



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“DI-O-ACIL-TREALOSA, TRI-O-ACIL-TREALOSA
(DAT, TAT) Y LA GLICOLIPOPROTEÍNA DE 19
KDA (LPQH) DE *Mycobacterium tuberculosis*
INHIBEN LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO
POR MACRÓFAGOS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

PRESENTA:
MARINA ESCALERA ZAMUDIO

TUTOR(ES): DR. RAUL MANCILLA JIMENEZ
DRA. LUZ MARIA LÓPEZ MARÍN



2009

FACULTAD
DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

Formato	Ejemplo
<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Escalera Zamudio Marina 56 22 33 66/ 38 68 Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Biología 301501217</p>
<p>2. Datos del tutor: Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor (es): Dr. Raúl Mancilla Jimenez Dra. Luz María López Marín</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Enrique Ortega Soto</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. Emilio Córdoba Alarcón</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 Dra. Clara Inés Espitia Pinzón</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 M.C. Julio Alejandro Prieto Sagredo</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito.</p> <p style="text-align: center;">Título</p> <p style="text-align: center;">Subtitulo</p> <p style="text-align: center;">Número de páginas</p> <p style="text-align: center;">Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito "Di-O-acil-trealosa, Tri-O-acil-trealosa (DAT, TAT) y la glicolipoproteína de 19 kDa (LpqH) de Mycobacterium tuberculosis inhiben la producción de óxido nítrico por macrófagos"</p> <p style="text-align: right;">75 p 2009</p>

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Luz María López Marín y en el laboratorio del Dr. Raúl Mancilla Jiménez, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Agradezco a mis dos asesores haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo y por su valiosa asesoría en la realización de esta tesis. También, agradezco a Patricia Espinosa y Erika Segura, por su ayuda en la realización de este trabajo.

Agradezco el apoyo financiero al proyecto y por el otorgamiento de mi beca al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN218506), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 48509).

Muchas gracias todos mis profesores, que a lo largo de la carrera y de mi vida me retaron a pensar, e ir más allá de memorizar datos, contribuyendo a aumentar mi gran interés y pasión por la ciencia. Sin ellos, este trabajo no existiría.

A mis padres, familia, a mis amigos y colegas, a mi novio y a mis profesores, por su apoyo, paciencia y cariño, muchas gracias.

ABREVIATURAS

TB	Tuberculosis
MDR-Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a múltiples fármacos
BCG	Bacilo Calmette–Guérin
PPD	Derivado proteico purificado
DAT	Di-O-aciltrealosa
TAT	Tri-O-aciltrealosa
LAM	Lipoarabiomanano
LpqH	Proteína de 19 kDa
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
INF-γ	Interferón gamma
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alpha
IL	Interleucina
CD	Cluster de diferenciación
CR	Receptor de complemento
TLR	Receptor tipo Toll
PKC	Proteína- cinasa C
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
LPS	Lipopolisacárico
RLN	Radicales libres de nitrógeno
NO	Óxido nítrico
NOS2/ iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
MDMO	Macrófagos derivados de médula ósea
7-AAD	7-aminoactinomicina
IP	Ioduro de propidio
SDS–PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
BSA	Albúmina de suero bovina
DAB	Diaminobencidina

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. ANTECEDENTES.....	7
II.1 Breve historia de la TB.....	7
II.2 Epidemiología de la TB.....	11
II.3 El Agente Etiológico de la TB.....	15
II.3.A Filogenia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
II.3.B Genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
II.4 La pared celular de <i>M. Tuberculosis</i>	18
II.5 DAT y TAT.....	20
II.6 La glicolipoproteína de 19 kDa (LpqH)	23
II.7 Patogénesis e Inmunología de la TB.....	25
II.8 Respuesta Inmune Innata a la TB.....	26
II.9 Producción de radicales libres de nitrógeno (RLN) por macrófagos.....	27
II.10 Respuesta Inmune Adquirida a la TB.....	31
II.10.A El Granuloma.....	33
II.11 Evasión a la Respuesta Inmune por <i>M. tuberculosis</i>	34
III. JUSTIFICACIÓN.....	37
IV. HIPÓTESIS.....	38
V. OBJETIVO.....	38
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	39
VII. MÉTODOS.....	40
VIII. 1 Obtención de glicolípidos TAT y DAT	40
VIII. 2 Análisis de los lípidos extraídos.....	40
VIII. 3 Obtención de paredes micobacterianas enriquecidas en LpqH .	41
VIII. 4 Obtención y cultivo de macrófagos.....	42
VIII. 5 Cuantificación de nitritos en macrófagos tratados con lipopolisacárido (LPS) e Interferón gamma (IFN- γ)	42
VIII. 6 Análisis del efecto del TAT, DAT y de LpqH sobre la producción de NO por macrófagos.....	43

VIII. 7	Análisis de la traducción de iNOS.....	44
VIII. 8	Análisis de la viabilidad celular: determinación de necrosis y/o apoptosis.....	44
IX.	RESULTADOS	46
IX. 1	Purificación de lípidos.....	46
IX. 2	Obtención de la pared micobacteriana enriquecida en LpqH.....	48
IX. 3	Curvas de estandarización para la producción de óxido nítrico por activación de macrófagos J774 y RAW 264.7.....	49
IX. 4	El TAT y DAT inhiben la producción de NO inducida por LPS....	51
IX.5	LpqH inhibe la producción de NO inducida por LPS e IFN-γ.....	53
IX.6	LpqH inhibe la producción de NO, al inhibir la traducción de iNOS.....	57
IX.7	Análisis de la viabilidad celular en los experimentos de inducción/inhibición de la producción de NO con LpqH.....	58
X.	DISCUSIÓN	62
XI.	CONCLUSIONES	69
XII.	BIBLIOGRAFÍA	70

I. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis es la bacteria responsable de la tuberculosis (TB), una enfermedad pulmonar y extrapulmonar que es la principal causa de muertes generadas por un solo agente infeccioso a nivel mundial (OMS, 2006). A principios de la década de los noventa, la TB resurgió con brotes epidémicos aun en países desarrollados. El incremento en la incidencia y prevalencia de la enfermedad pronto se generalizó a nivel mundial, por lo que en 1993 la OMS la declaró una emergencia global; así pues, las autoridades sanitarias de muchos países se pusieron en guardia reactivando la investigación científica. Por otra parte, el fracaso relativo de la vacuna actual, la dificultad de diagnosticar a tiempo y tratar la enfermedad, junto con el surgimiento de cepas resistentes a múltiples fármacos, continúan siendo problemas graves (Bloom y col., 1994). De ahí, que expandir globalmente las estrategias de control de la TB y aumentar la inversión en la investigación científica son una prioridad.

En la investigación de la TB, hay tópicos que son de mucho interés; por ejemplo, se han estudiado múltiples aspectos de la patogenia, como la latencia, un fenómeno de gran importancia en la TB (Tufariello y col., 2003). Asimismo, se ha tratado de entender qué mecanismos utiliza el bacilo para establecerse al interior de su célula hospedera sin que sea eliminado. El motivo de esta tesis es estudiar el efecto que tienen algunas moléculas micobacterianas sobre unos de los mecanismos efectores más importantes del macrófago en contra de *M. tuberculosis*, que es la producción del óxido nítrico (NO).

II. ANTECEDENTES

II.1 Breve historia de la TB

Hay evidencia de que *M. tuberculosis* ha infectado al ser humano desde tiempos antiguos (Daniel, 2006). La presencia de secuencias de DNA micobacteriano en lesiones de espina dorsal en momias que datan de hace 5,400 mil años indica que ya había casos de TB en el antiguo Egipto (Nerlich y col., 1997). También, algunos registros escritos encontrados en la antigua Grecia, Roma y Arabia revelan que era considerada una enfermedad común y letal. Sin embargo, no fue sino hasta 1882, que Robert Koch logró identificar la causa de la TB al aislar el agente infeccioso y teñirlo de manera específica por primera vez.

Durante la primera guerra mundial, la TB fue una de las principales causas de muerte. La pobreza y el hambre fueron factores que favorecieron la propagación de esta enfermedad (Daniel, 2006). En 1921 Calmette y Guérin desarrollaron a partir de pases de una cepa de *Mycobacterium bovis*, una cepa altamente atenuada a la que se le llamó *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo Calmette–Guérin); hasta hoy, se han desarrollado diversas cepas derivadas de esta última, las cuales son utilizadas como vacuna en humanos, pues inducen una respuesta protectora contra el desarrollo de la enfermedad (Andersen, 2007).

En 1944 Schatz, Bugie y Waksman reportaron el descubrimiento de la estreptomicina, que fue el primer fármaco efectivo contra la TB (Daniel, 2006). Su uso, aunado a métodos de diagnóstico más eficaces, volvió a la TB una enfermedad curable, por lo que la incidencia y prevalencia de la misma

disminuyeron de manera significativa. Posteriormente, durante la segunda mitad del siglo XX, se desarrollaron nuevos fármacos, como la isoniazida y el etambutol, lo que permitió acortar el tiempo de tratamiento. Los casos de TB fueron cada vez más esporádicos y durante varias décadas, se creyó que la TB era una enfermedad casi extinta que sólo atacaba de manera oportunista.

Sin embargo, a principios de los noventa, la TB resurgió con brotes epidémicos de cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR-Mtb), que afectaron principalmente a pacientes con SIDA en Miami y Nueva York (Cole y *col.*, 2004). Aunque dichos brotes fueron controlados de manera satisfactoria, el incremento en la incidencia y prevalencia de la enfermedad pronto se generalizó a nivel mundial, por lo que en 1993 la OMS declaró a la TB una emergencia global y promovió el desarrollo de programas de control y tratamiento como el DOTS (Directly Observed Therapy Shortcourse), o TAES por sus siglas en español (OMS, 2006). Éste es uno de los programas más importantes que se han implementado, que promete disminuir el número de casos en países con alta incidencia al impulsar la participación del gobierno para intensificar la búsqueda de casos y realizar:

- Diagnóstico efectivo por análisis de esputo bajo microscopio en pacientes sintomáticos.
- Uso y distribución de medicamentos de alta calidad.
- Tratamiento completo en cada paciente bajo observación.
- Sistema de documentación, reporte y observación de cada caso.

Además de los programas de control contra la TB aplicados a nivel global, otra de las alternativas preventivas para la diseminación de la enfermedad más utilizadas ha sido la vacuna BCG, que se administra en una dosis única al

momento del nacimiento o más adelante en la infancia (Andersen, 2007). Entre los beneficios de su uso se incluye su costo relativamente bajo y su fácil accesibilidad, pues sólo requiere de una visita médica para generar sensibilización en los pacientes. El mecanismo de protección consiste en inducir una memoria inmunológica para prevenir la diseminación de la bacteria después de una infección primaria o para reducir el riesgo de reactivación endógena de la bacteria tras una infección latente (Bloom y *col.*, 1994). El uso de dicha vacuna, aunado a la mejora de las condiciones sanitarias de hospitales y hogares, a la ingesta de una dieta más balanceada y al uso de antibióticos eficaces ha contribuido al decremento en el número de casos, pero se está aún lejos de erradicar esta enfermedad.

El BCG es una vacuna muy eficaz para prevenir la TB de diseminación hematogena como la meningitis tuberculosa, pero ha dado resultados muy desiguales en la prevención de la TB pulmonar (Andersen, 2007). La protección a la TB pulmonar conferida por la vacuna, va en un rango de 0-80%, dependiendo de las características genéticas de las poblaciones, de los factores socio-económicos que determinan las condiciones de vida de las mismas, y de las características particulares de las cepas utilizadas (Martin y *col.*, 2006; Arbeláez y *col.*, 2000). Por lo tanto, en la actualidad se realizan esfuerzos importantes para desarrollar nuevas vacunas más efectivas.

Uno de los problemas más importantes que contribuyen a la creciente prevalencia/incidencia de la TB, es la falla en el diagnóstico temprano y en el tratamiento efectivo de la enfermedad (Chan y *col.*, 2000). La TB puede presentarse tanto en estado activo como latente, siendo la última un problema grave. La TB latente es asintomática, por lo que es difícil de diagnosticar y

contribuye a la diseminación de la enfermedad, pues continúa siendo altamente contagiosa. Actualmente, existen diversos métodos para poder diagnosticar individuos con TB activa; entre ellos, se encuentra la detección del bacilo en esputo de pacientes mediante la tinción de Ziehl-Nielsen, que consiste en teñir de manera permanente a las micobacterias con fucsina, dada la resistencia que confiere la pared celular a la decoloración con alcohol ácido. Otros son la realización de cultivos bacterianos a partir de muestras clínicas, y la detección de lesiones pulmonares en casos sintomáticos a partir de placas radiográficas. El método más común utilizado para diagnosticar TB latente y activa es la prueba de Tuberculina, ó PPD (Derivado Proteico Purificado), que sirve para identificar pacientes hipersensibles a antígenos micobacterianos. Todos estos métodos tradicionales resultan ineficientes porque dan un gran número de falsos positivos y no logran discernir entre personas vacunadas, casos latentes o casos de TB activa (Chan y *col.*, 2000).

Con el desarrollo de la biotecnología y la biología molecular, nuevas técnicas se han incorporado al diagnóstico tradicional, como la PCR, la hibridación de sondas de RNA o DNA *in situ*, la identificación del bacilo en esputo mediante inmunofluorescencia, y el inmunodiagnóstico, que se presenta como un campo prometedor (Chan y *col.*, 2000). También, se han desarrollado métodos radiométricos en los que se utiliza ^{14}C -palmitato para cuantificar la producción de CO_2 como BACTEC, y otros medios de cultivo para cuantificación de O_2 . Estos medios son utilizados para cuantificar bacterias de manera indirecta (por la cantidad relativa de metabolitos producidos por la misma), lo que reduce los tiempos de espera necesarios para los cultivos tradicionales. No obstante, ninguno de estos métodos nuevos supera la

sensibilidad y especificidad de los clásicos, además de que son muy caros y requieren de personal altamente capacitado para el manejo de equipo de laboratorio. Por lo mismo, es necesario invertir en investigación médica para desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico que permitan identificar casos nuevos de TB de manera eficiente y rápida, a un costo relativamente bajo.

El surgimiento de cepas MDR-Mtb y el incremento en la incidencia de la TB, se relacionan con el abandono del tratamiento (Bloom y col., 1994). Normalmente, éste suele durar de dos a ocho meses, dependiendo de la edad y condiciones de salud del paciente. Las personas dejan de tomar los medicamentos antes de tiempo, debido a que los síntomas de la enfermedad activa desaparecen relativamente rápido, o por los efectos secundarios moderados asociados a dichas terapias. El surgimiento de TB resistente a antibióticos, particularmente en países con alta incidencia de VIH, representa un riesgo al control de la TB, y confirma la necesidad urgente de continuar con la búsqueda de fármacos más eficaces que reduzcan el tiempo de tratamiento contra la TB, y de promover los lineamientos propuestos en los programas de control de la OMS para que los pacientes completen los tratamientos (OMS, 2006).

II.2 Epidemiología de la TB

Hoy en día, se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada de manera latente con *M. tuberculosis*, y 10% de ellos tienen un riesgo alto de desarrollar la enfermedad (OMS, 2006). Cada año se registran aproximadamente 14.4 millones de casos prevalentes, 9.2 millones incidentes y 1.7 millones de muertes relacionadas con la TB.

Según la OMS, los casos emergentes se asocian principalmente con la co-infección con VIH, ya que anualmente, 5-15% de los pacientes con SIDA, desarrollan tuberculosis por re-infección endógena (OMS, 2006); en el año 2006 se registraron 0.7 millones de personas co-infectadas, lo que constituyó el 8% de los casos de TB a nivel global. África es uno de los continentes donde la incidencia de TB aumenta con una tasa anual significativa, particularmente en el este y sureste (Nunn y *col.*, 2005); en algunos países de este continente más del 50% de pacientes infectados con TB son VIH seropositivos (Figura 1 y 2) y un 70% de las muertes de pacientes con SIDA se deben a la TB.

A partir de la implementación de los programas de control y prevención de la TB, en 1997 se registró una baja de un 35% de incidencia de la TB, con 8.0 millones de nuevos casos, 16.2 millones de casos prevalentes y 1.86 millones de muertes generadas por la infección (OMS, 2006). Sin embargo, con la creciente incidencia de VIH/SIDA, los casos de TB también han aumentado. La OMS también ha elaborado varias propuestas con instituciones gubernamentales, cuyos objetivos han sido reducir a la mitad los niveles de mortalidad y prevalencia de TB asociada a VIH para el 2015 (OMS, 2006; Nunn y *col.*, 2005). Para esto, se han tratado 3 millones de personas VIH positivas con terapia anti-retroviral y fármacos como cotrimoxazol e isoniazida con fines preventivos; asimismo, se continúa promoviendo la educación para la prevención de la infección por VIH y la TB.

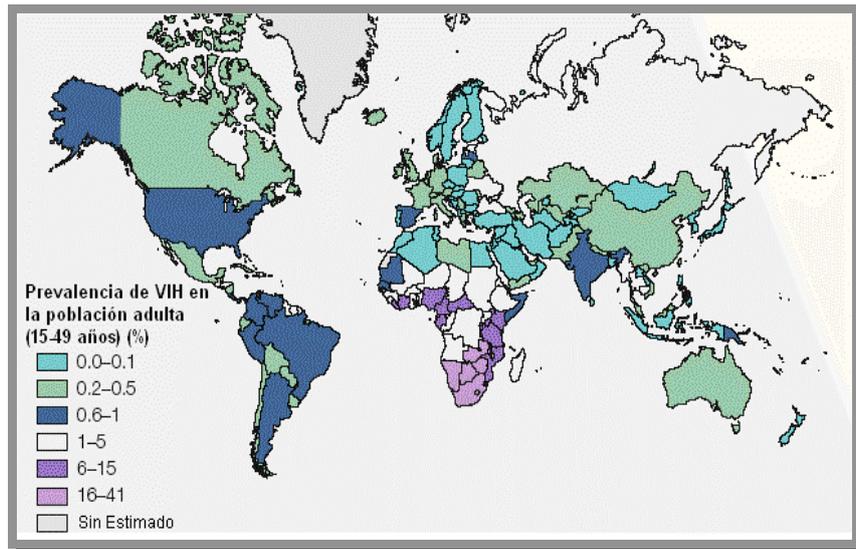


Figura 1. Prevalencia de VIH estimada a nivel global para 2006 (Nunn y col., 2005).

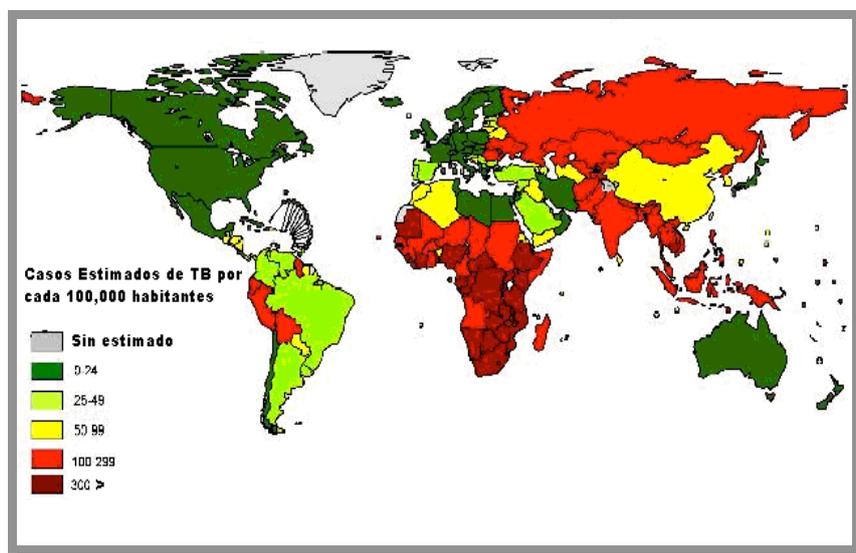


Figura 2. Incidencia de TB estimada a nivel global para 2006 (Nunn y col., 2005).

En México, la TB continúa representando un problema importante de salud (Sistema Único de información para la Vigilancia Epidemiológica, 2006). Actualmente, se estima en 16,404 casos por cada 100,000 habitantes en promedio (Tabla 1); en 2006 se registraron 17,000 nuevos casos y 3,000 muertes asociadas TB en todas sus formas. En los pacientes con VIH/SIDA, la

TB ocupa el tercer lugar como infección añadida, después de la candidiasis y la neumonía; en el 2006, se registraron 700 casos de TB activa asociados a VIH/SIDA (Sistema Único de información para la Vigilancia Epidemiológica, 2006).

La mayor incidencia de la enfermedad se presenta en los estados de Baja California, Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Veracruz, en donde la pobreza, la migración y la dispersión de la población rural complican la implementación de programas de control y tratamiento efectivos (Pérez, 2001). Los casos de tuberculosis fármaco-resistente se relacionan con el diagnóstico ineficaz y el tratamiento incompleto, originado por fallas en el sistema de salud. Éstos se podrían reducir aplicando a nivel nacional programas contra la TB, basados en un control estricto de cada caso.

Tabla 1. Casos de TB detectados por estado, porcentaje de incidencia a nivel nacional y tasa de incidencia por cada 100, 000 habitantes en México en 2006.
II.3 El Agente Etiológico de la TB (Sistema Único de información para la Vigilancia Epidemiológica, 2006).

Entidad	Número de casos/ 100, 000 habitantes	%	Tasa / 100, 000 habitantes
Baja California	1409	8.6	47.8
Guerrero	997	6.1	30.6
Chiapas	1339	8.2	30.3
Oaxaca	750	4.6	30.2
Veracruz	2047	12.5	28.1
Tamaulipas	862	5.3	27.3
Nuevo León	915	5.6	21.6
Sonora	725	4.4	19.5
D.F.	717	4.4	8.1
23 estados restantes	6647	40	---
TOTAL	16,404	99.7	---

II.3 El Agente Etiológico de la TB

M. tuberculosis es una micobacteria que presenta una morfología de bastón alargado, no flagelado, de aproximadamente 2-4 μm de largo y 0.2-0.5 μm de ancho (Cole y col., 2004); es un microbio intracelular capaz de adaptarse a condiciones aeróbicas, microaerofílicas y anaeróbicas. Las micobacterias se caracterizan por crecer en colonias con estructuras filamentosas que se asemejan al micelio de los hongos, de ahí que su nombre haga referencia a los organismos del reino Fungi.

Sin embargo, a partir de estudios genómicos comparativos se ha logrado determinar que se relacionan de manera cercana con las Actinobacterias y poseen algunas características compartidas con las bacterias Gram-positivas.

La clasificación taxonómica completa es la siguiente:

- Clase: Actinobacteria
-Actinobacteridae
- Orden: Actinomycetales
- Familia: Mycobacteriaceae
- Género: *Mycobacterium*
-Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
- Especies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*,
Mycobacterium bovis BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* y *Mycobacterium. microti*

II.3.A Filogenia de *Mycobacterium tuberculosis*

La secuenciación completa de cuatro genomas micobacterianos, dos de aislados clínicos causantes de TB en humanos, *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551, uno de la cepa patógena de bovinos, *M. bovis* AF122/97, y de *M. leprae*, ha permitido realizar estudios para reconstruir la filogenia y evolución de *M. tuberculosis* (Brosch y col., 2002). Dichos estudios se han basado en el análisis de la pérdida sucesiva de DNA entre linajes, que se determina a partir de la ausencia o presencia de veinte regiones variables y de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) caracterizados en veinte cepas representativas. Inicialmente, se había postulado que el complejo *M. tuberculosis* derivaba de un grupo ancestral edáfico y que *M. tuberculosis*, la bacteria patógena para el ser humano, se había originado a partir de *M. bovis*, al adaptarse de manera específica para infectar únicamente al ser humano, hace unos 10,000 años después de la domesticación del ganado (Brosch y col., 2002). Sin embargo, estudios recientes demuestran que *M. bovis* derivó después de *M. tuberculosis*, pues en su genoma hay un mayor número de secuencias perdidas; por lo tanto, se postula que *M. tuberculosis* es una cepa ancestral que proviene directamente del último ancestro común del complejo *M. tuberculosis* (Figura 3).

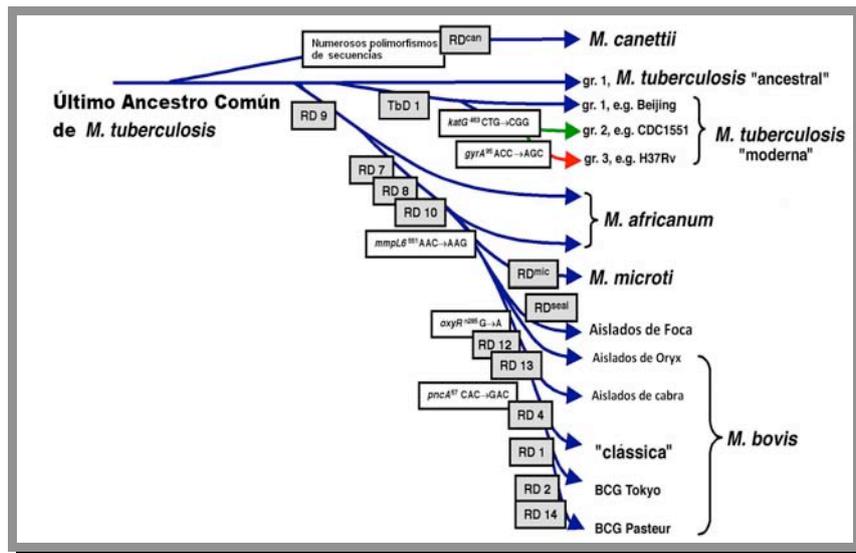


Figura 3. Filogenia reconstruida a partir del análisis de ausencia/presencia de secuencias variables y SNP's en genomas micobacterianos, en donde la pérdida de DNA es representada en las cajas grises. Las flechas de distintos colores (azul, verde y rojo) representan cambios en secuencias o polimorfismos específicos (Brosch y col., 2002).

II.3.B Genoma de *Mycobacterium tuberculosis*

El genoma de *M. tuberculosis* mide 4, 411, 532 pares de bases y es el segundo genoma bacteriano más grande que se conoce, después del de *E. coli* (Cole y col., 1998). Posee un contenido de G+C relativamente alto (65.6%) lo que se asocia con un modo de vida aerobio y es rico en secuencias altamente repetitivas y de inserción. Se estima que el 90.8% del genoma corresponde a secuencias génicas y sólo presenta 6 pseudogenes, en contraste con el genoma de *M. leprae*, que posee alrededor de 1,116 pseudo genes (Monot y col., 2005). En total, se han identificado aproximadamente 4,403 genes, de los cuales 3,993 corresponden a proteínas, mientras que los 50 restantes codifican para RNA's no mensajeros; un 16% de las proteínas totales caen en la categoría de polipéptidos relacionados con funciones específicas de micobacterias (Cole y col., 1998). Se ha demostrado que *M. tuberculosis*

cuenta con el potencial de sintetizar toda la maquinaria enzimática requerida para la biosíntesis de aminoácidos esenciales, vitaminas y cofactores; también, se han encontrado enzimas implicadas en la resistencia a antibióticos, como la β -lactamasa y las acetil transferasas.

Pocos organismos producen una gama tan diversa de lípidos como *M. tuberculosis* (Brennan, 2006; Cole y col., 1998). Se han encontrado 233 genes de metabolismo lipídico y un poco más de 20 genes que corresponden a enzimas relacionadas con la modificación post-síntesis de ácidos grasos, como la citocromo P-450; en contraste, *E. coli* posee sólo 50 genes de metabolismo lipídico. Se ha demostrado que *M. tuberculosis* posee una gran variedad de enzimas para la oxidación y biosíntesis de ácidos grasos, como los complejos sintasa de ácidos grasos 1 y 2, por lo que se le atribuye un metabolismo tanto lipolítico como lipogénico (Cole y col., 1998). Asimismo, se han encontrado genes importantes para la translocación de ácidos grasos hacia la pared celular, como el gen *fbp*, responsable de la inserción de ácidos micólicos.

II.4 La pared celular de *M. tuberculosis*

La pared celular de las micobacterias es muy compleja y difiere de manera substancial de la de otras bacterias (Brennan, 2006). Adicional a la membrana plasmática, hay una capa lipídica altamente hidrofóbica, rica en glicolípidos únicos como ácidos micólicos, lipoarabinomanano, dimicolato de trealosa y ftiocerol dimicocerosato, que se localiza por encima de la capa de peptidoglicano.

La pared se compone de dos capas principales, la externa y la interna (Brennan, 2006); la capa interna está formada por peptidoglicano, que se une

de manera covalente a moléculas de arabinogalactano mediante enlaces fosfo-disacáridos. Asimismo, contiene ácidos micólicos y homólogos, que se unen al arabinogalactano mediante enlaces ésteres. Este complejo micolil-arabinogalactan-peptidoglicano constituye el núcleo de la pared celular. La capa externa está formada por proteínas anfipáticas como porinas y por lípidos asociados a carbohidratos como fosfatidil inositol manósidos, lipoarabinomanano, sulfolípidos y lipomanano, que se unen de manera no covalente al núcleo de la pared (Ortalo-Magné y *col.*, 1996). Por lo tanto, son moléculas exportables y tienen una actividad biológica importante al participar en la modulación de la respuesta inmune del hospedero. Recientemente, se caracterizó una tercera región de la pared a la cual se le denomina cápsula, que se compone principalmente de carbohidratos como glucanos, arabinomanana y manana y que, a diferencia de las anteriores, sólo presenta un 2-3% de lípidos unidos mediante enlaces no covalentes (Figura 4).

La complejidad estructural y la alta hidrofobicidad de la pared celular micobacteriana, le dan fluidez y permeabilidad reducidas (Liu y *col.*, 1996; Kartmann y *col.*, 1999), lo que ocasiona resistencia a los antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos, pues el flujo de agentes polares se da a través de un número muy reducido de porinas activadas que la atraviesan. Igualmente, generan una alta tolerancia a la desecación y a agentes estresantes como ácidos fuertes y radicales libres. Por otro lado, la complejidad de la pared se relaciona de manera directa con la tasa de crecimiento y la virulencia de las micobacterias. A mayor complejidad, mayor es la resistencia a fármacos y a agentes microbicidas generados por el sistema inmune del hospedero;

asimismo, menor es el tiempo generacional, porque mas energía es invertida para sintetizar compuestos de la pared (Brennan, 2006).

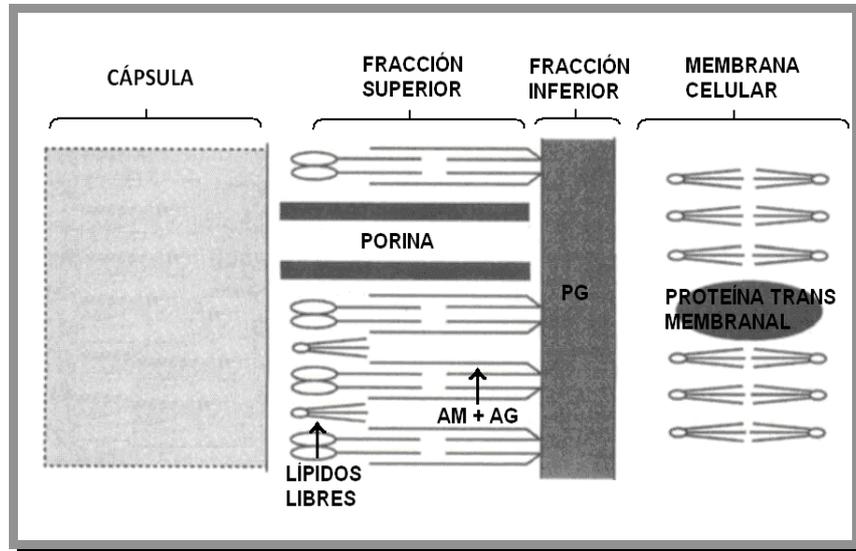


Figura 4. Modelo esquemático de la pared celular de *M. tuberculosis*. La figura muestra la cápsula, la capa superior de la pared, la capa inferior o núcleo de la pared (complejo de micolil-arabinogalactan peptidoglicano mAGP) y la membrana plasmática (Cole y col., 2004).

II.5 DAT y TAT

Un poco menos del 60% del peso seco de *M. tuberculosis* corresponde a lípidos atípicos de la pared celular micobacteriana; entre éstos, se ha descrito un grupo particular de glicolípidos que son las acil-trealosas (Besra y col., 1992). Éstas se componen de una o varias unidades alfa trealosa (α -D-glucopiranosil α -D glucopiranósido) que se unen a cadenas de ácidos grasos mediante enlaces acilos (Fig. 5 a) y se clasifican en dos grupos principales: las no polares y las polares. Las acil-trealosas no polares, como sulfolípidos, poseen de 2-4 cadenas de ácidos grasos no saturados de 25-27 carbonos, como el micolipénico; en contraste, las polares poseen cadenas de ácidos grasos polimetilados, como el micopanólico y el micosanólico.

El DAT y TAT (Di-O-aciltrealosa y Tri-O-aciltrealosa, respectivamente) son dos acil-trealosas no polares, que se han encontrado en la pared celular de cepas virulentas del complejo *M. tuberculosis* y en algunas bacterias oportunistas como *Mycobacterium fortuitum*; no obstante, no se han hallado en cepas poco virulentas relacionadas con *M. tuberculosis*, como *M. bovis* BCG y *M. microti* (Muñoz y col., 1997). Por otro lado, la cepa mutante *M. tuberculosis* PhoP/PhoR^{-/-}, de virulencia altamente atenuada, no es capaz de sintetizar estos glicolípidos (Fig. 5 b), lo que sugiere que éstos son factores de virulencia que podrían jugar un papel importante en la patogénesis (Gonzalo-Asensio y col., 2005).

Se ha demostrado que el DAT juega un papel dual en la activación de la respuesta inmune (Saavedra y col., 2006; Kil-Soo Lee, 2007). Por ejemplo, se sabe que induce una fuerte respuesta humoral, pues hasta un 80% de los pacientes infectados con TB activa presentan un título alto de anticuerpos anti-DAT (Escamilla y col., 1996). Esto indica que hay una producción activa del lípido durante la infección. Asimismo, se ha demostrado que este glicolípido inhibe la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ asociada con el decremento en la expresión de las moléculas de activación CD25 y CD69; además de que inhibe la secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-2, IL-12, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en esplenocitos de ratón (Saavedra y col., 2006). En monocitos humanos aislados a partir de donadores PPD⁻ y PPD⁺ (seronegativos y sero-positivos para la prueba de hipersensibilidad retardada al derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*), el DAT inhibe la secreción de IL-12, TNF- α e IL-6 inducida por lipopolisacárido o antígenos de *M. tuberculosis* (Kil-Soo Lee, 2007).

Se postula que el DAT y TAT son lípidos exportables que pueden generar interacciones específicas y no específicas con membranas celulares, alterando procesos importantes como la transducción de señales (Vergne, 1998). Así, se ha observado que el DAT inhibe la activación celular inducida por PMA-ionomicina, dependiente de la activación directa de la proteína cinasa C (PKC) (Palma-Nicolás y col., 2009). Dicha activación involucra la fosforilación de proteínas señalizadoras como ERK y otras cinasas activadas por mitógenos (MAPK), responsables de la activación de factores de transcripción, como NF- κ B, que regulan la expresión de citocinas y de otros mediadores importantes del sistema inmune; un ejemplo es la ruta de señalización que desemboca en la activación del estallido respiratorio en macrófagos (Iles y col., 2002).

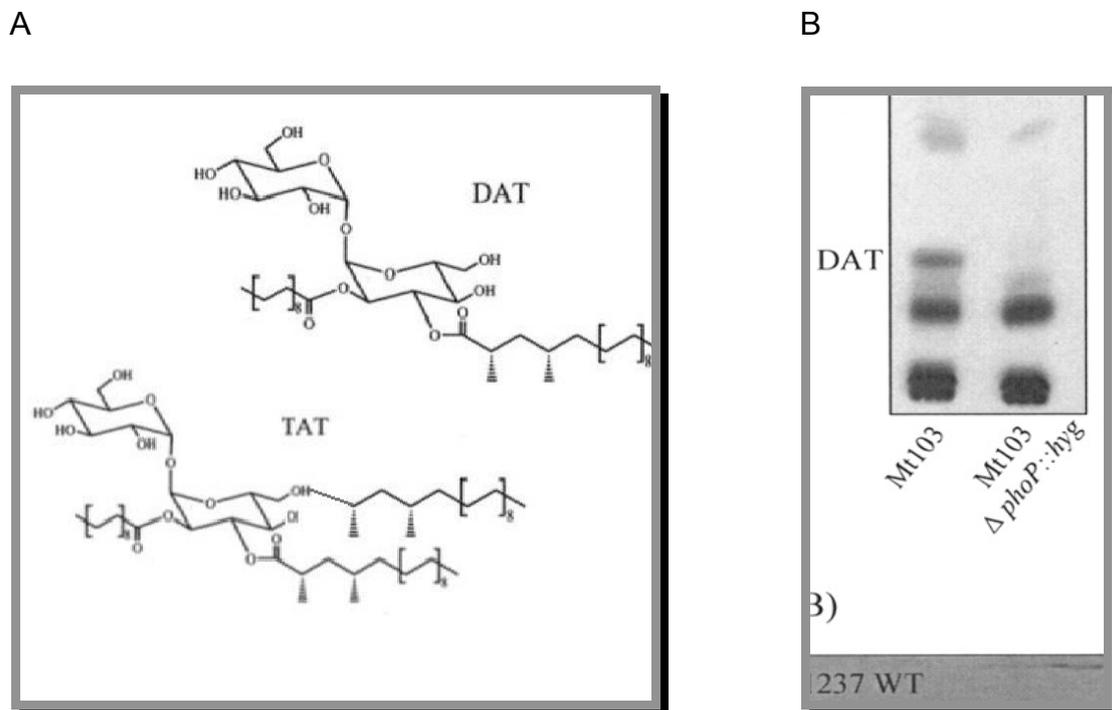


Figura 5. Trealosas aciladas de *M. tuberculosis*. (A) Estructura química de trealosas aciladas, (B) Cromatografía en capa fina (CCF) en donde se muestra la ausencia del DAT en la cepa Mt103 mutante de *M. tuberculosis* de virulencia atenuada (Mt103 Δ phoP::hyg) (Gonzalo-Asensio y col., 2005).

II.6 La glicolipoproteína de 19 kDa (LpqH)

M. tuberculosis posee varias lipoproteínas que tienen capacidad inmunomoduladora (Young y col., 1991); entre éstas, se ha identificado una glicolipoproteína altamente antigénica con peso de 19 KDa denominada LpqH [Rv3763], que se encuentra anclada a la pared celular o puede ser secretada por la bacteria. Dicha proteína se expresa en micobacterias de lento crecimiento como *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. avium-intracellulare*, pero no en micobacterias de crecimiento rápido como *M. smegmatis* y *M. vaccae*.

La LpqH es un polipéptido de 159 aminoácidos, que sufre varias modificaciones post-traduccionales como acilaciones y glicosilaciones (Cole y col., 2004; Herrmann y col., 1996); además, presenta una secuencia consenso de lipidación altamente conservada que se localiza de manera adyacente al péptido-sígnal. Los motivos lipídicos de la proteína consisten en acilaciones *N*-terminales de residuos de Cisteína (Cys) con moléculas de diacilglicerol. Estas últimas, se asocian con ácidos grasos como el ácido palmítico, oleico y palmitoleico, formando estructuras altamente hidrofóbicas que son responsables del anclaje de la proteína a la pared celular micobacteriana (Herrmann y col., 1996). La presencia de glicosilaciones en la proteína fue demostrada por mutaciones dirigidas y ensayos de unión a lectina, y aunque los sitios exactos de glicosilación aún no han sido determinados, se postula que las glicosilaciones en la LpqH cumplen una función protectora, pues mutaciones dirigidas en los posibles sitios de glicosilación resultan en un incremento en la tasa de proteólisis y degradación de la misma (Herrmann y col., 1996).

La función biológica de la LpqH aún no ha sido establecida, pero sus propiedades antigénicas, como la estimulación de la producción de anticuerpos específicos y la activación de la respuesta de células T, han sido demostradas tanto en modelos *in vitro* que utilizan células humanas, como modelos de ratón (Senol y col., 2006). Se sabe que los motivos lipídicos de la proteína son los principales responsables de la actividad inmunogénica de la misma, puesto que son capaces de interactuar con moléculas membranales como los TLR's, modulando la respuesta inmune de manera paradójica (Ciaramella y col., 2004; Fulton y col., 2004; Noss y col., 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que la LpqH induce la secreción de IL-12 y promueve la actividad bactericida de macrófagos; pero también, inhibe la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad-II (CMH-II) y el procesamiento antigénico, e induce la apoptosis de monocitos humanos vía TLR-2 (López y col., 2003). Asimismo, se sugiere que aunque la LpqH interactúa principalmente con TLR-2 para modular la respuesta inmune, la proteína posee motivos que podrían estar asociados a la interacción con TLR-4 (Means y col., 1999).

La actividad dual de la proteína se atribuye, en parte, al tiempo de exposición que tienen las células con el antígeno, pues la exposición prolongada provoca la transducción de señales inhibitorias para algunas funciones efectoras. Por ejemplo, se ha demostrado que la incubación de macrófagos con la LpqH por tiempos largos, inhibe la transcripción de genes que regulan la expresión de CMH-II y otras proteínas requeridas para la presentación antigénica, provocando la inhibición de la respuesta de células T CD4⁺ (Noss y col., 2001; López y col., 2003). Sin embargo, no todos los

mecanismos de inhibición en la respuesta inmune por parte de la LpqH han sido explorados.

II.7. Patogénesis e Inmunología de la TB

M. tuberculosis entra al organismo por vía aérea, a partir de la inhalación de pequeñas gotas en aerosol liberadas al toser, estornudar o al hablar (Flynn y col., 2001). Una vez inhalada, la bacteria tiene cuatro posibles destinos, que dependen de la eficiencia de la respuesta inmune que se genera en el individuo infectado (Kauffmann y col., 2002): 1) la bacteria es eliminada cuando la respuesta inmune innata es altamente efectiva; 2) la respuesta inmune es insuficiente, por lo que la bacteria coloniza los tejidos y se multiplica dando lugar a un cuadro clínico-patológico; 3) la bacteria permanece en un estado de latencia contenida en los granulomas y es posible que nunca se reactive; o 4) después de un estado de latencia, la bacteria se reactiva para dar lugar a una enfermedad activa (Figura 6).

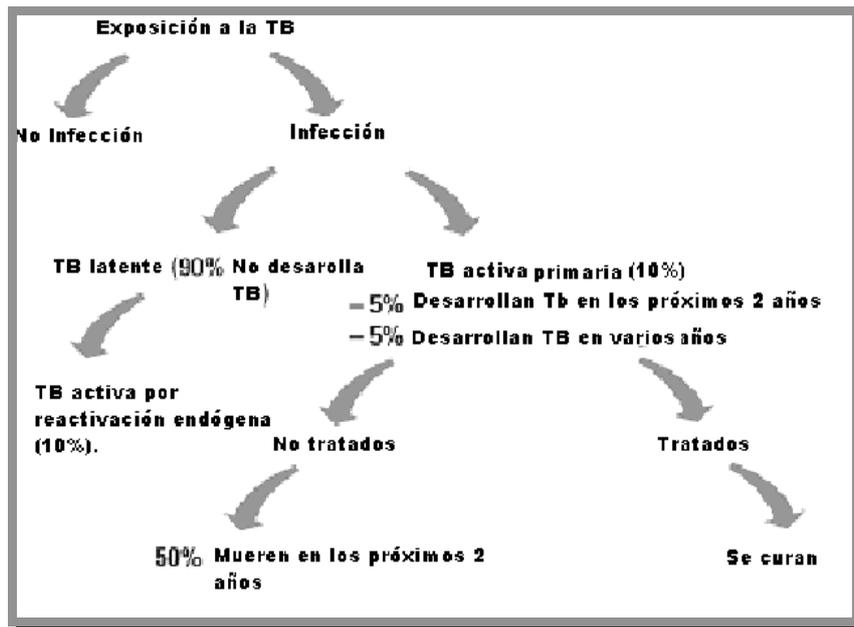


Figura 6. Esquema de los eventos posibles ante una infección por *M. tuberculosis*. Se estima que la enfermedad aguda se desarrolla en el 10-30% de los casos de exposición directa a la TB, mientras que el 70-90% de los casos de exposición, la bacteria permanece latente. De estos casos, sólo el 10% desarrolla la enfermedad. Sin embargo, no hay manera de saber con certeza qué porcentaje de la población que se expone a la TB no se infecta, pues esta aproximación se obtiene a partir de los casos en donde no hay respuesta celular aparente (Kauffmann y col., 2002).

II.8 Respuesta Inmune Innata a la TB

Después de la entrada del bacilo a las vías respiratorias, se desencadenan una serie de eventos que constituyen la activación de la respuesta inmune innata (Flynn y col., 2001; Kauffmann y col., 2002; Schluger y col., 1998). Éstos consisten en la activación de células fagocíticas y células presentadoras de antígenos (CPA), que se encuentran distribuidas en la mucosa respiratoria. La función de estas células es impedir el crecimiento bacteriano a través de la fagocitosis, la secreción de citocinas pro-inflamatorias, y el procesamiento y presentación de antígenos, que resulta en la activación de la respuesta inmune adquirida, la cual es instrumentada por los linfocitos T. Las células dendríticas y los macrófagos, importantes células de la respuesta inmune innata, poseen

moléculas de superficie que intervienen en el reconocimiento molecular de las micobacterias y en la activación de células T. Los principales receptores que intervienen en dicho reconocimiento pertenecen a la familia de los receptores tipo Toll (TLR's), los receptores de complemento CR1, CR3, CR4, los receptores para proteínas surfactantes, receptores tipo "scavenger", y otros como el receptor de manosa, que reconocen carbohidratos (Flynn y *col.*, 2001). Una vez que las células fagocíticas reconocen a las micobacterias, el proceso de fagocitosis comienza; las bacterias son internalizadas en fagosomas que se forman a partir de la fusión de membranas, lo que puede conllevar a la eliminación de la micobacteria a través de los mecanismos efectores como la producción de óxido nítrico (NO).

II.9 Producción de radicales libres de nitrógeno (RLN) por macrófagos.

Los macrófagos pueden ser activados por estímulos tanto endógenos, como exógenos, para generar NO y otros RLN's (Iles y *col.*, 2002; MacMicking y *col.*, 1997; Lowenstein y *col.*, 2004), cuya función es eliminar a los microorganismos que han sido fagocitados. Las células en reposo no expresan iNOS, que es la enzima citosólica que sintetiza NO, NO₂ y HNO₂ a partir del amino ácido L-arginina. Pero, cuando uno o más estímulos interaccionan con receptores celulares como los TLR's, se promueve la activación de cascadas de señalización que desembocan en la transcripción, traducción y ensamblaje de esta enzima (Figura 7).

Muchos compuestos de bacterias y hongos pueden activar estas rutas, y por ende, la producción de NO. Uno de éstos es el lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular de bacterias Gram-negativas (Lowenstein y

col., 2004). La vía por la cual el LPS induce la producción de NO ha sido ampliamente estudiada. Cuando el LPS es liberado al medio extracelular, se une a la proteína de unión a LPS presente en plasma y otros fluidos corporales, que funciona como un acarreador hacia el receptor de membrana de alta afinidad, CD14. El LPS se une al CD14 y se forma el complejo CD14/LPS, entonces el Receptor Tipo Toll 4 (TLR-4), junto con la proteína MD-2, interaccionan con dicho complejo, provocando la activación de una amplia gama de moléculas de señalización intracelular. Entre éstas, se encuentran la proteína adaptadora MyD88, las cinasas IRAK-TRAF-6, MAPK y JUN, y los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, cuya expresión es esencial para la síntesis de NO (Fig. 7).

Las citocinas pro-inflamatorias secretadas por células del sistema inmune, como TNF- α , IL-1 β e interferón gamma (IFN- γ), también activan la producción de NO (Lowenstein y col., 2004). La vía de activación de iNOS inducida por IFN- γ depende de los receptores de membrana IFNR1 y 2 (Receptor para interferón 1 y 2). Cuando IFN- γ se une a éstos, la ruta de las cinasas JAK y STAT-1 son activadas y se induce la expresión del IRF-1 (factor de respuesta a interferón-1), un factor que regula la transcripción del gen *Nos2*.

La convergencia de las rutas dependientes de LPS e IFN- γ sugiere que dichas moléculas pueden actuar de manera sinérgica para estimular la producción de NO (Lowenstein y col., 2004). Asimismo, la señalización cruzada entre las cascadas asociadas con distintos receptores celulares puede hacer que la actividad de receptores aparentemente no relacionados con la inducción de iNOS contribuya en la producción de NO de manera indirecta. Por ejemplo, la proteína MD2, normalmente asociada con TLR-4, puede jugar un papel

importante en la activación de iNOS al asociarse con TLR-2. Otros factores que pueden contribuir a la expresión de iNOS son el factor inducible por hipoxia-1 y Stat1- α , que se expresan en situaciones de estrés celular (Lowenstein y *col.*, 2004).

La regulación de la actividad de iNOS también se da a nivel post-transcripcional y post-traducciona (Lowenstein y *col.*, 2004). Por ejemplo, la estabilidad de los transcritos depende de la presencia de la proteína HuR, que se une a regiones ricas en secuencias de tipo AUUUA ubicadas hacia el extremo 3' de los mRNA, evitando la degradación de los mismos y asegurando su traducción. Asimismo, se han descrito proteínas como la NAP110 (proteína de 110 kDa asociada a NOS2), que regulan negativamente la actividad de iNOS al interactuar con los monómeros e inhibir la homodimerización de iNOS, pues esta enzima sólo es capaz de sintetizar RLN's cuando se encuentra en su forma dimérica.

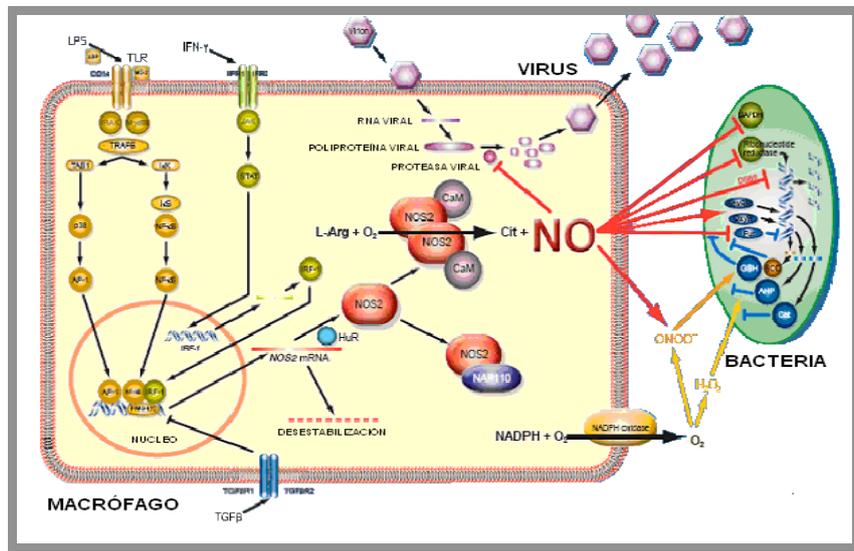


Figura 7. Las cascadas de señalización intracelular que activan la síntesis de NO responden a estímulos endógenos y exógenos. Entre éstas se incluyen las dependientes de receptores como los TLR's e IFNR1 y 2, que activan diversas moléculas como IRAK, MAPK, NF- κ B y AP-1 induciendo la transcripción, traducción y ensamblaje de iNOS (Lowenstein y *col.*, 2004).

En un pH neutro-alcalino como el del citosol, el NO tiende a transformarse en compuestos más estables, como los nitritos (MacMicking y *col.*, 1997; Lowenstein y *col.*, 2004). Estos compuestos estables son transportados por la proteína NRAMP hacia el fagolisosoma. Una vez en la vesícula, el pH ácido de la misma genera que éstos regresen a su forma inestable y reactiva, y produzcan estrés oxidativo que afecta proteínas, lípidos y DNA. Por ejemplo, se ha demostrado que el NO induce rompimientos de DNA de doble cadena, modifica residuos de cisteína en proteínas, bloquea procesos metabólicos, e inactiva enzimas que presentan cluster de [4Fe-4S], muchas de las cuales participan en el metabolismo del hierro. El NO también inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido-reductasa, que participa en la síntesis de ácidos nucleicos, y posiblemente ataca las proteínas que contienen motivos de zinc (Lowenstein y *col.*, 2004).

En modelos de ratón, los RLN's juegan un papel crucial para el control de la TB (Chan y *col.*, 1995; Scanga y *col.*, 2001; MacMicking y *col.*, 1997). A partir de diversos estudios, se ha demostrado que el uso de inhibidores de iNOS *in vivo* aumenta significativamente la mortalidad, y que la ausencia del gen que codifica para la iNOS (*Nos2*) en ratones transgénicos infectados con *M. tuberculosis* genera una enfermedad fulminante. El papel que juega el NO en el control de la TB humana es controversial, pues no ha sido posible construir un modelo humano que sea consistente en la producción de NO, con el que se demuestre que el NO confiere protección contra *M. tuberculosis* (Chan y *col.*, 2001). Sin embargo, hay estudios indirectos que sugieren que el NO participa en el control de la enfermedad en humanos; por ejemplo, se ha demostrado un incremento en la producción de NO por macrófagos alveolares en tejidos de

individuos humanos infectados con *M. tuberculosis* (Rich y col., 1997). Asimismo, hay también estudios epidemiológicos que muestran cómo algunos polimorfismos en proteínas relacionadas con el metabolismo de NO, como NRAMP y el receptor de vitamina D (VDR), se correlacionan con una mayor susceptibilidad a la enfermedad en algunas poblaciones humanas (Bellamy y col., 1998). Por lo tanto, es probable que el NO sea un factor que contribuye en el control de la TB humana (Chan y col., 2001).

II.10 Respuesta Inmune Adquirida a la TB

En la respuesta inmune adquirida en contra de *M. tuberculosis* participan tanto linfocitos B como T (Flynn y col., 2001; Kauffmann y col., 2002; Schluger y col., 1998). Los linfocitos B se encargan de secretar anticuerpos específicos contra las moléculas antigénicas de origen micobacteriano, lo que podría resultar en la amplificación de la respuesta innata.

La respuesta inmune mediada por los linfocitos T es la más importante; en ésta participan tanto los linfocitos CD4+ como los CD8+. Los linfocitos CD4+ juegan un papel fundamental en la defensa en contra de la bacteria (Kauffmann y col., 2002), pues su función es reconocer antígenos presentados en moléculas del CMH-II de CPA's, y secretar citocinas pro-inflamatorias para reclutar y activar las funciones de distintos tipos de células del sistema inmune innato. Desde las observaciones de Mosmann, se reconocen dos tipos de linfocitos CD4+, que son los Th1 y Th2 (Mosmann y Sad, 1997). Los primeros, son productores de citocinas pro-inflamatorias como son la interleucina-2 y el INF- γ , lo que resulta en la amplificación de la respuesta linfocitaria, y la capacidad bactericida del macrófago, respectivamente. Estas células tienen un

efecto inmunoprotector en contra de las micobacterias. Por otro lado, están los linfocitos CD4+ Th2, los cuales secretan IL-4 e IL-6, que por sus efectos anti-inflamatorios, generan un microambiente permisivo para la supervivencia del bacilo (Flynn y *col.*, 2001). En cuanto a la función de los linfocitos T CD8+, éstos se encargan de inducir apoptosis o lisis en células que han sido infectadas, además de secretar IFN- γ . Dicha actividad citotóxica es mediada por el reconocimiento de antígenos presentados en moléculas de CMH-I de distintas células infectadas, lo que promueve la secreción de proteínas líticas como TIA-1, perforina, granzima y granulicina (Figura 8; Kauffmann y *col.*, 2002).

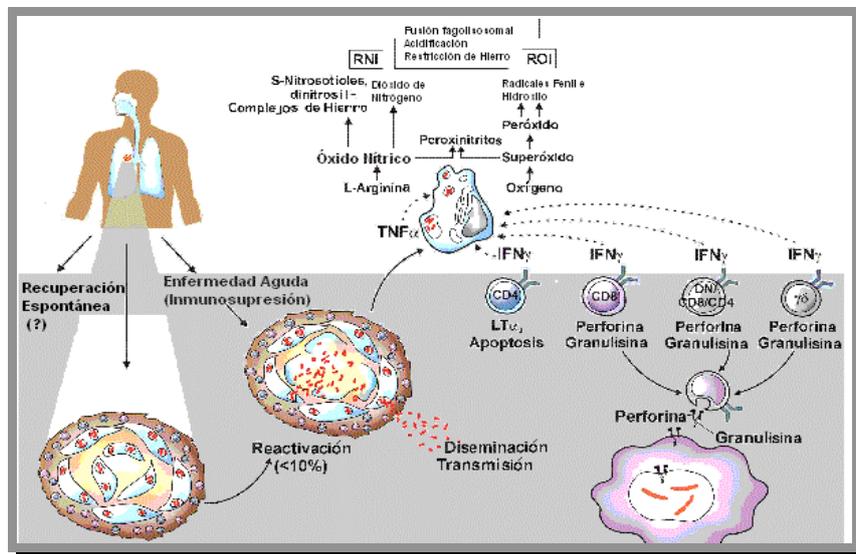


Figura 8. La infección con *M. tuberculosis* activa células de la respuesta inmune innata y adaptativa, cuyos mecanismos efectores pueden llevar a la eliminación de la bacteria (Kauffmann y *col.*, 2002).

Existen otros linfocitos cuya participación en el control de la enfermedad es importante; éstos están restringidos al reconocimiento de antígenos lipídicos presentados en el contexto de moléculas de clase CD1, las cuales son expresadas únicamente en macrófagos y células dendríticas (Flynn y *col.*,

2001). Dicho procesamiento y presentación se da, al menos en parte, a partir del fenómeno de *crosspriming* o presentación cruzada. En éste, los cuerpos apoptóticos o exosomas provenientes de células infectadas, que contienen antígenos lipídicos micobacterianos, son liberados al espacio extracelular para ser fagocitados por células dendríticas o macrófagos para su procesamiento y presentación vía CD1 a linfocitos T. Otra posibilidad es que los lípidos secretados sean captados y presentados directamente por moléculas CD1, aunque esto no se ha demostrado hasta ahora.

Por otro lado, también están los linfocitos T con receptores para antígeno de tipo γ/δ , que reconocen antígenos inusuales como fosfoligandos, cuya presentación es independiente de moléculas especializadas para la presentación de antígenos del tipo CMH-I, CMH-II y CD1 (Kauffmann y col., 2002).

II.10.1 El Granuloma

La interacción temprana que hay entre *M. tuberculosis* y el sistema inmune innato, resulta crucial para contender con la infección por esta bacteria (Flynn y col., 2001). Cuando las micobacterias se diseminan en el tejido pulmonar, entran en contacto con distintas células, como macrófagos y dendríticas, que al ser estimuladas desencadenan una respuesta pro-inflamatoria que se caracteriza por una reacción granulomatosa (Flynn y col., 2001; Pérez y col., 2003). Los granulomas son estructuras nodulares cuya función es aislar al agente infeccioso; se componen principalmente de macrófagos, células gigantes de Langhans, linfocitos T y fibroblastos en las fases crónicas. Los granulomas poseen un centro necrótico caseoso, que se origina a partir de la

lisis de células y de tejido extracelular (Pérez y col., 2003). La muerte celular que ocurre en la necrosis caseosa resulta de la acción de linfocitos T citotóxicos, aunque también se ha demostrado que la bacteria promueve la expresión de enzimas líticas como gelatinasas, y que algunos compuestos micobacterianos inducen muerte celular.

La formación del granuloma se debe al reclutamiento de diversas células inflamatorias (Pérez y col., 2003). Primero, los neutrófilos migran hacia el sitio de infección, seguidos por monocitos que se diferencian a macrófagos hacia el segundo y tercer día. Aproximadamente, para el noveno día, se forman granulomas maduros compuestos por macrófagos epitelioides rodeados por células gigantes de Langhans; estas células se originan a partir de la fusión de varios macrófagos epitelioides, que resulta en la formación de células gigantes multinucleadas con núcleos en forma de herradura que se localizan hacia la periferia. La adhesión intercelular en el granuloma es mediada por la presencia de receptores como ICAM-1 y de otras moléculas como integrinas, cuya expresión es regulada positivamente por moléculas de origen micobacteriano, como el LAM (Pérez y col., 2003). De la misma manera, las células de Langhans generan una matriz extracelular rica en proteínas como fibronectina que provee un sistema de anclaje para las distintas células que componen el granuloma.

II.11 Evasión a la Respuesta Inmune por *M. tuberculosis*

Una característica particular de *M. tuberculosis* es su habilidad para permanecer en el organismo, a pesar de la fuerte respuesta inmune que se desencadena en su contra (Colakoğlu, 2004; Flynn y col., 2003); esto sugiere el

desarrollo de mecanismos de evasión o de modulación negativa de la respuesta inmune del hospedero. Dichos mecanismos se clasifican en dos grupos principales: 1) evasión o regulación negativa de la respuesta inmune innata, por ejemplo, inhibición de la maduración y fusión fago-lisosomal y del procesamiento y presentación de antígeno y 2) evasión o modulación negativa de la respuesta inmune adaptativa, como es la inhibición de la respuesta mediada por células T (por ejemplo, la inhibición de la secreción de citocinas pro-inflamatorias mediada por linfocitos CD4+ de ayuda).

En diversos trabajos se ha demostrado que la modulación negativa de la respuesta inmune durante la infección activa es orquestada por una amplia gama de compuestos micobacterianos, que inhiben varias de las funciones efectoras de las células inmunes (Colakoğlu, 2004; Flynn y *col.*, 2003). Por ejemplo, el amonio y algunos sulfátidos derivados de glicolípidos producidos por la bacteria funcionan como agentes inhibidores de la fusión fago-lisosomal, pues alcalinizan el medio interno de las vesículas e impiden su maduración. Reciente se ha demostrado la exclusión de la ATPasa protón-adenosina trifosfatasa en fagosomas que contienen micobacterias; este complejo enzimático es responsable de la acidificación del medio intra-fagosomal, por lo que su ausencia impide la posterior destrucción de la bacteria. Se ha propuesto que la ausencia del complejo puede deberse a que es removido rápidamente del fagosoma, o bien, porque la fusión de fagosomas micobacterianos con vesículas que contienen el complejo enzimático anclado a la membrana es impedida por algún mecanismo aún no descrito (Flynn y *col.*, 2003).

De la misma manera, se ha demostrado que en el fagosoma que contiene micobacterias ocurre un bloqueo en la conversión de los marcadores Rab5 a

Rab7, que se asocia a la permanencia de Rab14 y Rab22 en la membrana (Via y *col.*, 1997). Dicha conversión es un proceso indispensable para la maduración de las vesículas fagocíticas. Asimismo, Rab14 es una proteína GTPasa que funciona como marcador temprano de la maduración lisosomal y cumple una función antagónica a la ATPasa protón-adenosina trifosfatasa, ya que su presencia promueve la permanencia de las vesículas en estado inmaduro e impide la fusión fagolisosomal (Flynn y *col.*, 2003).

Las micobacterias tienen mecanismos de protección contra el estrés oxidativo inducido por RNL's (Lowenstein y *col.*, 2004). El NO promueve la expresión de los genes SoxR, OxyR, que son factores de transcripción que al interactuar con cofactores de hierro, inducen la expresión de genes de proteínas detoxificadoras que protegen a la bacteria; algunas de estas proteínas, como las flavo-hemoglobinas y la AHP (alquil-hidroperóxido reductasas), actúan como trampa de peroxinitritos y los inactivan.

Por otro lado, se han propuesto varios mecanismos de la micobacteria que bloquean el procesamiento y presentación de antígenos, entre los cuales se incluye el secuestro intracelular de moléculas de CMH-II, la reducción en la expresión de activadores de CMH-II, como el transactivador Clase II, y la inhibición de la secreción de citocinas estimuladoras del proceso como el IFN- γ (Flynn y *col.*, 2003). Asimismo, se ha encontrado que el PPD favorece la expresión del TGF- β , el cual inhibe la respuesta inmune, puesto que es un regulador negativo de la expresión de IFN- γ y de TNF- α (Flynn y *col.*, 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

Para poder desarrollar estrategias potencialmente exitosas para el control y erradicación de la TB se requiere, entre otras cosas, conocer los mecanismos que el bacilo despliega para regular negativamente la respuesta inmune del individuo infectado. Aún cuando se han identificado algunos mecanismos de evasión al sistema inmune que posee *M. tuberculosis*, como la inhibición de respuesta celular T (por ejemplo, inhibición de la secreción liberación de citocinas pro-inflamatorias) y la inhibición de la maduración fagolisosomal, se prevé que existen muchos otros que en conjunto podrían explicar la extraordinaria capacidad de esta bacteria para colonizar con éxito diferentes tejidos del hospedero. El macrófago es una célula altamente equipada para contender con patógenos, que como estrategia de eliminación de los mismos, produce NO. El NO genera estrés oxidativo que afecta proteínas, lípidos y DNA, y que conlleva finalmente a la eliminación de las bacterias; es probable que el NO es un factor que contribuye en el control de la TB humana. Un campo poco explorado es el que concierne estudiar los mecanismos a través de los cuales se bloquean las actividades bactericidas del macrófago por micobacterias, incluyendo la producción de radicales libres de nitrógeno. En esta tesis se analizan los efectos que algunas moléculas micobacterianas tienen sobre la producción de óxido nítrico, un gas altamente letal para muchos patógenos.

IV. HIPÓTESIS

Los glicolípidos DAT /TAT y la glicolipoproteína de 19 kDa (LpqH) son inhibidores de la respuesta inmune innata anti-micobacteriana, al disminuir la síntesis de NO por el macrófago.

V. OBJETIVO

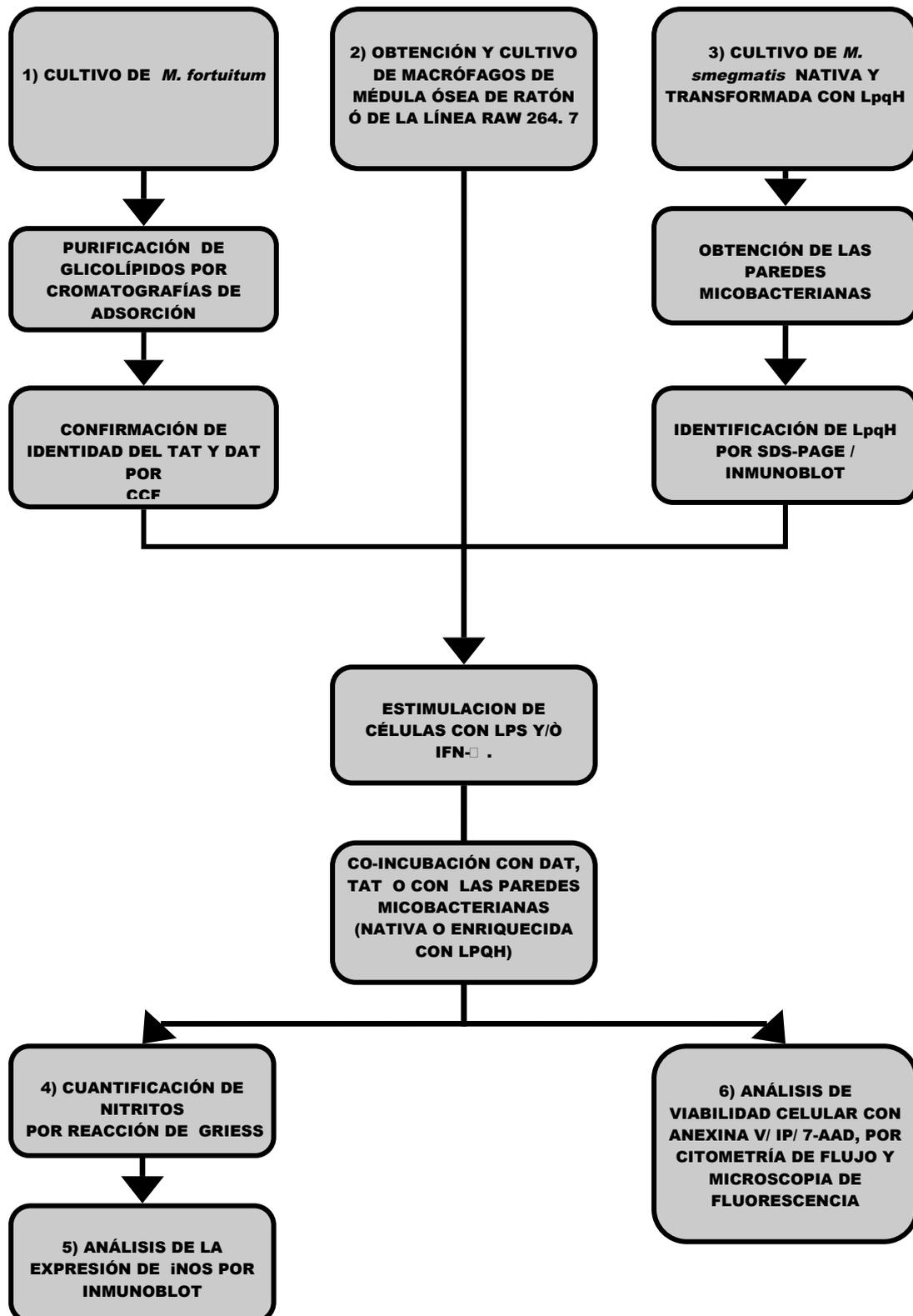
Estudiar *in vitro* el efecto de los glicolípidos DAT y TAT, y de LpqH sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención de los glicolípidos TAT y DAT.
- Obtención de paredes micobacterianas enriquecidas en LpqH.
- Cultivo de macrófagos y estimulación en la producción de nitritos por tratamiento con lipopolisacárido (LPS) e Interferón gamma (IFN- γ).
- Análisis del efecto del TAT, DAT y de LpqH sobre la producción de NO por macrófagos.
- Análisis de la traducción de iNOS.
- Análisis de la viabilidad celular.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia seguida en este estudio se esquematiza en la siguiente figura:



VIII. MÉTODOS

VIII. 1 Obtención de glicolípidos TAT y DAT

Para la obtención de DAT y TAT, se utilizó la cepa *M. fortuitum*, pues es una bacteria de rápido crecimiento y baja virulencia que produce DAT y TAT con estructura semejante a los de *M. tuberculosis*, y que permite un manejo fácil en el laboratorio (Saavedra y *col.*, 2006). Dicha cepa se cultivó en medio Sauton a 37° C por dos semanas; después, se inactivaron las bacterias por autoclave y se obtuvieron los cuerpos celulares por filtración. Los glicolípidos totales fueron extraídos incubando los cuerpos celulares con solventes orgánicos (metanol/cloroformo 2:1 vol/vol por cuatro días y después con cloroformo/metanol 2:1, a 37° C por una hora); posteriormente, se realizó un lavado de Folch y se eliminó la fase acuosa. El extracto obtenido se fraccionó secuencialmente por columnas de cromatografía de adsorción en Florisil o gel de sílica, que fueron lavadas con solventes de polaridad creciente. Posteriormente, los lípidos fueron purificados por cromatografías de capa fina preparativas y por columnas de cromatografía de adsorción en gel de sílica empacadas comercialmente, siguiendo métodos previamente reportados (López Marín y *col.*, 2003).

VIII. 2 Análisis de los lípidos extraídos.

Para determinar la presencia de los lípidos glicosilados de interés para este estudio, las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) y reveladas a 110°C con antrona al 2 % en ácido sulfúrico, y su identidad fue confirmada por el factor de retención (Rf) en CCF (Saavedra y *col.*, 2006).

Finalmente, se descartó la contaminación por endotoxinas, mediante la prueba de coagulación de lisado de amebocitos de *Limulus*.

VIII. 3 Obtención de paredes micobacterianas enriquecidas en LpqH

Dada la dificultad de purificación de la LpqH, para analizar el efecto de dicha glicolipoproteína sobre la producción de NO, se decidió utilizar paredes micobacterianas completas enriquecidas con la LpqH. Para la obtención de las paredes micobacterianas, se utilizaron dos cepas de *M. smegmatis* (mc²155); una nativa (como control, pues naturalmente *M. smegmatis* no expresa LpqH), y otra transformada para expresar la glicolipoproteína de 19-kDa de *M. tuberculosis* (LpqH). Dicha cepa fue transformada con el plásmido p16R1 que contiene un fragmento SmaI de 1.8-kb que codifica el gen estructural de LpqH de *M. tuberculosis* (Donadas por Y. Zhang, MCR Tuberculosis and Related Infections Unit, Hammersmith Hospital, Londres, Inglaterra). Ambas cepas fueron cultivadas a 37°C en medio Middlebrook 7H9 por tres semanas. Después, las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas con PBS frío (10mmol/L), para sonicarlas en frío a veinte ciclos de 60 segundos y 20 KHz con 50 segundos de descanso entre ciclos. La concentración total de proteínas en los sonicados fue determinada por Lowry y posteriormente, las proteínas totales fueron separadas por SDS-PAGE al 15%, cargando 15 µg de proteínas totales por pozo. Enseguida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, y para comprobar la presencia de LpqH en la pared de *M. smegmatis* transformada, se realizó un inmuno-blot, utilizando un anticuerpo monoclonal contra LpqH (1:1000), incubando toda la noche. Para visualizar las bandas de proteína, la membrana fue incubada con el anticuerpo

secundario acoplado a peroxidasa por una hora, y revelada por quimioluminiscencia o con diaminobencidina (DAB). Por último, se descartó la contaminación de los sonicados por endotoxinas, mediante la prueba de coagulación de lisado de amebocitos de *Limulus*.

VIII. 4. Obtención y cultivo de macrófagos

La línea celular de macrófagos de ratón RAW 264. 7 (ATCC) fue cultivada a 37° C y 5% CO₂ en frascos de 75 cm² con medio RPMI suplementado con 1 % de suero fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico/ antimicótico, 1% de L-glutamina y 1% de piruvato de sodio (de una solución stock 100 X, en todos los casos). Las células fueron cosechadas mecánicamente antes de llegar a confluencia. Para obtener macrófagos derivados de médula ósea (MDMO), se extrajeron los fémures y tibias de ratones hembra Balb/CJ, de 5-11 semanas de edad y se extrajo la médula ósea; las células progenitoras inmaduras fueron colectadas en medio DMEM con 10% de FBS, 10% de suero de caballo y 10% de factor estimulante de colonias (Coligan y col., 1996). Después, las células se incubaron por ocho días para promover su diferenciación, y los macrófagos fueron seleccionados mediante adherencia y cosechados mecánicamente.

VIII. 5. Cuantificación de nitritos en macrófagos tratados con lipopolisacárido (LPS) e Interferón gamma (IFN-γ)

Las células (RAW 264.7 ó MDMO) fueron sembradas a una densidad de 2 x 10⁵ ó 1x10⁶, en cajas de 96 ó 12 pozos con medio DMEM suplementado con 1% de SFB, y se incubaron a 37°C y 5% CO₂; una vez adheridas, se cambió el medio. Con el fin de promover la producción de óxido nítrico, las células fueron

tratadas con LPS de *E.coli* B55:05 (500ng/ml), con IFN- γ recombinante de ratón (250ng /ml), o con ambos por 48 horas. Como control positivo de la inhibición en la producción de NO, algunos pozos se trataron con el inhibidor específico de la iNOS, L-NIL (N-iminoetil-L-lisina, 100 μ M), co-incubando LPS y/o IFN- γ por 48 horas. Después de las 48 horas de incubación, se colectaron los sobrenadantes y la producción de NO fue determinada por la reacción colorimétrica de Griess, y la placa fue leída por espectrofotometría a 540nm (Hirvonen y col., 1997).

VIII. 6 Análisis del efecto del TAT, DAT y de LpqH sobre la producción de NO por macrófagos.

Para los ensayos con DAT y TAT, los glicolípidos se disolvieron en hexano-etanol (1:1, vol/vol), y se depositaron 40, 60 u 80 μ g por pozo en cajas de cultivo de 96 ó 12 pozos. El solvente se dejó evaporar bajo condiciones estériles, con luz UV durante 2 horas. Una vez evaporado, se sembraron 2×10^5 ó 1×10^6 células por pozo. Posteriormente, se incubaron las células simultáneamente con los glicolípidos y con LPS o IFN- γ , estimulando por 48 horas, como se ha descrito anteriormente. Como controles, se usaron células en pozos tratados o no con solvente, ó células estimuladas con LPS y/o IFN- γ en pozos sin lípidos o con L-NIL.

Para los ensayos con LpqH, las células fueron sembradas en placas de cultivo y se incubaron con 50 ó 100 μ g de pared de *M. smegmatis* transformada para expresar LpqH, co-estimulando con LPS y/o IFN- γ . Como controles, se usaron células tratadas con 100 μ g de *M smegmatis* nativa con LPS y/o IFN- γ , células estimuladas con LPS y/o IFN- γ en pozos sin pared micobacteriana, y

células con LPS y/o IFN- γ con L-NIL. Después de las 48 horas de incubación, se colectaron los sobrenadantes y se cuantificó la producción de NO.

VIII. 7 Análisis de la traducción de iNOS

Después de 48 horas de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS frío y tratadas con 100 μ l de buffer de lisis RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, Deoxicolato de Na 0.5%, SDS 0.1%), con 2 μ L PMSF (fenilmetansulfonil-fluoruro, 100X), y con 4 μ l de CIP (cóctel de inhibidores de proteasas, 40X). Luego, fueron cosechadas mecánicamente y se agitaron con *vortex* por 15 min para promover la lisis celular; enseguida, se incubaron en hielo 20 min y fueron centrifugadas a 14,000 g, a 4°C por 15 min. Los sobrenadantes fueron colectados y la concentración total de proteínas en las muestras fue determinada por el método de Lowry. Posteriormente, las proteínas totales fueron resueltas por SDS–PAGE al 7.5%, cargando 100 μ g por pozo, y transferidas a una membrana de PVDF; para comprobar la presencia de iNOS, se realiza un inmuno-blot. La membrana se bloqueó en BSA (albúmina bovina de suero) al 5% en PBS toda la noche, se lavó tres veces con PBS-Tween y se incubó con un anticuerpo monoclonal α -iNOS (1:5,000) toda la noche a 4°C. Después, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario por una hora, y revelada por quimioluminiscencia o con DAB (Hirvonen y *col.*, 1997). Como control de carga, se usó un anticuerpo en contra de β -tubulina (1:2000), re-incubando la membrana previamente revelada para iNOS.

VIII. 8 Análisis de la viabilidad celular: determinación de necrosis y/o apoptosis.

Las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 ó 2×10^5 con los tratamientos correspondientes, en placas de cultivo de baja adherencia de 24 pozos con o sin vidrios de reloj. Como control positivo de muerte celular se trataron algunos pozos con estaurosporina, un potente inhibidor de cinasas que funciona como inductor de apoptosis ($43 \mu\text{M}$), por 24 horas. Posteriormente, las células fueron marcadas con los colorantes indicadores de apoptosis/necrosis: Anexina V-FITC ($5 \mu\text{l}$), yoduro de propidio (IP; $10 \mu\text{l}$) o 7-aminoactinomicina D (7-AAD; $4 \mu\text{l}$), y se analizaron por microscopía de fluorescencia y/o citometría de flujo (Szepietowski *y col.*, 2002; Philpott *y col.*, 1996). Para la microscopia de fluorescencia, los vidrios de reloj con las células adheridas fueron lavados con buffer de incubación (NaCl 0.818 g, CaCl_2 0.0275 g y HEPES 0.2383 g en 100 ml de H_2O) y se colocaron en una cámara húmeda. Después, las células se incubaron con yoduro de propidio y Anexina V-FITC por 15 min en la oscuridad, se lavaron nuevamente y se fijaron con paraformaldehído al 1% en buffer de incubación. Posteriormente, los vidrios se dejaron secar y se montaron en portaobjetos con medio DAKO, que protege la señal fluorescente; una vez que se han secado las laminillas, se almacenaron a 4°C , en la oscuridad para su posterior observación en el microscopio.

Para el análisis por citometría de flujo, las células fueron cosechadas de los pozos de baja adherencia y lavadas por centrifugación con el buffer de incubación. Después, fueron resuspendidas y se incubaron con Anexina V-FITC por 15 min. Nuevamente, se lavaron las células y se les agregó 7-AAD. Finalmente, las muestras fueron analizadas inmediatamente en el citómetro de flujo FACScan (BD, Biosciences).

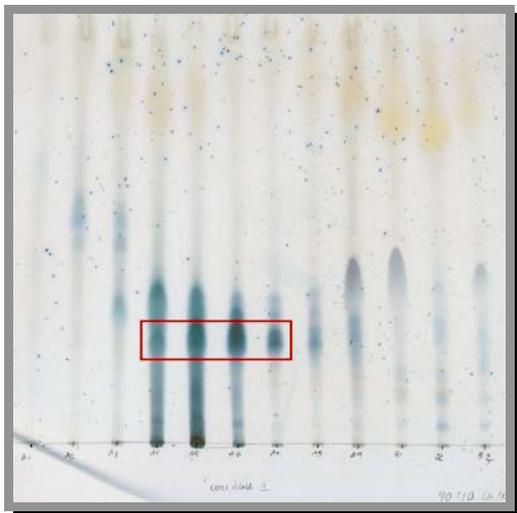
IX. RESULTADOS

IX. 1 Purificación de lípidos.

Para obtener fracciones enriquecidas con TAT o DAT a partir del extracto lipídico total, se eligió una cromatografía de adsorción en fase normal, que separa componentes con base en su polaridad. El TAT se obtuvo al lavar con solvente de 5-10% cloroformo/metanol, mientras que el DAT se obtuvo con 15-20% cloroformo/metanol. Para visualizar dichas fracciones, se realizaron placas de cromatografía de capa fina (CCF) que se eluyeron en cloroformo/metanol, 9:1, vol/vol para el TAT y, 8:2, vol/vol para el DAT.

En la Figura 1 se observan las fracciones enriquecidas en TAT (A) y DAT (B) obtenidas a partir de una columna de cromatografía de lípidos totales de *M. fortuitum*. Las fracciones tenían una cantidad considerable de grasas que posteriormente fueron eliminadas mediante otras técnicas de purificación.

A



B

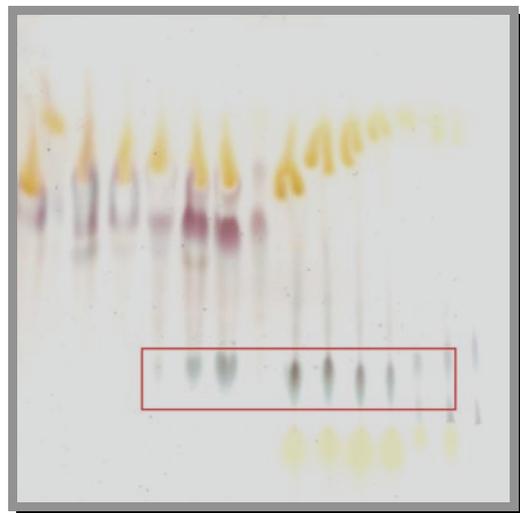


Figura 1. Obtención de TAT (A) y DAT (B). Cromatografía en capa fina de fracciones obtenidas a partir de un extracto total lipídico de *M. fortuitum*. Los recuadros rojos indican los glicolípidos de interés para el presente trabajo.

En la Figura 2 se observa una CCF con los glicolípidos purificados mediante precipitaciones selectivas, CCF preparativas y en columnas de cromatografía de fase reversa y normal. En las columnas de fase normal, el TAT se obtuvo con 3-5% cloroformo/metanol, mientras que el DAT se obtuvo con solventes de 10-12.5% cloroformo/metanol. A partir de este punto, el grado de pureza de ambos glicolípidos es alto, pues las grasas y otros compuestos han sido prácticamente eliminados. Para visualizar el TAT y DAT, la CCF se corrió utilizando cloroformo/metanol (8:2, vol/vol).

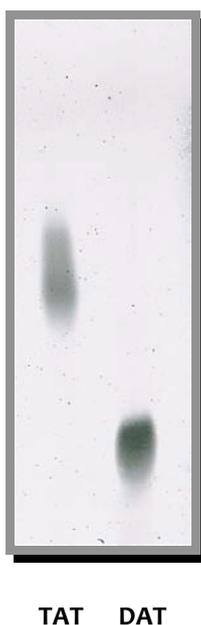


Figura 2. Purificación de DAT y TAT. CCF de los lípidos purificados mediante distintas técnicas. A partir de este grado de pureza, ambos compuestos pueden utilizarse para hacer los ensayos biológicos.

Finalmente, una fracción del lote total de cada lípido fue analizada para determinar la contaminación por endotoxinas, mediante la prueba de coagulación del lisado de amebocitos de *Limulus*. Todas las muestras fueron negativas, pues la concentración de endotoxinas detectable fue menor a 2 λ /ml.

IX. 2 Obtención de la pared micobacteriana enriquecida en LpqH.

Para confirmar la presencia de LpqH en la pared de *M. smegmatis* transformada con el plásmido p16R1 (que contiene el gen de la LpqH de *M. tuberculosis*), se llevó a cabo un inmuno-blot con un anticuerpo monoclonal de ratón en contra de LpqH y con un anticuerpo secundario anti-IgG marcado con peroxidasa. Al revelar la membrana por quimioluminiscencia o con diaminobencidina, se detectó una banda de 19 kDa que corresponde a LpqH (Fig. 3), no observándose bandas reactivas en la pared de *M. smegmatis* nativa.

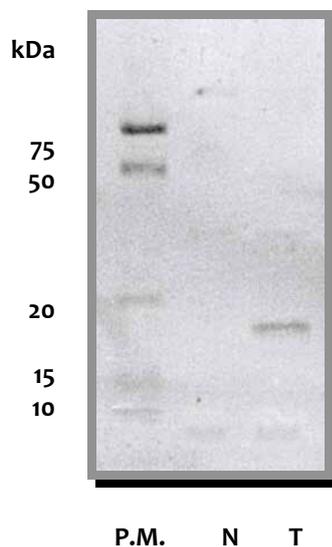


Figura 3. Inmuno-blot de la pared de *M. smegmatis* nativa y transformada. La membrana de PVDF fue incubada con un anticuerpo monoclonal anti-LpqH y revelada con DAB. Se observa una banda reactiva que corresponde al peso de 19 kDa en la pared de *M. smegmatis* transformada, pero no en la pared de la bacteria nativa. P.M., pesos moleculares; N, *M. smegmatis* nativa; T, *M. smegmatis* transformada.

IX. 3 Curvas de estandarización para la producción de óxido nítrico por activación de macrófagos J774 y RAW 264.7

Para determinar la concentración de LPS/ IFN- γ que se requería para generar una óptima producción de NO, se realizaron curvas de activación utilizando células J774. Los resultados obtenidos fueron posteriormente extrapolados a la activación de macrófagos de médula ósea y a la línea celular RAW 264.7. En un principio, las pruebas se hicieron usando la línea celular J774, pues se ha reportado que éstas generan cantidades considerables de NO al ser estimuladas (Singh y col., 2005); no obstante, dichas células dejaron de producir NO, pues tienden a hiperactivarse fácilmente y dejar de funcionar para estos fines. Por lo tanto, se adquirió de manera posterior la línea celular RAW 264.7, que es más eficiente en la producción de NO (Hirvonen y col., 1997). Primero, se probó la activación celular estimulando con IFN- γ en concentraciones crecientes en unidades, pues así es como la mayoría de los artículos consultados reportaban su uso (Singh y col., 2005); sin embargo, al observar un mínimo efecto en la activación de la producción de NO, se trató con cantidades crecientes en nanogramos.

En las curvas de estandarización, se estimularon 2×10^5 células con diferentes concentraciones de LPS y/o IFN- γ , a 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Para la activación con LPS, se probaron concentraciones de 1 ng/ml hasta 20 μ g/ml, mientras que para el IFN- γ , se probaron concentraciones en un rango de unidades, hasta microgramos (3 U/ml hasta 1 μ g/ml). Al transcurrir los tiempos establecidos, los sobrenadantes fueron colectados y se cuantificó la producción de NO por la reacción de Griess. A continuación, se muestra la producción de NO en células J774 estimuladas con LPS (Fig. 4). Los datos se extrapolaron de

una curva patrón con correlación lineal de $R^2=0.997$. La mayor producción de NO se obtuvo al estimular con 500ng/ml de LPS por 48 horas.

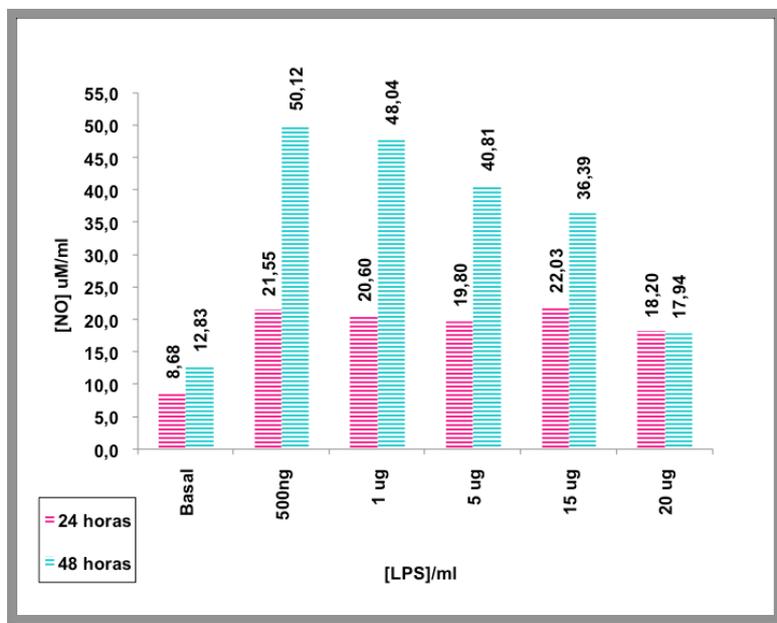


Figura 4. Producción de NO en macrófagos J774. Se trataron 2×10^5 células con distintas concentraciones de LPS, incubando por 24 y 48 horas. La cantidad de NO es detectada en los sobrenadantes de cultivo por la reacción de Griess. Experimento representativo de tres.

En la Figura 5 se muestran los datos de producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y/o IFN- γ por 48 horas. Los datos se extrapolaron de una curva patrón con una correlación lineal de $R^2=0.9996$; la mayor producción de NO se obtuvo al usar 500ng/ml de LPS o 250ng/ml de IFN- γ . Los datos obtenidos para otros tiempos menores a 48 horas con las mismas concentraciones de LPS y/o IFN- γ , no dieron una producción de nitritos detectables, o las cantidades obtenidas no fueron mayores a los controles negativos (datos no mostrados).

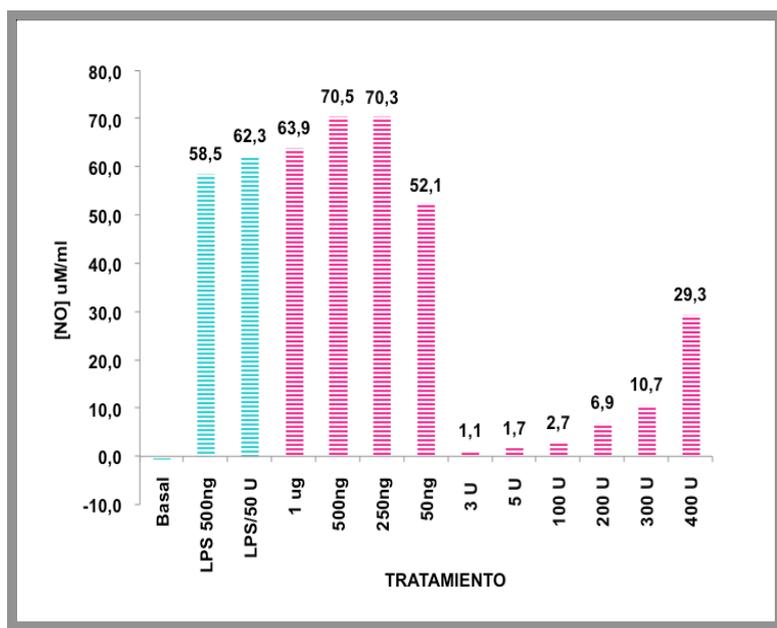
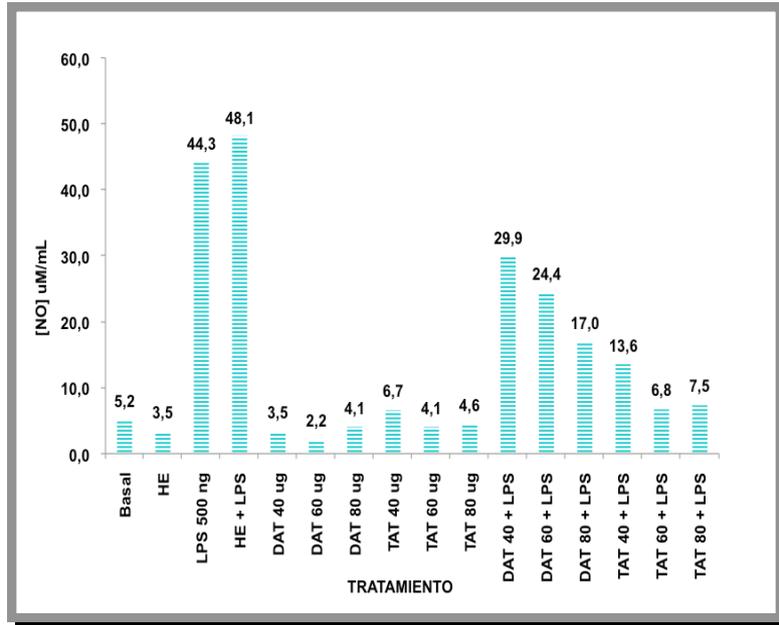


Figura 5. Producción de NO por macrófagos RAW 264.7 tratados con LPS y/o IFN- γ . Se trataron 2×10^5 células con LPS y/o IFN- γ (barras azules), ó sólo con IFN- γ (barras rosas), en concentraciones crecientes de unidades (U) o nanogramos (ng), incubando por 48 horas. Experimento representativo de tres; la cantidad de NO es detectada en los sobrenadantes de cultivo por la reacción de Griess.

IX. 4 El TAT y DAT inhiben la producción de NO inducida por LPS.

Para analizar el efecto de DAT y TAT sobre la producción de NO, se realizaron tres experimentos con macrófagos de medula ósea de ratones Balb/CJ. En la Figura 6, se observa que cantidades crecientes de TAT y DAT no alteran la producción de NO con respecto al control. Sin embargo, la presencia de DAT y TAT inhibe de forma dependiente de la concentración la producción de NO inducida por LPS. Al tratar las células con distintas dosis de TAT ó DAT (40, 60 y/o 80 μg), se observa una reducción de hasta un 77.3% con TAT y de 53.5 % con DAT (Tabla 1).

A



B

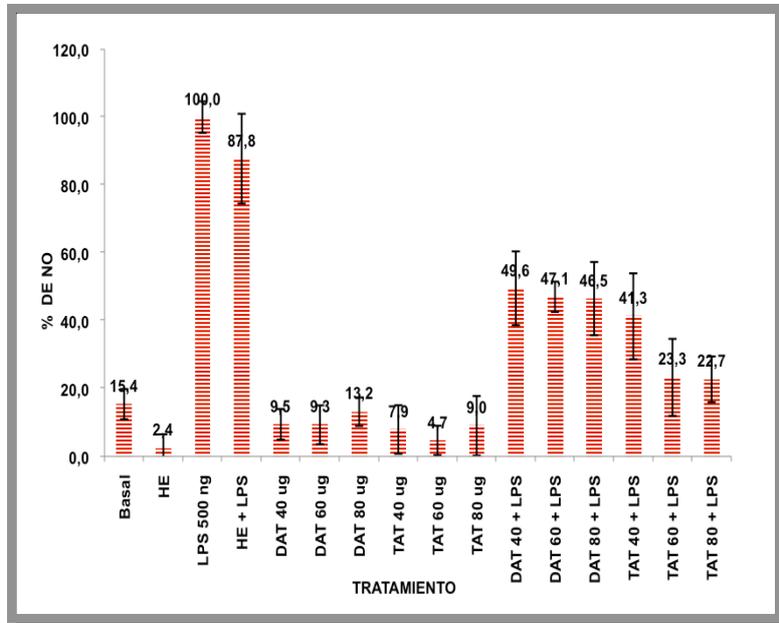


Figura 6. Inhibición de la síntesis de NO por TAT y DAT. Se trataron macrófagos de médula ósea con DAT o TAT, en la presencia o ausencia de LPS. A. Experimento representativo con macrófagos de medula ósea, donde se muestran los valores absolutos en la producción de NO, observándose un efecto inhibitorio de ambos glicolípidos. B. Promedio de 3 experimentos independientes; los datos muestran el porcentaje de inhibición en la producción de NO inducida por LPS (tomado como el 100%), debido al tratamiento con DAT y TAT; HE, hexano etanol (vehículo para depósito de lípidos).

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la síntesis de NO en macrófagos de médula ósea tratados con LPS y distintas concentraciones de DAT y TAT. (Promedio de tres experimentos independientes).

Tratamiento [µg]	% Producción de NO	% Inhibición
DAT 40 + LPS	49.6 ± 10.89	50.4
DAT 60 + LPS	47.1 ± 4.46	52.9
DAT 80 + LPS	46.5 ± 10.80	53.5
TAT 40 + LPS	41.3 ± 12.65	58.7
TAT 60 + LPS	23.3 ± 11.34	76.7
TAT 80 + LPS	22.7 ± 6.75	77.3

IX.5 LpqH inhibe la producción de NO inducida por LPS e IFN-γ.

Para evaluar el efecto de la pared de *M. smegmatis* rica en LpqH sobre la producción de NO inducida por LPS o por IFN-γ, se realizaron múltiples experimentos con la línea de macrófagos RAW 264.7. En la Figura 7 se muestra que hay un incremento en la producción de NO hasta de un 54.1% en células tratadas con la pared de *M. smegmatis* nativa, que se atribuye a los diversos compuestos inductores presentes en la pared de la bacteria nativa. Al estimular las células con diferentes concentraciones del sonocado de pared enriquecida con LpqH (50 y 100 µg/ml), no hay una inducción en la producción de NO atribuible a la presencia de LpqH, pues la cantidad de NO que se produce no es mayor a la generada por la pared de la bacteria nativa y no se observa un efecto aditivo. De la misma manera, la producción de NO en las células tratadas con la pared rica en LpqH (sin ser estimuladas con LPS) podría deberse a diversos compuestos inductores presentes en la pared de la bacteria nativa.

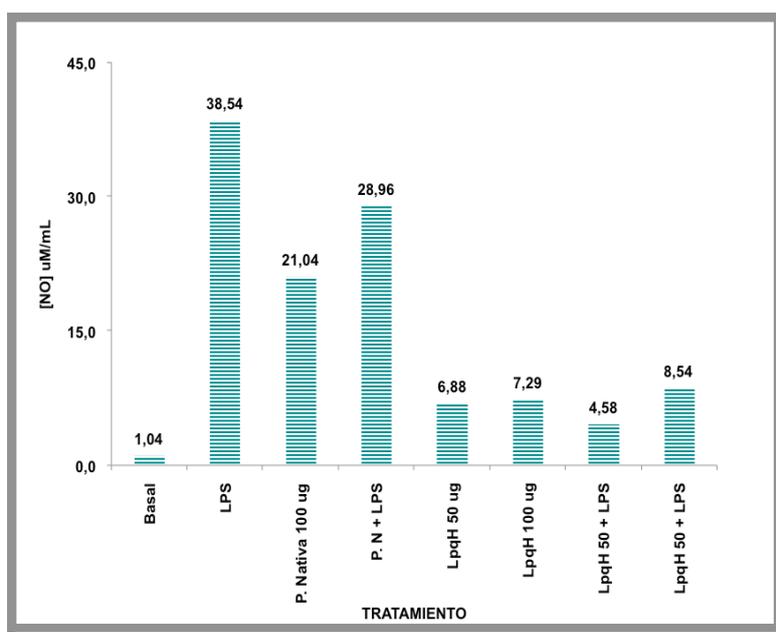
Al tratar las células simultáneamente con 50 µg de la pared rica en LpqH y LPS, se observa una inhibición significativa en la síntesis de NO de hasta un 84.5%. La pared de la bacteria nativa tiene también un efecto

inhibitorio en la producción de NO, pero de un rango menor (37.2%) (Figura 7). No obstante, para obtener valores de inhibición en la producción de NO atribuibles únicamente a LpqH, se debe restar el valor de inhibición generado por la pared de bacteria nativa al porcentaje de inhibición inducido por LpqH (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de inhibición de la síntesis de NO con distintas concentraciones de pared de *M. smegmatis* que expresa LpqH, o con pared de *M. smegmatis* nativa. Los valores de inhibición por LpqH se obtuvieron restando la inhibición generada por la pared de la *M. smegmatis* nativa.

Tratamiento [µg]	% Producción de NO	% Inhibición
Nativa + LPS	62.8 ± 5.12	0
50 µg LpqH + LPS	15.5 ± 3.53	47.3
100 µg LpqH + LPS	15.8 ± 3.33	47

A



B

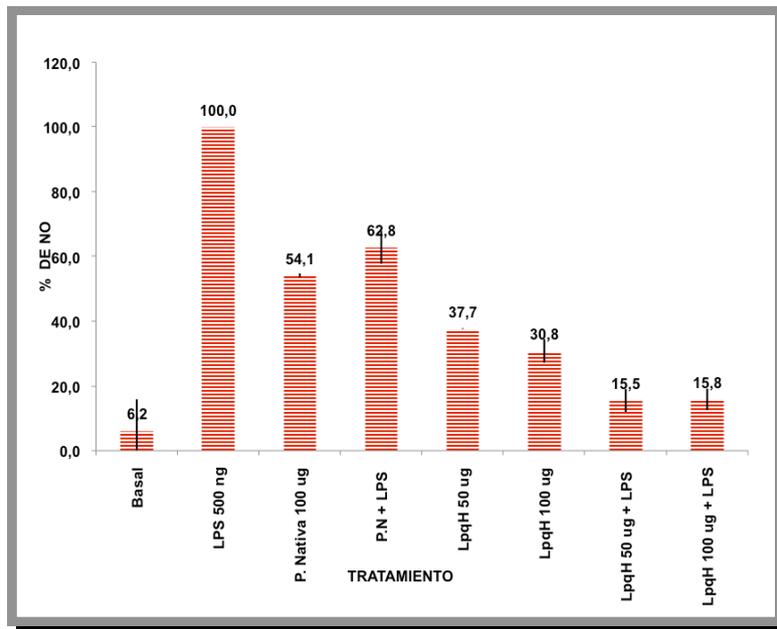


Figura 7. Inhibición en la producción de NO por LpqH en células estimuladas con LPS. A. Experimento representativo que muestra los valores absolutos en la producción de NO, donde se observa el efecto inhibitorio de los sonicados; B. Promedio de 3 experimentos independientes. Los datos son expresado como el porcentaje de la inhibición en la de producción de NO. P.N., Pared de *M. smegmatis* nativa.

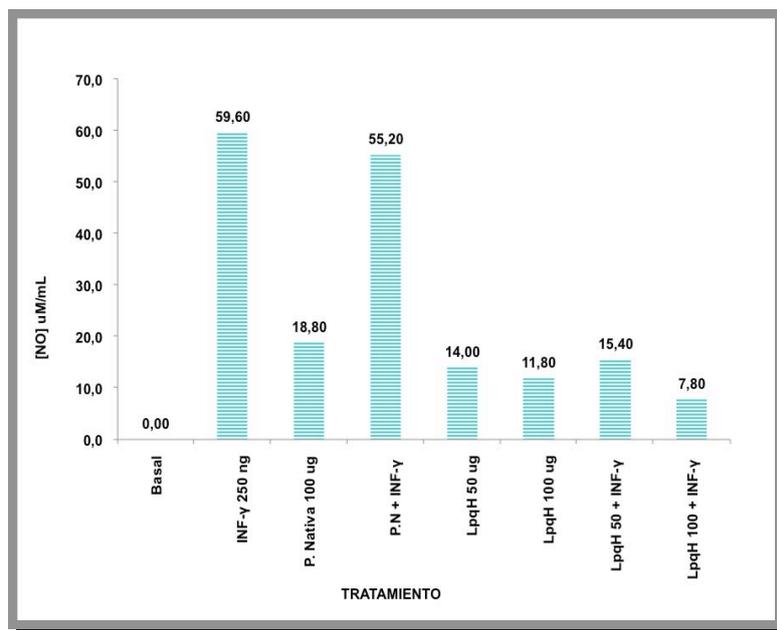
En el caso de las células tratadas con LpqH y co-estimuladas con IFN- γ , se observa un patrón muy similar de inhibición de la síntesis de NO al observado con LPS (Fig. 8). De manera similar, cuando las células son tratadas con el sonicado de bacteria nativa, hay también inducción de la síntesis de NO de hasta un 33.2 %. Al estimular las células con las diferentes dosis del sonicado enriquecido con LpqH (50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), no hay inducción en la producción de NO atribuible a LpqH. No obstante, cuando las células son tratadas simultáneamente con LpqH e IFN- γ , hay una inhibición significativa de la síntesis de NO (80.2%), mientras que el sonicado de la bacteria nativa sólo inhibe un 6.7%. De la misma manera, para obtener los valores de inhibición de

la producción de NO inducida por LpqH, es necesario restar la inhibición generada por la pared de *M. smegmatis* nativa.

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de la síntesis de NO con distintas concentraciones de sonicado de *M. smegmatis* transformada o nativa, en células co-estimuladas con IFN- γ . Los valores de inhibición por LpqH se obtuvieron restando la inhibición generada por la pared de la *M. smegmatis* nativa.

Tratamiento [μ g]	% Producción de NO	% Inhibición
Nativa + IFN- γ	93.3 \pm 1.22	0
50 μ g LpqH + IFN- γ	23.0 \pm 9.98	70.6
100 μ g LpqH + IFN- γ	19.8 \pm 17.34	73.5

A



B

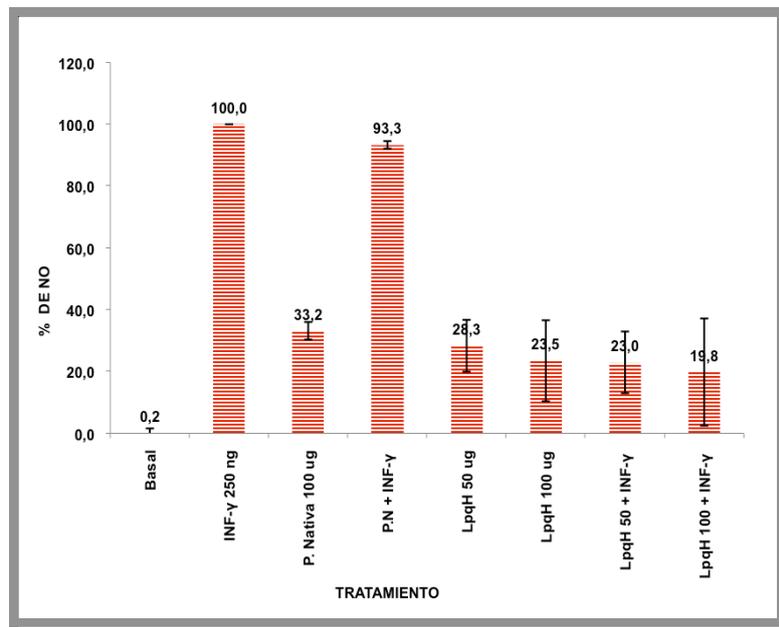


Figura 8. Inhibición en la producción de NO por LpqH en células RAW 264.7 estimuladas con IFN- γ . A. Experimento representativo que muestra los valores absolutos en la producción de NO, donde se observa el efecto inhibitorio de los sonicados; B. Promedio de 3 experimentos independientes en el que se muestra el porcentaje inhibición en la de producción de NO. P.N., Pared de *M. smegmatis* nativa.

IX.6 LpqH inhibe la producción de NO, al inhibir la traducción de iNOS.

Para evaluar si el efecto inhibitorio de la pared de *M. smegmatis* transformada con LpqH en la síntesis de NO, se debía a una disminución en expresión de la enzima iNOS, se realizó un inmuno-blot para determinar la cantidad de proteína que se expresaba en las células después de los tratamientos. Después de la electro-transferencia, la membrana PVDF fue incubada con anticuerpo monoclonal de ratón α -iNOS (1:2000) toda la noche, y revelada por DAB. Aunque se realizaron varios experimentos, en sólo uno de estos se observó el efecto esperado, pues no se pudo completar la estandarización para obtener las condiciones apropiadas para realizar el blot. En la Figura 9 se muestra el

inmuno-blot representativo; aunque en éste no fue posible incluir controles de carga, se puede apreciar que en comparación con la expresión basal de iNOS en células no tratadas, hay un incremento semejante en la densidad de la banda que corresponde a iNOS en células tratadas con LPS, IFN- γ , pared de *M. smegmatis* nativa y con LpqH. De manera notable, se observa la ausencia de iNOS en las células que fueron co-incubadas con 100 μ g LpqH y con LPS/IFN- γ (500/250 ng). Esta observación sugiere la capacidad inhibitoria de LpqH en la expresión de iNOS inducida por LPS e IFN- γ .

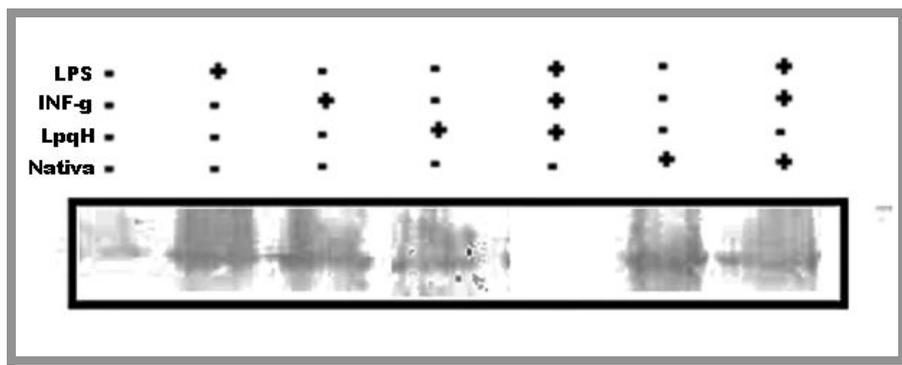


Figura 9. Inmuno-blot de las proteínas totales citosólicas de células RAW 264.7, después de ser tratadas con las paredes de *M. smegmatis* transformada y nativa y con LPS y/o IFN- γ . La membrana PVDF fue incubada con anticuerpo monoclonal de ratón α -iNOS (1:2000) toda la noche, y revelada por DAB. Se realizó un solo experimento.

IX.7 Análisis de la viabilidad celular en los experimentos de inducción/inhibición de la producción de NO con LpqH.

Para evaluar si la viabilidad celular se veía afectada, se realizó citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, utilizando como indicador de apoptosis Anexina-V acoplada a FITC. Asimismo, para evaluar necrosis, se utilizó yoduro de propidio (IP) o 7-AAD. En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos expresados en porcentaje de muerte celular para cada tratamiento. Después de restar la muerte celular basal a cada condición, y considerando ambos tipos de

muerte (necrosis y apoptosis), se observa que el tratamiento con LPS genera un 22 % de muerte celular, mientras que con IFN- γ , se observa una mortalidad celular de 32 %. El tratamiento con la pared de *M. smegmatis* nativa produce una mortalidad celular del 46%, mientras que el tratamiento con la pared de *M. smegmatis* transformada con LpqH, no afecta la viabilidad celular. Es de interés señalar que el tratamiento simultáneo con LPS o IFN- γ y con la pared de una u otra bacteria, no incrementa la tasa de muerte celular puesto que no hay un efecto aditivo. Estos datos muestran que el decremento en la producción de NO inducido por LpqH no se puede atribuir a una disminución en la viabilidad celular. En la Figura 10 se muestran las fotografías correspondientes a la microscopía de fluorescencia, y en la Figura 11, los dot-plots de la citofluorometría.

Tabla 4. Muerte celular por apoptosis/ necrosis inducida por el tratamiento con la pared de *M. smegmatis* nativa y transformada con LpqH, LPS y/o IFN- γ . Los valores son expresados en porcentaje de células sin marca (células vivas) y células en apoptosis /necrosis (marcadas positivamente con Anexina-V/ IP). La muerte basal se ha restado a cada condición para obtener valores atribuibles a cada tratamiento. Datos de un experimento representativo de tres.

Tratamiento (48 Horas)	% Células vivas	% Células muertas por Apoptosis / necrosis
Basal	83.205	16.795
Estaurosporina (43 μ M)	67.08	32.92
LPS (500 ng)	77.735	22.265
IFN- γ (250 ng)	67.63	32.37
LpqH 50 μ g	100	0
LpqH 50 μ g + LPS	89.46	10.54
LpqH 50 μ g + IFN- γ	69.065	30.935
Nativa 100 μ g	53.78	46.22
Nativa + LPS	70.21	29.79

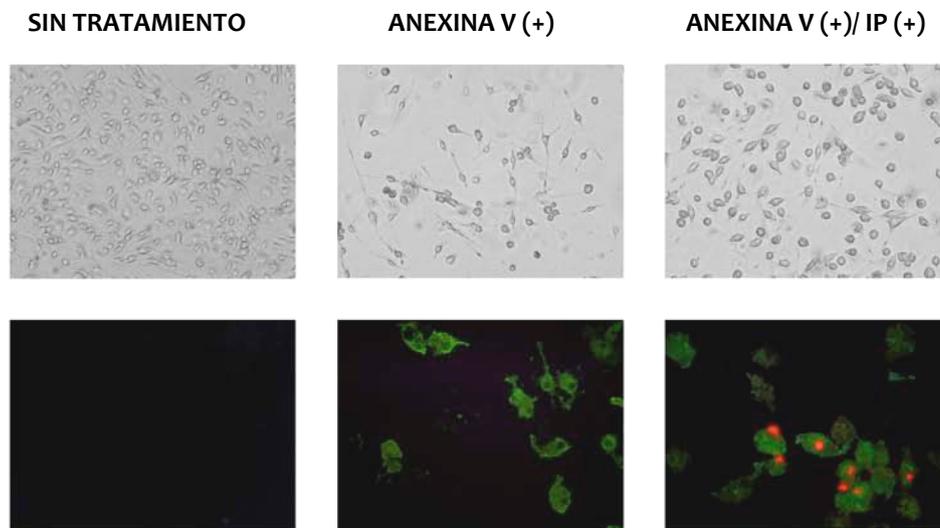


Figura 10. Microfotografías en campo claro y por microscopía de fluorescencia de células sin tratamiento para inducción de apoptosis, en apoptosis temprana inducida por estaurosporina (Anexina V positivas) y en apoptosis tardía (Anexina V /IP positivas), la cual fue inducida prolongado en tiempo de incubación.

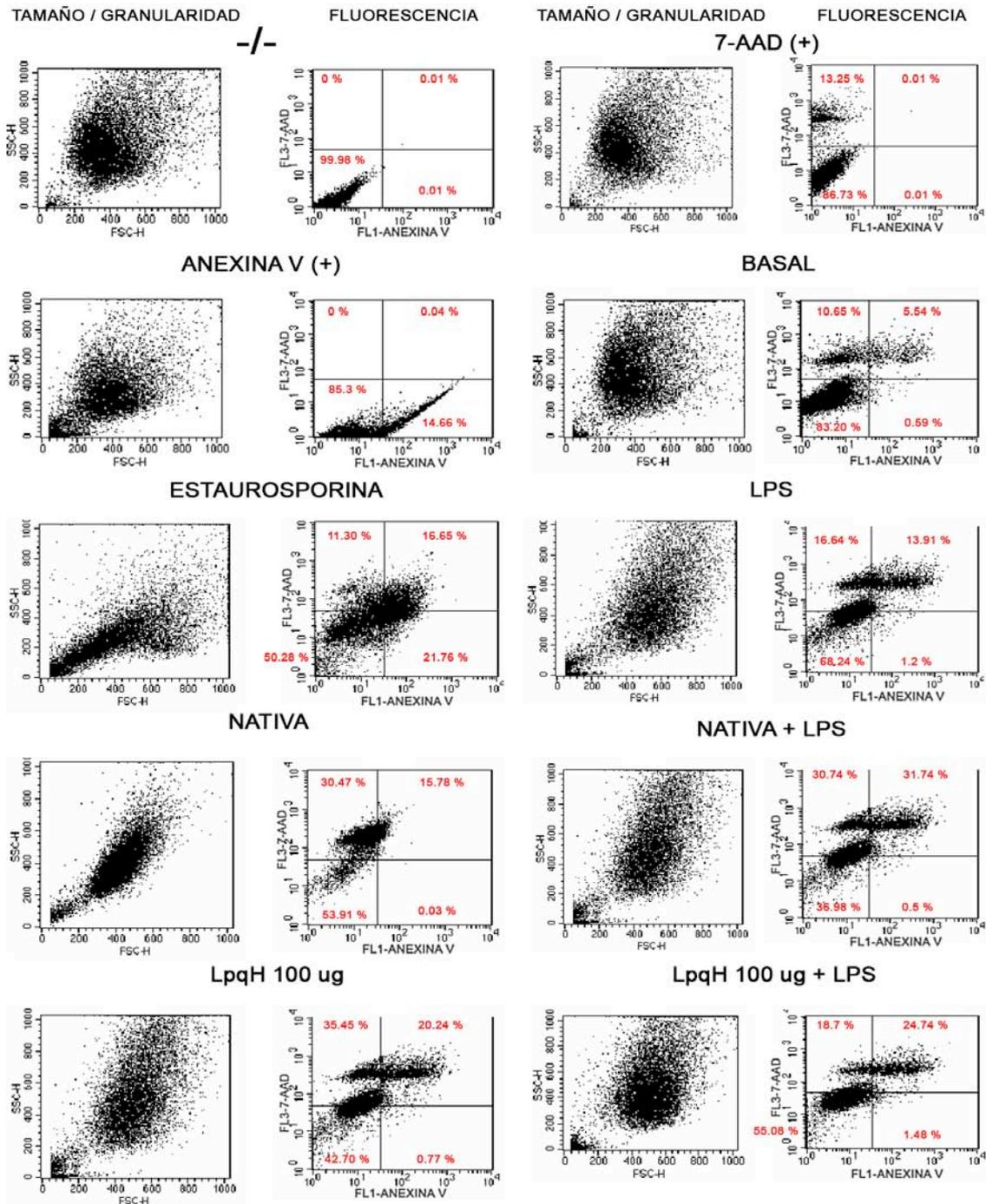


Figura 11. Dot-plots obtenidos por citofluorometría. Las células marcadas con Anexina V-FITC se localizan en el cuadrante superior izquierdo, y las marcadas con 7-AAD en el cuadrante inferior derecho. En el cuadrante superior derecho se agrupan células apoptótico/necróticas. Se indican los porcentajes correspondientes así como los tratamientos. Datos de un experimento representativo de tres.

X. DISCUSIÓN

Una característica peculiar de *M. tuberculosis* es su capacidad para permanecer dentro del organismo, a pesar de la respuesta inmune que se desencadena en su contra. Esto indica que esta bacteria es un patógeno intracelular altamente exitoso capaz de subsistir y de replicarse al interior del macrófago, que es sin duda, la célula mejor equipada para contender con microbios intracelulares.

Entender cómo es que *M. tuberculosis* logra esta hazaña, constituye un campo de investigación activo y fascinante, pues las estrategias que el bacilo despliega con este fin son variadas. En la fase inicial de la infección, para ser internalizado por el macrófago, el bacilo utiliza de manera preponderante el receptor de manosa, un receptor de la familia de las lectinas de tipo C que reconoce motivos de carbohidrato. Para que dicha interacción se lleve a cabo, el bacilo cuenta con una variedad de moléculas de superficie que funcionan como ligandos, como son lipoarabinomano y ciertas glicoproteínas de la pared, pues estos contienen carbohidratos como manosa (Kang y col., 1998; Diaz-Silvestre y col., 2005). Esta vía de infección se ha considerado permisiva, pues promueve la activación de programas anti-inflamatorios, que son tolerantes para el crecimiento intracelular de la micobacteria (Astarie-Dequeker y col., 1999).

El macrófago infectado por el bacilo de la TB presenta varios defectos funcionales que le impiden eliminarlo (Hestvik y col., 2005). En primer lugar, el fagosoma infectado por micobacterias, es incapaz de fusionarse con lisosomas, lo que protege al bacilo de la acción lítica de factores lisosomales. Otros defectos incluyen la disminución en la capacidad de procesar y presentar

antígeno, la respuesta reducida al IFN- γ y la producción disminuida de citocinas pro-inflamatorias y de radicales libres de oxígeno y nitrógeno; recientemente, se ha observado que las micobacterias son capaces de manipular a su conveniencia la muerte celular programada del macrófago (Keane y col., 2000).

En estudios recientes, se han identificado diversos componentes de la pared celular que podrían estar involucrados en pasos clave de la patogénesis, funcionando como factores de virulencia, como diversos glicolípidos y glicolipoproteínas, como son LpqH, y LAM (Hestvik y col., 2005). En el presente trabajo se investigó el papel de los glicolípidos DAT y TAT de la pared de *M. tuberculosis*, en la producción de NO inducida por LPS o IFN- γ en macrófagos. Este trabajo es apoyado por observaciones previas, en las que se demuestra que el DAT inhibe la proliferación de esplenocitos de ratón y la secreción de citocinas pro-inflamatorias en linfocitos y macrófagos (Saavedra y col., 2006; Kil-Soo Lee, 2007). Considerando lo anterior, se postuló que el DAT y TAT podrían afectar funciones efectoras del macrófago.

Se demostró que ambos glicolípidos inhiben la producción de NO inducida por LPS; la inhibición observada fue de hasta un 77.3% con TAT y un 53.5% con DAT. Aunque los mecanismos involucrados en dicha inhibición no se analizaron en este trabajo, experimentos preliminares indican que el DAT puede alterar cascadas de señalización reguladas por proteínas de amplia distribución en diversas estirpes celulares, como las cinasas MAPK, PKC y ERK 1/2 (Palma-Nicolás y col., 2009). Las cascadas de señalización intracelulares que activan la síntesis de NO, incluyen aquellas que son dependientes de diversas moléculas como MAPK, NF- κ B y AP-1 (Lowenstein y col., 2004). Por lo tanto, las rutas de señalización alteradas por el DAT pueden

estar involucradas en la producción de óxido nítrico (NO), un importante agente microbicida generado por el macrófago (Lowenstein y *col.*, 2004).

Se postula que el mecanismo inhibitorio de estos lípidos se da como resultado del silenciamiento de cascadas de señalización esenciales para la activación de la traducción de iNOS. En este trabajo, el efecto del DAT/TAT sobre la traducción de dicha proteína no fue explorado, puesto que la estandarización de la densitometría para cuantificar la expresión de iNOS por inmuno-blot no ha sido completada.

Los microdominios son clusters de lípidos, ricos en colesterol, ácidos grasos y otras moléculas de membrana, como proteínas trans-membranales específicas, que forman unidades discretas en las membranas celulares. Estos cumplen una función importante en la facilitación de procesos celulares importantes, como la interacción de receptores para la activación de la señalización intracelular. Diversos experimentos muestran que la señalización mediada por moléculas presentes en microdominios lipídicos puede ser interrumpida al introducir agentes que destruyen dichas balsas lipídicas, o que impiden la formación de las mismas (Nelson y Cox., 2005). Por otro lado, es posible que DAT y TAT puedan generar interacciones no específicas con membranas celulares, alterando procesos importantes como el reclutamiento de receptores o moléculas co-estimuladoras para la formación de microdominios.

Otra posibilidad es que estos lípidos interactúen de manera directa con receptores celulares como TLR-4 o TLR-2, actuando como antagonistas, como se ha demostrado para otros glicolípidos, como LAM. No obstante, para comprender de forma detallada el tipo de interacción que ocurre entre el DAT

/TAT y los macrófagos, es importante analizar en detalle la actividad de distintos receptores celulares, y las moléculas de señalización dependientes de éstos.

En este trabajo también se demostró que la pared de *M. smegmatis* enriquecida en LpqH tiene un importante efecto inhibitorio sobre la producción de NO inducida por LPS e IFN- γ en macrófagos; la inhibición observada fue de 47% cuando las células se co-estimulan con LPS, y de 73% cuando son tratadas con IFN- γ ; por otro lado, no se observó inducción significativa en la producción de NO atribuible a LpqH. Además, se demostró que LpqH inhibe la expresión de iNOS inducida por LPS e IFN- γ , lo cual explica la disminución en la producción de óxido nítrico. Estas observaciones contrastan con un estudio previo, en el que se muestra que LpqH induce la producción de NO de manera dependiente de TLR- 2 (Uszynski y Bloom, 2001); no obstante, aunque en dicho estudio se trabajó con células de ratón, los autores trabajaron con la proteína purificada y no se evaluó el efecto de LpqH sobre la síntesis de NO inducida por LPS o IFN- γ . Por lo tanto, no se puede descartar que la LpqH tenga un efecto dual, tanto estimulador como inhibitorio, sobre la producción de NO.

Consideramos que la actividad inhibitoria de la pared de *M. smegmatis* rica en LpqH, puede atribuirse a la presencia de esta proteína, pues al comparar la inhibición inducida por la pared de *M. smegmatis* nativa, se observa una diferencia muy importante a favor de la pared de la micobacteria transformada. La pared de *M. smegmatis* transformada inhibe la producción de NO inducida por LPS un 47.3% más que la pared de la bacteria nativa y un 73.5% más

cuando la producción de NO es dependiente de IFN- γ . Sin embargo, es necesario confirmar estos datos haciendo experimentos con la LpqH purificada.

En cuanto a los mecanismos involucrados en dicha inhibición, se sabe que LpqH interacciona de manera directa con TLR-2, modulando distintos aspectos de la respuesta inmune innata (Ciaramella *y col.*, 2004; Fulton *y col.*, 2004; Noss *y col.*, 2001; López *y col.*, 2003). En trabajos previos, se ha demostrado que la exposición prolongada de macrófagos humanos y de ratón a LpqH interfiere con la señalización de IFN- γ . Dicha interferencia es dependiente de la señalización continua de TLR-2, y resulta en el bloqueo de la transcripción de genes cuya expresión es responsiva al IFN- γ . Por lo tanto, es probable que LpqH inhiba la expresión de iNOS vía TLR-2 o interfiriendo con otras rutas con señalización cruzada.

Para determinar si la disminución en la expresión de iNOS y en la producción de NO se relacionaban con una disminución en la viabilidad celular, se realizaron estudios de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia utilizando como marcador de apoptosis la Anexina-V, y como marcador de muerte celular por necrosis el yoduro de propidio (IP) y el 7-AAD. Se observó que LPS induce hasta un 22.2 % de muerte celular y el IFN- γ hasta un 32.3 %, mientras que 50 μ g de LpqH no inducen muerte celular. Así pues, LpqH no potencia el efecto necrótico/apoptótico del LPS o del IFN- γ . Estas observaciones contrastan con otras hechas en trabajos previos, en las cuales se ha demostrado que LpqH induce apoptosis significativa vía TLR-2 en monocitos y macrófagos de humanos y ratón (Ciaramella *y col.*, 2004). Las diferencias observadas podrían deberse a que las células utilizadas en este

trabajo son de origen neoplásico, y con frecuencia son más resistentes a la muerte.

Asimismo, el incremento en la tasa de muerte debida principalmente a necrosis en las células tratadas con la pared de *M. smegmatis* nativa, podría explicarse por la hipótesis que postula que las bacterias no patógenas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* inducen una alta tasa de muerte celular por necrosis, en comparación a la alta tasa de apoptosis inducida por las bacterias patógenas (Cole y col., 2004). Esto podría sugerir que la necrosis contribuye a generar una potente respuesta inmune pro-inflamatoria que protege al hospedero contra micobacterias no patógenas (Cole y col., 2004). Por otro lado, ha sido esclarecido el papel de la apoptosis

En cuanto a la apoptosis observada con LPS e IFN- γ , se ha demostrado que el LPS induce apoptosis por dos mecanismos (Seminara y col., 2007). El primero es mediado por la secreción autócrina de TNF- α (relacionada a tiempos cortos y a apoptosis temprana); el segundo, está asociado con la producción de NO (en fases tardías por tiempos prolongados). El NO induce apoptosis al activar la fosforilación de JNK, promover la liberación del citocromo C mitocondrial, inducir la sobre expresión de p53, y al generar estrés oxidativo (Xaus y col., 2000). Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento con IFN- γ induce apoptosis por la sobre expresión de Fas y Bax, así como del factor de transcripción STAT1, que regula la expresión de caspasas y otras moléculas pro-apoptóticas (Inagaki y col., 2002). Por lo tanto, no es posible descartar que importantes mediadores del sistema inmune, como son NO, TNF- α e IFN- γ , pueden jugar un papel dual en la protección del macrófago contra la micobacteria; por un lado, al inducir apoptosis, podrían disminuir el pool de

macrófagos que pueden atacar la infección, pero por otro, estas moléculas activan o forman parte de mecanismos microbicidas, que conllevan a la erradicación de la bacteria. El papel de la apoptosis mediada por estos efectores en la activación de la respuesta inmune ante un patógeno, permanece poco claro y controversial.

La interacción temprana que ocurre entre macrófagos y *M. tuberculosis* es crucial para definir el resultado de una infección. Aunque el papel del NO como mecanismo de defensa contra la tuberculosis en humanos es controversial, hay evidencia creciente de que éste podría ser importante en el control de la infección. *M. tuberculosis* ha evolucionado diversas estrategias para poder establecer la infección crónica, que desemboca en el desarrollo de la patología aguda. Los compuestos estudiados en este trabajo son probablemente factores de virulencia que confieren ventaja evolutiva, protegiendo a la bacteria del sistema inmune y favoreciendo su permanencia en el hospedero, al contribuir en la evasión de un importante mecanismo de eliminación. Para esclarecer el papel de estos durante la infección activa con *M. tuberculosis*, es necesario evaluar si el DAT, el TAT y la LpqH son capaces de cambiar el curso de una infección experimental *in vivo* o *in vitro*.

XI. CONCLUSIONES

Los glicolípidos DAT/TAT y la glicolipoproteína LpqH son tres moléculas que disminuyen la síntesis de NO dependiente de LPS e IFN- γ en macrófagos, por lo que modulan negativamente una parte de respuesta inmune innata, que desencadena ante una infección con *M. tuberculosis*. La actividad inhibitoria del *M. smegmatis* transformada con LpqH es resultado de la disminución en la traducción de la enzima iNOS, y probablemente se puede atribuir a la presencia de LpqH. La viabilidad celular no juega un papel importante en la inhibición de la síntesis de NO. Los compuestos estudiados son factores de virulencia que, probablemente, contribuyen al establecimiento de la enfermedad, modulando aspectos claves de la respuesta inmune innata como es la producción de NO. Dicha actividad inmuno-moduladora por estos compuestos, particularmente del TAT, no ha sido descrita anteriormente. Sin embargo, es necesario explorar a fondo los mecanismos de acción de éstos y su papel en la infección activa en modelos *in vitro* e *in vivo*.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Andersen P. Tuberculosis vaccines. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007 Jul; 5(7):484-7

Arbeláez, M. P, BCG vaccine effectiveness in preventing tuberculosis and its interaction with human immunodeficiency virus infection. 2000, *International journal of epidemiology*, 29:1085-1091.

Arko-Mensah J, Julián E, Singh M, Fernández C. TLR2 but not TLR-4 signaling is critically involved in the inhibition of INF-gamma-induced killing of mycobacteria by murine macrophages. *Scand J Immunol.* 2007 Feb;65(2):148-57

Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun.* 1999;67:469-77

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans, *N Engl J Med.* 1998 Mar 5; 338 (10):640-4

Besra, G. Bolton, R. McNeil, M.R. Ridel¹, M. Simpson, K. Glushka, J. Vaan Halbeek, H. Brennan, J Structural Elucidation of a Novel Family of Acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry* 1992, 31, 9832-9837

Bloom BR, Ed. Tuberculosis. Pathogenesis, Protection, and Control. 1994, ASM Press, Washington.

Brennan, P.J. Structure, Function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 83: 91-97, 2003.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):3684-9.

Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1995 Feb;63(2):736-40.

Chan ED, Heifets L, Iseman MD. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber. Lung Dis.* 80(3), 131–140 (2000).

Chan, ED., J. Chan, and N. W. Schluger. 2001. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 25:606–612.

Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB, Garg SK, Sanarico N, Bocchino M, Galati D, Martino A, Auricchio G, D'Orazio M, Stewart GR, Neyrolles O, Young DB, Colizzi V, Fraziano M. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection, J infect Dis. 2004 Sep 15;190(6):1167-76.

Colakoğlu S. *Mycobacterium tuberculosis* virulence factors and its immune evasion mechanisms, Mikrobiyol Bul. 2004 Jan-Apr;38(1-2):155-67.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, et al: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998, 393:537-544
Cole ST, Eisenach Kathleen Davis, McMurray, David N., Tuberculosis and the tubercle bacillus, 2004, American Society Microbiology .

Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. (Eds.), Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, N.Y, 1996, pp. 14.1.1–14.1.19

Daniel TM. The history of tuberculosis. Respir Med. 2006 Nov; 100(11):1862-70.

De Saint Jean M, Brignole F, Feldmann G, Goguel A, Baudouin C. Interferon-gamma induces apoptosis and expression of inflammation-related proteins in Chang conjunctival cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 Sep;40(10):2199-212

Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. Microb Pathog. 2005;39:97-107.

Escamilla, L., Mancilla, R., Glender, W. & López Marín, L. M. (1996) *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Resp. Crit. Care Med. 154: 1864-1867.

Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2001; 19:93-129.

Flynn, JoAnne, Chan J, Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy, Current Opinion in Immunology 2003, 15:450–455

Fulton SA, Reba SM, Pai RK, Pennini M, Torres M, Harding CV, Boom WH. Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein., infect Immun. 2004 Apr;72(4):2101-10

Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV, Boom WH. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2003 Aug;71(8):4487-97

Gonzalo Asensio J, Maia C, Ferrer NL, Barilone N, Laval F, Soto CY, Winter N, Daffe M, Gicquel B, Martin C, Jackson M. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 2006 Jan 20; 281(3):1313-6. (2005).

Herrmann JL, O'Gaora P, Gallagher A, Thole JE, Young DB. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J*. 1996 Jul 15;15(14):3547-54.

Hestvik AL, Hmama Z, Av-Gay Y. Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol Rev*. 2005; 29: 1041-50.

Hirvonen MR, Nevalainen A, Makkonen N, Mönkkönen J, Savolainen K. Induced production of nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in RAW 264.7 macrophages by streptomycetes from indoor air of moldy houses. *Arch Environ Health*. 1997 Nov-Dec;52(6):426-32.

Hortelano S, Alvarez AM, Boscá L. Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *FASEB J*. 1999 Dec; 13(15):2311-7.

Iles, K. E. and Forman, H. J. (2002) Macrophage signaling and respiratory burst *Immunol. Res.*, 26, pp. 95 - 10521

Inagaki Y, Yamagishi S, Amano S, Okamoto T, Koga K, Makita Z. Interferon-gamma-induced apoptosis and activation of THP-1 macrophages. *Life Sci*. 2002 Oct 11;71(21):2499-508.

Johann AM, Barra V, Kuhn AM, Weigert A, von Knethen A, Brüne B. Apoptotic cells induce arginase II in macrophages, thereby attenuating NO production, *FASEB J*. 2007 Sep;21(11):2704-12.

Kang BK, Schlesinger LS: Characterization of Mannose Receptor-Dependent Phagocytosis Mediated by *Mycobacterium tuberculosis* Lipoarabinomannan.; *Infect Immun*, 1998, 66: 2769-2777.

Kartmann B, Stenger S, Niederweis M. Porins in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1999 Oct;181(20):6543-6.

Kauffmann SH, Protection against tuberculosis: cytokines, T cells and Macrophages. *Ann Rheum Dis* 2002: 61 suppl. II9, 54-58

Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol.* 2000; 164:2016-20.

Kil-Soo Lee, Vinod S. Dubey, Pappachan E. Kolattukudy, Chang-Hwa Song, A-Rum Shin, Saet-Byel Jung, Chul-Su Yang, Su-Young Kim, Eun-Kyeong Jo, Jeong-Kyu Park; Hwa-Jung Kim. (2007) Diacyltrehalose of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits lipopolysaccharide- and mycobacteria-induced proinflammatory cytokine production in human monocytic cells. *FEMS Microbiology Letters* 267:1, 121–128

Liu, J., Barry, c. II, Besra, G. S., and Nikaido, H. (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity for the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* 271, 29545-29551.

López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol.* 2003 Mar 1;170(5):2409-16.

Lowenstein CJ, Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance, *J Cell Sci.* 2004 Jun 15;117(Pt 14):2865-7

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.

MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5243-8.

Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999 Oct 1;163(7):3920-7

Martin C. Tuberculosis vaccines: past, present and future, *Curr Opin Pulm Med.* 2006 May;12(3):186-91.

Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppee, J.-Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J. S., Truman, R. W., Williams, D. L., Gelber, R., Virmond, M., Flageul, B., Cho, S.-N., Ji, B., Paniz-Mondolfi, A., Convit, J., Young, S., Fine, P. E., Rasolofo, V., Brennan, P. J., Cole, S. T. (2005). On the Origin of Leprosy. *Science* 308: 1040-1042

Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol.* 1997 Apr;9(2):87-92.

Muños, M. Lanéelle, MA, Luquin, M, Torrelles J, Julián, e, Austina V, Daffé, M, 1997, Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol . Lett.* 157:251-259.

Nelson, D., Cox, M. Lehninger Principles of Biochemistry, NY-EUA, W.H Freeman y Co, 4ta ed, 2005.

Nerlich AG, Haas CJ, Zink A, Szeimies U, Hagedorn HG. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet*. 1997 Nov 8;350(9088):1404.

Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):9108.

Nunn, P. Williams, B. Floyd, K. Dye, C. Elzinga, G. Raviglione, Tuberculosis control in the era of HIV. *Nature*. 2005 Vol.5 pp.819-826

OMS, 2006, Hoja de datos N°104, Revisada en Marzo 20 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>) (OMS, 2006)

Ortalo-Magné A, Lemassu A, Lanéelle MA, Bardou F, Silve G, Gounon P, Marchal G, Daffé M. Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species: *J Bacteriol*. 1996 Jan;178(2):456-61

Pérez P,R. La tuberculosis en México, deuda añeja de salud pública, *Gac Med Mex* 2001; 137 (1): 93-94

Perez RL, Rivera-Marrero CA, Roman J. Pulmonary granulomatous inflammation: From sarcoidosis to tuberculosis. *Semin Respir infect*. 2003 Mar;18(1):23-3224

Philpott, N.J., Turner, A.J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J.C., Gordon-Smith, E.C., Dalgleish, A.G. and Gibson, The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 87, 2244–2251. 1996

Prisco Palma et. al.2008 Manuscrito en Preparación.

Rich EA, Torres M, Sada E, Finegan CK, Hamilton BD, Toossi Z. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber Lung Dis*. 1997; 78(5-6):247-55

Saavedra, R., Segura, E., Tenorio, E. P., López Marín, L. M. (2006) Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4+ and CD8+ T-cells. *Microbes infect*.

Scanga CA, Mohan VP, Tanaka K, Alland D, Flynn JL, Chan J. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *infect Immun*. 2001 Dec;69(12):7711-7.

Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:679–691

Seminara AR, Ruvolo PP, Murad F. LPS/INFgamma-induced RAW 264.7 apoptosis is regulated by both nitric oxide-dependent and -independent pathways involving JNK and the Bcl-2 family. *Cell Cycle*. 2007 Jul 15;6(14):1772-8

Senol G, Erer OF, Yalcin YA, Coskun M, Gündüz AT, Biçmen C, Ertas M, Ozkan SA. Humoral immune response against 38-kDa and 19-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *Eur Respir J*. 2007 Jan;29(1):143-8.

Singh G, Singh B, Trajkovic V, Sharma P. *Mycobacterium tuberculosis* 6 kDa early secreted antigenic target stimulates activation of J774 macrophages. *Immunol Lett*. 2005 May 15;98(2):180-8.

Sistema Único de información para la Vigilancia Epidemiológica, EPI-TB, DGE/SSA Datos preliminares, Dic 2005.

Szepietowski JC, Morita A, Tsuji T. Ultraviolet B induces mast cell apoptosis: a hypothetical mechanism of ultraviolet B treatment for uraemic pruritus, *Med Hypotheses*. 2002 Feb;58(2):167-70.

Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*. 2001 Feb 23;291(5508):1544-7

Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis*. 2003 Sep;3(9):578-90.

Vergne, I. I. & Daffe, M. Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front. Biosci.* 3, 865–876 (1998).

Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7.; *J Biol Chem*. 1997 May 16;272(20):13326-31.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, Bogdan C, Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3823-31

Young DB, Garbe TR. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, *Res Microbiol*. 1991 Jan;142(1):55-65.