



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

“Estudio sobre la capacidad apoptogénica para macrófagos de

***Mycobacterium tuberculosis* y de sus lipoproteínas**

LpqH (19 kDa) y PstS-1 (38 kDa)”

T E S I S

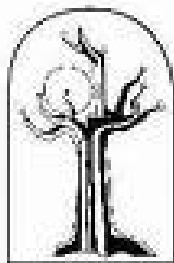
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

BIOL. ALEJANDRO SÁNCHEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ



BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F.

Enero, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Mi más sincero agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas así como al Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por todo el apoyo y las facilidades para la realización de este trabajo.

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca con número de registro 195122 durante el periodo comprendido de Enero de 2005 a Enero de 2010, así como por un estímulo adicional mediante el programa de apoyo integral para la formación de doctores en 2008.

Asimismo todo mi agradecimiento a mi comité tutorial integrado por los Dres. Raúl Mancilla Jiménez (tutor principal), Julio Morán Andrade y Luz María López Marín por su disposición para resolver mis dudas así como por sus recomendaciones a lo largo de la realización del presente trabajo sin las cuales no hubiera sido posible llegar a este momento.

Para mi mamá Amelia González Medina, te amo preciosa

Para mi papá Antonio Sánchez Pérez, gracias por todo

A mis hermanos Luis Antonio y Erika, mi inspiración

A la UNAM, mi casa

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer de manera muy especial a todas las personas que han sido parte fundamental a lo largo de la realización de la presente tesis.

Quiero agradecer a mis padres Amelia González Medina y Antonio Sánchez Pérez porque con su sueño hicieron posible el mío, además de que siempre me apoyaron de manera incondicional y desinteresada en todo momento, gracias nuevamente esto es suyo también.

A mis hermanos Luis Antonio y Erika Lizbeth, que afortunado soy, los quiero mucho y muchas gracias por todo lo que me han enseñado.

A mis sobrinos Toñito y Omar, por su cariño y risas, los quiero mucho.

A mi tutor principal el Dr. Raúl Mancilla Jiménez, por enseñarme lo que significa ser un científico y permitirme redescubrir lo hermoso que es la ciencia.

A Patricia Espinosa Cueto por toda la asesoría técnica necesaria para la realización de los experimentos de esta tesis, pero mas que nada por ser una gran amiga, muchas gracias Paty.

A resto de los integrantes del laboratorio con los que tuve la fortuna de interactuar tanto de manea científica como personal y me han dejado importantes enseñanzas, Ismael, Miguel, Maritrini, Germán, Hugo, Carlos, Jimena, Marina, Navyl, Teresa y Guadalupe.

A los Dres Julio Morán y Luz María López miembros de mi comité tutorial por sus consejos y disposición permanente para ayudarme, asimismo mi agradecimiento a todos los dres. con los que he tenido la fortuna de aprender en mis cursos, en particular quiero agradecer al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por permitirme trabajar con él y de esta manera también aprender.

A los técnicos académicos Erika Segura y Gonzalo Acero por su disposición para ayudarme en todo momento.

A los miembros del banco de sangre el Instituto Nacional de Rehabilitación por su invaluable ayuda para obtener el material biológico necesario para esta tesis, en particular a Monica Saldaña, Verónica Santana y Christina, mil gracias.

La realización y culminación de este trabajo requirió la utilización de las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en este sentido quiero agradecer a las secretarias del departamento de Inmunología así como a los auxiliares del laboratorio; las señoras Esther y Tere así como a Rodolfo por su ayuda. Asimismo, agradezco al personal del Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, particularmente a Blanca y Azucena por todas las atenciones que tuvieron para resolver mis múltiples dudas durante los trámites necesarios durante mi doctorado.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros de clase tanto en la carrera como en el posgrado por los ratos agradables que me permitieron compartir con ustedes, no los menciono para no omitir a nadie pero gracias a todos ustedes.

ÍNDICE

1. RESUMEN	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Datos históricos	10
2.2. Epidemiología	11
2.3. Patogenia	12
2.4. La apoptosis	15
2.5. La apoptosis en la tuberculosis	19
2.6. Mecanismos implicados en la apoptosis	20
2.7. Proteínas micobacterianas implicadas en la apoptosis	21
3. FUNDAMENTACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1. Cultivo de macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica.	25
6.2. Cultivo de bacterias	25
6.3. Aislamiento de las lipoproteínas LpqH y PstS-1.	26
6.4. Ensayos de fagocitosis para determinar la capacidad apoptogénica de las cepas de <i>M. smegmatis</i> nativa y transformada.	27
6.5. Ensayos de apoptosis con LpqH y PstS-1 incorporadas en papel de nitrocelulosa.	27
6.6. Medición de apoptosis por TUNEL	28
6.7. SDS-page y Western blot para determinar la activación de caspasas	29
6.8. Ensayos con inhibidores específicos de la actividad de las caspasas	29

6.9. Medición del potencial de la membrana mitocondrial	30
6.10. Determinación de la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) por inmunofluorescencia.	30
6.11. Ensayos de ELISA celular para investigar la expresión membranal de TNF, TNFR1, TNFR2, Fas y FasL.	31
6.12. Cuantificación de TNF en el sobrenadante de los MDM incubados con LpqH y PstS-1.	32
6.13. Ensayos de inhibición de la apoptosis con anticuerpos monoclonales contra TNF, TNFR1, TNFR2, Fas, FasL, TLR2 y TLR4.	32
6.14. Análisis estadístico	33
7. RESULTADOS	34
7.1. Las proteínas LpqH y PstS-1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> inducen apoptosis en macrófagos humanos.	34
7.2. La apoptosis inducida por LpqH y PstS-1 es dependiente de caspasas.	39
7.3. Participación de la mitocondria en la apoptosis inducida por la proteína de LpqH de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	43
7.4. Ensayos para estudiar la participación de los receptores TLR2 y TLR4 en la apoptosis inducida por las lipoproteínas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	47
7.5. Las lipoproteínas LpqH y PstS-1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> estimulan la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF)	49
7.6. Participación del TNF y sus receptores TNFR1 y TNFR2 en la apoptosis inducida por LpqH y PstS-1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	51
7.7. Análisis de la participación de la vía de apoptosis mediada por Fas-FasL	55

8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES	67
10. PERSPECTIVAS	68
11. BIBLIOGRAFÍA	69

1. RESUMEN

En este trabajo realizamos experimentos que demuestran que las lipoproteínas de 19 y 38 kDa (LpqH y de PstS-1, respectivamente) de *Mycobacterium tuberculosis* poseen la capacidad de inducir apoptosis de macrófagos humanos. Esto se demostró mediante la utilización de dichas proteínas obtenidas de cepas transformadas de *Mycobacterium smegmatis*. Encontramos que tanto las bacterias transformadas como las lipoproteínas aisladas son altamente eficientes para inducir apoptosis de macrófagos humanos. Ambas moléculas desencadenaron vías similares con incremento en la secreción de TNF y sobre-expresión membranal de FasL y de los receptores de muerte Fas, TNFR1 y TNFR2. La importante contribución de dichos receptores en la muerte observada se determinó mediante su bloqueo con anticuerpos específicos, que disminuyeron significativamente la apoptosis. Se observó que la apoptosis inducida por ambas lipoproteínas es dependiente de caspasas ya que se documentó la activación de las caspasas 8, 9 y 3 y el bloqueo de su actividad con inhibidores específicos disminuye también la apoptosis. Se demostró que en la apoptosis inducida por LpqH había pérdida del potencial de membrana mitocondrial con translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) hacia el núcleo indicando que en la apoptosis inducida por LpqH también participan mecanismos independientes de caspasas. La implicación de los receptores de muerte y de la vía mitocondrial indican que en el desencadenamiento de la apoptosis participan las vías intrínseca y extrínseca. Adicionalmente, se demostró mediante experimentos de bloqueo que la capacidad apoptogénica de estas lipoproteínas es mediada por el receptor TLR2. En conclusión, este estudio muestra que a través de las lipoproteínas LpqH y PstS-1 *Mycobacterium tuberculosis* posee la capacidad de modular el periodo de vida del macrófago infectado vía la activación de TLR2. Aún resta por establecerse el significado biológico de dicho fenómeno.

2. ANTECEDENTES

2.1. DATOS HISTÓRICOS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha retomado una gran importancia a nivel mundial, pues pese a los programas de salud que se han implementado el número de nuevos casos ha ido en aumento en los últimos años [1]. El principal agente etiológico de la enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), esta es una bacteria facultativa intracelular con una gran capacidad para adaptarse al ambiente adverso que representa el permanente contacto con el sistema inmunológico de su hospedero. El origen de la TB no se conoce, sin embargo, existen reportes que parecen indicar que dicho padecimiento se ha encontrado asociado al ser humano por mucho tiempo, ya que se han encontrado lesiones de tipo tuberculoso en momias egipcias y peruanas [2]. A pesar de esto, no fue sino hasta el siglo XVIII con las descripciones de las lesiones tuberculosas realizadas por Laennec y posteriormente con la inducción de lesiones en pulmones de ratón al inocularlos con tejido de pulmón de personas con tuberculosis realizadas por Villemin cuando se comienza a estudiar con mayor detenimiento a esta enfermedad [2]. Sin embargo, una de las principales interrogantes en aquel momento era el relacionado al agente etiológico responsable. Fue en el trabajo realizado por Robert Koch en el siglo XIX titulado *Der Aetiology der Tuberculose* en donde por primera vez se presentaron las técnicas de histología y de cultivo necesarias para identificar el bacilo de la tuberculosis. Asimismo, en el mismo trabajo Koch establece los principios que permitirían determinar la naturaleza infecciosa de una enfermedad conocidos como los postulados de Koch [2].

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La tuberculosis es una enfermedad que ha retomado una gran importancia a nivel mundial. Según datos de la OMS, en el 2007 se reportaron 9.3 millones de nuevos casos y se calcula que hasta 13.7 millones de personas podrían tener tuberculosis prevalente, además se reporta que cada año fallecen hasta 1.3 millones de personas [1]. Gran parte de los casos de tuberculosis ocurren en países en vías de desarrollo principalmente en el continente africano y el asiático, sin embargo, en otras regiones como América y Europa el número de personas infectadas continúa en aumento.

Anteriormente se había determinado que la incidencia y la prevalencia de la tuberculosis había disminuido de manera significativa gracias al establecimiento de medidas para controlar o erradicar la infección [1]. Entre las medidas que ayudaron a controlar la infección se encuentra la utilización de una vacuna contra la tuberculosis basada en una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* denominada bacilo de Calmette-Guerin (BCG) en honor a los científicos franceses que obtuvieron y aislaron dicha bacteria. Desafortunadamente, aún cuando la vacunación inicialmente resultó ser una medida efectiva, posteriormente, hubo estudios que demostraron su poca eficacia para proteger en contra de la tuberculosis pulmonar, esto sobretodo en países pobres [3]. Las razones de la disminución en la efectividad de la vacunación con BCG y el consecuente resurgimiento en el número de casos de tuberculosis se han asociado a diversos factores. Entre los más importantes se encuentran: a) las características de la población infectada, como son el estado nutricional, b) la susceptibilidad genética y c) la exposición a micobacterias saprófitas del medio ambiente [3-6]. Por otra parte el desarrollo de fármacos para contender con la TB tuvo un gran impacto para disminuir la tuberculosis, pero el surgimiento de cepas de micobacterias resistentes a estos fármacos tuvo influencia en el resurgimiento en la incidencia de la infección [1].

Por otra parte, el surgimiento de la epidemia del VIH ha sido un factor importante para el incremento en el número de personas con TB [7;8]. Lo anterior se debe a que el virus tiene como célula blanco los linfocitos CD4⁺ promoviendo una disminución marcada en esta población celular. Esta disminución tiene una gran repercusión en la reactivación de la tuberculosis en las personas coinfectadas ya que se sabe que estos participan de manera importante en el control del bacilo de la tuberculosis al secretar citocinas que permiten la activación de la capacidad bactericida del macrófago [9-11]. La infección con VIH ha tenido un gran impacto ya que actualmente se calcula que cada año se presentan 456 000 decesos a causa de esta coinfección.

2.3. PATOGENIA

La tuberculosis es una enfermedad que se adquiere principalmente por la vía respiratoria al inhalar aerosoles que contienen bacilos. Una vez que los bacilos entran en el tracto respiratorio rápidamente son fagocitados por los macrófagos alveolares [12;13]. La fagocitosis ocurre cuando el macrófago reconoce a la bacteria, lo que genera la transducción de señales hacia el interior celular, promoviendo la reestructuración del citoesqueleto y la generación del fagosoma [14;15]. En el reconocimiento del bacilo participan receptores presentes en la membrana del macrófago y adhesinas de la bacteria. Entre los receptores celulares se ha implicado al DC-SIGN, al receptor para manosa, receptores “scavenger”, al CD14 y al receptor de β -glucano. Adicionalmente, se ha encontrado que participan opsoninas entre las que están las inmunoglobulinas y las proteínas del complemento; estas moléculas recubren a la bacteria promoviendo su fagocitosis a través de receptores específicos como los receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (FcRs) y los receptores para fracciones del complemento (CRs) [14;15]. Las adhesinas son moléculas presentes en la superficie del

bacilo que actúan como ligandos que interaccionan con receptores celulares presentes en la membrana de la célula blanco [16-18]. Entre las adhesinas mejor caracterizadas para la micobacteria se encuentra la lipoarabinomanana (LAM) un lipoglicano con residuos de manosa que interacciona con el receptor de manosa de la célula [19;20]. Otra adhesina que tiene la capacidad de interaccionar con el receptor para manosa es la lipoproteína de 19 kDa, ya que además de tener dominios lipídicos también posee azúcares en su estructura que le permiten interaccionar con dicho receptor para promover la fagocitosis de la bacteria [21]. Los fosfatidil manósidos afines al CR3 así como los lipopolisacáridos y diferentes sulfolípidos con afinidad por los receptores “scavenger” son otros ejemplos de adhesinas micobacterianas que promueven la fagocitosis del bacilo [22;23]. La existencia de adhesinas micobacterianas es un tema de interés, ya que por su capacidad para interaccionar de manera específica con algunos receptores celulares podrían funcionar “seleccionando” una ruta favorable para el establecimiento de la infección. Lo anterior debido a que la fagocitosis promovida por la interacción de las adhesinas con ciertos receptores celulares inhibe la activación de las vías de degradación desarrolladas normalmente en los macrófagos [24;25].

El macrófago constituye la principal célula efectora en la respuesta inmunológica celular innata contra las infecciones bacterianas intracelulares, ya que por medio de la fagocitosis y la degradación del material fagocitado en el lisosoma son eliminados diversos agentes infecciosos. Después del reconocimiento del patógeno se inician cascadas de señalización hacia el interior de la célula promoviendo la reestructuración del citoesqueleto y la generación de prolongaciones membranales que rodean al patógeno formando el fagosoma [14]. Posteriormente, el fagosoma adquiere diversas proteínas que funcionan como marcadores para promover la maduración fagosomal. Durante la maduración hay disminución del pH intrafagosomal por la acción de

ATPasas que bombean H^+ del citoplasma hacia el lumen del fagosoma, se observa generación de iones H^+ por la acción de la NADPH oxidasa y recientemente, ha adquirido mucha importancia la producción de óxido nítrico (NO) por medio de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) con la finalidad de eliminar el contenido fagocitado. Finalmente, el fagosoma se une con el lisosoma en donde serán degradados los contenidos del fagosoma por la acción de las enzimas hidrolíticas [14;15]. Recientemente se han identificado factores antimicobacterianos en el fagosoma, algunos de los cuales resultan ser muy efectivos en la eliminación de la micobacteria, en particular llama la atención el papel de las catelicinas [26;27].

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria intracelular que utiliza al macrófago como su principal célula hospedera, por lo que posterior a la fagocitosis, dicha bacteria inicia una serie de mecanismos para sobrevivir y replicarse dentro del ambiente intracelular del macrófago. Algunos de estos mecanismos tienen como finalidad principal el impedir la fusión del fagosoma que contiene al bacilo con el lisosoma y de esta manera evitar la liberación de factores nocivos al interior de la vacuola fagocítica [28-30]. Se ha determinado que diferentes lípidos micobacterianos tienen una participación importante en estos procesos. Entre los lípidos caracterizados se ha visto que el fosfatidil-inositol manósido inhibe la maduración del fagosoma y el reclutamiento de la ATPasa y otros lípidos como el DAT (di-acil-tricérol) y el TAT (tri-acil-tricérol) inhiben la activación de iNOS y por lo tanto la producción de radicales libres de nitrógeno (Espinosa-Cueto P. y Mancilla R.. artículo en preparación). Recientemente, la habilidad del bacilo de la tuberculosis para intervenir y modificar los programas de muerte de su célula hospedera es un campo que ha adquirido mayor interés debido a que esto podría tener implicaciones importantes en la patogenia de la enfermedad.

2.4. LA APOPTOSIS

La apoptosis es de gran interés pues incide en áreas diversas de la biología como la embriogénesis, la homeostasis de las poblaciones celulares, el desarrollo de neoplasias, la autoinmunidad y mas recientemente en los procesos de infección [31;32]. De manera general, se ha descrito que la apoptosis puede ser dependiente o independiente de caspasas (Figura 1). Las caspasas son proteínas con actividad proteolítica que se caracterizan por tener en su sitio activo una cisteína, y por cortar sustratos celulares en sitios específicos que se encuentran después de repeticiones de residuos de ácido aspártico; al igual que otras proteasas estas son inicialmente sintetizadas como zimógenos que son activados cuando su predominio es cortado por otras proteasas [33]. Las caspasas se han clasificado en subfamilias de acuerdo a su sustrato, secuencia y estructura, hasta el momento se han identificado claramente cerca de una docena de caspasas y aunque algunas participan en el procesamiento postraducciona l de diferentes proteínas la mayoría participan en la apoptosis [34-36]. Entre las mejor caracterizadas por participar en las fases iniciales de la apoptosis están las caspasas 8 y 9 cuya función principal es activar a otras proteínas. Entre los blancos principales se encuentran las caspasas 3, 6 y 7 que se clasifican como efectoras al cortar distintos blancos celulares que promueven la fragmentación celular y la formación de cuerpos apoptóticos [34;35;37]. La participación de las caspasas en la apoptosis se demostró en estudios en los que al inhibir su activación y/o disminuir su actividad catalítica se disminuye o se previene la apoptosis [38;39]. Debido al papel fundamental ejercido por las caspasas en este tipo de muerte se le clasificó como apoptosis caspasa-dependiente. Sin embargo, también se observó que otros factores pueden promover apoptosis sin que las caspasas participen, siendo otros los factores determinantes, este tipo de muerte fue llamada

apoptosis caspasa-independiente [40]. Entre los estímulos mejor caracterizados que pueden activar la apoptosis están los relacionados con la activación de receptores de muerte de la familia de TNF, entre los que se encuentran los receptores 1 y 2 (TNFR1, TNFR2) para TNF y el receptor Fas para Fas ligando (FasL). Estos receptores son proteínas transmembranales, cuyo dominio extracelular está encargado de la unión con el ligando [41-43]. Una vez que el ligando se une al receptor se forman trímeros iniciándose su vía de señalización. Estos receptores en su dominio intracelular poseen motivos denominados dominios de muerte (death domains; DD) los cuales en la activación, por uniones homotípicas reclutan y se asocian a los dominios de muerte de las proteínas adaptadoras de muerte asociadas a Fas (FADD) [44-46]. FADD posee en su estructura dominios efectores de muerte (death effector domains; DED) que promueven la unión con dominios análogos presentes en los zimógenos de la procaspasa 8 [47]. El reclutamiento de varias moléculas de procaspasa 8 favorece por autoprocésamiento la activación y la generación de la caspasa 8 activa [48]. La caspasa 8 activada puede cortar a otras procaspasas promoviendo la activación de caspasas efectoras como la 3, 6 y 7, las que a su vez activan deoxyribonucleasas (CAD; deoxyribonucleasas activadas por caspasas) que promueven la degradación del DNA y la muerte celular [49;50]. Adicionalmente la caspasa 8 puede cortar otros blancos celulares entre los que se encuentra la proteína proapoptótica Bid [51], la cual una vez cortada interacciona con otra molécula propapoptótica denominada Bax, este dímero se transloca hacia la membrana mitocondrial, en este sitio se propone, eliminan la interacción de la molécula antiapoptótica Bcl-2 y promueven la liberación del citocromo C hacia el citoplasma celular por un mecanismo desconocido asociado a una caída transitoria del potencial de la membrana interna de la mitocondria [52-54]. Normalmente el citocromo C es un componente de las vías de oxidación de la

mitocondria, sin embargo, cuando se libera hacia el citoplasma este interacciona con el factor asociado a apoptosis (apaf), ambos factores reclutan al zimógeno de la caspasa 9 generando caspasa 9 activa, la cual a su vez incrementa la cantidad de caspasas efectoras que promueven la muerte celular [34;37].

La participación de la mitocondria en la apoptosis ha cobrado importancia desde que se demostró que es capaz de activar vías de muerte independientes de caspasas. Para esto, la membrana mitocondrial permite la liberación otras proteínas como la endonucleasa G (endo G) y el factor inductor de apoptosis (AIF), los cuales migran hacia el núcleo en donde conjuntamente promueven la degradación del DNA y por consecuencia la muerte celular [40;52].

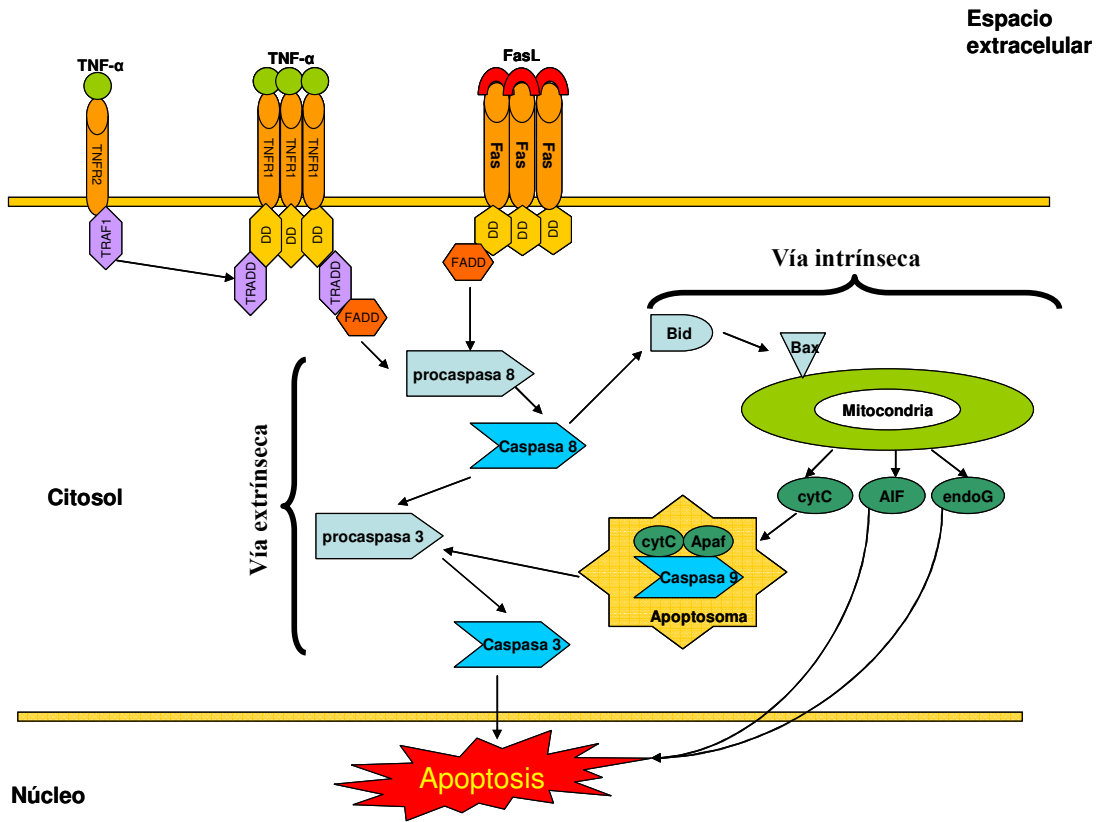


Figura 1. Esquema general de las vías de apoptosis. La apoptosis caspasa-dependiente es desencadenada por la unión de los ligandos TNF ó FasL a los receptores de muerte TNFR1, TNFR2 o Fas. En esta vía cuando el ligando se une a su receptor se permite la asociación de los dominios de muerte en el citoplasma celular, lo cual promueve el reclutamiento de la procaspasa iniciadora 8 que se autoprocasa liberando la forma activa, esta a su vez activa a la caspasa efectora 3 llevando a la apoptosis a su fase irreversible. Por otra parte la mitocondria puede amplificar la apoptosis, en esta, la caspasa 8 activada, corta y activa a las moléculas proapoptóticas Bid y Bax que son translocadas a la membrana mitocondrial, esto promueve la liberación del citocromo C y su asociación con Apaf y la caspasa 9 formando el apoptosoma que incrementa la caspasa 3 activa. Abreviaturas: AIF, apoptosis-inducing factor; apaf, apoptosis-associated factor; cyt C, cytochrome C; DD, death domain; endoG, endonucleasa G; FADD, fas-associated death domain; TNFR1/2 tumor necrosis factor receptor ½; TNF, tumor necrosis factor; TRADD, TNF-receptor associated death domain; TRAF1, TNF-receptor associated factor 1.

2.5. LA APOPTOSIS EN LA TUBERCULOSIS

De manera interesante, en los últimos años se han identificado patógenos capaces de modular los mecanismos de apoptosis de su célula hospedera, entre los que se encuentra *Mycobacterium tuberculosis* [32]. Existen varios reportes de estudios *in vitro* que demuestran que posterior a la fagocitosis de micobacterias los macrófagos comienzan a exhibir rasgos de apoptosis como la disminución en el tamaño celular, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos, un fenómeno que podría ser de gran importancia en la patogenia de la TB. Más aún, se han observado abundantes macrófagos apoptóticos en granulomas de pacientes con tuberculosis y en lavados broncoalveolares de pacientes con tuberculosis activa [55;56]. En cuanto a los mecanismos de la apoptosis, se encontró que el TNF- α es un importante mediador [57]. Además en lesiones de pacientes tuberculosos y un modelo murino se ha visto la participación de FasL [58;59]. Por otra parte se ha determinado que las micobacterias de acuerdo a su virulencia también poseen diferente capacidad apoptogénica, siendo las cepas virulentas menos apoptogénicas que sus contrapartes atenuadas. Esto es de interés pues podría afectar la persistencia intracelular de la bacteria [60;61]. La inhibición de la apoptosis parece ser un rasgo de virulencia asociado a la regulación diferencial de las moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas celulares. Se ha observado que macrófagos infectados con micobacterias virulentas sobre-regulan moléculas antiapoptóticas como Bcl-2, Mcl-1 y al mismo desregulan las moléculas antiapoptóticas como Bax y Bad [62;63]. Por otra parte, se ha observado que la infección con la cepa virulenta (H37Rv) promueve el desprendimiento de una forma soluble del receptor TNFR2 de la membrana de macrófagos infectados, el cual ya en el sobrenadante interacciona con TNF inhibiendo su capacidad apoptogénica [64]. Por otra parte, existen reportes en los que se ha observado que la apoptosis disminuye la supervivencia de las micobacterias

cargadas en los cuerpos apoptóticos [65;66], sugiriendo que la apoptosis del macrófago infectado es benéfica para el individuo infectado ya que se favorece la presentación de antígeno vía MHC clase I generando una respuesta específica mediada por linfocitos CD8+ contra las células infectadas lo que promueve la eliminación de las micobacterias [67;68]. Por lo anterior, la apoptosis del macrófago infectado por micobacterias es un tema de gran interés por sus posibles repercusiones en el curso y desenlace de la infección tuberculosa.

2.6. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA APOPTOSIS

En lo que respecta a los mecanismos implicados en la apoptosis, se ha descrito que participan las caspasas 8, 3 y la citocina TNF [57;69]. De manera interesante se encontró que para la inducción de la apoptosis se requiere necesariamente de la interacción de la micobacteria con el receptor TLR2 del sistema inmune innato [69;70]. El papel de FasL, otra importante vía de apoptosis no se ha dilucidado totalmente, sin embargo hay evidencias de su importancia. El estudio de la participación de la vía Fas-FasL ha llamado la atención ya que recientemente, se ha descrito que entre los mecanismos de apoptosis que resultan más efectivos para contener la infección micobacteriana se encuentra el desencadenado por Fas-FasL [66;71;72]. Se ha especulado que en personas capaces de controlar la infección micobacteriana la apoptosis mediada por esta vía desencadenada por linfocitos o por los mismos macrófagos podría promover la eliminación de las células que servirían como reservorio micobacteriano. La relevancia de la apoptosis desencadenada por la vía Fas-FasL es reafirmada por observaciones que indican que la micobacteria ha desarrollado mecanismos que impiden que su célula hospedera muera por esta vía, se ha observado que en las células infectadas la bacteria es capaz de promover la activación de NF- κ B

sobre-regulando la producción del inhibidor FLIP [71;73]. Además, por otro lado, las células infectadas expresan mayor cantidad de FasL y menor cantidad de Fas en su superficie lo cuál se ha propuesto que evita que estas células sean eliminadas por esta vía [58;59;63;74]. Sin embargo, no se conocen con certeza los factores micobacterianos implicados en esta aparente desensibilización de la activación de la apoptosis aunque se ha asociado a la lipoarabinomanana manosilada (ManLAM) presente en la superficie de las cepas virulentas [73].

2.7. PROTEÍNAS MICOBACTERIANAS IMPLICADAS EN LA APOPTOSIS

Un aspecto poco estudiado es el concerniente a los componentes micobacterianos que participan en la inducción de apoptosis de macrófagos. Como se ha mencionado, se han implicado las lipomananas [75], también al ácido tuberculoesteárico, al ácido micólico [76], ESAT-6 (Rv3875) [77], PE_PGRS33 (Rv1818c) [78] además de LpqH (Rv3763) [69;79] mencionada anteriormente.

Debido a que se ha encontrado que *Mycobacterium tuberculosis* posee en su pared lipoproteínas, siendo las más abundantes LpqH y PstS-1 [80;81] resulta de interés conocer también a la lipoproteína PstS-1 y determinar si esta también tienen la capacidad de inducir apoptosis de macrófagos, así como analizar con mayor profundidad las vías involucradas en la apoptosis activada por ambas lipoproteínas.

3. FUNDAMENTACIÓN

En el presente trabajo buscamos caracterizar la capacidad apoptogénica para macrófagos de las lipoproteínas LpqH y PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis* por varias razones. Actualmente se considera la apoptosis un mecanismo de inmunidad innata que favorece la eliminación de la micobacteria. El conocimiento de las moléculas involucradas en este proceso podría ayudar a conocer mejor los mecanismos involucrados y a diseñar posibles manipulaciones terapéuticas. La información obtenida puede servir de base para investigar el papel biológico de este fenómeno en el curso y desenlace de la infección micobacteriana.

4. HIPÓTESIS

Mycobacterium tuberculosis induce apoptosis de macrófagos por medio de sus lipoproteínas de LpqH y PstS-1 vía TLR2 con la participación de las citocinas TNF y FasL así como de sus receptores TNFR1, TNFR2 y Fas.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

- Analizar la capacidad apoptogénica de las lipoproteínas LpqH y PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis* y las vías bioquímicas involucradas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. CULTIVO DE MACRÓFAGOS HUMANOS DERIVADOS DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

Los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM), se obtuvieron a partir de paquetes celulares (40-60 ml) que fueron donados por el banco de sangre del Instituto Nacional de Rehabilitación. La sangre se obtuvo por venopunción de donadores sanos lo cual fue ratificado con una batería de estudios serológicos. Las células mononucleares fueron separadas por centrifugación diferencial en Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ). Las células se cultivaron en cajas de petri (Corning Inc.; NY) en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino, L-glutamina 5 mM y 5 µg/ml de penicilina-estreptomicina en una incubadora a 37 °C. Los macrófagos se aislaron por adherencia al plástico por 5-7 días hasta que se observó una morfología de maduración.

6.2. CULTIVO DE BACTERIAS

En este estudio utilizaron una cepa silvestre de *Mycobacterium smegmatis* (mc²155) y 2 cepas de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 transformadas con plásmidos que codifican las proteínas LpqH ó PstS-1 de *M. tuberculosis*. La *Mycobacterium smegmatis* transformada con el cDNA de LpqH fue donada por el Dr. Y. Zhang; MRC Tuberculosis and Related Infections Unit, Hammersmith Hospital, London, UK. La *Mycobacterium smegmatis* transformada con el cDNA de PstS-1 fue donada por la Dra. Clara Espitia; Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, DF. Las bacterias se cultivaron por 4-5 días en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 2% de glucosa y 50µg/ml de Higromicina B. Posteriormente, las

bacterias se cosecharon por centrifugación y se lavaron con buffer de fosfato de sodio (10 mM). La presencia de LpqH y PstS-1 en las cepas transformadas y su ausencia en la cepa nativa fue corroborada por “Westen-blot” con anticuerpos específicos dirigidos contra cada proteína.

6.3. AISLAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS LpqH Y PstS-1.

Para obtener las proteínas para los ensayos de apoptosis se siguió el procedimiento descrito anteriormente por Wallis [82]. En resumen, se obtuvieron fracciones de pared celular de las micobacterias transformadas por sonicación (5 ciclos de 5 min cada uno) a 20 KHz en hielo. Las proteínas se resolvieron en geles preparativos de SDS-PAGE al 12-15%, para esto 3 mg de sonificado fueron mezclados volumen a volumen en buffer de muestra (19 μ m EDTA, 0.1% SDS, 1% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y 0.5 mM Tris-HCl pH 6.8), se calentaron por 5 min a 95 °C. Se cargaron geles de 20 cm de largo con carriles de 1.5 mm. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se tiñeron con rojo Ponceau para identificar las bandas correspondientes a LpqH y PstS-1 y se cortaron. La presencia de las proteínas de interés en las bandas cortadas fue corroborada en blots paralelos utilizando el anticuerpo monoclonal correspondiente. Enseguida, las bandas de nitrocelulosa con las proteínas incorporadas se solubilizaron con DMSO (Sigma–Aldrich; St. Louis, MO) y se precipitaron con buffer de carbonato de sodio (0.05 mM pH 9.6). El pellet se lavó tres veces con PBS pH 7.4 y se guardaron alícuotas a -20 °C. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry usando albúmina de suero bovino como estándar. Adicionalmente, para algunos ensayos también se obtuvieron las proteínas presentes en las zonas correspondientes a 19 y 38 kDa de *Mycobacterium smegmatis* nativa.

6.4. ENSAYOS DE FAGOCITOSIS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD APOPTOGÉNICA DE LAS CEPAS DE MYCOBACTERIUM SMEGMATIS NATIVA Y TRANSFORMADA

Se hicieron ensayos para investigar si la fagocitosis de las micobacterias de *M. smegmatis* nativa y de sus contrapartes transformadas que expresan LpqH (*M. smegmatis*+LpqH) o PstS-1 (*M. smegmatis*+PstS-1) inducían apoptosis. Para esto se realizó el un procedimiento similar al descrito anteriormente con ligeras modificaciones [83], de manera breve, macrófagos derivados de sangre periférica (1×10^6) con morfología de maduración (7 días de cultivo) se incubaron con las micobacterias en proporción de 20 bacterias por célula (MOI 1:20) por 4 h a 37 °C. Después de lavar e incubar por 20 h adicionales, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y se determinó la apoptosis por citometría de flujo utilizando anexina V.

6.5. ENSAYOS DE APOPTOSIS CON LpqH y PstS-1 INCORPORADAS EN PAPEL DE NITROCELULOSA.

Para estos experimentos, los macrófagos con morfología de activación (7 días de cultivo) se incubaron con EDTA (5mM) por 10 min a 4 °C y se despegaron suavemente con una espátula de plástico. Después de lavar se colocaron 5×10^5 macrófagos en placas de experimentación de 12 pozos; a este tiempo los macrófagos presentaban una viabilidad mayor al 95% determinada por exclusión de azul tripano. Enseguida, las células se incubaron con diferentes cantidades de LpqH y PstS-1 incorporadas en nitrocelulosa o con las proteínas de la cepa nativa presentes en tiras de las regiones de 19 y 38 kDa, por 1 h a 37 °C. Como control positivo de apoptosis se incubaron MDMs con cicloheximida (100 µg/ml) (Sigma–Aldrich; St. Louis). Para cuantificar la apoptosis se utilizó un kit comercial de ELISA que detecta fragmentación internucleosomal

(Roche Diagnostics; Penzberg, Germany). Brevemente, pasado el tiempo de incubación con las proteínas se recuperaron las células por centrifugación y se adicionó buffer de lisis incubando por 30 min a temperatura ambiente. Después de centrifugar el lisado por 10 min (1500 rpm) se colocaron 20 μ l del sobrenadante en pozos de placas de ELISA recubiertos con estreptavidina. Enseguida, se agrega a cada pozo la mezcla de reacción que contiene dos anticuerpos uno anti-histonas biotinilado y un anticuerpo anti-DNA peroxidado. Después de incubar en agitación ligera por 2 h a temperatura ambiente, se lava cada pozo tres veces con buffer de lavado, se agrega solución de revelado (ABTS) y se incuba por 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. Las placas se leyeron a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Bio-Tek Instruments).

6.6. MEDICIÓN DE APOPTOSIS POR TUNEL

Alternativamente, la apoptosis se midió por medio de la técnica de TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling). Para estos experimentos 1×10^6 macrófagos se incubaron con las bacterias nativas y transformadas o con las lipoproteínas de LpqH y PstS-1 por 1 y 24 h. Después de centrifugar las células, se adicionó al pellet celular buffer de permeabilización (0.05% saponina en PBS) por 3 min y se lavó 3 veces con PBS. Posteriormente, se agregó la mezcla de reacción de TUNEL (1 μ l dUTPs-TRITC + 9 μ l buffer de incubación) a las células y se incubó por 1 h a 37 °C en la oscuridad, se lavó de nuevo 3 veces con PBS y se determinó la apoptosis por citometría de flujo (FACScan ó FACScalibur, Beckton Dickinson).

6.7. SDS-PAGE Y WESTERN BLOT PARA DETERMINAR LA ACTIVACIÓN DE CASPASAS

Para determinar la activación de las caspasas en los macrófagos incubados con LpqH y PstS-1, las proteínas celulares fueron separadas en geles de poliacrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE) desnaturalizantes al 17.5% por medio del sistema discontinuo de Laemmli. Para esto se obtuvieron extractos proteicos totales por lisis con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 50 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% desoxicolato de sodio y 0.1% SDS); las células se sometieron a vortex y se incubaron por 20 min a 4 °C. Posteriormente, los lisados se centrifugaron (14,000 rpm por 15 min a 4 °C), se removió el sobrenadante, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Lowry y se resolvió 35 µg de proteína por SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (polyvinylidene difluoride) a 350 mAmp por 45 min y se bloquearon con leche descremada al 5% por 1 h. Después de bloquear, las membranas se incubaron con los anticuerpos monoclonales específicos para detectar las formas activa e inactiva de las caspasas 8, 9 y 3 dilución 1:1000 (Upstate Cell Signaling; Lake Placid, NY) por toda la noche a 4 °C. Después de lavar, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (dilución 1:1000 por 1 hora a temperatura ambiente). Finalmente, las membranas fueron reveladas por medio de un kit de quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology, Rockford IL).

6.8. ENSAYOS CON INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE LA ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS.

Para determinar la participación de las caspasas en la apoptosis inducida, se utilizaron inhibidores específicos para cada caspasa estudiada y un inhibidor general de caspasas. Para esto, 1×10^6 macrófagos fueron incubados con 20 µg de los inhibidores

para la caspasa 8 (Z-IETD-FMK), caspasa 9 (Z-LEHD-FMK), la caspasa 3 (Z-DEVD-FMK) y un inhibidor general de caspasas (Z-VAD-FMK) por 30 min a 37 °C, (BD Bioscience Pharmingen; San Diego, CA). Después de lavar, las células se incubaron con LpqH y PstS-1 incorporadas en nitrocelulosa por 1 h a 37 °C. La apoptosis se determinó por ELISA de fragmentación nucleosomal.

6.9. MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para investigar la participación de la mitocondria en la apoptosis de MDM, se analizó el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial son observados con el uso del colorante DIOC₆(3). Para esto, 1×10^6 macrófagos se incubaron con las lipoproteínas por diferentes tiempos, se lavó por centrifugación 3 veces con PBS y se adicionó al pellet una solución 40 nM de DIOC₆(3); incubándose por 30 min a 37 °C en oscuridad e inmediatamente se determinó la marca mitocondrial por citometría de flujo.

6.10. DETERMINACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN DEL FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS (AIF) POR INMUNOFLUORESCENCIA.

Para determinar si en la apoptosis inducida por LpqH de *M. tuberculosis* participa el factor inductor de apoptosis (AIF), se determinó la translocación de dicho factor de la mitocondria hacia el núcleo de las células. Para esto 1×10^5 macrófagos se trataron con 5 μ g de LpqH por diferentes tiempos; posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con PBS. Las células se permeabilizaron con una solución de saponina al 0.05% en PBS por 5 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS; posteriormente se incubaron las células con un anticuerpo anti-AIF (clona E20; Santa Cruz

Biotechnology) elaborado en ratón por 60 min a temperatura ambiente. Después de lavar 2 veces con PBS, se agregó un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a ficoeritrina (PE) por 45 min a temperatura ambiente en oscuridad; se lavó 2 veces con PBS, se agregó medio de montaje con DAPI (diamino fenil-indol) para teñir núcleos y se montaron laminillas para su análisis por microscopia de fluorescencia. Se tomaron diferentes campos en cada laminilla y se analizó la colocalización de las marcas.

6.11. ENSAYOS DE ELISA CELULAR PARA INVESTIGAR LA EXPRESIÓN MEMBRANAL DE DE TNF, TNFR1, TNFR2, Fas Y FasL.

Para determinar la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos en los macrófagos incubados o no con las lipoproteínas se realizaron ensayos de ELISA de membranas celular de la siguiente manera. Después de bloquear las placas de ELISA con 3% de BSA (albumina de suero bovino) en PBS por 2 h, se agregaron 1×10^5 macrófagos. Después de 2 h, se bloqueo la peroxidasa endógena con una solución de 5% de metanol y 0.1% H_2O_2 por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los macrófagos se incubaron con LpQH ó PstS-1 por 1 h a 37 °C. Después de lavar tres veces con una solución de PBS-BSA 1% y 0.1% NaN_3 , las células se incubaron por 1 h a 37 °C con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra TNF (clona 28401), TNFR1, TNFR2 (clona 22221) (obtenidos de R&D Systems; Minneapolis, MN), Fas (clona ZB4) y FasL (clona BR-17) obtenidos de (Upstate Cell Signaling; Lake Placid, NY) en las siguientes concentraciones: TNF (5 μ g/ml, dilución 1:100), TNFR1 (1 μ g/ml, dilución 1:100), TNFR2 (2 μ g/ml, dilución 1:100), Fas (1 μ g/ml, dilución 1:100), y anti-FasL (0.5 μ g/ml, dilución 1:100). Como control, se utilizaron anticuerpos de los isotipos correspondientes (Upstate Cell Signaling; Lake Placid, NY). Después de lavar 3 veces, se incubó por 1 h a 37 °C con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón ó anti IgG

de cabra (dilución 1:1000) acoplados a peroxidasa. Pasado el tiempo de incubación, se lavó de nuevo 3 veces y se agregó la solución de revelado (ABTS). Las placas se leyeron a 405 nm en un lector de ELISA (BIO-TEK Instruments).

6.12. CUANTIFICACIÓN DE TNF EN EL SOBRENADANTE DE LOS MDM INCUBADOS CON LpqH y PstS-1.

Para cuantificar la cantidad de TNF secretada por las células incubadas con las lipoproteínas se utilizó un kit comercial de ELISA de captura. Para esto, se colocaron 5×10^5 células en cajas de cultivo y se incubaron con LpqH y PstS-1 durante 0, 15, 30, 45 y 60 min. Como control se utilizó cicloheximida (100 $\mu\text{g/ml}$). Al término de cada tiempo se recolectaron los sobrenadantes de las células por centrifugación (1500 rpm X 5 min) y se agregaron 100 μl de los sobrenadantes a pozos recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-TNF y se incubó por 2 h a 37 °C. Después de lavar 4 veces, se agregó un anticuerpo policlonal anti- TNF biotilado y se incubó por 1 h a 37 °C. Después de lavar 4 veces, se agregó estreptavidina conjugada a peroxidasa y se incubó por 30 min a 37 °C. Posteriormente, se lavó 4 veces los pozos y se agregó la solución de revelado TMB (3,3', 5, 5' tetrametilbenzidina) y peróxido de hidrogeno incubando por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó HCl 1N en agua para parar la reacción y se leyeron las placas a 450 nm en un lector de ELISA. Se utilizó una curva de TNF- α recombinante como estándar.

6.13. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA TNF, TNFR1, TNFR2, FAS, FASL, TLR2 Y TLR4.

Para determinar la participación de los receptores y ligandos de muerte TNF, TNFR1, TNFR2, Fas, FasL así como de los receptores del sistema inmune innato TLR2

y TLR4 en la apoptosis inducida por LpqH y PstS-1, se realizaron ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales. Para estos ensayos 1×10^5 macrófagos se preincubaron con los anticuerpos neutralizantes como se menciona a continuación: TNF (1 $\mu\text{g/ml}$), TNFR1 (5 $\mu\text{g/ml}$), TNFR2 (1.5 $\mu\text{g/ml}$), Fas (500 ng/ml), FasL (32 ng/ml), TLR2 (20 $\mu\text{g/ml}$) (clona TLR2.1) (eBioscience; San Diego, CA) y TLR4 (20 $\mu\text{g/ml}$) (clona HTA-125) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) y los controles de isotipo (Dako; Carpintería, CA). Después de 30 min de incubación a 37 °C, sin lavar se agregaron las lipoproteínas y se incubó por 1 h a 37 °C. Como control se incubaron MDM con cicloheximida (100 $\mu\text{g/ml}$). La apoptosis se determinó por ELISA de nucleosomas.

6.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el propósito de comparar experimentos individuales en los ensayos de ELISA, la densidad óptica obtenida de las células no tratadas se normalizo a 1. El resto de los valores dentro del experimento fueron divididos entre la densidad óptica de las células no tratadas para obtener un valor relativo de apoptosis en unidades arbitrarias. Los datos fueron analizados utilizando la prueba *t* de Student, se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

7. RESULTADOS

7.1. LAS PROTEÍNAS LpqH Y PstS-1 DE *Mycobacterium tuberculosis* INDUCEN APOPTOSIS EN MACRÓFAGOS HUMANOS.

Para investigar la capacidad apoptogénica de las cepas de *Mycobacterium smegmatis* transformadas (*M.smegmatis*+LpqH y *M.smegmatis*+PstS-1), se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis cuantificándose la apoptosis por citometría de flujo con Anexina V. Así mismo se hicieron ensayos de fagocitosis con *M.smegmatis* nativa. Como un control positivo de apoptosis los MDM se trataron con 100 µg de cicloheximida (CHX). En los ensayos realizados se observó que las cepas transformadas inducían apoptosis en un grado mayor que *M. smegmatis* nativa. Esta diferencia fue mayor con *M. smegmatis*+PstS-1 (Fig. 2). Para determinar si las proteínas eran las responsables de la apoptosis, se hicieron ensayos incubando células con tiras de nitrocelulosa solubilizadas con DMSO que contenían LpqH y PstS-1 de las cepas de *M. smegmatis* transformadas. Para esto, se realizó una cinética de apoptosis en macrófagos humanos incubados con 5 µg de las proteínas por 1 y 24 h y se determinó mediante citometría de flujo por TUNEL. Con 5 µg de lipoproteínas se observó que a 1 h el nivel de apoptosis era mayor que a 24 h por lo que en experimentos subsecuentes los tiempos de incubación fueron de solo 1 h (Fig. 3).

Para determinar la dosis óptima se hicieron ensayos de apoptosis incubando células con 0.5, 5 y 50 µg por 1 h. Como se observa en la Fig. 4 en el análisis mediante ELISA de nucleosomas, ambas proteínas inducen elevados niveles de apoptosis en las concentraciones utilizadas de 0.5, 5 y 50 µg, se puede observar que 5 µg es una dosis apropiada ya que el nivel de apoptosis obtenido fue similar al producido con 50 µg de lipoproteína y con 100 µg de CHX. Además, debido a que el método de ELISA es de

amplia aceptación dada su facilidad de ejecución y su gran reproducibilidad [83;84] fue elegido para los siguientes experimentos.

Para descartar una posible contribución de proteínas de *M. smegmatis* nativa que comigren con LpqH ó PstS-1 en la inducción de apoptosis se hicieron ensayos con proteínas de esta cepa presentes en tiras de nitrocelulosas cortadas de las regiones donde migran LpqH y PstS-1. Como se observa en la Fig. 4, la apoptosis inducida por las proteínas de LpqH y PstS-1 era significativamente mayor que la obtenida con 100 µg de las proteínas de *M. smegmatis* nativa. Para eliminar un posible papel de los lipopolisacáridos (LPS) en la apoptosis, los experimentos se realizaron en presencia del inhibidor específico polimixina B (Sigma–Aldrich; St. Louis, MO).

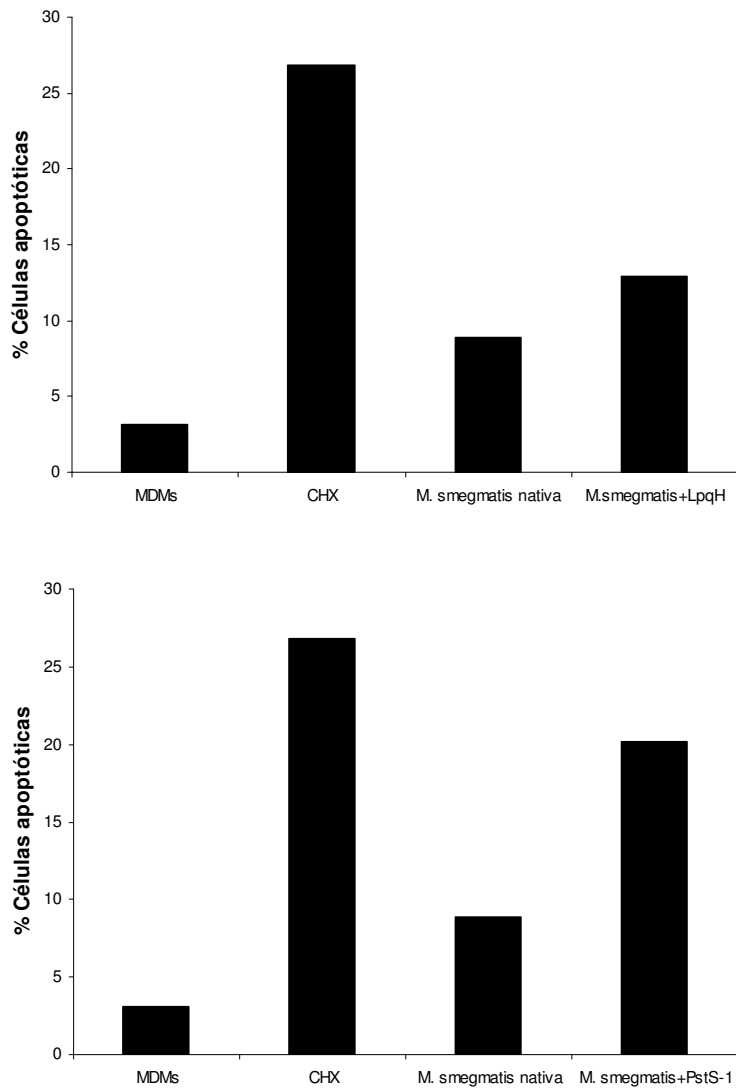


Figura 2. Ensayo de fagocitosis con MDM y *M. smegmatis* transformadas. Macrófagos derivados de sangre periférica (1×10^6) se incubaron con *M. smegmatis* nativa, *M. smegmatis*+LpqH y *M. smegmatis*+PstS-1 en proporción de 20 bacterias por célula (MOI 1:20) por 4 h a 37 °C. Después de 20 h de incubación se determinó la apoptosis mediante citometría de flujo con Anexina V. Como control positivo de inducción de apoptosis se incubaron macrófagos con cicloheximida (CHX). MDMs células sin tratamiento. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

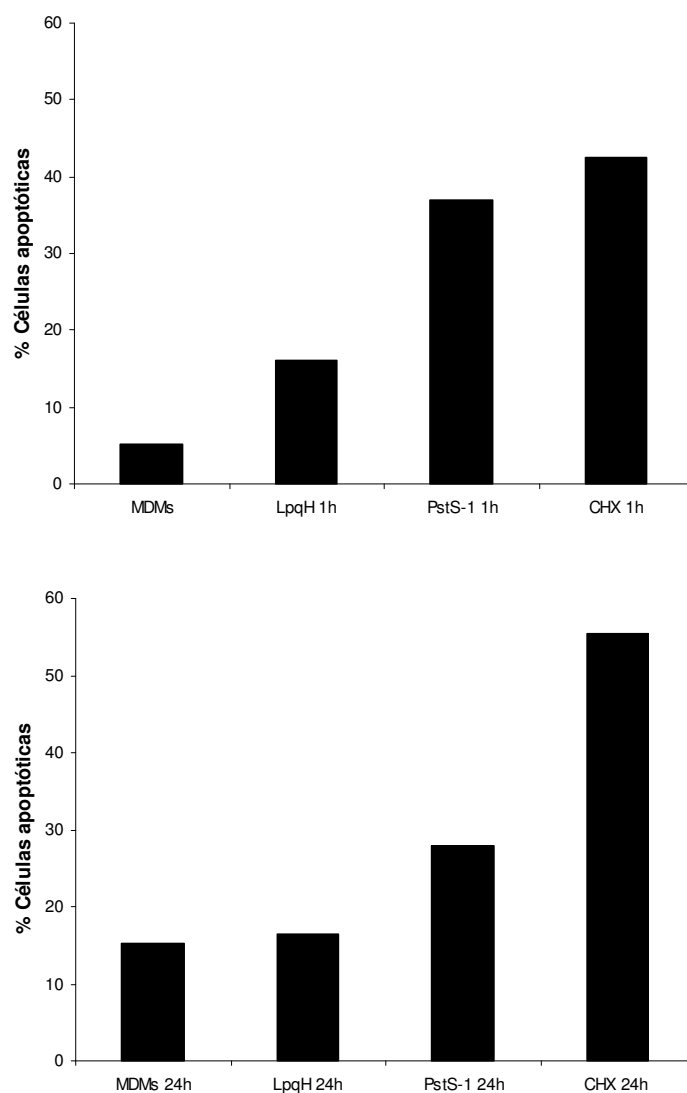


Figura 3. Cinética de la apoptosis inducida por las lipoproteínas LpqH y PstS-1 de *M. tuberculosis* presentadas en nitrocelulosa y medida por TUNEL. Macrófagos derivados de sangre periférica (1×10^6) se incubaron con $5 \mu\text{g}$ de las lipoproteínas por 1 y 24 h; la apoptosis se determinó por citometría de flujo por TUNEL. Como control positivo de inducción de apoptosis los macrófagos se trataron con cicloheximida (CHX). Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. MDMs células sin tratamiento.

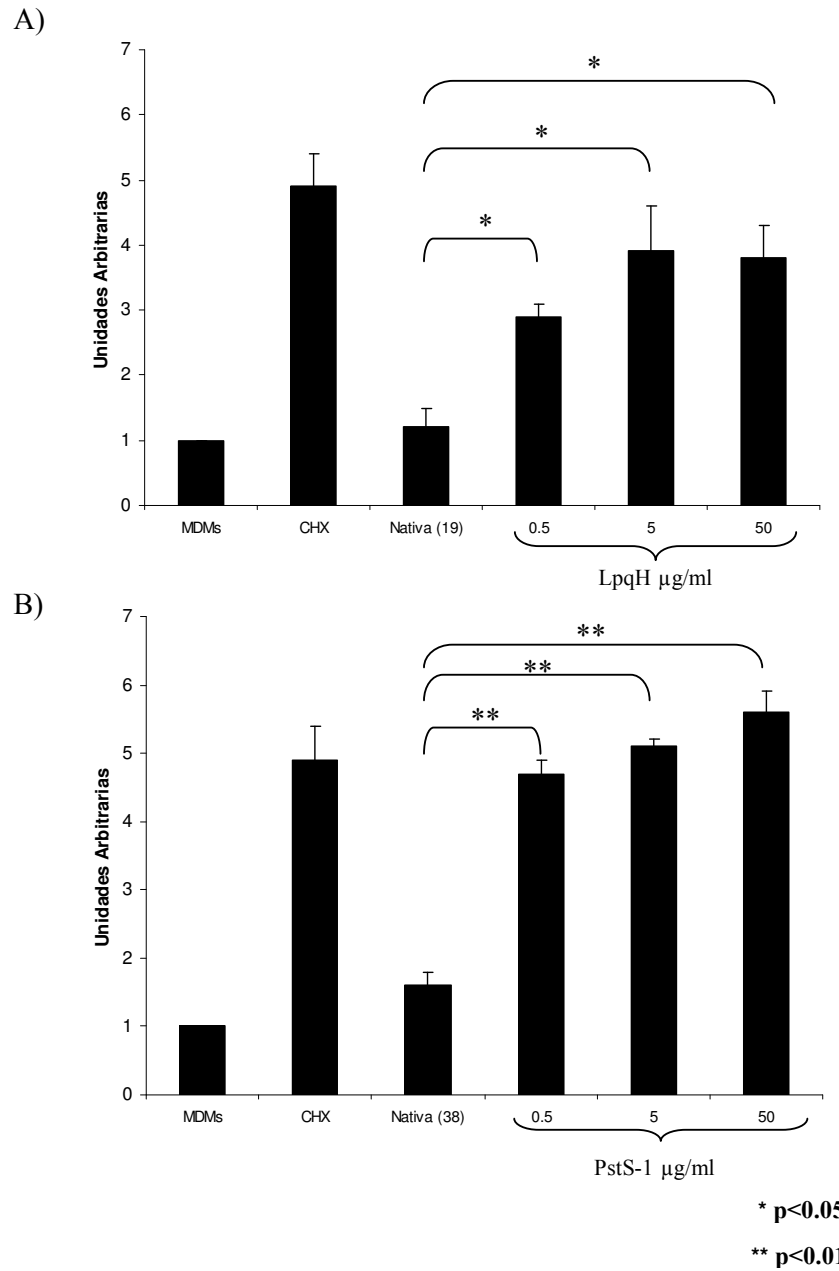


Figura 4. LpqH (A) y PstS-1 (B) de *M. tuberculosis* inducen apoptosis en macrófagos. Macrófagos derivados de monocitos (0.5×10^6) de sangre periférica se incubaron por 1 h con las lipoproteínas incorporadas, en nitrocelulosa en las concentraciones indicadas. Como control, los macrófagos se incubaron con 100 µg de las proteínas de una cepa nativa de *M. smegmatis* que comigra con las zonas de LpqH y PstS-1 (Nativa (19) ó Nativa (38)). Como control positivo, macrófagos se trataron con cicloheximida (CHX). Se determinó la apoptosis por ELISA de fragmentación nucleosomal. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

7.2. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR Lp_qH Y PstS-1 ES DEPENDIENTE DE CASPASAS.

Para investigar si la apoptosis inducida se debía a un mecanismo dependiente de caspasas, se realizaron experimentos de “Western-blot” con el propósito de observar las diferentes formas de activación de las proteasas y ensayos en presencia de inhibidores específicos para las caspasas 8, 3 y 9. Debido a que se sabe que las vías de apoptosis dependientes de caspasas pueden ser desencadenadas de manera extrínseca e intrínseca [36;37], se investigó la participación de las caspasas 8 y 3 (activadas por receptores de muerte) para la vía extrínseca y como una indicación de activación de la vía intrínseca a la caspasa 9 (activada por factores mitocondriales). Para los ensayos de “Western-blot”, se obtuvieron extractos totales de células tratadas con Lp_qH y PstS-1. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con los anticuerpos monoclonales específicos para detectar las formas activa e inactiva de las caspasas 8, 9 y 3. Finalmente, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia. Para las células tratadas con las proteínas se pueden observar las formas activas de las caspasas 8, 9 y 3 (Fig. 5).

Para confirmar y extender los anteriores resultados, se incubaron macrófagos con inhibidores específicos para las caspasas 8, 3 y 9 así como un inhibidor general de caspasas. Dichos inhibidores difunden libremente en la célula uniéndose de manera específica al sitio activo de las caspasas inhibiendo su actividad [38]. Se observaron resultados similares para ambas lipoproteínas (Fig. 6). Hubo una disminución importante de la apoptosis en células tratadas con el inhibidor general de caspasas y con los inhibidores específicos de las caspasas 8, 3 y 9. Lo anterior resulta de interés ya que implica la participación de la vía activada por receptores al inhibirse la apoptosis con las caspasas 8 y 3 y se implica además la participación de la vía intrínseca mediada

por la mitocondria, al observarse disminución de la apoptosis mediante la inhibición de la caspasa 9 (Fig 6).

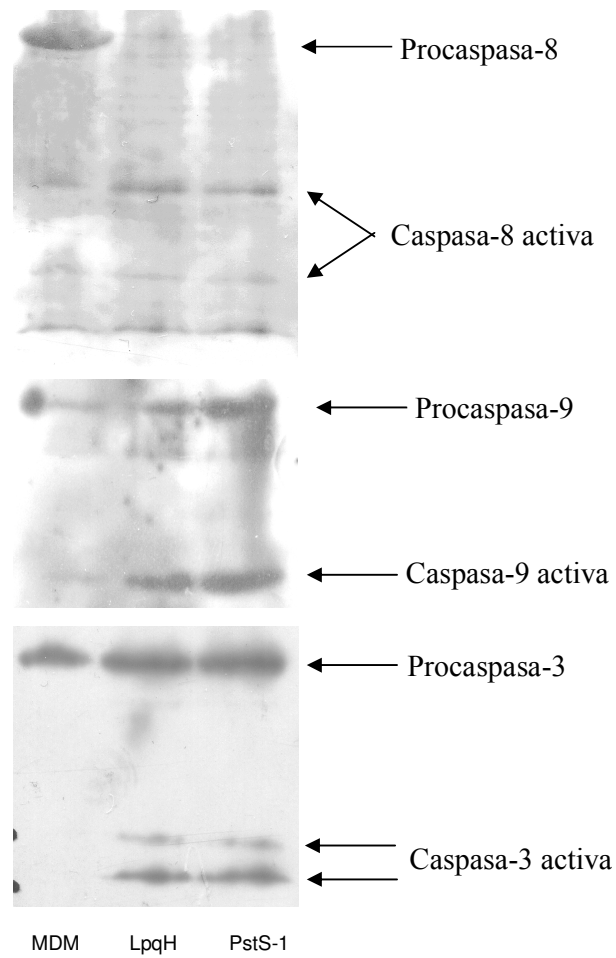
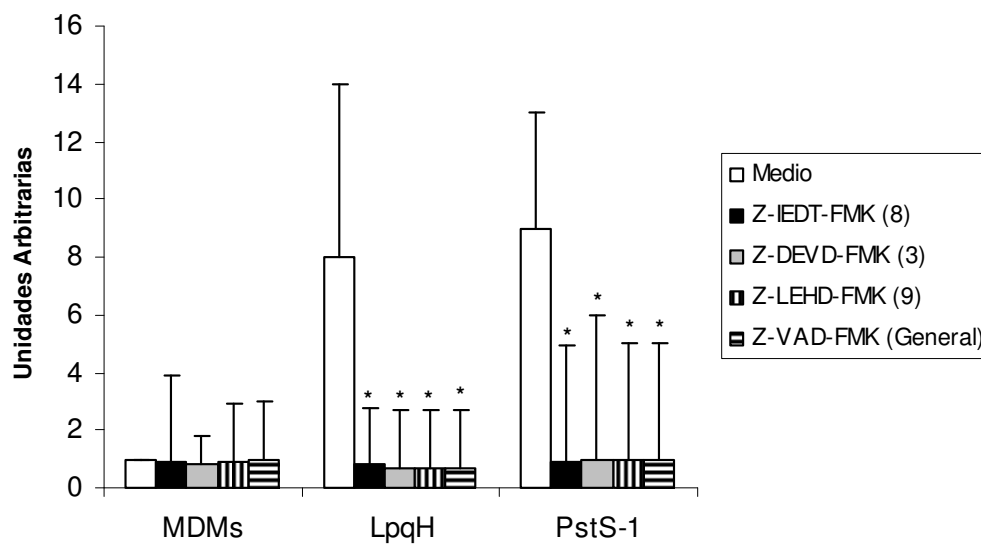


Figura 5. Análisis de la activación de las caspasas en la apoptosis inducida por LpqH y PstS-1. Los macrófagos derivados de monocitos (2×10^6) se incubaron con $5 \mu\text{g}$ de las lipoproteínas por 1 h; se obtuvieron extractos celulares totales, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con los anticuerpos correspondientes los que se revelaron por quimioluminiscencia. MDM macrófagos no tratados.



* p<0.05

Figura 6. Las caspasas 8, 9 y 3 participan en la apoptosis de macrófagos inducida por LpqH y PstS-1 de *M. tuberculosis*. Los macrófagos (1×10^6) fueron pretratados o no con los inhibidores sintéticos específicos de caspasas z-IETD-FMK (caspasa 8), z-DEVD-FMK (caspasa 3), z-LEHD-FMK (caspasa 9) y con el inhibidor general de caspasas z-VAD-FMK por 30 min a 37 °C. Posteriormente, las células se incubaron con 5 μg de las lipoproteínas por 1 h y se determinó la apoptosis por ELISA de fragmentación nucleosomal. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de * $p < 0.05$.

7.3. PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PROTEÍNA DE LpqH DE *Mycobacterium tuberculosis*.

De manera interesante los resultados anteriores implicaban, además de la vía extrínseca, a la vía intrínseca que es mediada por factores mitocondriales. Se sabe que la mitocondria amplifica la apoptosis mediante la liberación de citocromo C que promueve la activación de la caspasa 9 [37]. Si bien el mecanismo de liberación del citocromo C del interior mitocondrial es un mecanismo que aún no se conoce con detalle, se ha propuesto que la interacción de la proteína proapoptótica Bad con la proteína antiapoptótica bcl-2 genera un poro en la membrana mitocondrial por medio del cual el citocromo es liberado [52]. La generación de dicho poro promueve un cambio en el potencial de membrana de la mitocondria ($\Delta\psi_m$) el cual se ha considerado característico de las células apoptóticas y el cual es medible por medio del colorante DIOC₆(3), este es un colorante que se une de manera específica a la membrana mitocondrial debido a su afinidad por el potencial energético generado durante la generación de ATP. Cuando hay un cambio en el potencial de la membrana mitocondrial de la célula apoptótica, este puede detectarse fácilmente por citometría de flujo usando este colorante [85;86]. Para investigar de manera más detallada la participación de la mitocondria en la apoptosis de los macrófagos se investigó si LpqH de *M. tuberculosis* promueve cambios en el potencial de membrana de la mitocondria. Como se observa en la Fig. 7, la incubación de los macrófagos con LpqH promueve cambios en el potencial de membrana de la mitocondria, que se manifiesta como una disminución en la marca de DIOC en las células incubadas con la proteína (M1= 27.51%). Se ha determinado que la mitocondria puede además inducir apoptosis caspasa-independiente, mediante factores como la endonucleasa G y el factor de inducción de apoptosis (AIF) [52]. Una vez fuera

de la mitocondria AIF se transloca hacia el núcleo celular en donde tiene la capacidad de actuar como endonucleasa promoviendo el corte del DNA [87]. En este estudio investigamos la participación de AIF. Por epifluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-AIF se observó que después de una hora de incubación con LpqH 30 % de los MDMs presentaban fluorescencia intensa del núcleo indicando la translocación de AIF de la mitocondria al núcleo. En la Fig. 8 se pueden observar los núcleos AIF positivos teñidos en amarillo resultado de la colocalización del colorante nuclear DAPI con el colorante rojo de la ficoeritrina que marca el anticuerpo anti-AIF. Para hacer más evidente la colocalización se utilizaron pseudocolores marcando de color verde los núcleos y de rojo la marca de AIF.

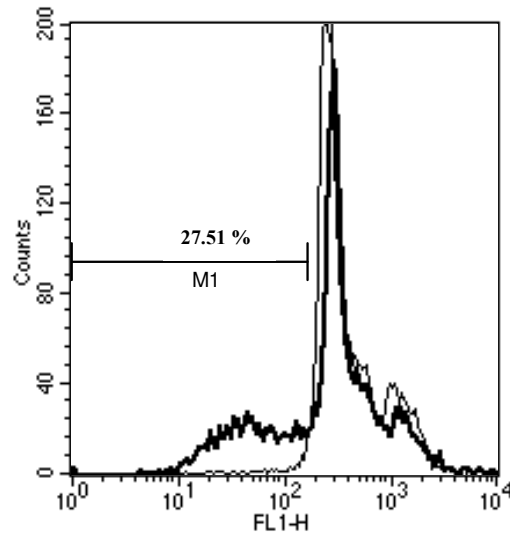


Figura 7. La exposición de los macrófagos marcados con $\text{DIOC}_6(3)$ a LpqH induce pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Los macrófagos (1×10^6) se incubaron con LpqH y después con una solución 40 nM de $\text{DIOC}_6(3)$. La línea delgada indica la lectura obtenida por la marca de $\text{DIOC}_6(3)$ en las células no tratadas, mientras que con la línea gruesa se indica la lectura obtenida de las células tratadas con LpqH . Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

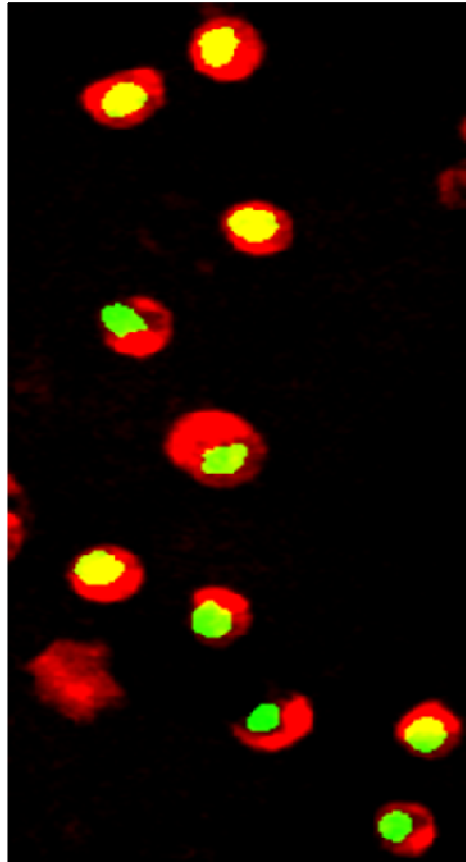
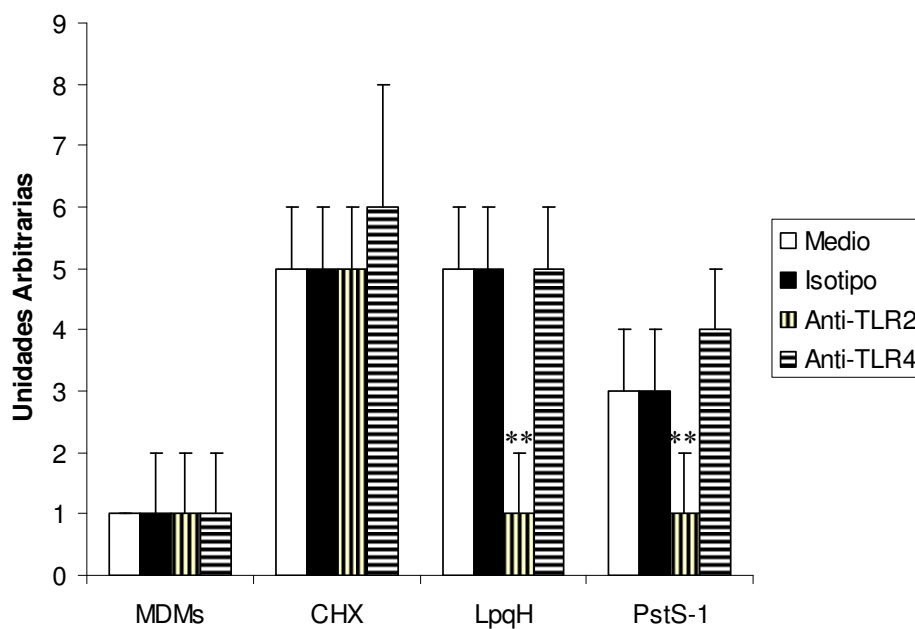


Figura 8. El tratamiento de los macrófagos con LpqH induce la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) de la mitocondria hacia el núcleo de las células apoptóticas. En el panel se observan los núcleos teñidos con DAPI (pseudocolor verde) y el marcaje de AIF con un anticuerpo específico acoplado a ficoeritrina (PE; color rojo). La colocalización de DAPI y AIF se observa en color amarillo. Imágenes 40X.

7.4. ENSAYOS PARA ESTUDIAR LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES TLR2 Y TLR4 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LAS LIPOPROTEINAS DE *Mycobacterium tuberculosis*.

Debido a que los receptores TLR2 y TLR4 tienen una participación muy importante en la respuesta inmune innata y en el desencadenamiento de apoptosis [69;88;89], estudiamos la participación de estos receptores en la apoptosis de MDMs por LpqH y PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis*. Para lo anterior se preincubaron macrófagos con anticuerpos neutralizantes conocidos por su capacidad para bloquear la señalización de TLR2 y TLR4. El anticuerpo contra TLR2 inhibió la apoptosis inducida por ambas lipoproteínas, confirmando que la apoptosis es inducida por motivos lipídicos presentes en LpqH y PstS-1 (Fig. 9). En cambio el anticuerpo anti-TLR4 no afectó la magnitud de la apoptosis (Fig. 9). Como controles se utilizaron anticuerpos irrelevantes de los mismos isotipos correspondientes los cuales no inhibieron la apoptosis y tampoco fue inhibida la apoptosis mediada por cicloheximida en concordancia con el hecho de que TLR2 y TLR4 no participan en la apoptosis inducida por esta molécula.



** p < 0.01

Figura 9. La apoptosis inducida por las lipoproteínas micobacterianas es dependiente de TLR2 pero no de TLR4. Los macrófagos (1×10^5) se preincubaron con anticuerpos inhibidores de TLR2 ó TLR4 y posteriormente se adicionaron $5 \mu\text{g}$ de las lipoproteínas. Se determinó la apoptosis por ELISA de nucleosomas. Como controles los macrófagos se incubaron con los isotipos correspondientes. MDMs, macrófagos no tratados; CHX, cicloheximida. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de ** p < 0.01.

7.5. LAS LIPOPROTEÍNAS LpqH y PstS-1 DE *Mycobacterium tuberculosis* ESTIMULAN LA SECRECIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

Se sabe que uno de los principales efectos de la interacción de proteínas bacterianas con los macrófagos es la secreción de TNF [90]. Para investigar si la incubación con LpqH y PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis* promueve la secreción de TNF de los macrófagos, se cuantificó por un método de ELISA la cantidad de dicha citocina en el medio de cultivo. Como se observa en la Fig. 10, la incubación de los macrófagos con las lipoproteínas bacterianas induce la secreción de TNF detectada en el sobrenadante del medio de cultivo la cual es tiempo-dependiente. Como control se incubaron macrófagos con las proteínas de *M. smegmatis* nativa presentes en las regiones de 19 y 38 kDa. Estas proteínas inducen niveles significativamente menores a las inducidas por las proteínas de *M. tuberculosis* (Fig. 10). Como control negativo se incubaron los macrófagos con CHX y no se detectó secreción de TNF.

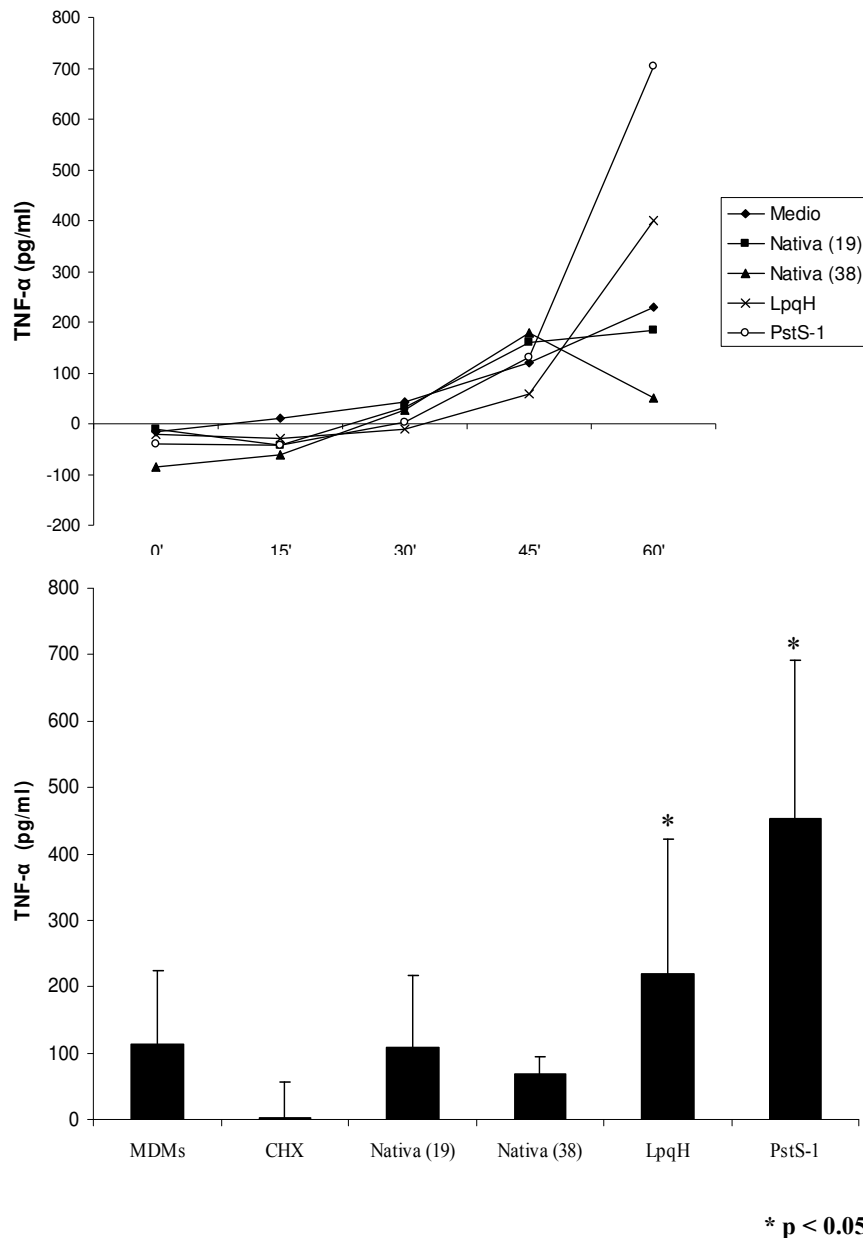


Figura 10. LpqH y PstS-1 promueven la secreción de TNF. A) Los MDMs se incubaron con 5 μg de las lipoproteínas ó con 100 μg de las proteínas de *M. smegmatis* nativa presentes en las zonas de 19 kDa (Nativa (19)) y 38 kDa (Nativa (38)). En los tiempos indicados se obtuvo el medio de cultivo por centrifugación y la cantidad de TNF se determinó por ELISA. B) Los macrófagos se incubaron por 1 h con cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), las proteínas de las zonas de LpqH y PstS-1 *M. smegmatis* nativa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ó con las lipoproteínas de LpqH ó PstS-1 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Al término de la incubación, el medio de cultivo fue obtenido y la cantidad de TNF se determinó por ELISA. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de * $p < 0.05$.

7.6. PARTICIPACIÓN DEL TNF Y SUS RECEPTORES TNFR1 Y TNFR2 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LpqH Y PstS-1 DE *Mycobacterium tuberculosis*.

En vista del incremento en la secreción de TNF por los macrófagos incubados con las lipoproteínas y de la importancia de la expresión de los receptores TNFR1 y TNFR2 para la citotoxicidad de la citocina [64;78], se analizó su expresión en la membrana de los macrófagos mediante un ELISA celular. De manera interesante se incrementó la expresión de ambos receptores en los macrófagos incubados con las lipoproteínas (Fig. 11), siendo la expresión de TNFR1 mayor que la de TNFR2. La sobre-expresión de TNFR2 es de interés pues este receptor no posee dominios de muerte.

Para determinar si la secreción del TNF y el incremento de los receptores TNFR1 y 2 se relacionaban a la inducción de apoptosis se realizaron experimentos con anticuerpos neutralizantes para TNF y sus receptores. Se encontró que los anticuerpos contra TNF y TNFR1 inhibieron de manera significativa la apoptosis inducida por LpqH (Fig. 12; $p < 0.05$). De mucho interés fue observar que la inhibición con el anticuerpo para TNFR2 fue mayor ($p < 0.01$). Por otra parte, la preincubación de los macrófagos con los tres anticuerpos anteriores inhibió de manera significativa la apoptosis inducida por PstS-1 (Fig. 12). Como se esperaba ninguno de los anticuerpos disminuyó la apoptosis inducida por cicloheximida ya que se sabe que la apoptosis inducida por esta sustancia no depende de receptores; los anticuerpos irrelevantes de los mismos isotipos no afectaron la apoptosis inducida por las lipoproteínas. Ya que se ha descrito que TNFR2 puede inducir apoptosis al reaccionar con TNF membranar se investigó la expresión de esta citocina por medio de un ELISA celular, no observándose diferencias entre macrófagos tratados y no tratados (Fig. 13).

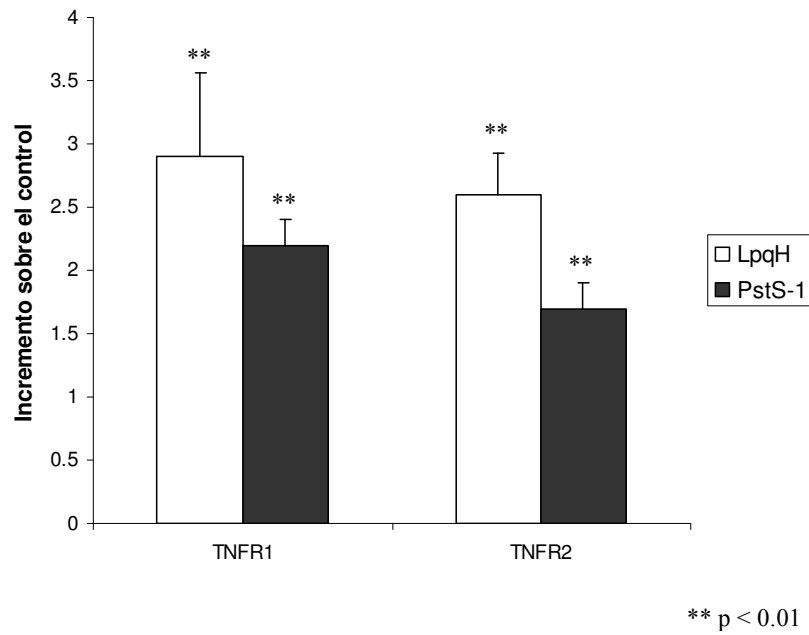


Figura 11. LpqH y PstS-1 inducen la sobre-expresión promueven de TNFR1 y TNFR2 para TNF en la membrana de los macrófagos. Los macrófagos se incubaron con las lipoproteínas y la cantidad de los receptores TNFR1 y TNFR2 se determinó mediante ELISA celular. Se muestra la media y la desviación estándar del incremento relativo con respecto al control de tres experimentos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de ** $p < 0.01$.

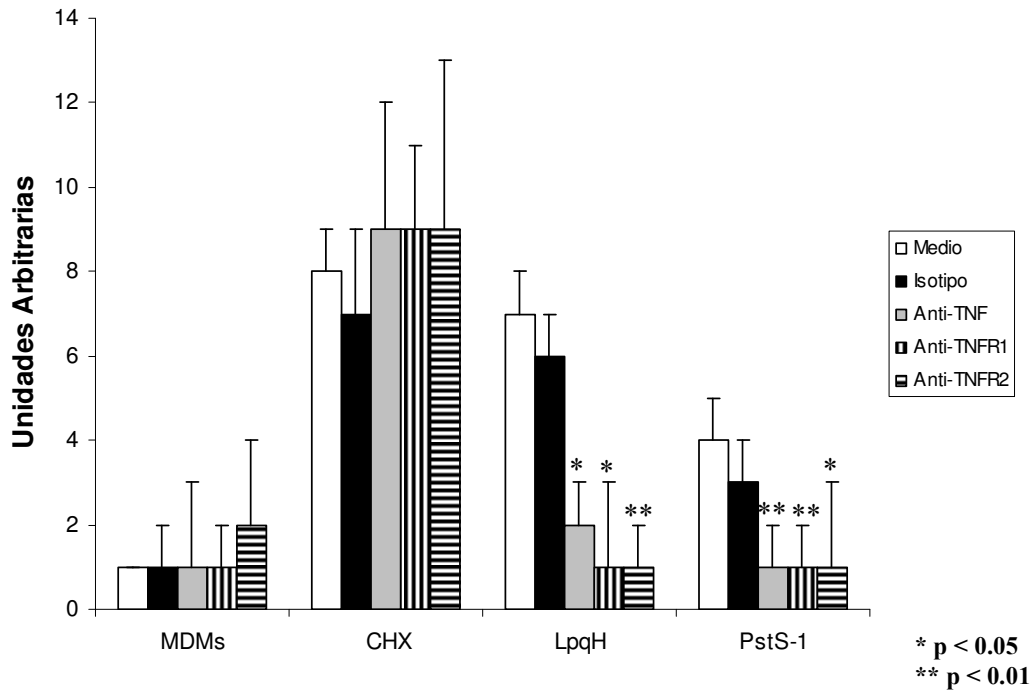


Figura 12. El TNF así como sus receptores TNFR1 y TNFR2 participan en la apoptosis inducida por LpqH y PstS-1. Los macrófagos (MDMs) fueron preincubados o no por 30 min a 37 °C con anticuerpos neutralizantes contra TNF, TNFR1 y TNFR2. Posteriormente, las células se incubaron con 5 µg de las lipoproteínas. La apoptosis se determinó mediante ELISA de fragmentación nucleosomal. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de * p < 0.05, ** p < 0.01.

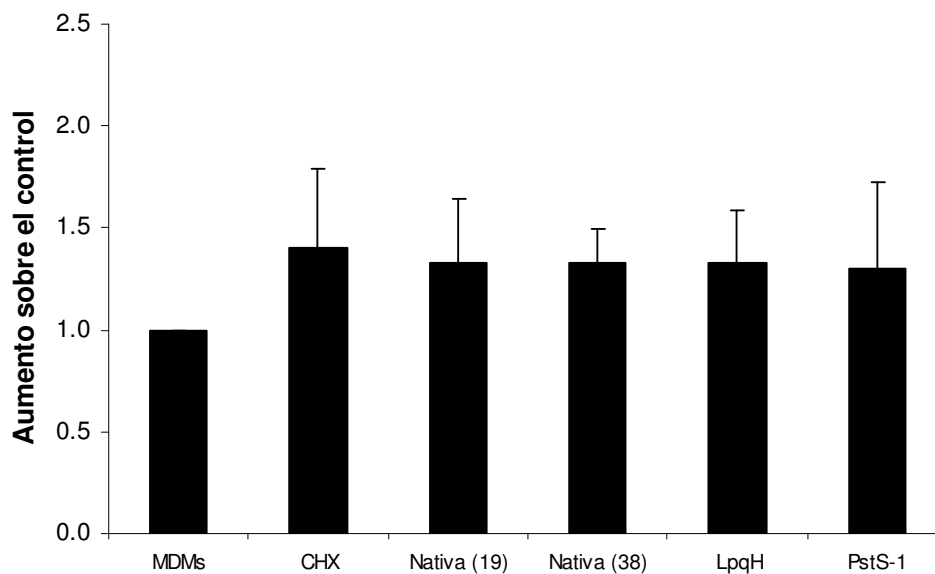


Figura 13. LpqH y PstS-1 no inducen la expresión de TNF membranal en MDM. Los macrófagos se incubaron con cicloheximida (CHX), las proteínas de las zonas de de 19 kDa (Nativa (19)) y 38 kDa (Nativa (38)) de la cepa nativa ó con las lipoproteínas LpqH ó PstS-1. La expresión de TNF se analizó por ELISA celular. Se muestra el incremento relativo en la cantidad de los receptores sobre la cantidad basal (normalizada a 1). Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.7. ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE APOPTOSIS MEDIADA POR FAS-FASL

Se sabe que la apoptosis puede ser iniciada por diferentes receptores de la familia TNF entre los que se encuentra Fas al interactuar con su ligando FasL [91]. Debido a que los macrófagos expresan el receptor Fas y su ligando FasL y son susceptibles a la muerte mediada por dicha vía, se analizó la participación de esta vía en la apoptosis de macrófagos promovida por LpqH y PstS-1. Primeramente se estudió si la incubación de los macrófagos con las lipoproteínas inducía un incremento en la expresión de Fas y FasL en la membrana mediante ELISA celular. LpqH promovió un incremento en la cantidad de FasL, mientras que la expresión de Fas no fue diferente (Fig. 14). Por otra parte la incubación de los macrófagos con PstS-1 indujo un incremento en la expresión de Fas y de FasL (Fig. 14). La importancia funcional de la sobre-expresión de Fas y FasL se analizó en ensayos de inhibición de la apoptosis utilizando anticuerpos neutralizantes en forma análoga a los experimentos de bloqueo de TNF y sus receptores (Fig. 12). La incubación con el anticuerpo neutralizante anti-Fas inhibió de manera significativa la apoptosis mediada por ambas lipoproteínas (Fig. 15), mientras que la incubación con el anticuerpo neutralizante de FasL disminuyó en mayor medida la apoptosis inducida por PstS-1 (Fig. 15). La incubación de los macrófagos con estos anticuerpos no inhibió la apoptosis inducida con cicloheximida (CHX).

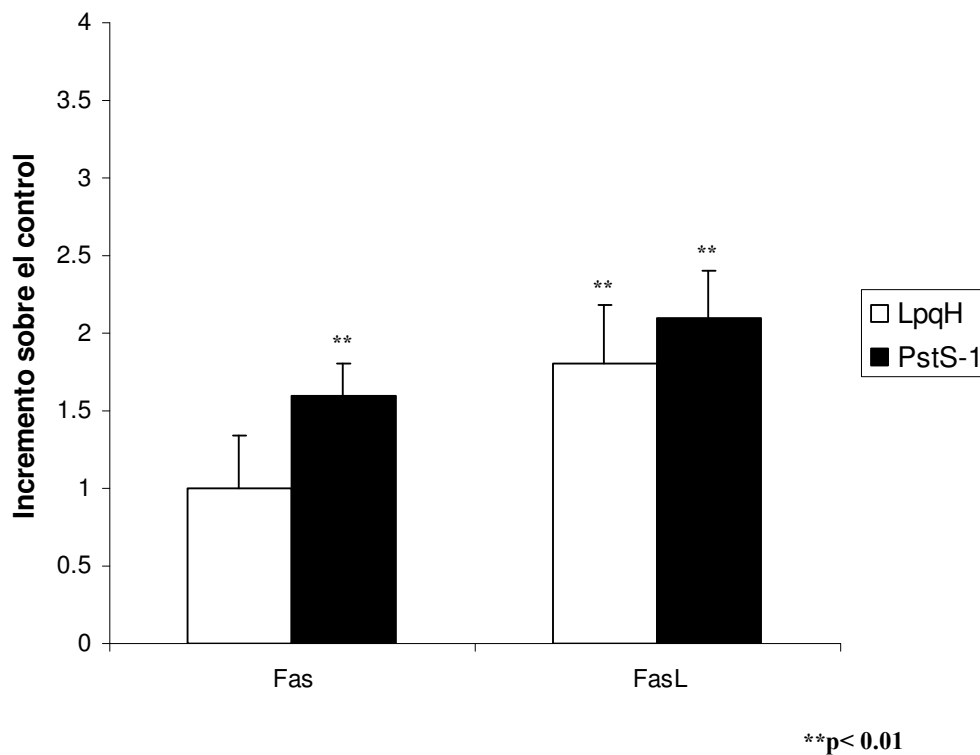


Figura 14. LpqH y PstS-1 incrementan la expresión de Fas y FasL. Los macrófagos fueron incubados con las lipoproteínas y la expresión de las citocinas se determinó mediante ELISA celular. Se muestra el incremento relativo en la cantidad de los receptores sobre la cantidad basal (normalizada a 1). Se muestra la media y la desviación estándar del incremento relativo con respecto al control de tres experimentos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de ** $p < 0.01$.

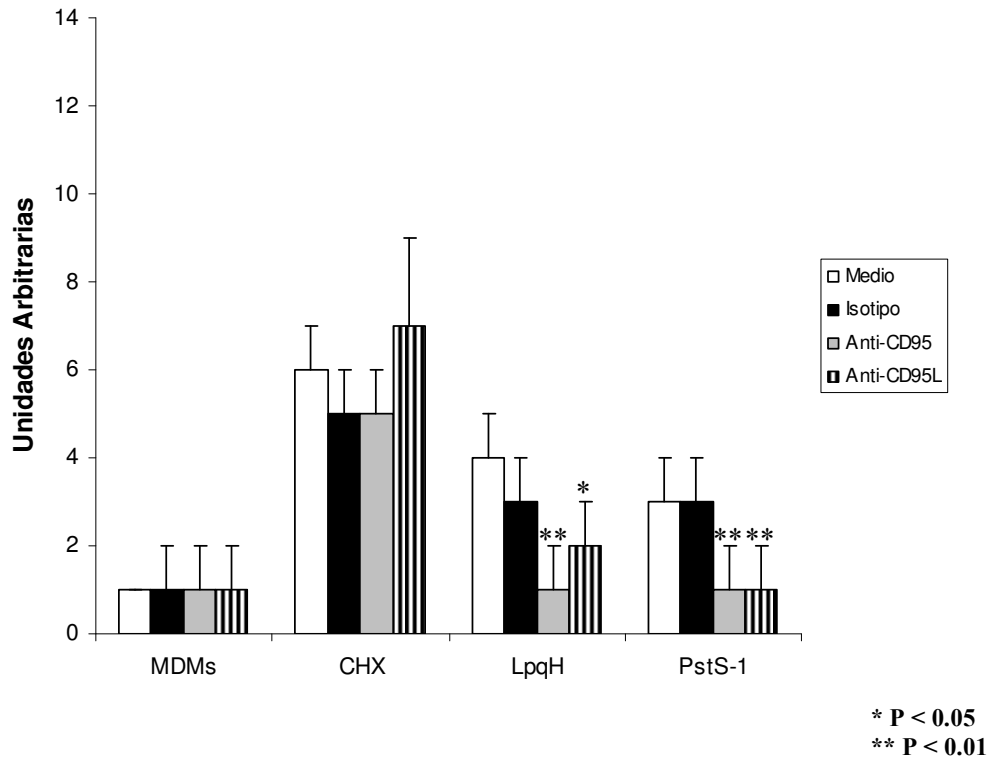


Figura 15. El receptor Fas y su ligando FasL participan en la apoptosis inducida por las lipoproteínas de LpqH y PstS-1. La participación de Fas y FasL en la apoptosis inducida por las lipoproteínas se estudio mediante ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales. Los macrófagos (MDMs) se preincubaron por 30 min a 37 °C con anticuerpos neutralizantes para Fas y FasL. Posteriormente, sin lavar, se incubaron los macrófagos con 5 µg de las lipoproteínas de LpqH ó PstS-1 por 1 h a 37 °C y se determinó la apoptosis mediante ELISA de fragmentación nucleosomal. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de ** p < 0.01, * p < 0.05.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años se han identificado patógenos capaces de modular los mecanismos de apoptosis de su célula hospedera, entre los que se encuentra *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) [31;32].

En el presente trabajo se analizó la capacidad del bacilo de la tuberculosis para inducir apoptosis de macrófagos y se encontró que además de la fagocitosis del bacilo es factible inducir apoptosis de MDM con las lipoproteínas LpqH y PstS-1 aisladas. El tratamiento a las células por sólo 1 h con las lipoproteínas incorporadas en membranas de nitrocelulosa, indujo niveles muy altos de apoptosis, semejantes a los observados con 100 ug de cicloheximida. LpqH y PstS-1 son proteínas de la pared bacteriana que pueden ser secretadas hacia el espacio extracelular, por lo tanto en ambas ubicaciones pueden interactuar con moléculas de superficie del macrófago para iniciar la apoptosis [21;92;93]. Las lipoproteínas se encuentran tanto en bacterias Gram-positivas como en bacterias Gram-negativas, como *Treponema pallidum*, diferentes especies de *Mycoplasma* y *Borrelia burgdorferi* [94]. En estos casos se ha caracterizado que los dominios acilados confieren actividades biológicas importantes a estas proteínas, entre las que se encuentran la habilidad para promover la activación del macrófago y el desencadenamiento de apoptosis [88;94].

En el presente trabajo documentamos por primera vez la capacidad apoptogénica de la lipoproteína PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis*, anteriormente se había caracterizado por participar en el transporte de fosfatos y por ser un gran inmunógeno al promover una fuerte respuesta inmune mediada por anticuerpos [93;95;96]. Adicionalmente, nuestras observaciones confirman y extienden anteriores observaciones que muestran la capacidad apoptogénica para macrófagos de la lipoproteína LpqH [69;79;97]. Recientemente han aparecido reportes en los que se describe la capacidad

apoptogénica para macrófagos de varias moléculas de *M. tuberculosis* entre los que se encuentran proteínas no aciladas como ESAT-6, PE_PGRS33, así como una proteína recombinante de LpqH expresada en *Escherichia coli* [69;77;78].

Las caspasas, endopeptidasas que pertenecen a una familia de proteasas ricas en cisteína participan en las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. En la vía extrínseca, la trimerización de los receptores de muerte en la membrana celular por la interacción con sus ligandos promueve la activación de la caspasa iniciadora 8 llevando a la activación de la caspasa ejecutora 3. En la vía intrínseca, la caspasa 8 corta a la molécula Bid activándola la cual se une a la molécula Bax en la membrana mitocondrial, este heterodímero se une a la molécula antiapoptótica Bcl-2 removiéndola de la membrana mitocondrial y promoviendo la liberación del citocromo C hacia el citoplasma, el cual posteriormente promueve de la activación de la caspasa 9 y de la caspasa 3 [37]. En este estudio, el papel de las caspasas en la apoptosis fue documentado mediante la demostración de la conversión de zimógeno hacia las formas activas de las caspasas 8, 9 y 3 en las células apoptóticas por “Western-blot”. La participación de las caspasas se confirmó utilizando inhibidores específicos sintéticos para caspasas; estos inhibidores se unen como pseudosustrato al sitio activo de las caspasas inhibiendo su actividad catalítica [38]. Se encontró que los inhibidores de las caspasas 8, 9 y 3 previenen la apoptosis inducida por ambas lipoproteínas. De manera interesante observamos que el inhibidor general de caspasas no disminuyó totalmente la apoptosis inducida por las lipoproteínas lo que nos sugirió la participación de una vía independiente de caspasas. Lo anterior, aunado a la participación de la caspasa 9 nos indicó la participación de la mitocondria posiblemente con liberación de citocromo C del interior de la mitocondria hacia el citoplasma resultando en la activación de la caspasa 9. Además se sabe que de la mitocondria también pueden ser liberados otros

factores capaces de inducir apoptosis independiente de caspasas; uno de los mejor caracterizados es el factor inductor de apoptosis (AIF). Se sabe que una vez que es liberado de la mitocondria AIF es translocado hacia el núcleo en donde actúa como endonucleasa promoviendo fragmentación de DNA y por lo tanto la muerte celular [40]. En este estudio encontramos que la incubación de los macrófagos con LpqH promovió pérdida en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y se observó que AIF es translocado hacia el núcleo celular. Por esto, podemos decir que en la apoptosis inducida por las lipoproteínas de *M. tuberculosis* participan vías caspasa dependiente y caspasa independiente con participación mitocondrial.

En el presente trabajo se describe la participación de TLR2 en la apoptosis inducida por la lipoproteína de PstS-1 y se confirma su participación en la inducida por LpqH [69;97]. Esto se determinó con anticuerpos neutralizantes anti-TLR2 que inhibieron la apoptosis casi en su totalidad. En contraste, anticuerpos inhibidores de TLR4 no tuvieron ningún efecto. Los motivos en las lipoproteínas responsables de la activación del TLR2 en las lipoproteínas micobacterianas se desconocen, sin embargo, es posible que se trate de grupos acilados de la fracción lipídica de las proteínas, como lo sugieren estudios con lipoproteínas bacterianas sintéticas [88;89]. Sin embargo, no se puede descartar la participación de secuencias peptídicas ya que se ha demostrado que una lipoproteína micobacteriana recombinante expresada en *Escherichia coli*, que por lo tanto carece de dominios acilados, es capaz de inducir apoptosis por medio de TLR2 [69]. Las vías de señalización iniciadas por las lipoproteínas micobacterianas se desconocen; se ha demostrado que la activación de TLR2 por otras lipoproteínas bacterianas y por lipoproteínas sintéticas desencadena la apoptosis en la que una proteína acopladora denominada factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) juega

un papel fundamental al unirse a los dominios de muerte asociados al receptor Fas [70;88].

En este estudio se demostró que los ligandos de muerte TNF y FasL participan en la apoptosis de macrófagos expuestos a LpqH y PstS-1. Estas citocinas, miembros de la familia de TNF, son proteínas transmembranales de tipo II las cuales son transportadas a la membrana celular después de su traducción y procesamiento [43;91;98]. Se ha observado que pueden encontrarse, además de libres, unidos a la membrana plasmática [99]. TNF y FasL se unen de manera específica a sus receptores presentes en la membrana celular. TNF, ya sea de manera soluble o en la forma membranal señalizan al unirse a uno de sus dos receptores, TNFR1 o TNFR2 [98;100]. En cuanto a FasL, esta citocina promueve la muerte por apoptosis al unirse a su receptor Fas. Los receptores TNFR1 y Fas poseen dominios citoplásmicos de muerte los cuales una vez que son activados interactúan con dominios de muerte presentes en las proteínas adaptadoras TRADD (para TNFR1) y FADD (para Fas); esto resulta en el reclutamiento y activación de la caspasa iniciadora 8 llevando la célula a la apoptosis.

En este estudio observamos que las lipoproteínas micobacterianas promueven el incremento en la secreción de TNF de los macrófagos. Adicionalmente, se observó una marcada reducción de la apoptosis en las células tratadas con anticuerpos bloqueadores contra TNF. Estos resultados confirman anteriores estudios que muestran que los macrófagos que fagocitan micobacterias incrementan la secreción de TNF, y que anticuerpos contra TNF reducen la apoptosis [56;57;83]. También se ha reportado con anterioridad que TNF exógeno incrementa la apoptosis de los macrófagos, siendo este efecto mayor en macrófagos infectados con micobacterias. Se ha propuesto que la causa de esta susceptibilidad aumentada se debe a que las micobacterias tienen la capacidad de sensibilizar a las células a los efectos apoptogénicos del TNF, desconociéndose los

mecanismos involucrados [60]. En este estudio describimos un mecanismo que pudiera explicar mejor la sensibilización de las células a la apoptosis, pues observó que los macrófagos incubados con LpqH y PstS-1 de *M. tuberculosis* incrementaron la expresión de los receptores TNFR1 y TNFR2 en la membrana celular. La importancia de este hallazgo fue demostrada con el uso de anticuerpos bloqueadores los cuales redujeron significativamente la apoptosis.

De particular interés fue la disminución de la apoptosis observada en células tratadas con el anticuerpo anti-TNFR2, ya que dicho receptor carece de dominios de muerte que puedan desencadenar de manera directa la apoptosis [101]. Hasta este momento no se había descrito un papel proapoptótico del TNFR2 en la apoptosis inducida por micobacterias, aun cuando se conoce su papel en la apoptosis mediada por linfocitos T. En este modelo se propone que el TNFR2 puede inducir apoptosis de manera indirecta al interactuar con TNFR1 por medio de sus adaptadores intracelulares TRAF ó bien por un mecanismo denominado “ligand passing”, el que propone que el TNFR2 al tener una afinidad mayor por TNF a bajas concentraciones es capaz de capturar dicha citocina y de transferirla al TNFR1, iniciándose así la apoptosis [102-104]. En relación con lo anterior, se ha descrito la existencia de una forma transmembranal del TNF que al interactuar con TNFR2 puede promover la muerte celular por apoptosis [105]. En este estudio sin embargo, no fue posible demostrar el incremento de TNF transmembranal.

En este estudio se demostró que la vía Fas-FasL participa en la apoptosis de macrófagos inducida por las lipoproteínas micobacterianas LpqH y PstS-1. Se encontró que las lipoproteínas derivadas de *M. tuberculosis* promueven la sobreexpresión de FasL y/o Fas en la membrana de los macrófagos. FasL es almacenado en vesículas secretoras de donde pueden ser transportados a la membrana celular para su presentación como molécula transmembranal de clase II [106]. Por otra parte, se sabe

que el FasL puede encontrarse también en forma soluble en sangre o en el medio de cultivo debido a la acción de metaloproteasas que producen un corte proteolítico en la región yuxtamembranal del dominio extracelular. Se ha determinado que la forma transmembranal de FasL es 1000 veces más eficiente que la forma soluble para inducir apoptosis en células que expresan Fas [107]. En este estudio, no fue posible cuantificar el FasL en el sobrenadante, sin embargo los anticuerpos neutralizantes contra FasL redujeron la apoptosis (Fig. 15), sugiriendo que este sistema participa en la apoptosis inducida por las lipoproteínas.

En el pasado pocos estudios se han enfocado al análisis de la contribución de la vía Fas-FasL en la apoptosis de macrófagos inducida por micobacterias. En un reporte se observó que FasL recombinante en combinación con cicloheximida induce apoptosis de macrófagos infectados con micobacterias [66]. Por otra parte, se observó que monocitos THP-1 infectados con micobacterias vivas o muertas y estimulados con PMA (ácidos de forbol miristato) e IFN- γ (interferón gamma) son menos susceptibles a la apoptosis mediada por FasL [71]. En otro estudio realizado con macrófagos infectados con *M. tuberculosis* se observó que estos expresan niveles disminuidos de Fas en la membrana celular y de mRNA, mientras que FasL de membrana y del mRNA para de este están incrementados [63]. Se ha especulado que el incremento en la expresión del mRNA de FasL y la alta expresión del FasL en los macrófagos presentes en los granulomas de tuberculosis puede proteger a estas células a la muerte mediada por la vía Fas-FasL [58;59]. Por otra parte, también es posible que los macrófagos equipados con el FasL anclado a la membrana puedan ser muy eficientes para matar células susceptibles a la muerte mediada por Fas, incluyendo macrófagos y otros tipos celulares presentes en los granulomas o *in vitro*. Existen algunas observaciones que apoyan esta idea; células dendríticas con FasL en su membrana inducen apoptosis de células T Fas⁺/CD4⁺ [54] y

la enterotoxina B de estafilococo promueve la sobreexpresión de FasL en los macrófagos los cuales a su vez adquieren la capacidad para matar linfocitos [108]. Adicionalmente, macrófagos humanos infectados con HIV que sobre-expresan FasL inducen apoptosis de linfocitos T CD4+ la cual es abrogada cuando la interacción Fas-FasL es bloqueada [109;110].

Los mecanismos implicados en la sobre-expresión de Fas y FasL en los macrófagos incubados con las lipoproteínas micobacterianas no se han examinado con detalle. Sin embargo, la participación de NF- κ B es posible debido a que se sabe que este factor puede ser activado por lipoproteínas bacterianas y sintéticas a través de TLR2 y ensayos con proteínas reporteras han demostrado que la sobre-regulación de Fas y FasL en células de Kupffer depende de la activación transcripcional de NF- κ B [88;111;112].

Finalmente, en la actualidad es ampliamente reconocido que las micobacterias virulentas inhiben la apoptosis de los macrófagos infectados, aunque algunas observaciones *in vitro* e *in vivo* muestran que estas bacterias son apoptogénicas aunque en menor grado que sus contrapartes atenuadas. En algunos estudios hasta el 40% de los macrófagos infectados con la cepa virulenta H37Rv son apoptóticos [57;79]. Adicionalmente, en lavados bronquioalveolares [113] y en granulomas de pacientes con tuberculosis [59] así como en ratones infectados con el bacilo H37Rv [58] pueden encontrarse numerosos macrófagos apoptóticos. Nuestros resultados plantean la duda de en que medida las lipoproteínas LpqH y PstS-1 así como otras moléculas apoptogénicas participan en la inducción de apoptosis por micobacterias viables. Un papel importante para las lipoproteínas es sugerida por estudios que muestran que la incubación de los bacilos con anticuerpos neutralizantes de la lipoproteína LpqH disminuyen significativamente la apoptosis de los macrófagos infectados con la cepa H37Rv [79]. Por otra parte, bacilos knockout para la lipoproteína LpqH muestran una capacidad

apoptogénica disminuida [97]. En lo que concierne a la participación de la lipoproteína PstS-1 en la apoptosis inducida por micobacterias viables no existen observaciones previas, sin embargo, es de interés que esta molécula se expresa abundantemente en la superficie bacteriana, particularmente durante la deprivación de fosfatos [95]. En dicha localización la lipoproteína podría estar disponible para interactuar con receptores celulares e inducir apoptosis.

Finalmente, estos hallazgos, aunados a los del presente trabajo sugieren un papel determinante de las lipoproteínas micobacterianas para modular el periodo de vida de las células hospederas de la micobacteria, los macrófagos. La significancia biológica de este fenómeno así como la determinación de si esto es una característica frecuente entre todas las lipoproteínas micobacterianas es aún tema de debate. Se ha sugerido la posibilidad de que sea la cantidad y calidad de las lipoproteínas presentes en la membrana de las micobacterias quizá pueda ser determinante para la infectividad y la virulencia de la micobacteria, de tal manera que, las micobacterias de acuerdo a su infectividad podrían tener expresión diferente de estas moléculas en su membrana. Hasta el momento no existen estudios proteómicos detallados de la membrana de micobacterias con diferente virulencia que permitan dilucidar este aspecto. Por otra parte, resulta interesante que la micobacteria es capaz de modular la expresión de algunas lipoproteínas, un ejemplo de esto es la expresión de PstS-1, la cual adicionalmente a su función de transportar fosfato para la micobacteria, en este estudio demostramos su capacidad apoptogénica para macrófagos. Por esto resulta atractiva la posibilidad de que la micobacteria regule de manera diferenciada también sus moléculas de muerte no solo para contender con diferentes requerimientos metabólicos, sino también para contender ante retos inmunitarios.

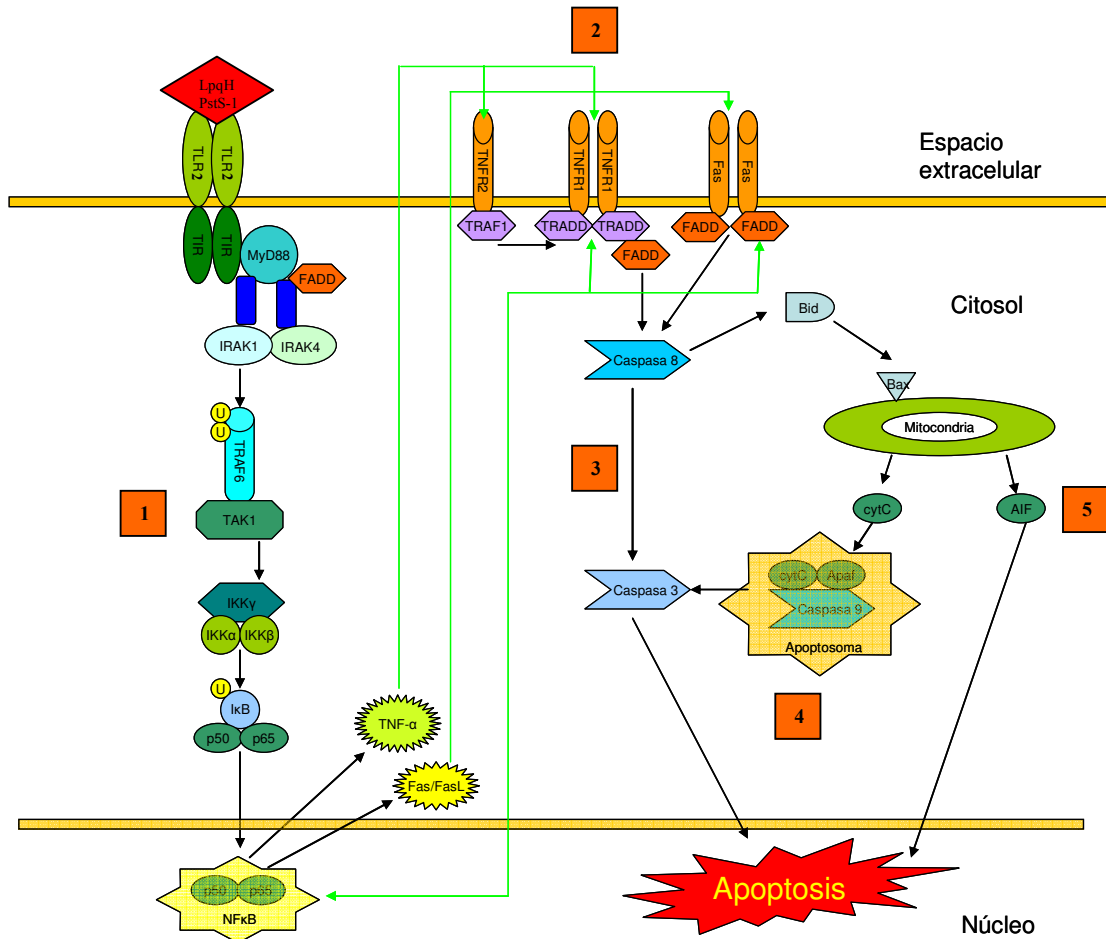


Figura 16. Esquema demostrativo de las vías implicadas en la apoptosis inducida por las lipoproteínas de LpqH y PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis* descritas en el presente trabajo. 1) Las lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* LpqH y PstS-1 interaccionan con TLR2, dicha interacción promueve la secreción de TNF así como la sobre-expresión en la membrana celular de sus receptores de muerte TNFR1, TNFR2 así como del receptor Fas y de su ligando FasL. Los mecanismos de sobre-expresión no fueron estudiados en el presente trabajo, sin embargo se propone es mediada por la activación de la vía consensu de NF-κB de acuerdo a lo descrito en estudios anteriores. 2) La secreción y sobre-expresión de ligandos y receptores de muerte en la membrana celular promueve la iniciación de las cascadas extrínseca e intrínseca de apoptosis. 3) En la vía extrínseca la activación en la membrana de los receptores de muerte promueve la activación de las caspasas 8 y de la caspasa 3; por otra parte en la vía intrínseca 4) se observó incremento en la permeabilidad mitocondrial, así como la activación de la caspasa 9. Adicionalmente; 5) se encontró que la apoptosis va acompañada de la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) hacia el núcleo de las células apoptóticas sugiriendo que un componente apoptótico independiente de caspasas también esta implicado.

9. CONCLUSIONES

-Las lipoproteínas de LpqH y PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis* poseen capacidad apoptogénica para macrófagos humanos.

-Las proteínas interaccionan y promueven la señal de apoptosis a través del receptor TLR2.

-En la apoptosis inducida por ambas lipoproteínas hay activación y participación de las caspasas 8, 3 y 9.

-En la apoptosis inducida por la lipoproteína LpqH la apoptosis también puede ser caspasa-independiente en la que participa la mitocondria al observarse pérdida en el potencial de membrana mitocondrial y mediante la liberación del factor inductor de apoptosis AIF.

-La estimulación de los macrófagos humanos con las lipoproteínas LpqH y PstS-1 resulta en el aumento en la secreción de TNF y en la sobre-expresión de los receptores de muerte TNFR1, TNFR2, Fas y del ligando FasL pero no de la forma de TNF membranal.

-La señalización de TNFR1, TNFR2 y Fas es necesaria en la apoptosis de macrófagos humanos incubados con las lipoproteínas LpqH y PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis*.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar investigaciones para determinar el papel de la apoptosis inducida por las lipoproteínas LpqH y PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis* en la sobrevivencia o eliminación de la micobacteria en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Investigar el papel en la apoptosis que poseen los azúcares presentes en las lipoproteínas LpqH y PstS-1.
- Caracterizar los mecanismos de sobre-expresión de los receptores y ligandos de muerte en los macrófagos humanos inducidos por la incubación con las lipoproteínas.
- Investigar en un modelo *in vivo* la posible implicación de la apoptosis en la formación y desarrollo de las lesiones asociadas a la tuberculosis.

11. BIBLIOGRAFIA

1. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Control
EPIDEMIOLOGY, STRATEGY, FINANCING. 2009.
2. **Schluger,N.W.,** The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and
twenty-three) years. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2005. **32**: 251-256.
3. **Roche,P.W., Triccas,J.A., and Winter,N.,** BCG vaccination against
tuberculosis: past disappointments and future hopes. *Trends Microbiol.* 1995. **3**:
397-401.
4. **Orme,I.M., McMurray,D.N., and Belisle,J.T.,** Tuberculosis vaccine
development: recent progress. *Trends Microbiol.* 2001. **9**: 115-118.
5. **Orme,I.M.,** Current progress in tuberculosis vaccine development. *Vaccine*
2005. **23**: 2105-2108.
6. **Roche,P.W., Triccas,J.A., Avery,D.T., Fifis,T., Billman-Jacobe,H., and
Britton,W.J.,** Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins
distinguish vaccination with bacille Calmette-Guerin from infection with
Mycobacterium tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 1994. **170**: 1326-1330.
7. **Flynn,J.L.,** Immunology of tuberculosis and implications in vaccine
development. *Tuberculosis.(Edinb.)* 2004. **84**: 93-101.

8. **Haase,A.T.**, Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu.Rev.Immunol.* 1999. **17**: 625-656.
9. **Orme,I.M., Miller,E.S., Roberts,A.D., Furney,S.K., Griffin,J.P., Dobos,K.M., Chi,D., Rivoire,B., and Brennan,P.J.**, T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J.Immunol.* 1992. **148**: 189-196.
10. **Orme,I.M., Andersen,P., and Boom,W.H.**, T cell response to Mycobacterium tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 1993. **167**: 1481-1497.
11. **Stenger,S. and Modlin,R.L.**, T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Curr.Opin.Microbiol.* 1999. **2**: 89-93.
12. **Dannenberg,A.M., Jr.**, Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: basic principles. *Indian J.Chest Dis.Allied Sci.* 1982. **24**: 68-77.
13. **Dannenberg,A.M., Jr.**, Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev.Infect.Dis.* 1989. **11 Suppl 2**: S369-S378.
14. **Aderem,A. and Underhill,D.M.**, Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 1999. **17**: 593-623.
15. **van Oss,C.J.**, Phagocytosis: an overview. *Methods Enzymol.* 1986. **132**: 3-15.

16. **Braun,L., Ohayon,H., and Cossart,P.,** The InIB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol.Microbiol.* 1998. **27**: 1077-1087.
17. **Braun,L. and Cossart,P.,** Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes.Infect.* 2000. **2**: 803-811.
18. **Sawyer,R.T., Drevets,D.A., Campbell,P.A., and Potter,T.A.,** Internalin A can mediate phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by mouse macrophage cell lines. *J.Leukoc.Biol.* 1996. **60**: 603-610.
19. **Schlesinger,L.S., Hull,S.R., and Kaufman,T.M.,** Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J.Immunol.* 1994. **152**: 4070-4079.
20. **Schlesinger,L.S., Kaufman,T.M., Iyer,S., Hull,S.R., and Marchiando,L.K.,** Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J.Immunol.* 1996. **157**: 4568-4575.
21. **az-Silvestre,H., Espinosa-Cueto,P., Sanchez-Gonzalez,A., Esparza-Ceron,M.A., Pereira-Suarez,A.L., Bernal-Fernandez,G., Espitia,C., and 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.

22. **Villeneuve,C., Etienne,G., Abadie,V., Montrozier,H., Bordier,C., Laval,F., Daffe,M., Maridonneau-Parini,I., and starie-Dequeker,C.,** Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 51291-51300.
23. **Villeneuve,C., Gilleron,M., Maridonneau-Parini,I., Daffe,M., starie-Dequeker,C., and Etienne,G.,** Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *J.Lipid Res.* 2005. **46**: 475-483.
24. **Schlesinger,L.S.,** Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J.Immunol.* 1993. **150**: 2920-2930.
25. **Zimmerli,S., Edwards,S., and Ernst,J.D.,** Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1996. **15**: 760-770.
26. **Liu,P.T., Stenger,S., Tang,D.H., and Modlin,R.L.,** Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J.Immunol.* 2007. **179**: 2060-2063.

27. **Yuk,J.M., Shin,D.M., Lee,H.M., Yang,C.S., Jin,H.S., Kim,K.K., Lee,Z.W., Lee,S.H., Kim,J.M., and Jo,E.K.,** Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host.Microbe* 2009. **6**: 231-243.
28. **Deretic,V., Via,L.E., Fratti,R.A., and Deretic,D.,** Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking. *Electrophoresis* 1997. **18**: 2542-2547.
29. **Deretic,V. and Fratti,R.A.,** Mycobacterium tuberculosis phagosome. *Mol.Microbiol.* 1999. **31**: 1603-1609.
30. **Deretic,V., Singh,S., Master,S., Harris,J., Roberts,E., Kyei,G., Davis,A., De,H.S., Naylor,J., Lee,H.H., and Vergne,I.,** Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol.* 2006. **8**: 719-727.
31. **Navarre,W.W. and Zychlinsky,A.,** Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol.* 2000. **2**: 265-273.
32. **Weinrauch,Y. and Zychlinsky,A.,** The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu.Rev.Microbiol.* 1999. **53**: 155-187.
33. **Thornberry,N.A., Rano,T.A., Peterson,E.P., Rasper,D.M., Timkey,T., Garcia-Calvo,M., Houtzager,V.M., Nordstrom,P.A., Roy,S., Vaillancourt,J.P., Chapman,K.T., and Nicholson,D.W.,** A combinatorial

approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme

B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis.

J.Biol.Chem. 1997. **272**: 17907-17911.

34. **Earnshaw,W.C., Martins,L.M., and Kaufmann,S.H.**, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* 1999. **68**: 383-424.
35. **Thornberry,N.A.**, Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem.Biol.* 1998. **5**: R97-103.
36. **Thornberry,N.A. and Lazebnik,Y.**, Caspases: enemies within. *Science* 1998. **281**: 1312-1316.
37. **Budihardjo,I., Oliver,H., Lutter,M., Luo,X., and Wang,X.**, Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1999. **15**: 269-290.
38. **Garcia-Calvo,M., Peterson,E.P., Leiting,B., Ruel,R., Nicholson,D.W., and Thornberry,N.A.**, Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 32608-32613.
39. **Thornberry,N.A.**, The caspase family of cysteine proteases. *Br.Med.Bull.* 1997. **53**: 478-490.

40. **Cregan,S.P., Dawson,V.L., and Slack,R.S.**, Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004. **23**: 2785-2796.
41. **Nagata,S.**, Apoptosis by death factor. *Cell* 1997. **88**: 355-365.
42. **Roulston,A., Reinhard,C., Amiri,P., and Williams,L.T.**, Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 10232-10239.
43. **Wallach,D., Varfolomeev,E.E., Malinin,N.L., Goltsev,Y.V., Kovalenko,A.V., and Boldin,M.P.**, Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu.Rev.Immunol.* 1999. **17**: 331-367.
44. **Boldin,M.P., Mett,I.L., Varfolomeev,E.E., Chumakov,I., Shemer-Avni,Y., Camonis,J.H., and Wallach,D.**, Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J.Biol.Chem.* 1995. **270**: 387-391.
45. **Boldin,M.P., Varfolomeev,E.E., Pancer,Z., Mett,I.L., Camonis,J.H., and Wallach,D.**, A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J.Biol.Chem.* 1995. **270**: 7795-7798.
46. **Chinnaiyan,A.M., O'Rourke,K., Tewari,M., and Dixit,V.M.**, FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995. **81**: 505-512.

47. **Boldin,M.P., Goncharov,T.M., Goltsev,Y.V., and Wallach,D.,** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996. **85**: 803-815.
48. **Muzio,M., Stockwell,B.R., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S., and Dixit,V.M.,** An induced proximity model for caspase-8 activation. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 2926-2930.
49. **Enari,M., Sakahira,H., Yokoyama,H., Okawa,K., Iwamatsu,A., and Nagata,S.,** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998. **391**: 43-50.
50. **Peitsch,M.C., Mannherz,H.G., and Tschopp,J.,** The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol.* 1994. **4**: 37-41.
51. **Li,H., Zhu,H., Xu,C.J., and Yuan,J.,** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998. **94**: 491-501.
52. **Arnoult,D., Gaume,B., Karbowski,M., Sharpe,J.C., Cecconi,F., and Youle,R.J.,** Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 2003. **22**: 4385-4399.

53. **Lutter,M., Perkins,G.A., and Wang,X.,** The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC.Cell Biol.* 2001. **2**: 22.
54. **Suss,G. and Shortman,K.,** A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J.Exp.Med.* 1996. **183**: 1789-1796.
55. **Fayyazi,A., Eichmeyer,B., Soruri,A., Schweyer,S., Herms,J., Schwarz,P., and Radzun,H.J.,** Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J.Pathol.* 2000. **191**: 417-425.
56. **Gil,D.P., Leon,L.G., Correa,L.I., Maya,J.R., Paris,S.C., Garcia,L.F., and Rojas,M.,** Differential induction of apoptosis and necrosis in monocytes from patients with tuberculosis and healthy control subjects. *J.Infect.Dis.* 2004. **189**: 2120-2128.
57. **Keane,J., Balcewicz-Sablinska,M.K., Remold,H.G., Chupp,G.L., Meek,B.B., Fenton,M.J., and Kornfeld,H.,** Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect.Immun.* 1997. **65**: 298-304.
58. **Mustafa,T., Bjune,T.G., Jonsson,R., Pando,R.H., and Nilsen,R.,** Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scand.J.Immunol.* 2001. **54**: 630-639.

59. **Mustafa,T., Mogga,S.J., Mfinanga,S.G., Morkve,O., and Sviland,L.,** Significance of Fas and Fas ligand in tuberculous lymphadenitis. *Immunology* 2005. **114**: 255-262.
60. **Keane,J., Remold,H.G., and Kornfeld,H.,** Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J.Immunol.* 2000. **164**: 2016-2020.
61. **Danelishvili,L., McGarvey,J., Li,Y.J., and Bermudez,L.E.,** Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2003. **5**: 649-660.
62. **Sly,L.M., Hingley-Wilson,S.M., Reiner,N.E., and McMaster,W.R.,** Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J.Immunol.* 2003. **170**: 430-437.
63. **Zhang,J., Jiang,R., Takayama,H., and Tanaka,Y.,** Survival of virulent Mycobacterium tuberculosis involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. *Microbiol.Immunol.* 2005. **49**: 845-852.
64. **Balcewicz-Sablinska,M.K., Keane,J., Kornfeld,H., and Remold,H.G.,** Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J.Immunol.* 1998. **161**: 2636-2641.

65. **Molloy,A., Laochumroonvorapong,P., and Kaplan,G.,** Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J.Exp.Med.* 1994. **180**: 1499-1509.
66. **Oddo,M., Renno,T., Attinger,A., Bakker,T., MacDonald,H.R., and Meylan,P.R.,** Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *J.Immunol.* 1998. **160**: 5448-5454.
67. **Schaible,U.E., Winau,F., Sieling,P.A., Fischer,K., Collins,H.L., Hagens,K., Modlin,R.L., Brinkmann,V., and Kaufmann,S.H.,** Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat.Med.* 2003. **9**: 1039-1046.
68. **Winau,F., Kaufmann,S.H., and Schaible,U.E.,** Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. *Cell Microbiol.* 2004. **6**: 599-607.
69. **Lopez,M., Sly,L.M., Luu,Y., Young,D., Cooper,H., and Reiner,N.E.,** The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J.Immunol.* 2003. **170**: 2409-2416.
70. **Brightbill,H.D., Libraty,D.H., Krutzik,S.R., Yang,R.B., Belisle,J.T., Bleharski,J.R., Maitland,M., Norgard,M.V., Plevy,S.E., Smale,S.T., Brennan,P.J., Bloom,B.R., Godowski,P.J., and Modlin,R.L.,** Host defense

mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors.

Science 1999. **285**: 732-736.

71. **Loeuillet,C., Martinon,F., Perez,C., Munoz,M., Thome,M., and Meylan,P.R.,** Mycobacterium tuberculosis subverts innate immunity to evade specific effectors. *J.Immunol.* 2006. **177**: 6245-6255.

72. **Stenger,S., Mazzaccaro,R.J., Uyemura,K., Cho,S., Barnes,P.F., Rosat,J.P., Sette,A., Brenner,M.B., Porcelli,S.A., Bloom,B.R., and Modlin,R.L.,** Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 1997. **276**: 1684-1687.

73. **Krzyzowska,M., Schollenberger,A., Pawlowski,A., Hamasur,B., Winnicka,A., ugustynowicz-Kopec,E., and Niemialtowski,M.,** Lipoarabinomannan as a regulator of the monocyte apoptotic response to Mycobacterium bovis BCG Danish strain 1331 infection. *Pol.J.Microbiol.* 2007. **56**: 89-96.

74. **Wu,S.H., Chu,J.J., and Chiang,C.D.,** Increased soluble Fas ligand concentration in tuberculous pleural effusion. *J.Formos.Med.Assoc.* 2001. **100**: 32-34.

75. **Dao,D.N., Kremer,L., Guerardel,Y., Molano,A., Jacobs,W.R., Jr., Porcelli,S.A., and Briken,V.,** Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect.Immun.* 2004. **72**: 2067-2074.

76. **Nuzzo,I., Galdiero,M., Bentivoglio,C., Galdiero,R., and Romano,C.C.,**
Apoptosis modulation by mycolic acid, tuberculostearic acid and trehalose 6,6'-
dimycolate. *J.Infect.* 2002. **44**: 229-235.
77. **Derrick,S.C. and Morris,S.L.,** The ESAT6 protein of Mycobacterium
tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression.
Cell Microbiol. 2007. **9**: 1547-1555.
78. **Basu,S., Pathak,S.K., Banerjee,A., Pathak,S., Bhattacharyya,A., Yang,Z.,
Talarico,S., Kundu,M., and Basu,J.,** Execution of macrophage apoptosis by
PE_PGRS33 of Mycobacterium tuberculosis is mediated by Toll-like receptor 2-
dependent release of tumor necrosis factor-alpha. *J.Biol.Chem.* 2007. **282**: 1039-
1050.
79. **Ciaramella,A., Martino,A., Cicconi,R., Colizzi,V., and Fraziano,M.,**
Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates Mycobacterium tuberculosis-
induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection. *Cell
Death.Differ.* 2000. **7**: 1270-1272.
80. **Young,D., Garbe,T., Lathigra,R., bou-Zeid,C., and Zhang,Y.,**
Characterization of prominent protein antigens from mycobacteria.
Bull.Int.Union Tuberc.Lung Dis. 1991. **66**: 47-51.
81. **Young,D.B. and Garbe,T.R.,** Lipoprotein antigens of Mycobacterium
tuberculosis. *Res.Microbiol.* 1991. **142**: 55-65.

82. **Wallis,R.S., mir-Tahmasseb,M., and Ellner,J.J.**, Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: the monocyte western blot. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990. **87**: 3348-3352.
83. **Riendeau,C.J. and Kornfeld,H.**, THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. *Infect.Immun.* 2003. **71**: 254-259.
84. **Allen,R.T., Hunter,W.J., III, and Agrawal,D.K.**, Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 1997. **37**: 215-228.
85. **Inayat-Hussain,S.H., Annuar,B.O., Din,L.B., Ali,A.M., and Ross,D.**, Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniothalamine in HL-60 leukemia cells. *Toxicol.In Vitro* 2003. **17**: 433-439.
86. **Mathur,A., Hong,Y., Kemp,B.K., Barrientos,A.A., and Erusalimsky,J.D.**, Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc.Res.* 2000. **46**: 126-138.
87. **Ikai,T., Akao,Y., Nakagawa,Y., Ohguchi,K., Sakai,Y., and Nozawa,Y.**, Magnolol-induced apoptosis is mediated via the intrinsic pathway with release of AIF from mitochondria in U937 cells. *Biol.Pharm.Bull.* 2006. **29**: 2498-2501.

88. **Aliprantis,A.O., Yang,R.B., Weiss,D.S., Godowski,P., and Zychlinsky,A.,**
The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J.*
2000. **19**: 3325-3336.
89. **Haase,R., Kirschning,C.J., Sing,A., Schrottner,P., Fukase,K., Kusumoto,S.,
Wagner,H., Heesemann,J., and Ruckdeschel,K.,** A dominant role of Toll-like
receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages.
J.Immunol. 2003. **171**: 4294-4303.
90. **Ozinsky,A., Smith,K.D., Hume,D., and Underhill,D.M.,** Co-operative
induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J.Endotoxin.Res.*
2000. **6**: 393-396.
91. **Hengartner,M.O.,** The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000. **407**: 770-776.
92. **Barbolini,G., Bisetti,A., Colizzi,V., Damiani,G., Migaldi,M., and
Vismara,D.,** Immunohistologic analysis of mycobacterial antigens by
monoclonal antibodies in tuberculosis and mycobacteriosis. *Hum.Pathol.* 1989.
20: 1078-1083.
93. **Espitia,C., Cervera,I., Gonzalez,R., and Mancilla,R.,** A 38-kD
Mycobacterium tuberculosis antigen associated with infection. Its isolation and
serologic evaluation. *Clin.Exp.Immunol.* 1989. **77**: 373-377.
94. **Sutcliffe,I.C. and Russell,R.R.,** Lipoproteins of gram-positive bacteria.
J.Bacteriol. 1995. **177**: 1123-1128.

95. **Espitia,C., Elinos,M., Hernandez-Pando,R., and Mancilla,R.,** Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect.Immun.* 1992. **60**: 2998-3001.
96. **Torres,A., Juarez,M.D., Cervantes,R., and Espitia,C.,** Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microb.Pathog.* 2001. **30**: 289-297.
97. **Ciaramella,A., Cavone,A., Santucci,M.B., Garg,S.K., Sanarico,N., Bocchino,M., Galati,D., Martino,A., Auricchio,G., D'Orazio,M., Stewart,G.R., Neyrolles,O., Young,D.B., Colizzi,V., and 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. **190**: 1167-1176.
98. **Zhou,T., Mountz,J.D., and Kimberly,R.P.,** Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol.Res.* 2002. **26**: 323-336.
99. **McGeehan,G.M., Becherer,J.D., Bast,R.C., Jr., Boyer,C.M., Champion,B., Connolly,K.M., Conway,J.G., Furdon,P., Karp,S., Kidao,S., and .,** Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* 1994. **370**: 558-561.

100. **Kriegler,M., Perez,C., DeFay,K., Albert,I., and Lu,S.D.,** A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988. **53**: 45-53.
101. **Fotin-Mleczek,M., Henkler,F., Samel,D., Reichwein,M., Hausser,A., Parmryd,I., Scheurich,P., Schmid,J.A., and Wajant,H.,** Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J.Cell Sci.* 2002. **115**: 2757-2770.
102. **Vandenabeele,P., Goossens,V., Beyaert,R., Declercq,W., Grooten,J., Vanhaesebroeck,B., van de,C.M., Vercammen,D., Depuydt,B., Denecker,G., and .,** Functional requirement of the two TNF receptors for induction of apoptosis in PC60 cells and the role of mitochondria in TNF-induced cytotoxicity. *Circ.Shock* 1994. **44**: 196-200.
103. **Vandenabeele,P., Declercq,W., Vanhaesebroeck,B., Grooten,J., and Fiers,W.,** Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J.Immunol.* 1995. **154**: 2904-2913.
104. **Tartaglia,L.A., Pennica,D., and Goeddel,D.V.,** Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J.Biol.Chem.* 1993. **268**: 18542-18548.
105. **Grell,M., Douni,E., Wajant,H., Lohden,M., Clauss,M., Maxeiner,B., Georgopoulos,S., Lesslauer,W., Kollias,G., Pfizenmaier,K., and**

- Scheurich,P.**, The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995. **83**: 793-802.
106. **Qian,J., Chen,W., Lettau,M., Podda,G., Zornig,M., Kabelitz,D., and Janssen,O.**, Regulation of FasL expression: a SH3 domain containing protein family involved in the lysosomal association of FasL. *Cell Signal*. 2006. **18**: 1327-1337.
107. **Schneider,P., Holler,N., Bodmer,J.L., Hahne,M., Frei,K., Fontana,A., and Tschopp,J.**, Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J.Exp.Med*. 1998. **187**: 1205-1213.
108. **Bonfoco,E., Stuart,P.M., Brunner,T., Lin,T., Griffith,T.S., Gao,Y., Nakajima,H., Henkart,P.A., Ferguson,T.A., and Green,D.R.**, Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity*. 1998. **9**: 711-720.
109. **Badley,A.D., Dockrell,D., Simpson,M., Schut,R., Lynch,D.H., Leibson,P., and Paya,C.V.**, Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. *J.Exp.Med*. 1997. **185**: 55-64.
110. **Dockrell,D.H., Badley,A.D., Villacian,J.S., Heppelmann,C.J., Algeciras,A., Ziesmer,S., Yagita,H., Lynch,D.H., Roche,P.C., Leibson,P.J., and**

- Paya,C.V.**, The expression of Fas Ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection. *J.Clin.Invest* 1998. **101**: 2394-2405.
111. **Kuhnel,F., Zender,L., Paul,Y., Tietze,M.K., Trautwein,C., Manns,M., and Kubicka,S.**, NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J.Biol.Chem.* 2000. **275**: 6421-6427.
112. **Peng,Y., Gallagher,S.F., Haines,K., Baksh,K., and Murr,M.M.**, Nuclear factor-kappaB mediates Kupffer cell apoptosis through transcriptional activation of Fas/FasL. *J.Surg.Res.* 2006. **130**: 58-65.
113. **Placido,R., Mancino,G., Amendola,A., Mariani,F., Vendetti,S., Piacentini,M., Sanduzzi,A., Bocchino,M.L., Zembala,M., and Colizzi,V.**, Apoptosis of human monocytes/macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection. *J.Pathol.* 1997. **181**: 31-38.