuevos cada año (3). Además, existen 20 millones de personas infectadas que ponen en riesgo a aproximadamente otros 75 millones. Solo en México, se reportan aprox. 14,000 casos nuevos al año (4). El estudio básico de este parásito y su relación con el hospedero ayudarán en la búsqueda de una solución a este problema de salud mundial.

La infección por Mycobacterium tuberculosis se da usualmente en las vías respiratorias inferiores. Por lo tanto, el pulmón

resulta ser el primer órgano afectado. Allí, las bacterias se alojan en algún alveolo, donde son rápidamente fagocitadas por los neutrófilos y macrófagos alveolares. Debido a su largo tiempo de duplicación, la manifestación de los síntomas se da al cabo de varias semanas. En este tiempo se desarrolla una inflamación celular y a través de los vasos linfáticos se disemina la infección, inclusive llegando a otros tejidos. En una infección primaria, generalmente el hospedero desarrolla inmunidad celular adquirida y así combate y resuelve la infección. Sin embargo, en procesos de reinfección las lesiones se caracterizan por ser localizadas y necróticas. Esta necrosis, resultante de la reacción de hipersensibilidad retardada, causa lesiones irreparables y la resolución de la infección resulta ser mucho más lenta y difícil.

Para empezar a atacar este problema, analicemos el "arsenal" con el que cuentan ambas partes del sistema hospedero-parásito.

Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*

Existen varios factores postulados para explicar la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Entre éstos se encuentran el "factor cuerda", otros lípidos tóxicos: hierro, oxígeno, y proteínas del filtrado de cultivos de la bacteria. No se han identificado exotoxinas, endotoxinas, ni enzimas extracelulares deletéreas. Seguramente el factor más estudiado es el factor cuerda (6,6' dimicolato de trehalosa). En 1950 (5) se encontró que esta sustancia purificada tenía efectos altamente tóxicos en ratones inyectados intraperitonealmente con dosis

bajas y que además inhibía la migración de leucocitos. Sin embargo, posteriormente se vio que este mismo compuesto se encontraba en bacterias avirulentas de otras especies (5). En 1972, Kato (7) observó que anticuerpos anti-factor cuerda inducían mayor resistencia a la enfermedad. Aparentemente el factor sí contribuye a la virulencia pero no es decisivo en la expresión de la enfermedad. Otros lípidos tóxicos fuertemente implicados en la virulencia de M. tuberculosis son los sulfolípidos. Se ha observado una alta correlación entre el grado de virulencia y el contenido de sulfolípidos en varias cepas analizadas (8). A pesar de esto, aun no se sabe si la relación es directa y esto se complica al considerar la virulencia en términos de la respuesta inmune del hospedero.

Por otro lado, la bacteria presenta una alta dependencia del hierro para su crecimiento, y por lo tanto, se ha dicho que el producto bacteriano micobactina (una sustancia que puede secuestrar el hierro de la transferrina) es un factor indirecto de virulencia (9). Finalmente, se han encontrado en los medios de cultivo de Bacilo Calmette-Guerin (BCG) y M. smegmatis dos sustancias llamadas exoquelinas las cuales quelan y solubilizan al hierro (10). Estas han sido implicadas igualmente en la virulencia.

El oxígeno se ha vinculado a la virulencia de dos maneras distintas. En primer lugar, se ha observado que la tensión de oxígeno en el medio del hospedero afecta en manera proporcional al grado de desarrollo de la enfermedad (11); además, Guy et al. han encontrado que la inhibición del crecimiento por concentraciones reducidas de oxígeno es menor para cepas

virulentas (H37Rv) que para avirulentas (H37Ra) (12). Sin embargo, también se ha observado que aún con concentraciones altas de oxígeno, las avirulentas son incapaces de inducir enfermedad progresiva (11). Esto indica que, aunque el requerimiento micobacteriano de oxígeno es importante para el desarrollo de la enfermedad, no es el único factor involucrado en la virulencia. Se ha visto también una correlación entre la virulencia y la actividad de catalasa (13); pero existen varias micobacterias saprofitas y cepas de baja virulencia que muestran una alta actividad de catalasa (14), de manera que una vez más, no podemos considerar esto como factor único de virulencia. Por último, recientemente, se han descrito efectos de proteínas recuperadas del filtrado de cultivos de M. tuberculosis sobre la función de ciertas células del sistema inmune. En primer lugar, se ha descrito que la estimulación de células T por mitógenos (PHA, LDL) es inhibida por factores solubles secretados por células normales adherentes, previamente expuestas a estas proteínas (15). Por otra parte, éstas tienen un efecto sobre la morfología y la actividad membranar de los macrófagos; disminuyen la cantidad de pseudópodos y la rapidez con que éstos se forman (16). En conclusión, más que haber un factor específico para la virulencia de M. tuberculosis, la patogenicidad parece estar dada por un conjunto de factores que contribuyen en diferentes grados a la virulencia específica de cada cepa.

Mecanismos bacteriostáticos y bactericidas del macrófago

Ahora veamos el potencial destructor de la célula hospedera a la que se enfrenta M. tuberculosis. Una de las "armas" más poderosas con las que cuenta la célula mononuclear es el conjunto de productos provenientes de la reducción del oxígeno, que tienen efectos microbicidas. El peróxido de hidrógeno, por ejemplo, es bastante tóxico y se ha demostrado que los macrófagos peritoneales de ratón expuestos a linfocinas, in vitro, son capaces de matar a más del 90% de las M. microti ingeridas. Esta capacidad se anula con catalasa (17). Otros productos de reducción como el superóxido, aunque resultan tóxicos para muchos tipos de bacterias, son poco efectivos contra M. tuberculosis (18). Sin embargo, es posible que juegue un papel indirecto como sustrato para una reacción de dismutación y consecuente creación de peróxido.

Las enzimas lisosomales constituyen el otro factor microbicida importante en la célula. Se sabe que las actividades de éstas aumentan en los macrófagos de animales inmunizados o vacunados y especialmente en los macrófagos y las células epiteloides de los granulomas. En especial, la lisozima se ha descrito como un factor tuberculostático (19); mientras que la mieloperoxidasa, al aumentar la toxicidad del peróxido, se ha descrito como un factor microbicida, especialmente en los monocitos. La relevancia de esta enzima como microbicida, sin embargo, ha sido puesta en duda recientemente porque se ha visto que la mayoría de la gente que es deficiente en esta enzima, no parece tener una menor resistencia a la infección (20).

Por último, algunas sustancias de naturaleza proteica y lipidica han sido descritas como factores tuberculostáticos y/o tuberculocidas. Algunas proteínas básicas, por ejemplo, son capaces de adherirse a la superficie bacteriana y así afectar su reproducción. Por otro lado, existen ciertos ácidos grasos que pueden interferir con la actividad enzimática de la bacteria y, de hecho, este tipo de ácidos se encuentran en mayor cantidad en las membranas de las células de animales inmunes o retados (21). Podemos concluir que, al igual que los factores virulentos micobacterianos, la efectividad de la defensa de la célula está determinada por varios factores en conjunto.

Interacción entre el hospedero y M. tuberculosis : el granuloma

La lesión granulomatosa es el centro de las interacciones hospedero-parásito. En este sitio las células mononucleares juegan un papel muy importante, el cual quedará descrito más adelante. Sin embargo, en el granuloma también se encuentran polimorfonucleares, que son células secretoras encargadas de la fase inicial del desarrollo del granuloma. Estas células, en un proceso llamado degranulación, liberan al medio, de manera inespecífica, productos de reducción del oxígeno, enzimas hidrolíticas, etc. Estos factores liberados y los productos de la destrucción celular, atraen a los monocitos circulantes, al sitio de la infección. También llega a la lesión, una población de linfocitos T que, una vez activados, son capaces de, a su vez, activar a los monocitos. Estudios recientes usando animales con infecciones crónicas, sugieren que las células supresoras pueden jugar un papel importante en la determinación de las respuestas

celulares a los antígenos micobacterianos, tanto in vivo como in vitro (22). Por último, la inmunidad mediada por anticuerpos es nula o prácticamente nula en este tipo de infección.

A. Interacción general bacteria-célula mononuclear

Veamos en más detalle la interacción célula-célula entre la bacteria y la célula mononuclear: el enfrentamiento de estos dos sistemas con las características previamente descritas. Las células mononucleares (macrófagos residentes, monocitos, macrófagos inflamatorios, células epitelioides) se originan de un precursor común de tipo endotelial de la médula ósea (23). Existen células que están siendo liberadas continuamente por la médula y que circulan por la sangre en forma de monocitos. Estas colonizan tejidos diferentes y se diferencian pasando a ser macrófagos residentes de características específicas para cada tejido. Estos macrófagos residentes son los que primero se enfrentan a las micobacterias invasoras. Como estas bacterias son altamente resistentes a la digestión, forman focos persistentes de infección e inflamación que se vuelven granulomas. En estos puntos aumenta el influjo de los monocitos y, dadas las condiciones resultantes del proceso inflamatorio, estas células se diferencian en macrófagos inflamatorios y células epitelioides. Los linfocitos activados, formando parte del granuloma mismo, pueden aumentar la actividad de todas estas células mononucleares fagocíticas. Una breve visión de los papeles que juegan cada una de estas células en la enfermedad nos ayudará a entender la interacción general macrófago-micobacteria.

Para analizar el papel de los macrófagos residentes debemos fijarnos en las primeras etapas de la infección, cuando hay más interacción con estas células. En primer lugar, se puede variar la combinación hospedero/bacilo para luego ver los cambios correspondientes en las primeras fases de la infección. Por ejemplo, Gray et al. analizaron estas primeras etapas en ratones de varias cepas con diferentes susceptibilidades a la infección intranasal. No se hallaron diferencias significativas en relación con el establecimiento inicial de los bacilos en el pulmón entre las diferentes cepas. Sólo después de tres semanas se vio que las cepas más resistentes logran detener el crecimiento más rápidamente (24). Por otra parte, usando cepas de M. tuberculosis de alta y baja virulencia, se buscaron diferencias en la sobrevivencia de éstas dos en las etapas iniciales. A partir de la infección intravenosa de ratones se vio que las tasas de sobrevivencia de las bacterias tanto virulentas como avirulentas, eran muy similares (25). Por último, la inmunidad antituberculosis se caracteriza por el hecho de que una vez que la infección primaria ha desaparecido, tanto la sobrevivencia como el crecimiento iniciales de la infección retardada no disminuyen; solamente el desarrollo tardío se ve afectado y la infección se controla rápidamente (26). Todos estos experimentos indican que, a menos que estos macrófagos sean activados por medio de linfocitos o por algún elemento del granuloma, ya una vez estando en curso la infección no parecen jugar un papel muy importante, por lo menos en el enfrentamiento inicial hospedero-parásito (17).

Para entender las interacciones de M. tuberculosis con las demás células fagocíticas, estudiemos al granuloma. El influjo inicial es predominantemente de polimorfonucleares, y esta llegada junto con la de los monocitos continúa a lo largo de la vida del granuloma, aunque son los mononucleares los que predominan en las etapas tardías. Los monocitos, moderadamente fagocíticos, con pocos lisosomas primarios y secundarios, endocitan el material digerible del granuloma y así se diferencian como macrófagos inflamatorios que contienen muchos lisosomas primarios pequeños y lisosomas secundarios grandes. Con el desarrollo de la hipersensibilidad retardada a los antígenos extraños, aumenta la infiltración de los linfocitos T sensibilizados. La infiltración, maduración, fagocitosis, división y muerte de los monocitos aumenta y el granuloma es rodeado por las células epitelioideas. Se ha visto que la presencia de los linfocitos T es importante en la formación de estas células epitelioideas y en la destrucción de las bacterias (27).

Las células epitelioideas contienen muchas enzimas lisosomales y tienen altos niveles de pinocitosis y secreción, pero fagocitan muy poco. Ahora bien, la actividad micobactericida de las células inflamatorias y monocitos en general es bastante reducida. No se han detectado diferencias en la actividad micobactericida entre las células inflamatorias y los monocitos extraídos de animales inmunes y no-inmunes (28). Sin embargo, la exposición continua de estas células a linfocinas, in vitro, aumenta significativamente la actividad microbicida, especialmente de los monocitos (29).

Las células epitelioideas, por último, no parecen presentar mucha actividad antimicrobacteriana. Se ha visto que un efecto bacteriostático de duración variable contra M. tuberculosis H37Rv (una cepa virulenta) es seguido por la multiplicación normal de las bacterias intracelulares (30).

Relación intracelular bacteria-macrófago

Dadas estas generalidades de interacción, analicemos ahora de forma más detallada lo que ocurre dentro de la célula hospedera. Mycobacterium tuberculosis, como cualquier agente extraño de su tamaño, es internalizado por el macrófago a través de un proceso especializado de endocitosis: la fagocitosis. Este proceso es una respuesta localizada de una región de la membrana plasmática y las estructuras citoplásmicas subyacentes. A través del contacto de receptores, no necesariamente específicos, con proteínas de la superficie de la bacteria blanco, la membrana macrofágica envuelve poco a poco al microorganismo con la consecuente aposición de ambas membranas. El mecanismo es comparable al de un cierre de cremallera, y por eso se le ha llamado así, "de cremallera". Aunque aún no se entienden por completo las interacciones intracitoplásmicas que resultan en este proceso, se sabe que la actina juega un papel principal, y que tanto la miosina como los microtúbulos también parecen intervenir (31). En este aspecto, M. tuberculosis aparenta, al microscopio, ser adherida e ingerida de manera similar a cualquier otro microorganismo. Sin embargo, la cinética de coinernalización de proteínas membranales del

macrófago junto con las bacterias, durante la fagocitosis, parece variar de acuerdo con la virulencia de la cepa y la viabilidad de estas. Siendo de importancia para la sobrevivencia intracelular de la bacteria el tipo y número de proteínas con las que esté en contacto en el fagosoma, es probable que de confirmarse la existencia de este fenómeno, esta modulación sea crítica para el éxito o fracaso de la infección intracelular (32).

A partir de la internalización total de la bacteria, se empiezan a apreciar ciertas diferencias a nivel de microscopia electrónica. En este momento se observa una inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma (33). Además, se nota un "aflojamiento" de la membrana fagosomal, formándose así un espacio irregular entre la superficie bacteriana y la membrana del fagosoma. En este estado, la bacteria es capaz de reproducirse y acaba por destruir a la célula hospedera, quedando libre para comenzar este proceso una vez más en otra célula disponible. Ahora bien, la causa del ensanchamiento de la membrana fagosomal se desconoce, así como su posible contribución a la sobrevivencia de la bacteria internalizada. Sin embargo, dada la clara indicación de que una inhibición de la fusión fagolisosomal, a diferencia del ensanchamiento, podría tener un significado para la subsistencia de la bacteria, varios grupos se han abocado a estudiar las posibles causas de este fenómeno. Hasta la fecha, los resultados de estos estudios sugieren a tres factores principales como posibles causantes de esta inhibición: los polianiones (34,35), los nucleótidos cíclicos (36), y el amonio (37). Se postuló una interferencia de los polianiones, ya sea en forma de componentes

superficiales o de productos de secreción bacteriana, con la fusión fagolisosomal, por medio de la perturbación en la distribución de cargas de la membrana fagosomal. Se observó que ciertos polianiones, incluyendo los sulfolípidos y el ácido poli-D-glutámico, inhibían la fusión fago-lisosoma de macrófagos peritoneales que habían fagocitado levaduras.

Por otra parte, los cambios en la razón AMPc:GMPc son capaces de modular el grado de fusión fagolisosomal. Se ha propuesto, específicamente, que los aumentos en el AMPc, provocados por la bacteria, pudieran inhibir la fusión. Sin embargo, no existe aún evidencia de que este aumento observado con M. microti y BCG sea la causa y no un efecto del verdadero causante de la inhibición.

Por último, la presencia de amonio en el medio, puede inhibir la fusión fagolisosomal en macrófagos fagocíticos. Por lo tanto, su producción como resultado de los procesos metabólicos bacterianos, fue considerada como una posible fuente del inhibidor. El problema con estos factores (polianiones y amonio) es que ambos han sido probados en cantidades por arriba del rango esperado de concentraciones presentes en una situación in vivo.

El pH intracelular y la relación bacteria-macrófago

Con base en toda esta información sobre la interacción M. tuberculosis-macrófago, y sabiendo cuáles son las "armas" que cada uno posee, resulta claro que uno de los parámetros cuyo

valor en ciertas regiones intracelulares pudiera explicar de mejor manera esta situación. es el pH. Existen seis actividades celulares potencialmente tóxicas para la bacteria, que pudieran ser afectadas por cambios en el pH intracelular. Es muy difícil pensar en otro parámetro cuya modificación, por sí sola, pudiera afectar, al mismo tiempo, a tantos mecanismos implicados en la defensa hospedera.

La importancia del pH quizá resulte más obvia en lo que se refiere a la actividad de enzimas lisosomales. La mayor parte de las enzimas hidrolíticas tiene actividades restringidas a pHs relativamente "ácidos" (el pH intralisosomal es de 4.7). Se sugiere que esto es así, como forma de asegurar una actividad restringida y compartimentalizada en los lisosomas, de enzimas de tan alta capacidad destructora. Con actividades máximas fuera de los valores de pH intracitoplásmicos, se disminuye la posibilidad de una hidrólisis incontrolable. La restricción resulta ser tal, que al aumentar el pH lisosomal en solo una unidad, se pierde un 80% de la actividad hidrolítica total.

Por otra parte, tanto la distribución como la maduración de los precursores de ciertas enzimas lisosomales dependen de pHs ácidos en el sistema vacuolar (32,33). La llegada de algunas enzimas a partir de su sitio de síntesis o maduración a los lisosomas o a las vesículas exocíticas está determinada en gran medida por el pH de las vesículas de transporte y de los sitios blanco. El transporte de los precursores a través del aparato de Golgi así como la actividad de las enzimas procesadoras de este organelo son dependientes del pH de las vesículas de transporte y

de las regiones blanco del aparato: por lo tanto, la maduración se ve afectada al perturbar el pH intralisosomal (39).

Como se expuso anteriormente, la inhibición observada de la fusión fagolisosomal provocada por M. tuberculosis sugiere a éste como mecanismo importante en la sobrevivencia bacteriana. Por un lado, permite a la bacteria evadir el contacto con las enzimas hidrolíticas lisosomales. Por otro, se ha sugerido que durante la fusión fagolisosomal se liberan los ácidos grasos tóxicos, anteriormente descritos, por la acción de lipasas (lisosomales) o fosfolipasas (lisosomales y membranales) (40). En general, la fusión intervacuolar se acompaña por descensos en el pH de las vesículas involucradas. Los endosomas resultantes de la endocitosis mediada por receptores, las vesículas recubiertas, por ejemplo, se acidifican previamente a su fusión con lisosomas. Los primeros experimentos demostrando esto han sido ampliamente confirmados en situaciones muy diversas. Estos primeros experimentos, realizados en 1982, se hicieron con fibroblastos expuestos a alfa2-macroglobulina fluoresceinada. A diferentes tiempos se medía la intensidad de la fluorescencia - siendo ésta indicadora del pH- y así se observó que éste descendía con respecto al del medio y se detectaba una acidez marcada antes del tiempo de fusión con los lisosomas (41). Hasta la fecha, además de haberse reproducido en diversos tipos de células (incluyendo macrófagos), usando diversas sustancias de internalización (LDL, transferrina, etc.) se ha extendido a procesos de fusión fago-lisosoma (42,44) y de fusión membrana viral-endosoma (40). El descubrimiento de esta dependencia de la fusión membrana viral-endosoma del pH, es muy importante, ya que

muestra la generalidad del fenómeno. Estos experimentos fueron hechos con el virus Semliki Forest, cuya membrana superficial se pierde, en el momento de la penetración al citoplasma celular, a través de la membrana endosomal. Se observó que esta penetración era, en realidad, el resultado de la fusión de la membrana viral con la endosomal, y que ésta era marcadamente dependiente del pH ácido (~ 6.0) endosomal. De esta manera, dado que el amonio y las polianiones son agentes potencialmente alcalinizantes, se podría explicar el efecto inhibitorio observado para ambas sustancias.

Por otra parte, se ha visto que la toxicidad del peróxido, importante componente del arsenal celular, es afectada significativamente por el pH (18). A pHs ácidos su toxicidad es máxima, mientras que su reactividad química se vuelve mínima a pH=7. Además, la catalasa micobacteriana tiene una actividad óptima a pH=7.5. Por último, se ha reportado que los ácidos orgánicos, otro importante componente destructor de la célula, son más tuberculocidas, en general, cuando el pH es bajo (45).

Alteración del pH intracelular por otros parásitos (antecedentes)

El buscar productos bacterianos con capacidad de alterar el pH intracelular para intentar explicar, aunque sea parcialmente, la sobrevivencia intracelular de M. tuberculosis resulta ser, por lo tanto, un camino prometedor. De hecho, existen varios parásitos intracelulares, descritos en la literatura, que inhiben la acidificación de su fagosoma (46-48). Legionella pneumophila,

por ejemplo, al inhibir la acidificación del fagosoma bloquea la subsecuente fusión fagolisosomal, observándose el efecto aún con macrófagos activados. Sin embargo, los parásitos muertos son incapaces de inhibir tanto la acidificación como la fusión. Toxoplasma gondii, por otro lado, bloquea ambos procesos también y pierde esta capacidad cuando no es viable o cuando está recubierto por anticuerpos. Por último, recientemente se observó el mismo fenómeno en Nocardia asteroides aunque en este caso los parásitos muertos conservaban estas capacidades. Un aspecto muy interesante de estos experimentos es la observación de que las cepas no patógenas de dichos parásitos inducen un bloqueo parcial de la fusión, lo cual sugiere un papel directo de la inhibición en la determinación de la virulencia del microorganismo (48).

Técnicas empleadas para la medición del pH intracelular (antecedentes)

Existen tres métodos generales para medir el pH intracelular: por medio de bases lipofílicas, mediciones funcionales, y por medio de marcadores endocíticos (45). Las bases lipofílicas han sido muy usadas para determinar los pHs intracelulares. Las membranas celulares son permeables a estos agentes cuando no están cargados (a pH neutro), y son relativamente impermeables una vez que se protonan. Por lo tanto, si se dejan equilibrar con células intactas u organelos, estas bases débiles se acumularán en aquellas vesículas con pH ácido interno. Así pues, el grado de acumulación dependerá de la magnitud del gradiente de pH transmembranal y del volumen total

interno de las vesículas. Las mediciones de este tipo se hacen de dos maneras. Es posible llevar a cabo determinaciones ópticas usando colorantes como el naranja de acridina o la 9-amino acridina. Estas sustancias muestran alteraciones características en sus espectros de absorción e intensidad de fluorescencia como función de su concentración. Así, por mediciones de apagamiento de fluorescencia se puede rastrear la acidificación que ocurre a medida que se concentra la sustancia en compartimentos ácidos. Sin embargo, estas mediciones no se pueden convertir en valores absolutos de pH.

La otra manera, con la que sí se pueden obtener valores reales del pH, es usando bases débiles marcadas radioactivamente, como la ¹⁴C-metilamina. En este caso, se deja equilibrar a la base y luego se recuperan las vesículas por centrifugación o filtración y se determina la radioactividad de la fracción. Se determina el volumen intravesicular y así se calcula la concentración del indicador, lo que da una idea aproximada del pH. Sin embargo, si la fracción vesicular no es altamente homogénea (lo cual es muy frecuente), la determinación se distorsiona. Además, es obvio que la medición es imposible de hacer en células intactas.

Las mediciones funcionales hacen uso de la sensibilidad ácida de ligandos que son internalizados por la célula o de actividades enzimáticas intrínsecas de los organelos de interés. Por ejemplo, el conocido efecto de los pHs bajos sobre la actividad fusogénica de algunos virus con membrana se ha explotado para la identificación de los endosomas como el primer

explotado para la identificación de los endosomas como el primer compartimento ácido al que se expone la partícula viral recién internalizada (43). El pH en los lisosomas se ha podido medir usando ésteres metilados de aminoácidos, los cuales son hidrolizados por las esterases ácidas con su consecuente acumulación en los lisosomas. También existen ensayos funcionales para la medición de la acidificación de los gránulos cromafines y los gránulos densos de las plaquetas. Se basan en la presencia de transportadores en las membranas de estos gránulos, que usan un gradiente de pH para llevar a cabo su función. Es evidente, pues, que en el caso de que se quiera saber el pH de un organelo en condiciones normales, estos métodos no resultan muy convenientes. Sólo se han empleado en casos muy específicos (endosoma viral, gránulos cromafines, etc.), y en ellos resultan de gran valor.

Por último, el uso de indicadores endocíticos resulta ser el método más efectivo ya que con este método se introducen los indicadores de pH selectivamente a los endosomas o los lisosomas por medio de la endocitosis. Okhuma y Poole fueron quienes desarrollaron esta técnica, habiendo encontrado que el dextrán acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) podía ser usado como sonda intracelular para medir el pH (46). La intensidad de emisión a 550 nm. resulta ser proporcional al pH y a la cantidad total de fluoresceína, cuando ésta es excitada a 495 nm. Sin embargo, cuando se excita a 450 nm., la intensidad de emisión a esta misma longitud (550 nm.), sólo depende de la cantidad y no del pH. Por lo tanto, sacando la razón entre las intensidades de

de la excitación a 495 nm. y 450 nm., se puede construir una curva de calibración que relacione esta razón con valores absolutos de pH. Así, refiriéndose a esta curva, Okhuma y Foole hicieron registros de esta razón, en los lisosomas de células bajo diferentes condiciones experimentales. Las células (macrófagos) fueron incubadas durante varias horas a 37 °C en un medio que contenía FITC-dextrán; de esta manera, el marcador se localizó específicamente en los lisosomas. Además, como el dextrán es resistente a la degradación por las hidrolasas lisosomales, éste permaneció en los lisosomas durante el período experimental. El dextrán no internalizado fue eliminado y se midió la intensidad de emisión de los lisosomas encontrando un pH de 4.8. La adición de bases débiles, cloruro de amonio y cloroquina, o ionóforos carboxílicos, nigericina y monensina, rápidamente incrementaban la intensidad de fluorescencia a niveles similares a los correspondientes al medio externo. El quitar estos inhibidores del gradiente de pH lisosomal, resultaba en una restauración del pH original de 4.8 dependiente de ATP. Recientemente, se ha usado este principio acopiando FITC a diversas moléculas que efectúan recorridos bien caracterizados dentro de la célula. Así, moléculas que entran por endocitosis mediada por receptores, pinocitosis, o fagocitosis han sido acopiadas a este marcador, que además es fácil de unir covalentemente a una gran diversidad de moléculas, y consecuentemente se han determinado los diferentes pHs a los que van siendo expuestas a través de sus caminos particulares (41). La ventaja de poder hacer mediciones del pH intracelular en células vivas y en condiciones relativamente normales (no se ha

visto que el dextrán induzca ninguna anomalía significativa en el funcionamiento celular) nos llevó a escoger este método sobre los demás.

II OBJETIVO Y JUSTIFICACION

El objetivo de este proyecto es caracterizar los efectos de las proteínas de los filtrados del cultivo de Mycobacterium tuberculosis sobre el pH intralisosomal de los macrófagos. Si se toma como hipótesis inicial la existencia de este efecto, es posible proponer al menos tres modelos para su manifestación (fig. 1). En primer lugar, podría ser un efecto a distancia ocasionado por la secreción y consecuente difusión del antígeno bacteriano, de manera que el macrófago entrara en contacto con el producto antes de hacerlo con la bacteria misma. En este caso, el producto sería internalizado por el macrófago a través de la pinocitosis afectando a los lisosomas, de manera que la bacteria se enfrentaría a una célula con lisosomas dañados, facilitando su sobrevivencia intracelular. Esta facilitación estaría dada a través de la inhibición de la fusión o simplemente a través de la inactivación de enzimas lisosomales.

Un segundo modelo requeriría que, una vez que la bacteria sea internalizada, la secreción del producto en un volumen tan pequeño permitiera alcanzar una concentración alta por medio de muy pocas moléculas y, por lo tanto, con la relativa rapidez y eficiencia necesarias para inhibir la fusión fagolisosomal.

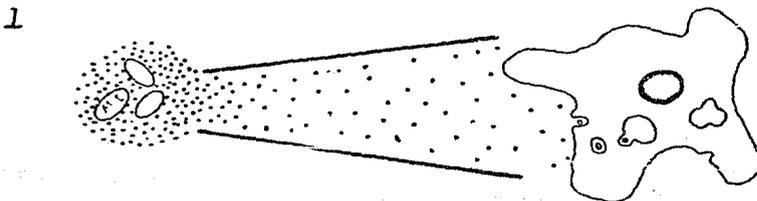
Por último, la tercera posibilidad sería que el producto ejerciera su efecto en el compartimento fagolisosomal directamente. Aunque ya se indicó que se ha observado inhibición de la fusión fago-lisosoma, estos estudios fueron hechos a través de observaciones al microscopio electrónico en donde se reportaron diferencias en los porcentajes de las fusiones; las

afirmaciones que se pueden hacer, por lo tanto, son relativas y sujetas a las limitaciones de confiabilidad implícitas en el muestreo microscópico. Además, en estos mismos estudios se vió que bajo ciertas condiciones no se observa esta inhibición. Por lo tanto, es posible continuar el análisis de este modelo.

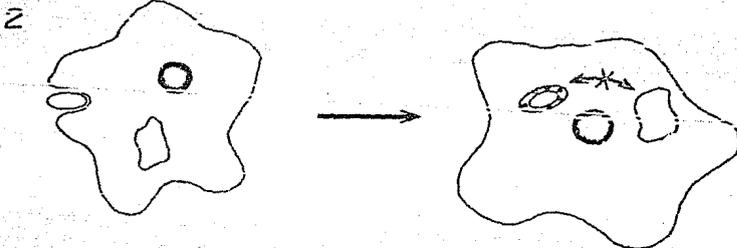
Con base en estas tres posibilidades, se pensó que si la detección del pH se realiza en lisosomas, usando las proteínas del filtrado (CFPE) sería más factible registrar un efecto (la posibilidad 1 o 3), que si se usaba a la bacteria completa desde un inicio (sólo se observaría con seguridad la 3). Para comenzar se decidió hacer la medición desde los lisosomas, básicamente por razones técnicas. Dadas las tres posibilidades, a priori, resulta igualmente coherente hacer la medición en el fagosoma que en el lisosoma; sin embargo, la medición en el lisosoma resulta mucho más sencilla. Por un lado, ofrece la posibilidad de evadir la manipulación directa de esta bacteria patógena durante los experimentos, que si resulta necesaria para efectuar mediciones en fagosomas; por otro, se evita el problema de acoplar el indicador de pH a la bacteria sin afectar su viabilidad.

El uso del CFPE tiene además dos ventajas importantes. Por un lado contiene, aparte de los posibles factores de secreción, proteínas superficiales de la bacteria, resultantes de la muerte y los procesos de recambio de la población. Así, se tiene la posibilidad de ver un efecto causado por cualquiera de estos dos tipos de productos. Además, el CFPE ha sido usado en otros proyectos tanto dentro como fuera de este laboratorio, de manera

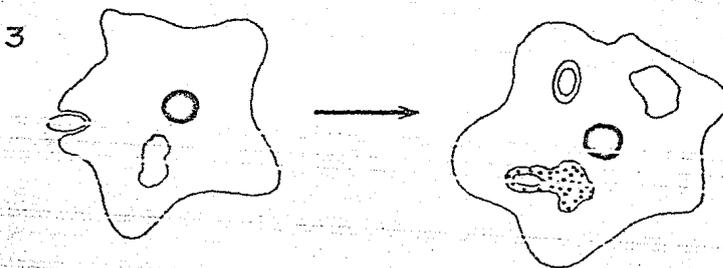
POSIBLES EFECTOS DE LA INGESTION DE
C.F.P.E



Inactivación lisosomal a distancia



Inhibición de fusión fagosoma - lisosoma



Inactivación lisosomal directa

FIGURA 1

Tres posibles formas de acción para un agente alcalinizante de origen micobacteriano (ver texto).

que está bien caracterizado electroforéticamente: patrón de bandeo (fig. 2) y análisis densitométrico.

Otra elección metodológica que vale la pena justificar, es el uso de una línea celular inmortal. Los cultivos de células extraídas de un animal, peritoneo de ratón, por ejemplo, resultan muy heterogéneos, representando poblaciones celulares de características muy diversas (incluso de dudable identidad macrofágica). Para este tipo de estudio, lo mejor era empezar usando células relativamente homogéneas para evitar resultados muy variables y de poca reproducibilidad.

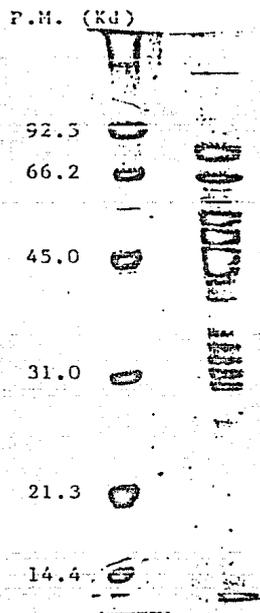


FIGURA 2

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de GFPE (proteínas de filtrado de cultivos micobacterianos) de la cepa H37Rv. Tinción de azul de Coomassie.

III MATERIAL Y METODOS

1. Reactivos

- medio de Lowenstein-Jensen (Difco, E.U.A.)
- fluoruro de fenil metil sulfonato (PMSF) (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)
- medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY)
- suero fetal bovino (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY)
- penicilina G (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)
- estreptomycin (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)
- dextrán fluoresceinado de peso molecular promedio de 70,000 (FD-70) (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)
- monensina (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)
- albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)
- transferrina (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)

2. Equipo

- filtros Whatman #3 (W & R Solston Lim., England)
- filtros de membrana de 0.45 y 0.22 μm . (Millipore Corp., Bedford, Mass.)
- pozos estándares de cultivo celular de 16 mm. de diámetro (Costar, Cambridge, Mass.)
- espectrofluorómetro (SLM Aminco, E.U.A.)
- celdillas de vidrio pulido de 3x3x12 mm. (NSG, E.U.A.)

3. Células

- Línea celular murina monocítica-macrofágica J774A.1
- Línea celular murina monocítica-macrofágica P388D.1
(ver Tabla 1)

4. Bacterias

- Mycobacterium tuberculosis de la cepa H37Rv (TMC' 102)
(cepa virulenta) (Escuela de Ciencias Biológicas,
Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.)

5. Medios de cultivo

- Proskauer-Beck-Youmans (PBY):

0.5% asparagina
0.5% fosfato de monopotasio
0.5% sulfato de potasio
2.0% glicerol

Se disuelven en agua destilada y se ajusta el pH a 6.8-7.0
usando hidróxido de sodio al 40%. En seguida se adiciona
citrato de magnesio 0.15%. Se esteriliza en autoclave a
15 libras durante 20 minutos.

- medio de Eagle modificado por Dulbecco
(para uso en atmósfera de 5% CO₂) suplementado con:

	2
penicilina G	100 unidades/ml
estreptomocina	100 ug/ml
suero fetal bovino	10%
HEPES	20 mM
bicarbonato de sodio	2.0 mg/ml

- medio de Eagle modificado por Dulbecco
(para uso en situaciones de presión atmosférica de CO₂)
suplementado con:

penicilina G	100 unidades/ml
estreptomocina	100 ug/ml
piruvato de sodio	0.85 mg/ml
HEPES	10 mM

6. Cultivos bacterianos

Las bacterias liofilizadas se resuspendieron en medio libre
de proteínas PBY y se subcultivaron en medio de Lowenstein-
Jensen para producir cultivos de inóculo en matraces Erlenmeyer
de 250 ml., con 100 ml. de PBY. Los cultivos se mantuvieron a
37 C hasta alcanzarse una fase de crecimiento estacionario, esto
es, hasta cubrirse uniformemente la superficie del medio PBY

(entre 4 y 8 semanas). En este momento, se cosecharon las bacterias de su medio de crecimiento (15).

7. Preparación del extracto de proteínas a partir de filtrados de cultivo micobacteriano (CFPE) (según la técnica reportada en la ref. 15)

El medio de cultivo fue separado de las masas bacterianas por filtración a través de un filtro Whatman #3 y pasado sucesivamente a través de filtros de membrana de 0.45 y 0.22 μm . Las proteínas del filtrado se aislaron por medio de precipitación a 4 C con cristales de sulfato de amonio a un nivel de saturación del 100%, seguido por centrifugación a 4 C durante 30 minutos a 60,000 x g. El precipitado se resuspendió en 5 ml. de solución salina amortiguada por fosfatos (PBS), pH 7.4, que contenía 0.2 mg/ml de PMSF como inhibidor de proteasas y se dializó repetidamente a 4 C seis veces contra 2L de PBS. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (52). se ajustó a 6mg/ml en PBS/PMSF y se distribuyó en raciones de 0.5 ml. que se almacenaban congeladas a -70 C hasta el momento de su uso.

8. Condiciones de cultivo celular

Las células fueron cultivadas en pozos estándares de cultivo de 16 mm de diámetro con 2×10^6 células por pozo e incubadas a 37 C en una atmósfera humedecida, con 5% CO_2 por lo menos 24 horas antes de iniciar el protocolo experimental. Después se incubaron con medio que contenía FD-70 a una

concentración de 2 mg/ml durante 24 horas. Subsecuentemente, las células se lavaron dos veces con PBS 0.01 M y luego se incubaron con medio fresco, libre de FD-70. Todas las manipulaciones experimentales posteriores se iniciaron tres horas después. Este periodo fué incorporado al protocolo para asegurar la presencia del FD-70 exclusivamente en los lisosomas: sin este periodo, el dextrán se encontraba distribuido en la membrana plasmática, en los endosomas y en los lisosomas y, por lo tanto, se obtenían fluorescencias correspondientes a pHs superiores al lisosomal. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripano (> 95%).

9. Registros espectrofluorométricos

Los registros de intensidad de fluorescencia se obtuvieron con un espectrofluorómetro SLM. Las células preincubadas con FD-70 se incubaron en medio modificado para situaciones con presión atmosférica de CO_2 . Este medio mantiene un pH de 7.2 al estar en contacto con la atmósfera, a diferencia del medio comunmente usado que requiere de una atmósfera con 5% de CO_2 para mantener este valor. Se incubó con CFPE; las condiciones específicas para cada sistema se detallarán más adelante. Al cabo del periodo de incubación correspondiente, las células se lavaron tres veces con PBS y luego se les añadió una solución de EDTA al 0.02%. Posteriormente, se resuspendieron usando un polímero de hule; estas células en suspensión, provenientes de un sólo pozo, se pasaron a una celdilla de vidrio pulido de 3x3x12 mm. No se observó diferencia alguna usando células suspendidas en PBS, en lugar de la solución de EDTA al

0.02%. La duración del periodo entre el primer lavado con PBS y su colocación en la celdilla fue menor a dos minutos. Las muestras se excitaron a 495 nm e inmediatamente después a 450 nm. Ambas intensidades de emisión se registraron a una longitud de onda de 550 nm (50). Los tiempos de estimulación fueron menores de 5 segundos en duración usando una apertura del "slit" de 8 mm, tiempo durante el cual no se apreció una disminución significativa ($< 0.5\%$) en la intensidad de fluorescencia (51).

10. Curva de calibración

Las células preincubadas con FD-70 se resuspendieron en soluciones amortiguadoras de Tris-maleato que contenían 20 μM de monensina y que cubrían un rango de 4.5-9.0 unidades de pH. También se incluyeron las células expuestas a medio con 500 $\mu\text{g/ml}$ de CFPE durante 30 minutos antes de ser resuspendidas. Se registraron las intensidades de emisión a 550 nm para las longitudes de onda de excitación de 495 nm y 450 nm, como se describió previamente (fig. 3). Cabe señalar que la curva que se obtuvo usando únicamente el marcador, FD-70, no fue significativamente diferente de la figura 3 (prueba t de Student $p < 0.01$).

11. Condiciones de incubación con CFPE

Las células preincubadas con FD-70, se incubaron durante 5 min. a 4 C con medio modificado que contenía CFPE (500 $\mu\text{g/ml}$). Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con medio fresco, libre de FD-70 a 37 C. Las mediciones se llevaron

I 495 / I 450

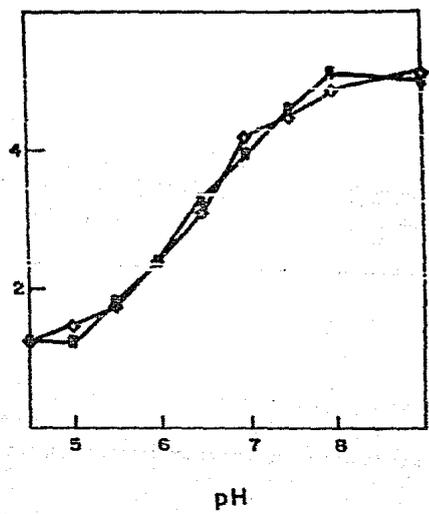


FIGURA 3 Curva de calibración. Mediciones de células estándar (■) y de células pre-incubadas conCFPE (500 ug/ml) durante 30 minutos (◊).

a cabo en cultivos idénticos en paralelo durante los siguientes 90 min. Los resultados se muestran como valores de pH, obtenidos al referirse a la curva de calibración previamente registrada. Otro grupo de células preincubadas con FD-70, se incubó con medio modificado con CFPE (500 ug/ml) a 37 °C durante 90 min., y se hicieron medidas de intensidad durante esta incubación. Un tercer grupo de células se incubó como en el primer caso (4 °C, 5 min.), usando CFPE calentado durante 30 min. a 56 °C. Finalmente, las condiciones de incubación y mediciones para las células de la línea P368 D.1 fueron idénticas a aquellas descritas para el primer caso. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano (> 90%). Este porcentaje de viabilidad no fue significativamente menor al del control. Salvo donde se especifica explícitamente, las células se mantuvieron a 37 °C y sólo durante el periodo de medición (< 10 segundos) se manejaron a temperatura ambiente.

12. Condiciones de incubación con otras proteínas

Se incubaron cultivos de J774 A.1 preincubados con FD-70 en paralelo, con transferrina, BSA, o CFPE a una concentración de 500 ug/ml. Las incubaciones se llevaron a cabo como anteriormente se describió para el primer caso (4 °C, 5 min.).

13. Análisis de los resultados

Los resultados se expresan como cambios en pH relativos al valor de la línea basal:

$$\Delta \text{pH} = (\text{valor de pH experimental}) - (\text{valor basal de pH control } 4.8)$$

Para la curva de calibración, los resultados se expresan como la razón entre las intensidades de emisión a 550 nm excitando a 495 nm y a 450 nm:

$$I_{495}/I_{450} = \frac{\text{Intensidad de emisión a 550 nm por excitación a 495 nm}}{\text{Intensidad de emisión a 550 nm por excitación a 450 nm}}$$

(Ver fig. 4).

PROTOCOLO

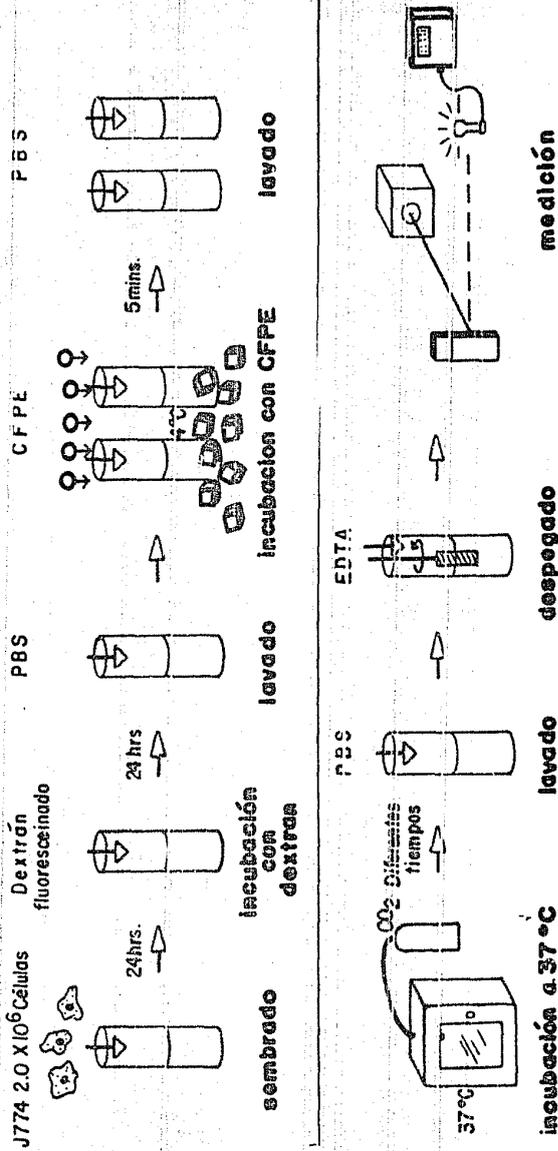


FIGURA 4 Esquem general del protocolo experimental empleado en la determinación de los efectos de CFPE sobre el pH lisosomal en macrófagos.

IV RESULTADOS

Erectos de CFPE de Mycobacterium tuberculosis sobre el pH lisosomal de macrófagos J774.

La incubación de cultivos de macrófagos cargados con FD-70, con 500 ug/ml de CFPE a 4 C durante 5 min. indujo ciclos múltiples de alcalinización-acidificación en los lisosomas de estas células (fig. 5A). Usando estas condiciones de incubación se esperaba registrar el efecto de aquella fracción del CFPE que se adhiere a la membrana; aquella que no se pierde en los lavados. Además, se pensó que las condiciones de incubación permitirían ver el erecto mas claramente ya que existiría una internalización sincronizada de los productos bacterianos debido a que a 4 C la dinámica de la membrana celular (pinocitosis, endocitosis mediada por receptores, fagocitosis) prácticamente se anula. Esta cinética de alcalinización-acidificación se determinó utilizando la curva de calibración mostrada en la fig. 3. El primer ciclo presenta un máximo 30 min. después del lavado con PBS. Es un proceso reversible que alcanza una alcalinización máxima con respecto al pH basal (4.8) de más de una unidad de pH. Se observa un segundo pico 60 minutos después del lavado. Al igual que con el primero, es reversible y de una magnitud comparable.

El experimento que se muestra en la fig. 5A se repitió, teniendo a los antígenos micobacterianos presentes durante todo el periodo de registro de 90 min., para ver si una sincronización de la internalización inicial de los antígenos es un prerequisite

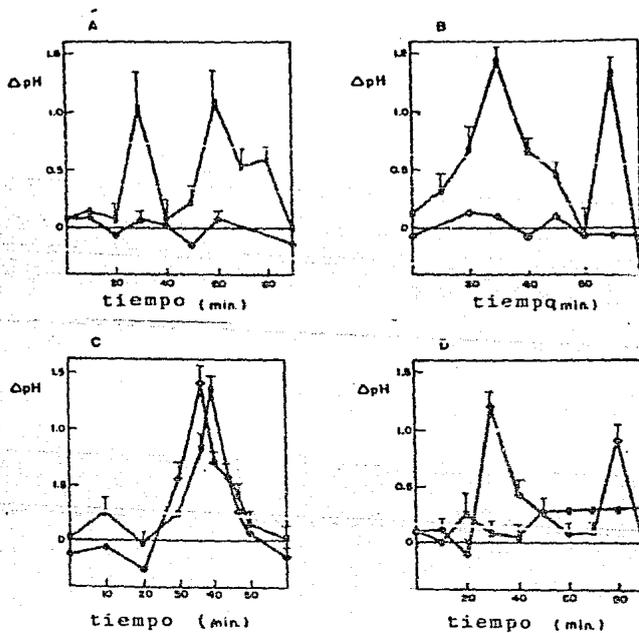


FIGURA 5

Cinéticas de alcalinización intralisosomal de macrófagos en presencia de CFPE.

- A: Células de la línea J774 se incubaron 5 min. a 4°C en presencia (■) o en ausencia (◆) de CFPE.
- B: Células de la línea J774 se incubaron 90 min. a 37°C en presencia (■) o en ausencia (◆) de CFPE.
- C: Células de la línea P388 (◆) o J774 (■) se incubaron 5 min. a 4°C en presencia de CFPE.
- D: Células de la línea J774 se incubaron 5 min. a 4°C en presencia de CFPE (◆) o de CFPE preincubado 10 min. a 36°C (■).

Los resultados se expresan en valor medio \pm e.s.

para los ciclos observados de alcalinización-acidificación. Las observaciones indican (fig. 5B) que el uso de este periodo largo de incubación resulta en una cinética ciclica y unos valores máximos de pH muy similares a los que anteriormente se describieron (5A).

Se prosiguió a investigar la sensibilidad de esta acción alcalinizante, al calor, como paso inicial en la caracterización de el (los) agente(s) efector(es). Cuando el filtrado de antígenos se calentó durante 30 min. a 56 °C, la magnitud de la alcalinización lisosomal se redujo significativamente (prueba t de Student - $p < 0.05$) (fig. 5D).

Efectos de CFPE sobre el pH lisosomal de macrófagos de la línea P388 D.1

Con la idea de empezar a explorar la generalidad de esta alcalinización, se usó otra línea celular con características distintas a la J774, la P388, para su posterior comparación. Se escogió esta línea en particular porque de las cuatro líneas murinas macrofágicas comúnmente utilizadas (J774, WEHI-3, PUS-1.8, P388) las que resultan menos parecidas entre sí son la J774 y la P388 (53) y, por lo tanto, de mayor interés para un estudio comparativo. Además, estas células (tabla 1) tienen, entre otras características, una composición de enzimas lisosomales diferente a la de las J774: tiene casi cinco veces menos adenosina deaminasa y casi seis veces menos β -glucuronidasa. Esta diferencia en composición lisosomal resultaba de interés particular dada la naturaleza ciclica de la alcalinización: si la

(ref. 53, 54)

TABLA 1

CELULAS

	línea J774.1	línea P388-D	macrófagos residentes
Area (um ²)	226.3	348.3	208.7
Diámetro mayor (um)	18.7	25.1	24.0
Razón núcleo-citoplasma	.67	.35	.36
Adenosina deaminasa (nmol/hr/mg.prot.)	3190	640	4170
β - Glucuronidasa (nmol/hr/mg.prot.)	530	90	130
Fosfatasa ácida (nmol/hr/mg.prot.)	2000	1870	860
Peroxidasa	0%	0%	.4%
Lisosima	100%	100%	100%
5'-Nucleotidasa	87.2%	33.3%	95.7%
Antígenos			
Leucocito	100%	100%	99%
Macrófago	100%	83%	100%
Receptor C3bi	89%	98%	98%
Receptor II para Fc	98%	97%	97%
Mac-2	90%	95%	63%
Mac-3	98%	97%	100%
Thy-1	93%	0%	0%
Fagocitosis de eritrocitos recubiertos de IgG	18.2%	88.1%	90.6%
Pinocitosis	97%	98%	100%
Secreción de lisosima (ug/10 ⁵ céls)	0.01	1.24	4.41
Secreción de β -glucuronidasa "	0.07	0.21	0.04
Incorporación de timidina tritiada en 24 horas	81.1%	81.0%	4.1%

recuperación del pH basal que se observó en los ciclos era consecuencia, por lo menos parcialmente, de una degradación lisosomal. se pensó que la comparación de estas dos líneas podría proporcionar información interesante.

La exposición de células de la línea P388 D.1 a 500 ug/ml de CFPE durante 5 min. a 4 °C indujo un efecto alcalinizante similar, durante los primeros 60 min. (fig. 5C), al observado para las células de la línea J774 A.1 (fig. 5A). No se hicieron registros a tiempos más largos.

Dependencia de la alcalinización en la concentración de CFPE.

Para ver si la alcalinización lisosomal es un proceso saturable y para definir el rango de concentraciones de CFPE en los que se observa el efecto, se registraron las cinéticas de alcalinización y sus pH para varias concentraciones de CFPE. Los incrementos máximos de alcalinización lisosomal aumentaron en función de la concentración dentro de un rango de 100-1000 ug/ml (fig. 6). Llegando a un nivel de saturación aparente de aproximadamente 700-1000 ug/ml. El curso temporal de los ciclos, sin embargo, no resultó significativamente diferente dentro de este mismo rango de concentración.

Efectos de otras proteínas sobre el pH lisosomal de macrófagos J774A.1.

A partir de los datos sobre la dependencia de la alcalinización en la concentración de CFPE (fig. 6), se probaron otras proteínas usando una concentración de 500 ug/ml de éstas.

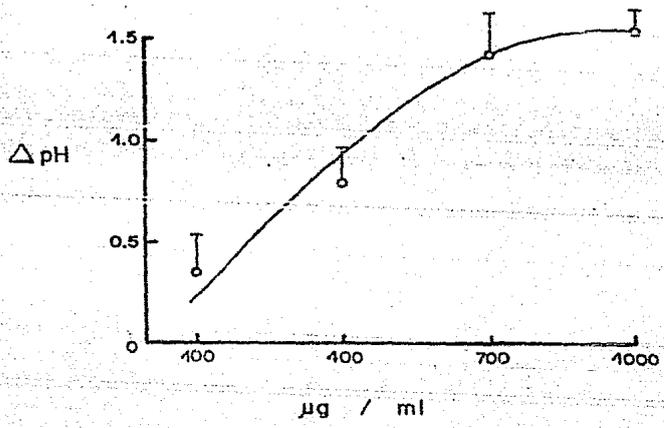


FIGURA 6 Dependencia de la alcalinización en la concentración de CFPE.

Se escogieron dos proteínas con vías de internalización celular distintas para observar sus efectos sobre el pH lisosomal. La BSA se internaliza por medio de la pinocitosis de fase fluida, mientras que la transferrina se internaliza por medio de la endocitosis mediada por receptores. Además, el destino final de estas dos proteínas es diferente: la BSA llega a lisosomas y la transferrina se recicla al medio extracelular después de haberse desacoplado del hierro en el endosoma. Se observó una acidificación residual cercana a la magnitud de aquella registrada para CFPE calentado (fig. 5D), pH 0.5, cuando los macrófagos se incubaron con estas proteínas (fig. 7).

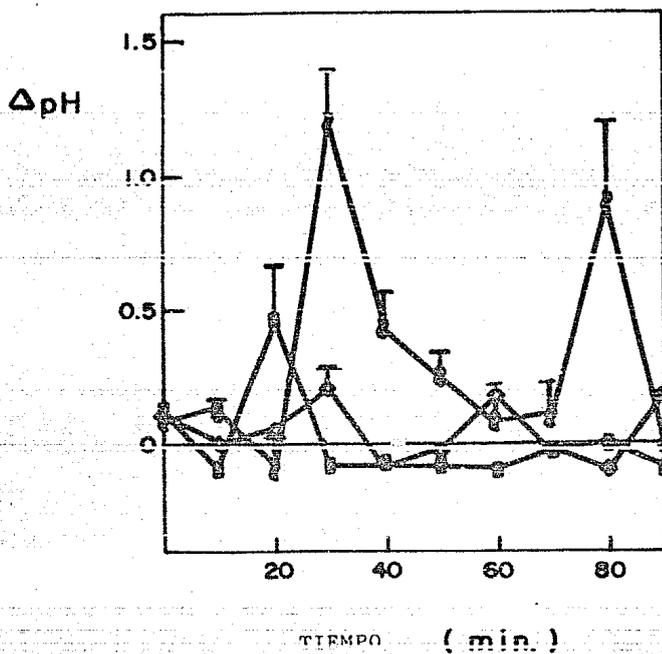


FIGURA 7

Efectos de otras proteínas sobre el pH lisosomal de células J774. Células pre-incubadas con albúmina (◇), transferrina (■), CFPE (△) como indicado para CFPE en la figura 5A.

Los resultados se expresan como valor medio + s.e.

V DISCUSION Y CONCLUSIONES

Estos experimentos muestran que la incubación de células murinas de características macrofágicas con un extracto de proteínas del filtrado de cultivos de Mycobacterium tuberculosis (CFPE) induce una alcalinización reversible, dependiente de la concentración, saturable y de naturaleza cíclica en el lumen lisosomal. La cinética cíclica fue confirmada por los resultados obtenidos a partir de la incubación prolongada de células con CFPE (fig. 5B), en donde una sincronización de la internalización inicial de los antígenos mostró no ser necesaria para la observación de los ciclos de alcalinización-acidificación. Además, el hecho de que el fenómeno de alcalinización observado en las células de la línea J774 A.1 (fig. 5C) fue similar, en los primeros 60 min. de registro, al observado para aquellas de la línea P388 D.1, sugiere que estos efectos son reproducibles en una línea celular con composición enzimática distinta (54). Esto implica que la alcalinización no se ve afectada, por lo menos en su primer ciclo, por la capacidad hidrolítica diferencial de estas líneas. Pensando en la posibilidad de que el restablecimiento del pH basal dentro de los ciclos fuera, por lo menos parcialmente, consecuencia de una degradación intralisosomal, se esperó ver diferencias entre estas células; sin embargo, al no haberlas observado no permite concluir nada sobre esta especulación. Además, este resultado implica que el efecto alcalinizante no se presenta de manera exclusiva en una línea celular específica sino que también parece ocurrir en una línea de características importantemente diferentes (tabla 1)

(53).

Finalmente, la observación de que ni los antígenos micobacterianos calentados, ni proteínas tales como la albúmina o transferrina son capaces de inducir ciclos de alcalinización-acidificación en estos lisosomas (figs. 5D y 7) sugiere a un componente antigénico activo termolábil, como responsable de los resultados reportados. Cabe señalar que a pesar de que la incubación con transferrina parece causar una alcalinización transitoria (fig. 7) ésta no resulta ser significativa (prueba t de Student - $p < 0.05$).

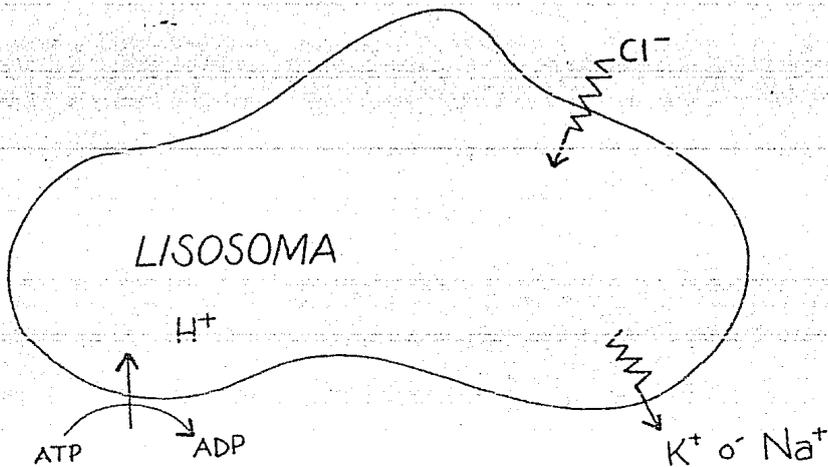
Haciendo unos cálculos sencillos podemos ver que la cantidad del posible agente alcalinizante responsable del efecto observado es de magnitud comparable a las cantidades efectivas de sustancias que tienen afinidades altas por su ligando. Suponiendo un peso molecular de 50,000 d (el peso molecular promedio del conjunto de proteínas presentes en el CFPE), 500 ug/ml resultan en una concentración de 10 μM ; es decir, aproximadamente 5 nanomolas por cada 2×10^6 células. Las Kms de algunas enzimas comunes (la hexocinasa de la glucosa, la glutamato deshidrogenasa, la aspartato aminotransferasa, etc.) están precisamente en el rango micromolar. Si además consideramos que el agente activo está representado por un 10% del total de las proteínas (estimación muy conservadora, dada, por la cantidad de proteína que se queda adherida a la membrana del macrófago después de lavar con PBS (comunicación personal de Verónica Mondragón)), entonces tendremos 0.25 nmolas de agente por 1×10^6 células. Estos cálculos representan cantidades máximas, ya que

dada una incubación a 4°C durante 5 min.. la adhesión considerada del 10% resulta muy poco probable: seguramente la cantidad real es sólo una fracción de esa proporción. Además, de este 10% capaz de adherirse, sólo una fracción sería responsable del efecto en sí (el 10% está representado por por lo menos 4 proteínas distintas). Es claro, por lo tanto, que aún considerando condiciones máximas, el rango de concentración usado es comparable con rangos de sustancias que actúan de manera muy específica, como las enzimas.

Interpretación de los resultados.

1. Una explicación plausible para los resultados obtenidos requeriría la existencia de un(os) antígeno(s) micobacteriano(s) capaz(es) de interferir con la función de alguna estructura lisosomal esencial para el proceso de acidificación.

Hasta hace poco, se pensaba que el bajo pH del lisosoma estaba dado por un equilibrio de Donnan; sin embargo, se ha establecido que la responsable es una bomba de H^{+} -ATPasa (55,56) (fig. 6). Los experimentos de Okhuma y cols. con FITC-dextrán muestran una acidificación casi inmediata al suministrar Mg^{++} -ATP a lisosomas aislados de hepatocitos (56). Esta acidificación es insensible a oligomicina, NaN₃, DCCD (inhibidores de H^{+} -ATPasas mitocondriales) y a vanadato (inhibidor de las H^{+} -ATPasas gástrica y de hongos), pero sensible a NEM (compuesto al que son sensibles las H^{+} -ATPasas mitocondriales, gástrica y de hongos). La sustitución del Mg^{++} por Cu^{++} o Zn^{++} también inhibió por completo la acidificación. La composición catiónica externa



• modelo actual del mantenimiento del gradiente de pH en lisosomas

FIGURA 8

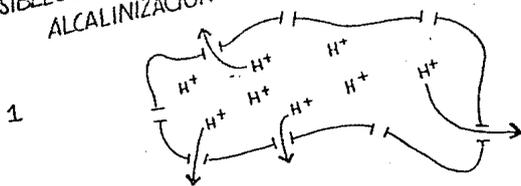
Modelo actual para explicar la diferencia en pH del citoplasma y los lisosomas (49).

(Na^+ , K^+ o colina) no tuvo efecto sobre la acidificación; sin embargo, la presencia de aniones externos permeables potenció la translocación de protones dependiente de ATP. En ausencia de aniones externos, la velocidad de acidificación se redujo. Estos resultados indicaron la posibilidad de la existencia de un mecanismo electrogénico para la ATPasa. sin embargo, no excluían la posibilidad de un transporte electroneutro de protones y aniones. Usando un marcador fluorescente sensible a potencial, Reeves y Harikumar mostraron en lisosomas de riñón de rata la creación de un potencial positivo interno después de la adición de ATP al medio (SS). La presencia de un anión permeable externo (Cl^-) contrarrestaba este efecto. Así, previniendo la formación de un gradiente eléctrico para los protones, los aniones externos facilitan el desarrollo de un gradiente químico mayor para protones; es decir, un pH intralisosomal más bajo.

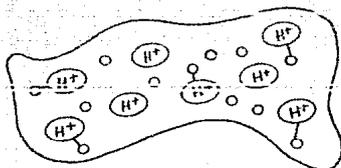
2. Dada esta situación lisosomal, la interferencia del agente(s) alcalinizante(s) debe ser sobre la permeabilidad de la membrana, la bomba H^+ ATPasa o bien la actividad química de los protones en el lumen (fig. 9).

Podemos descartar un efecto sobre el flujo aniónico por dos razones. Primero, porque el flujo aniónico contribuye a la rapidez de la acidificación de lisosomas aislados, pero realmente poco al valor final de pH intralisosomal. Además, en lisosomas que ya tienen un pH ácido, la eliminación de aniones es fácilmente contrarrestada por un flujo hacia fuera de cationes en el lisosoma (K^+ , Na^+) (fig. 8). En segundo lugar, está el hecho de que la alcalinización observada se da con mucha rapidez: a los

POSIBLES MECANISMOS DE ACCION DE C.F.P.E. EN LA
ALCALINIZACION LISOSOMAL

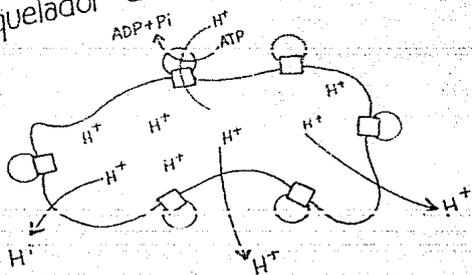


ionoforo



quelador de H^+ s

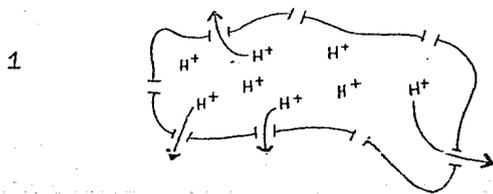
3



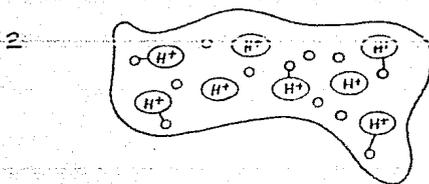
inhibidor de ATPasa

FIGURA 9 Tres posibilidades para los mecanismos de acción del (de los) agente(s) alcalinizante(s) micobacteriano(s) (ver discusión).

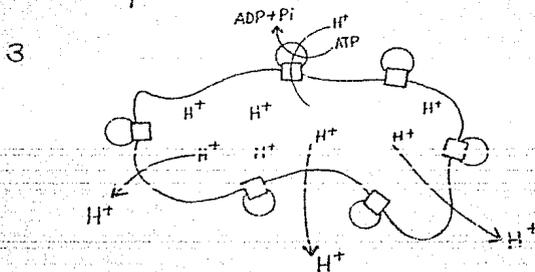
POSIBLES MECANISMOS DE ACCION DE C.F.R.E. EN LA
ALCALINIZACION LISOSOMAL



ionoforo



quelador de H^+ s



inhibidor de ATPasa

FIGURA 9 Tres posibilidades para los mecanismos de acción del (de los) agente(s) alcalinizante(s) micobacteriano(s) (ver discusión).

30 mins. en un intervalo de 5 mins.. La eliminación de aniones produce un efecto que se desarrolla durante intervalos largos de tiempo, hasta que el potencial de flujo de K^+ y Na^+ intralisosomal se agota y la difusión de H^+ a través de la membrana lisosomal relativamente impermeable se vuelve significativa. Como se observa en la fig. 5A, la alcalinización registrada es súbita e inmediata, considerando que el intervalo de tiempo reportado entre la internalización de una sustancia y la subsecuente fusión de su endosoma con el lisosoma es de aproximadamente 30 min.

3. Ahora bien, el hecho de que el segundo ciclo de alcalinización comienza solamente después de que el pH inicial se ha regenerado, sugiere una dependencia del pH para el modo de acción de este agente.

Una dependencia del pH en el daño mediado por toxinas de bacterias y plantas y en la entrada a células por otros tipos de parásitos intracelulares ha sido ampliamente reportada. De estas toxinas las mejor caracterizadas son la de la difteria, la exotoxina de Pseudomonas aeruginosa, y la toxina de planta modeccina (57-59). Cada una de éstas consiste de dos subunidades, A y B, donde la A, la más pequeña y lleva la actividad tóxica, mientras que la B es la responsable de la translocación de la cadena A al citoplasma celular. Las cadenas A inhiben la síntesis de proteínas. Tomando a la difteria, la mejor caracterizada, como ejemplo, ésta se adhiere a receptores en la membrana celular y es internalizada. La penetración ocurre

desde el endosoma y requiere un pH ácido (pH < 5.5). De hecho, se puede bloquear la intoxicación por medio de agentes que elevan el pH vacuolar, y después contrarrestar el bloqueo al bajar el pH del medio a 5.0 o menos. lo cual induce penetración directa a través de la membrana plasmática.

Se ha visto que a pH ácido la toxina sufre un cambio conformacional irreversible que aumenta su solubilidad en membranas. Este cambio resulta en la formación de canales dependientes de voltaje transmembranales, por donde se cree pasa la subunidad A.

Por otro lado la entrada de algunos virus con capa lipídica constituye uno de los casos mejor estudiados donde intervienen umbrales de pH para la observación de una función en particular. El virus de la influenza (60) y el Semliki-Forest (43), los dos casos mejor estudiados hasta el momento, tienen glucoproteínas de membrana que al estar en contacto con el pH ácido del endosoma sufren un cambio conformacional que las activa, permitiéndoles así mediar la fusión de la membrana viral con la endosomal. De esta manera, el virus es liberado al citoplasma celular. Los ionóforos y bases débiles inhiben esta entrada y cuando se exponen los virus a pHs bajos se observan fusiones membranales.

4. La cinética de pulsos observada se podría entonces explicar con base en una disminución de la actividad fuzogénica lisosomal como consecuencia de la alcalinización (41,42) y en una dependencia en el pH de la acción del agente presente en el CFPE, como la descrita anteriormente. Es decir, una vez que el lisosoma ha sido alcalinizado por su fusión con vesículas

pinocíticas cargadas de CFPE. éste queda afectado en su capacidad de fusionarse con otras vesículas. Por lo tanto, sólo hasta que recupera su valor normal de pH al metabólicamente neutralizar, por degradación lisosomal, al agente, puede fusionarse con una segunda carga antigénica vesicular y, así observarse un nuevo ciclo de alcalinización. La dependencia del pH sugerida para el agente, explicaría el hecho de que las vesículas pinocíticas no parezcan estar afectadas en su actividad fusogénica (la alcalinización se mide en lisosomas). Esto implicaría que la alcalinización requiere un umbral de pH mínimo que se encuentra entre los valores basales de los lisosomas (4.7-5.0) y aquellos de los pinosomas (6.0) para efectuarse.

La inhibición de la fusión fago-lisosoma (39) mediada por un efecto directo sobre lisosomas (34,35) y no fagosomas, como anteriormente fue sugerido (61,62), es una consecuencia probable de la alcalinización observada. El hecho de que otras observaciones (63) hayan indicado que aún cuando la fusión fago-lisosoma no se inhibe por opsonización de las bacterias, una gran proporción de las micobacterias sí sobreviven, apoya la idea de un efecto directo sobre la función lisosomal de un agente alcalinizante.

5. Volviendo a los modelos mencionados anteriormente (fig. 1), veamos que se puede concluir a partir de los resultados obtenidos. Las condiciones experimentales permiten predecir que si en la infección in vivo ocurre la primera posibilidad, la inactivación lisosomal probablemente sea de naturaleza cíclica. La posible ventaja adaptativa de un efecto tal es difícil de

concebir aunque los datos no excluyen esta posibilidad. El segundo modelo resulta el menos probable porque, aunque tampoco se ha demostrado su inexistencia (se requeriría hacer experimentos con la bacteria intacta), el(los) factor(es) alcalinizante(s) descrito(s) aquí parece(n) tener un umbral de pH para su acción por debajo del pH endosomal. Por último, la tercera posibilidad parece ser la más probable porque es consistente con un umbral de acción y porque bajo estas condiciones, donde existiría una fuente de producción continua de agente(s) en el lisosoma, el pH se mantendría alto a pesar de la degradación por enzimas lisosomales y el recambio celular.

VI PERSPECTIVAS

Las perspectivas para trabajo futuro son amplias y estimulantes. Creo que el camino más interesante está en la búsqueda del mecanismo molecular del fenómeno. El reproducir el efecto en lisosomas aislados constituye el primer paso. Se puede luego proseguir a comparar el efecto del CFPE con aquel producido por ionóforos (monensina, nigericina), inhibidores de la H⁺-ATPasa, la ausencia de ATP en el medio y bases débiles. Comparando cinéticas y magnitudes de alcalinización se tendrá idea del posible mecanismo. A partir de esta información, se podría buscar una proteína en el filtrado con las características correspondientes. Por ejemplo, si hay indicaciones de que sea ionóforo se podrían aislar proteínas liposolubles. Hallar el mecanismo implicaría obtener información sobre un proceso de evasión parasitaria novedoso.

Otro punto de investigación futura importante es la observación del fenómeno con la bacteria entera (viva y muerta, virulenta y avirulenta). De hecho, antes que esto, se debería usar CFPE de bacterias avirulentas y comparar su efecto sobre el pH lisosomal con los datos obtenidos aquí. Además, el uso de anticuerpos acoplados a FITC podría dar información sobre lo que pasa en el fagosoma.

El extender los periodos de incubación para observar si se presentan otros ciclos de alcalinización y, si así es, qué ocurre con su magnitud también resultaría interesante.

Es importante, por otra parte, la búsqueda de la presencia del fenómeno en otros parásitos intracelulares para ver la generalidad de su distribución. Así mismo, ver diferencias entre diferentes tipos celulares (macrófagos peritoneales, macrófagos activados - con diferentes sustancias -, macrófagos pulmonares, etc.) resultaría bastante interesante.

Por último, el usar esta técnica para explorar cambios del pH lisosomal ocasionados por otras sustancias puede resultar interesante. Por ejemplo, la diferencia observada aquí entre la BSA y la transferrina puede resultar importante en la distinción de estas dos vías de internalización al hacer estudios mas extensos.

VII REFERENCIAS

1. Margulis, L. Origins and evolution of eukaryotic intracellular organelles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 361: (1981)
2. Viaillier, J., Lahneche, J., Lanery, R. Etude critique de quelques tests utilisables pour l'identification de mycobacteries. *Annales de Biologie Clinique (Paris)* 25:1169 (1967)
3. Ratledge, C., Stanford, J. *The Biology of Mycobacteria* Academic Press 1:2 (1982)
4. *Boletín Epidemiológico (México)* jul (1965) p.8-10
5. Biscoe, H. Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J. Exp. Med.* 51:137 (1950)
6. Nagasuga, T., Terai, T., Yamamura, Y. Studies on the toxic lipid of isoniazid-resistant human tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* 83:248 (1961)
7. Kato, M. Effect of anti-cord factor antibody on experimental tuberculosis in mice. *Infect. Immun.* 7:14 (1973)
8. Gangadharam, P.R.J., Cohn, M.L., Middlebrook, G. Infectivity and pathogenicity of Indian and British strains of tubercle bacilli studied by aerogenic infection of guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 87:200 (1963)
9. Kochan, I. The role of iron in bacterial infections, with special consideration of host-tubercle bacillus interaction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 60:1 (1973)
10. Hocham, L.P., Ratledge, C. A new group of water-soluble iron-binding compounds from mycobacteria; the exocoelins. *J. Gen. Microbiol.* 89:375 (1975)
11. Sever, J.L., Youmans, G.P. The relation of oxygen tension to virulence of tubercle bacilli and to acquired resistance in tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 101:193 (1957)
12. Guy, L.R., Raffel, S., Clifton, C.E. Virulence of the tubercle bacillus. II. Effect of oxygen tension upon growth of virulent and avirulent bacilli. *J. Infect. Dis.* 94:99 (1954)

13. Knox, R., Meadow, P.M., Worssam, A.K.H. The relationship between the catalase activity, hydrogen peroxide sensitivity, and isoniazid resistance of mycobacteria. *Am. Rev. Tuberc.* 73:726 (1956)
14. Russell, W.F., Middlebrook, G. *Chemotherapy of Tuberculosis*. Springfield, Ill, Charles C. Thomas (1961)
15. Parra, C., Montano, L.F., Huesca, M., Rayón, I., Wilms, K., Goodssaid, F. Inhibition of PHA and LCL-induced by adherent cell supernatants treated with Mycobacterium tuberculosis culture filtrate protein extract. *Infect. Immun.* 52:309 (1986)
16. Dalma, D.D. Algoritmos para la métrica de la morfologia de macrófagos. (tesis) jun (1987)
17. Walker, L., Lowrie, D.B. Killing of M. microti by immunologically activated macrophages. *Nature*, London. 293:69 (1981)
18. Jackett, P.S., Aber, V.R., Lowrie, D.B. Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of Mycobacterium tuberculosis. *J. Gen. Microbiol.* 104:37 (1978)
19. Oshima, S., Myrvik, Q.M., Leake, E. The demonstration of lysozyme as a dominant tuberculostatic factor in extracts of granulomatous lungs. *British J. Exp. Pathology* 42:136 (1961)
20. Parry, M.F., Root, R.K., Metcalf, J.A., Delaney, K.K., Kaplow, L.S., Richar, W.J. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Annals Internal Med.* 95:293 (1981)
21. Kochan, I., Pellis, N.R., Pfohl, D.G. Effects of normal and activated cell fractions on the growth of tubercle bacilli. *Infect. Immun.* 6:142 (1972)
22. Watson, S.B., Collins, E.M. Development of suppressor T cells in mice heavily infected with mycobacteria. *Immunol.* 39:367 (1980)
23. Langevoort, H.L., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Van Furth, R. The nomenclature of mononuclear phagocytic cells. In "Mononuclear Phagocytes" R. Van Furth, ed. pp. 1-6. (1970)
24. Gray, D.F., Graham-Smith, H., Noble, J.L. Variation in natural resistance to tuberculosis. *J. Hyg.* 58:215 (1960)

15. Honda, E., Kanai, K. Effects of cortisone treatment on experimental mouse infection with pathogenic and saprophytic mycobacteria. Japanese J. Med. Sci. Bio. 30:109 (1977)
16. Schell, R.F., Ealey, W.F., Harding, G.E., Smith, D.W. The influence of vaccination on the course of experimental airborne tuberculosis in mice. J. Reticuloendothel. Soc. 16:131 (1974)
17. Ueda, K., Yamazaki, S., Someya, S. Experimental mycobacterial infection in congenitally athymic "nude" mice. J. Reticuloendothel. Soc. 19:77 (1976)
18. Fatterson, R.J., Youmans, G.P. Multiplication of M. tuberculosis within normal and "immune" mouse macrophages cultivated with and without streptomycin. Infect. Immun. 1:30 (1970)
19. Nogueira, N., Cohn, Z.A. Trypanosoma cruzi: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. J. Exp. Med. 148:288 (1978)
20. Hart, P. D'A., Armstrong, J.A. Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. 10:742 (1974)
21. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. En Molecular Biology of the Cell Garland Publishing, Inc. p. 312-313 (1983)
22. Garcia, E.A. CoINTERNALIZACION de proteínas de superficie de macrófagos como mecanismo defensivo de Mycobacterium tuberculosis. (tesis) sept. (1987)
23. Armstrong, J.A., Hart, P. D'A. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. J. Exp. Med. 134:713 (1971)
24. Geisow, M.J., Beaven, G.H., Hart, P.D'A., Young, M.R. Site of action of a polyanion inhibitor of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages. Exp. Cell Res. 126:159 (1980)
25. Goren, M.B., Hart, P.D'A., Young, M.R., Armstrong, J.A. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sialtides or Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 73:2510 (1976)
26. Weissman, G., Goldstein, I., Hoffstein, S. Prostaglandins and the modulation by cyclic nucleotides of lysosomal enzyme release. Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 2:803 (1976)

37. Gordon, A.H., Hart, P.D'A., Young, M.R. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature, London* 285:79 (1980)
38. Creek, K.E., Sly, W.S. The role of phosphomannosyl receptor in the transport of acid hydrolases to lysosomes. In J.T. Dingle, R.T. Dean, W.S. Sly (eds.): *Lysosomes in biology and pathology*, vol. 7 p.63-82 Elsevier Amsterdam (1984)
39. Braulke, T., Ceuze, H.J., Slot, J.W., Hasilik, A., von Figura, K. On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 43:315 (1987)
40. Poole, A.P., Howell, J.A., Lucy, J.A. Lysolecithin and cell fusion. *Nature, London* 227:815 (1970)
41. Trobo, B., Maxfield, F.R. Rapid acidification of endocytic vesicles containing $\alpha 2$ -macroglobulin. *Cell* 29:643 (1982)
42. Kiellian, M.C., Cohn, Z.A. Phagosome-lysosome fusion: characterization of intracellular membrane fusion in mouse macrophages. *J. Cell Biol.* 85:754 (1980)
43. Marsh, M., Bolzau, E., Helenius, A. Penetration of Semliki Forest virus from acidic prelysosomal vacuoles. *Cell* 32:931 (1983)
44. Fok, A.K., Ueno, M.S., Azada, E.A., Allen, R.D. Phagosomal acidification in Paramecium: effects on lysosomal fusion. *Eur. J. Cell Biol.* 43:412 (1987)
45. Dubos, R.J. Properties and structures of tubercle bacilli concerned in their pathogenicity. *Symposia of the Society for General Microbiology* 5:103 (1955)
46. Horwitz, M.A., Maxfield, F.R. Legionella pneumophila inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* 92(6):1936 (1984)
47. Sibley, L.D., Weidner, E., Krahenbuhl, J.L. Phagosome acidification blocked by intracellular Toxoplasma gondii. *Nature* 315:416 (1985)
48. Black, C.H., Paliescheskey, M., Beaman, B.L., Donovan, R.M., Goldstein, E. Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockage by Mycobacterium avium. *J. Infect. Dis.* 154:952 (1986)
49. Mellman, I., Fuchs, R., Helenius, A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* 55:663 (1986)

50. Okhuma, S., Poole, B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:3327 (1978)
51. Chicurel, M., Garcia, E., Goodsaid, F. Modulation of macrophage lysosomal pH by M. tuberculosis-derived proteins *Infect. Immun.* (en prensa) (1988)
52. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265 (1951)
53. Van Furth, R., van Schadewijk-Nieuwstad, M., Elzenga-Claasen, I., Cornelisse, C., Nibbering, P. Morphological, cytochemical, functional, and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell lines. *Cell Immun.* 90:339 (1985)
54. Snyderman, R., Pike, M.C., Fischer, D.G., Koren, H.S. Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. *J. Immunol.* 119(6):2060 (1977)
55. Harikumar, P., Reeves, J.P. The lysosomal proton pump is electrogenic. *J. Biol. Chem.* 258:10403 (1983)
56. Okhuma, S., Moriyama, Y., Takano, T. Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:2758 (1982)
57. Pappenheimer, A.M. Jr. Diphtheria toxin. *Ann. Rev. Biochem.* 46:69 (1977)
58. Olsnes, S., Phil, A. In Molecular action of toxins and viruses., ed. Cohen, van Heyningan pp.51-105 (1982)
59. Collier, R.J., Kaplan, D.A. *Sci Am* 251(1):56 (1984)
60. Yoshimura, A., Ohnishi, S. Uncoating of Influenza virus in endosomes. *J. Virol.* 51:497 (1984)
61. Leake, E.S., Ockers, J.R., Myrvik, Q.N. In vitro interactions of the BCG and Ravenal strains of Mycobacterium bovis with rabbit macrophages: adherence of the phagosomal membrane to the bacterial cell wall and the problem of the peribacillary space. *J. Reticuloendothel. Soc.* 22:129 (1977)
62. Rikihisa, Y., Mizuno, D. Different arrangements of phagolysosome membranes which depend upon the particles phagocytosed. *Exp. Cell Res.* 111:437 (1978)

63. Armstrong, J.A., Hart, P.D'A. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercule bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J. Exp. Med. 142:1 (1975)