



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Determinación del Efecto Inductor de Muerte Celular por Proteínas de
Mycobacterium tuberculosis en Macrófagos Murinos de la Línea Celular J774 y en
Macrófagos bovinos.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JUAN RAMÓN TORRES RÍOS

Tutor: José Ángel Gutiérrez Pabello
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Comité Tutorial: Angel Adrian Cataldi
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Arg.
Julio Moran Andrade
Instituto de Fisiología Celular UNAM



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.

A mis padres Juan Ramón Torres Colín y Avecita Ríos Guerra, por su esfuerzo, por su apoyo incondicional; gracias por todas esas palabras de aliento y esos pequeños empujones en mi vida ya que sin ellos nunca hubiera podido llegar hasta donde hoy estoy.

A mis hermanos Diana y Carlos por sus consejos y palabras de ánimo, porque como familia siempre han estado ahí para apoyarme siendo en algunos casos un ejemplo para mí.

A ti Yuliett, que hoy formas parte de mi vida y que me has acompañado en este proceso apoyándome y dándome ánimos para salir adelante, gracias por este grandioso regalo que ha sido tu amor.

Agradecimientos.

Agradezco a CONACYT por el financiamiento otorgado mediante el proyecto “Usos de microarreglos genómicos en la identificación de patrones de expresión génica asociados a la resistencia natural del ganado a patógenos intracelulares de origen bacteriano” (CB-2005-24794-48878-Z) sin el cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo. De igual forma se agradece el financiamiento del proyecto “Uso de un cóctel proteico (ESAT-6 y CFP10) en el diagnóstico de la tuberculosis bovina” IN214009.

A mis asesores Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por abrirme las puertas a su grupo de trabajo y darme la oportunidad de adquirir conocimientos y experiencia invaluable para un mejor desempeño en mi vida profesional; a los doctores Angel Adrian Cataldi y Julio Moran Andrade por su orientación y todas las atenciones que me proporcionaron al permitirme trabajar en sus diferentes instalaciones ya que sin su apoyo buena parte de este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Virginia Meikle por todo su apoyo y amistad durante mi estancia en las instalaciones del INTA en Buenos Aires Argentina. A la M. en C. Cristina Parada Colín por el diseño y la facilitación de las proteínas utilizadas en la realización de este trabajo. A la Biol. Patricia Espinoza Cuetos por orientarme y facilitarme el uso del equipo de citometría de flujo, así como por su ayuda en el análisis de los datos obtenidos.

A mis compañeros y amigos en el laboratorio de Brucella y Tuberculosis: Dra. Irasema Yela Miranda, Pablo Pedro Vera Sánchez alias “Pablito”, Yanela Villareal Morales, Ariel Deliler Sanchez López y Omar Aliaga Palomares; porque sin ellos esta pequeña aventura en el camino de mi vida hubiera sido solitaria y aburrida.

Resumen

La muerte celular es un proceso muy importante en el desarrollo y conservación de los organismos multicelulares, ya que juega un papel esencial en todos los seres vivos permitiendo mantener la regulación homeostática de las células. Inmunológicamente los procesos de muerte celular como el de apoptosis han sido asociados con el control y eliminación de infecciones virales, bacterianas y de algunos protozoarios; en el caso de especies del género *Mycobacterium*, especialmente en cepas atenuadas o avirulentas se ha observado que la apoptosis favorece un mejor control de la infección debido a que reduce su sobrevivencia conteniéndolas y limitando su crecimiento, además de estimular una mayor respuesta de células T CD8 específicas. En este trabajo se analizaron cuatro proteínas micobacterianas APA, ESAT-6, Lpr6 (P27) y PE_PGRS-33; así como los dominios PE y PGRS de la proteína PE_PGRS-33 para conocer su capacidad como inductores de muerte celular por apoptosis. Los resultados indican que las proteínas APA, ESAT-6, Lpr6 (P-27), PE_PGRS-33 y el dominio PE, no inducen apoptosis de manera significativa ($p > 0.05$) con respecto al control (19.8, 14.8, 16.7, 13.4 y 14.8% respectivamente) sin embargo en el caso del dominio PGRS se observa un 40% de apoptosis lo que resulta significativo con respecto al control ($p < 0.05$). Para conocer si la apoptosis observada era detonada por una vía dependiente de caspasas se analizó la actividad de la caspa 3 mediante un ensayo de fluorescencia los resultados de este experimento indican que no se presenta actividad de esta caspasa a las 16 horas post inducción con las diferentes proteínas.

Palabras claves: muerte celular, apoptosis, caspasas, proteínas micobacterianas.

Summary.

Cell death is a very important process in the development and maintenance of multicellular organisms because it plays an essential role in all living creatures maintaining the homeostatic regulation of cells and tissues. Apoptotic cell death in immune processes has been associated with the control and elimination of virus, bacteria and protozoa. In the case of species of the genus *Mycobacterium*, especially in attenuated or avirulent strains it has been shown that apoptosis helps to control infection because it reduces bacterial survival, holding them and limiting their growth, in addition it stimulates a greater response of specific CD8 T cells. In this work we analyzed the ability of four mycobacterial proteins APA, ESAT-6, Lpr6 (P27), PE_PGRS-33) and the PE and PGRS domains of the latter, to induce cell death by apoptosis. Results indicated that APA, ESAT-6, P-27, PE_PGRS-33 and the region PE_GST, did not induce apoptosis significantly ($p > 0.05$) compared to control (19.8, 14.8, 16.7, 13.4 and 14.8% respectively) but in the case of the PGRS domain of the PE_PGRS-33 protein 40% of the cells underwent apoptotic cell death having a statistical significance compared to control ($p < 0.05$). In order to demonstrate the role of caspases in apoptosis induction by the mycobacterial proteins, caspase 3 activity was assessed by a fluorescence assay, results of this experiment indicate that caspase 3 was not activated at 16 hours after induction with the bacterial proteins.

Keywords: cell death, apoptosis, caspases, mycobacterial proteins.

Índice

<i>Resumen</i>	II
Summary.....	IV
I. <i>Introducción</i>	- 1 -
1.1. <i>Datos Históricos</i>	- 1 -
1.2. <i>Patogénesis de la tuberculosis</i>	- 3 -
1.3 <i>Mecanismos de interacción patógeno-hospedador</i>	- 4 -
1.4. <i>Muerte celular: Apoptosis</i>	- 5 -
1.5. <i>Apoptosis como un mecanismo de control micobacteriano y Estrategias de evasión de la apoptosis que favorecen la sobrevivencia del patógeno</i>	- 11 -
1.6. <i>Proteínas micobacterianas implicadas en la apoptosis</i>	- 13 -
II. <i>Justificación</i>	- 15 -
III. <i>Objetivos</i>	- 16 -
3.1. <i>Objetivo general</i>	- 16 -
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	- 16 -
IV. <i>Hipótesis</i>	- 17 -
V. <i>Materiales y Métodos</i>	- 18 -
5.1. <i>Aislamiento y cultivo de macrófagos derivados de monocitos Bovinos y cultivo de macrófagos murinos de la línea celular J774</i>	- 18 -
5.2. <i>Proteínas Micobacterianas</i>	- 19 -
5.3. <i>Inducción de apoptosis y Determinación de la fragmentación del DNA</i>	- 20 -
5.4. <i>Determinación de la actividad de Caspasa 3</i>	- 20 -
5.5. <i>Análisis estadístico</i>	- 21 -
VI. <i>Resultados</i>	- 22 -

<i>6.1. Inducción de la fragmentación del DNA por seis proteínas micobacterianas, en macrófagos murinos de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos obtenidos a partir de sangre periférica.....</i>	<i>- 22 -</i>
<i>6.2. Determinación de la actividad de caspasa 3 en macrófagos murinos de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos, tratados con seis proteínas de origen micobacteriano.</i>	<i>- 25 -</i>
<i>VII. Discusión.....</i>	<i>- 27 -</i>
<i>VIII. Conclusión.....</i>	<i>- 32 -</i>
<i>IX. Referencias.....</i>	<i>- 33 -</i>

Lista de figuras

- Fig. 1: Representación esquemática de las señales detonadas en la vía extrínseca e intrínseca de la Apoptosis (Tomado de Duprez L. *et al.*, 2009)..... - 10 -
- Fig. 2: Clasificación de las proteínas de la Familia Bcl-2 de acuerdo al número de dominios homólogos a Bcl-2 que poseen. - 11 -
- Fig. 3: Inducción de la Fragmentación del DNA en macrófagos murinos J774 por cuatro proteínas de origen micobacteriano y dos regiones constitutivas de una de ellas. 16 hrs post tratamiento con 10 µg de proteína o 25 µg de camptotecina (control +) las células fueron marcadas mediante la técnica de túnel y analizadas por citometria de flujo para determinar el porcentaje de células apoptóticas. Los datos que se muestran son el resultado de cuatro experimentos independientes. * Indica un valor significativo de $p < 0.05$ - 23 -
- Fig. 4: Inducción de la Fragmentación del DNA en macrófagos bovinos obtenidos a partir de sangre periférica y expuestos a 4 proteínas de origen micobacteriano y a la región PGRS-33 de una de ellas. Después de 16 hrs post tratamiento con 10 µg de proteína o 25 µg de camptotecina (control +) las células fueron marcadas mediante la técnica de túnel y analizadas por citometria de flujo para determinar el porcentaje de células apoptóticas. Los datos que se muestran son resultado de un único experimento realizado..... - 24 -
- Fig. 5: Actividad de caspasa 3 en macrófagos murinos J774 inducida por cuatro proteínas de origen micobacteriano y dos regiones constitutivas de una de ellas. Después de 16 hrs post tratamiento con 10 µg de proteína o 25 µg de camptotecina (control +) las células fueron lisadas y se agrego un sustrato fluorogenico especifico de caspasa 3 la cantidad de fluorescencia emitida se determino en un rango de 380/430-460nm por 30 min utilizando un lector de micro placas de detección múltiple Synergy HT BioTek. Los datos que se muestran son el resultado de cuatro experimentos independientes. - 26 -

Fig. 6: Actividad de caspasa 3 en macrófagos bovinos inducida por 4 proteínas de origen micobacteriano y a la región PGRS-33 de una de ellas. Después de 16 hrs post tratamiento con 10 µg de proteína o 25 µg de camptotecina (control +) las células fueron lisadas y se agregó un sustrato fluorogénico específico de caspasa 3 la cantidad de fluorescencia emitida se determinó en un rango de 380/430-460nm por 30 min utilizando un lector de micro placas de detección múltiple Synergy HT BioTek. Los datos que se muestran son resultado de un único experimento realizado. - 26 -

I. Introducción.

La tuberculosis bovina es considerada como una enfermedad infecciosa, crónico-progresiva, la cual se caracteriza por la formación típica de lesiones granulomatosas con un grado variable de necrosis, calcificación y encapsulamiento (Michel *et al.*, 2010; OIE. 2004; SAGARPA). El interés principal en esta enfermedad gira alrededor de las enormes pérdidas económicas que genera en la industria ganadera de todo el mundo; además del potencial riesgo que representa para la salud humana (Meikle V. *et al.*, 2009; Pollock J.M. *et al.*, 2006). Existen reportes los cuales indican que en países como el Reino Unido anualmente esta enfermedad genera pérdidas hasta por tres billones de dólares e infecta hasta 50 millones de cabezas de ganado; mientras que en Norte y Sur América se estiman alrededor de 420 millones de cabezas de ganado infectadas por año (Meikle *et al.*, 2009). En cuanto al riesgo que representa en la salud humana algunos datos indican que en países industrializados entre el 0.5 al 7.2% de los casos de tuberculosis humana son ocasionados por *M. bovis*, llegándose a incrementar a nivel mundial hasta alcanzar del 10 al 15% de la población infectada, principalmente en regiones con una alta incidencia de la enfermedad.

1.1. Datos Históricos.

Históricamente la tuberculosis es una enfermedad que ha acompañado al hombre desde hace mucho tiempo, tan atrás como tres millones de años cuando el primer progenitor de *M. tuberculosis* fue probablemente contemporáneo y coevolucionó con los primeros homínidos en el este de África (Palomino *et al.*, 2007). Momias y esqueletos encontrados en excavaciones de Egipto, India y China han permitido

documentar casos de tuberculosis con una antigüedad de hasta 5000 años; mientras que en Grecia alrededor del año 460 a de c. Hipócrates ya hacía una clara descripción de muchos de los síntomas y lesiones derivados de esta enfermedad (Donoghue, 2011; Jordao y Viera, 2011). De acuerdo con Michel y colaboradores (2010), la tuberculosis bovina como la conocemos hoy día, pudo haber emergido en Europa y desde ahí distribuirse a todo el mundo durante el periodo colonial mediante la exportación de ganado infectado desde Reino Unido y los Países Bajos a sus respectivas colonias; sin embargo también menciona que esta teoría debe de ser tomada con reserva, ya que la relación evolutiva existente entre las diferentes cepas europeas y algunas otras cepas de *M. bovis* que han sido secuenciadas no parece ser tan evidente.

En cuanto al agente etiológico causante de la tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, es un bacilo, no móvil de 1 a 4 µm de longitud; el cual se caracteriza por tener una pared celular formada por ceras de ácidos micólicos que lo protegen de la degradación dentro de los fagocitos y le proporcionan su característica de acido-alcohol resistente (Corner *et al.*, 2010). *M. bovis* es un miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* una familia de ecotipos de micobacterias estrechamente relacionadas y en el cual cada uno de ellos se encuentra adaptado para causar la enfermedad en una especie o en un grupo de hospedadores específico, aunque entre ellos existe la posibilidad de transmisión inter-especie (Hewinson *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2010). Inicialmente se sugirió que una *M. bovis* ancestral dio origen a las cepas causantes de la tuberculosis en el ser humano, sin embargo, análisis de las regiones de variación en el genoma de diferentes cepas de micobacterias aisladas en humanos y animales han demostrado lo contrario, que *M. bovis* desciende de un *Mycobacterium tuberculosis* ancestral del cual divergió aproximadamente hace 15 000 - 20 000 años (Donoghue, 2011; Hewinson *et al.*, 2006).

1.2. Patogénesis de la tuberculosis.

Debido a que la tuberculosis es principalmente una infección del sistema respiratorio los cambios patológicos más importantes ocurren en los pulmones y nódulos linfáticos asociados. En el ganado bovino la exposición a aerosoles que contienen la *M. bovis* es considerada como la ruta más frecuente de infección, sin embargo el contacto por ingestión de alimentos o agua contaminada con este patógeno puede llevar al desarrollo de la infección en el tejido linfático asociado al tracto intestinal. Los macrófagos alveolares y células epiteliales que se encuentran en el tracto respiratorio son las primeras células que entran en contacto con la bacteria, lo que induce una respuesta de tipo inflamatoria, en la cual las citosinas y quimiocinas que son liberadas generan la acumulación de una variedad de células inmunes que con el tiempo, forman un granuloma caracterizado por un número pequeño de fagocitos infectados, rodeado por macrófagos y monocitos activados los cuales a su vez también se encuentran rodeados por linfocitos activos. Si en este punto la infección es contenida adecuadamente el granuloma puede contraerse y eventualmente desaparecer dejando una pequeña cicatriz o calcificación, pero por el contrario si la respuesta inmune no controla la replicación bacteriana el granuloma incrementa en tamaño y celularidad generando eventualmente muerte celular y necrosis del tejido (Dietrich and Doherty, 2009).

Las infecciones experimentales con *M. bovis* han demostrado que los principales subtipos de células T (células T $\gamma\delta$, CD4 y CD8) están involucrados en el progreso de la infección. En el ganado infectado de forma experimental se ha observado que las células T CD4 de memoria son la población dominante productora de IFN-

γ, sin embargo las células T CD8 también son consideradas como importantes para producir IFN-γ. Además las células T CD4 contribuyen inhibiendo el crecimiento intracelular del bacilo mientras que las células T CD8 lisan a los macrófagos infectados con micobacterias. En este modelo se ha visto también que células Tγδ participan en los estadios tempranos de la infección y en el inicio de la formación de lesiones, aunque también juegan un rol importante en la contención bacteriana mediante la producción de IFN-γ. Por último y seguido al inicio de la respuesta inmune celular el desarrollo de una respuesta humoral puede también estar involucrada en la respuesta inmune en contra de este patógeno (Pollock *et al.*, 2006).

1.3 Mecanismos de interacción patógeno-hospedador.

Una de las características más importantes de la micobacteria y que es considerada el principal factor de su éxito como patógeno es la capacidad de sobrevivir dentro de las células del hospedador, especialmente células inmunes como macrófagos y monocitos. La forma en que han logrado conseguir esto es mediante la interferencia de los procesos de activación y fagocitosis de estas células en prácticamente todas sus etapas, esta interacción se considera que inicia inmediatamente después de ocurrido el contacto entre la bacteria y los receptores celulares; principalmente aquellos que juegan un papel crucial en estos procesos como pueden ser los receptores Fc, receptores del complemento, de manosa, de proteínas surfactantes, así como los receptores CD14 y CD43. Es importante mencionar que la respuesta del macrófago depende del tipo de receptor con el que la micobacteria este interactuando, por ejemplo se sabe que la presencia de manosa en moléculas de la superficie de micobacterias patógenas inhibe la fagocitosis por activación del macrófago lo que tiene como resultado una célula más susceptible a la infección. El lipoarabinomanano (LAM) uno de los

principales componentes de la pared celular de muchas micobacterias patógenas tiene la capacidad de unirse al receptor DC-SIGN presente en la superficie de las células dendríticas (DC), esta molécula es crucial para la maduración de las DC y la unión de LAM inhibe este proceso además de que decrece la producción de IL-12 e induce la producción de IL-10, lo cual suprime la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y la expresión de receptores coestimulatorios. Sumado a esto la pared celular de las micobacterias contiene muchos ácidos grasos de cadena corta que estimulan de manera importante la respuesta inflamatoria del hospedador, induciendo la formación del granuloma mediante la sobre regulación de la presentación de antígenos y la subsecuente respuesta de células T y NK. Entre algunos otros factores que también pueden regular la respuesta del hospedador hacia la micobacteria se encuentra la lipoproteína de 19 kDa la cual interactúa con las células presentadoras de antígenos vía TLR1/2 causando una inhibición en la producción de citosinas y reducción en el procesamiento de antígenos así como en la expresión del MHC-II. La proteína ESAT 6 también tiene un efecto similar al de la proteína de 19 kDa, opera a través de TLR 2 y se cree que puede inducir altos niveles de IL-4 e IL-13 (Dietrich and Doherty, 2009; Ernst, 1998; Hernandez-Pando *et al.*, 2009).

1.4. Muerte celular: Apoptosis.

La muerte celular es un proceso muy importante en el desarrollo y conservación de los organismos multicelulares, ya que juega un rol esencial en todos los seres vivos permitiendo mantener la regulación homeostática de las células, participando en el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune; además de que tienen un rol activo durante la fase de desarrollo embrionario (Krzyszowska *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2007). Los procesos de muerte celular son clasificados de acuerdo a diferentes criterios, entre estos se pueden mencionar la apariencia

morfológica, criterios enzimológicos, aspectos funcionales o características inmunológicas (Krysko *et al.*, 2011; Duprez *et al.*, 2009; Kroemer *et al.*, 2009).

La apoptosis es considerada como uno de los dos principales tipos de muerte celular, fue descrita por primera vez en 1972 por Jhon Kerr, Andrew Wyllie y Alastair Currie's, entre los cambios morfológicos que la caracterizan se pueden mencionar un redondeo de la célula, retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular, condensación de cromatina, fragmentación nuclear, poca o ninguna modificación ultra estructural de los organelos citoplasmáticos, un "burbujeo" de la membrana plasmática y finalmente el engullimiento de las células apoptóticas por fagocitos residentes (Duprez *et al.*, 2009; Kroemer *et al.*, 2008; Kroemer *et al.*, 2009). Durante la activación del proceso apoptótico dos familias de proteínas evolutivamente conservadas se encuentran involucradas en su regulación: las cistein proteasas específicas a aspartato o caspasas, que se encargan de mediar la fase de ejecución de la apoptosis y las proteínas Bcl-2 las cuales se encargan del control de la integridad mitocondrial en la célula (Krysko *et al.*, 2011).

Las caspasas son una familia de cistein proteasas que son altamente conservadas en organismos multicelulares, en los cuales funcionan como reguladores centrales de la muerte celular (Kuranaga, 2011). Son sintetizadas como zimogenos inactivos en los cuales su dimerización es crucial para estabilizar la conformación de su sitio activo, estructuralmente contienen un prodominio, una sub unidad larga denominada p20 y una sub unidad corta la cual se denomina como p10; para su activación se requiere de la escisión en una secuencia de residuos de aspartato en específico, lo que resulta en la separación de las sub unidades y la remoción del prodominio (Huai *et al.*, 2010; Kitazumi *et al.*, 2011; Shrader *et al.*, 2010).

Una forma en que pueden ser clasificadas las caspasas es como caspasas iniciadoras y caspasas ejecutoras (Duprez *et al.*, 2009; Li and Yuan, 2008). Las primeras se caracterizan por poseer un prodominio amino terminal largo

[denominado DED (dominio efector de muerte) en el caso de caspasa 8 y CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) en el caso caspasa 9] cuya función es la de regular la formación de complejos de proteínas que proveen la plataforma molecular para la activación e inhibición de otras caspasas. A diferencia de las caspasas iniciadoras, las caspasas ejecutoras no poseen prodominios largos, existen como dímeros y únicamente requieren de una escisión proteolítica por una caspasa iniciadora para remover un “loop” inhibitor que cubre su sitio activo, lo que le permite actuar sobre diversos sustratos específicos escindiéndolos y ocasionando así la aparición de las típicas características morfológicas de un proceso apoptótico: “Burbujeo” de la membrana, núcleo picnótico, redondeo celular y formación de cuerpos apoptóticos (Schrader *et al.*, 2010).

En células de mamíferos, las caspasa pueden ser activadas por una de dos vías de la apoptosis la vía extrínseca o la vía intrínseca.

La *vía extrínseca* es mediada por un sub grupo de receptores pertenecientes a la súper familia del Factor de Necrosis Tumoral, los cuales son conocidos como receptores de muerte (DRs); entre estos se incluyen el TNFR, Fas y TRAIL. En forma general la estimulación de estos receptores inicia con el reclutamiento y activación de las caspasas iniciadoras 8 y 10, las cuales a su vez inducen la actividad de la caspasa efectora 3 cuya función principal radica en la escisión de un número de sustratos que causan las ya bien conocidas características de una célula apoptótica (Portt *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2009) Fig. 1.

Los DRs son una familia de proteínas transmembranales de tipo I caracterizado por la presencia de múltiples repetidos ricos en cisteínas en el dominio extracelular y un modulo de interacción proteína-proteína constituido por 80 amino ácidos conocido como el dominio de muerte (DD) en el tallo citoplasmático. Funcionalmente estos receptores actúan como sensores de superficie celular los cuales detectan señales de daño extracelular por unión con su ligando; al

interactuar con su respectivo ligando los DRs inducen una multimerización que forma los complejos de señalización inductores de muerte (DISC) los cuales incluyen múltiples moléculas adaptadoras como FADD, TRADD y RIP (Li and Yuan, 2008; Wilson *et al.*, 2009). En el caso de la vía extrínseca los ejemplos mejor caracterizados que describe los eventos que conducen a la muerte celular por apoptosis son el de Fas y su ligando (FasL), así como el de TNFR1 y su ligando TNF- α (Elmore, 2007). Para los receptores de FasL y TRAIL; FADD es reclutado en el DISC a través de su DD ubicado en la región carboxilo terminal (C-terminal), la cual a su vez interactúa mediante su dominio efector de muerte en la región amino terminal (N-terminal) con el dominio efector de muerte de la caspasa 8. El reclutamiento y oligomerización de la caspasa 8 en el DISC resulta en su activación auto catalítica lo cual es crítico para la iniciación de la muerte celular (Li and Yuan, 2008; Wilson *et al.*, 2009).

En el otro caso la interacción de TNF- α con TNFR1 ocasiona la formación de distintos complejos de señalización: El complejo I que está formado por las moléculas adaptadoras TRADD, RIP1, TRAF2 y las cIAPs 1 y 2; cuya función principal es la de promover la sobrevivencia celular mediante la activación de las vías de señalización del factor nuclear- κ B (NF- κ B), JNK y MAPK p38; las cuales son capaces de regular la respuesta inflamatoria y la inducción de la expresión de proteínas anti apoptóticas como las FLIPs. Sumado al complejo I la unión de TRADD con su ligando también puede mediar la formación de dos complejos citoplasmáticos el IIA y el IIB, cuya formación detonan señales pro-apoptóticas. El complejo IIA se forma a partir de la disociación de RIP1 y TRAF2 de TRADD lo que permite a este último reclutar a la caspasa 8 a través de FADD formando a si un nuevo complejo; por su parte el complejo IIB se forma mediante la unión de RIP 1 con FADD lo que activa la caspasa 8 (Li and Yuan, 2008; Wilson *et al.*, 2009).

Por otro lado la *vía intrínseca* o autónoma se centra y/o está regulada por la mitocondria, entre los factores que detonan esta vía se pueden mencionar el daño o el estrés intracelular causado por la exposición a agentes citotóxicos, radiación,

restricción de nutrientes o por estrés oxidativo; esto resulta en la traslocación de miembros pro-apopticos de la familia de proteínas Bcl2 a la mitocondria, los cuales a través de su homo-oligomerización forman poros en la membrana externa de la mitocondria lo que promueve su permeabilización (MOMP) y la liberación al citosol de factores pro-apopticos provenientes del espacio inter-membranal de la mitocondria (IMS) (Fig.1). Entre los principales factores que son liberados del IMS se encuentran el citocromo *c*, cuya asociación induce la actividad de APAF1, lo que resulta en la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9, a su vez esta caspasa iniciadora detona la actividad de la caspasa ejecutora 3 ocasionando una respuesta similar a la observada en la vía extrínseca. Otros factores pro-apopticos que también son liberados del IMS incluyen a SMAC/DIABLO, OMI/HTRA2, endonucleasa G (EndoG) y el factor de inducción de apoptosis (AIF) (Ghavami *et al.*, 2009; Shawn *et al.*, 2010; Tait and Green, 2010).

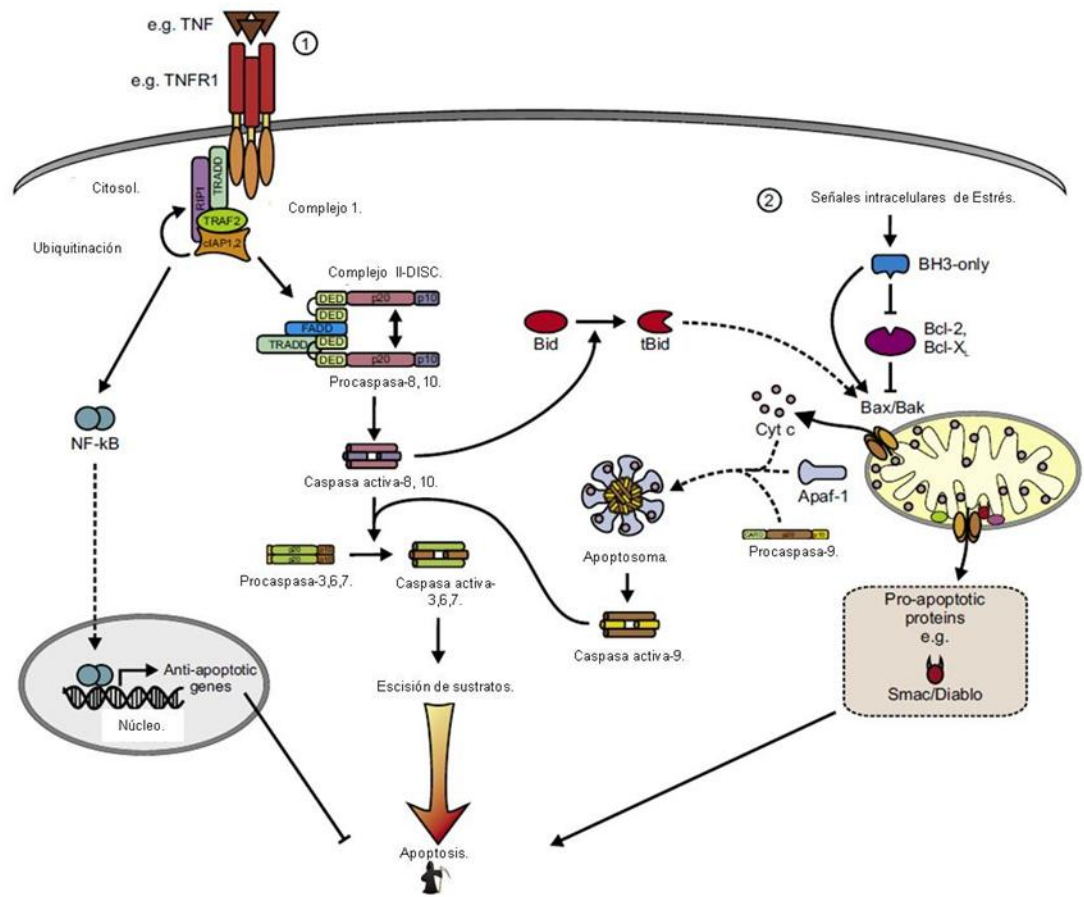


Fig. 1: Representación esquemática de las señales detonadas en la vía extrínseca e intrínseca de la Apoptosis (Tomado de Duprez L. *et al.*, 2009).

Por su parte la familia de proteínas Bcl-2 en base a su capacidad pro apoptótica o anti apoptótica y por el número de dominios homólogos a Bcl-2 (BH) que poseen, se encuentra sub dividida en tres grupos (Fig.2): a) Proteínas anti apoptóticas asociadas a Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 A1/Bfl-1) las cuales actúan previniendo la activación y homo-oligomerización de las proteínas pro apoptóticas Bax y Bak; b) Proteínas pro apoptóticas asociadas a Bax (Bax, Bak, Bok/Mtd) cuya activación y homo-oligomerización genera la formación de poros en la membrana mitocondrial externa a través de los cuales escapan moléculas pro apoptóticas, incluyendo activadores secundarios de las caspasas derivados de la

mitocondria; y c) Proteínas pro apoptóticas con un dominio único BH3 (Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nbk, Blk, Noxa, Puma/Bbc3, Hrk/DP5), estas proteínas se encargan de integrar y transmitir las señales de muerte que emanan de procesos celulares deficientes a otros miembros de la familia Bcl-2, interactuando con proteínas anti apoptóticas para inhibir su función y/o interactuando directamente con proteínas multidominio como Bax y Bak para estimular su actividad.

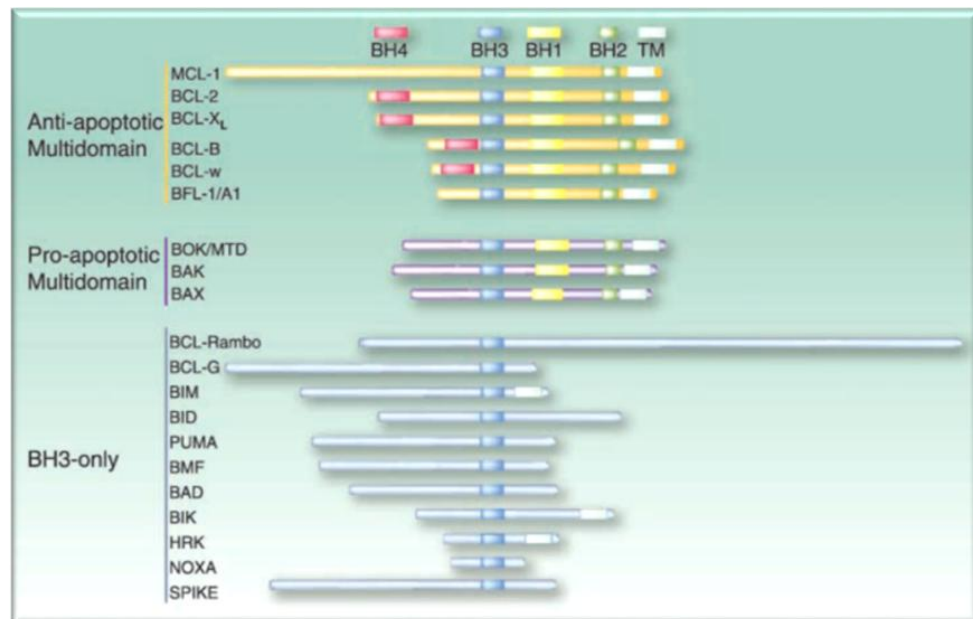


Fig. 2: Clasificación de las proteínas de la Familia Bcl-2 de acuerdo al número de dominios homólogos a Bcl-2 que poseen (Danial N.N. 2007).

1.5. Apoptosis como un mecanismo de control micobacteriano y Estrategias de evasión de la apoptosis que favorecen la sobrevivencia del patógeno.

La apoptosis como un mecanismo para controlar infecciones con patógenos intracelulares es un aspecto de la respuesta inmune innata que se considera ampliamente conservado en animales y plantas (Briken V. y Miller J.L. 2008).

Inmunológicamente los procesos de muerte celular como el de apoptosis han sido asociados con el control y eliminación de infecciones virales, bacterianas y de algunos protozoarios; debido a que permite remover el nicho celular en el cual estos patógenos residen, además de que favorecen un aumento en la respuesta inmune adaptativa mediante la activación de células detríticas y la subsecuente presentación de antígenos; de igual forma incrementa la actividad microbicida de macrófagos y células detríticas debido al engullimiento de los cuerpos apoptóticos que se forman durante este proceso (Kelly *et al.*, 2008; Jordao and Vieira, 2011; Spira *et al.*, 2003).

En el caso de especies del genero *Mycobacterium*, especialmente en cepas atenuadas o avirulentas como son *M. bovis BCG*, *M. avium* o *M. tuberculosis H37Ra* se ha observado que la apoptosis favorece un mejor control de la infección debido a que reduce su sobrevivencia conteniéndolas y limitando su crecimiento, también se ha observado que estimula una mayor respuesta de células T CD8 específicas (Krzyzowska *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2006). Sin embargo también ha sido observado que cepas virulentas de *M. tuberculosis* disminuyen o inhiben la cantidad de apoptosis presente en macrófagos infectados en comparación con las cepas avirulentas o atenuadas, aunque los mecanismos por los cuales logran regular este proceso no han sido completamente comprendidos se sabe que entre ellos podrían estar involucrados genes que inhiben activamente la apoptosis en las células del hospedador interviniendo las diferentes señales de activación de este proceso (Briken and Miller, 2008). Un ejemplo de esto es el gen *nuoG* que codifica una sub unidad de la deshidrogenasa NADH tipo I (NDH-I) en *M. tuberculosis*, se ha observado que la deleción de este gen causa una elevación de los niveles de ROS y de apoptosis seguidos a la infección de macrófagos primarios. De igual forma la deleción del gen *Sec A2* el cual es requerido para la secreción de la dismutasa superoxido A, lo que resulta en el aumento de la producción de ROS, apoptosis y la pérdida de la virulencia. Otra proteína que ha sido involucrada en la inhibición de la apoptosis en las células del hospedador es la Proteína cinasa E

(PknE) una serin-treonin-cinasa cuya delección vuelve más susceptibles a estas bacterias a la exposición del óxido nítrico (Behar *et al.*, 2011; Briken and Miller, 2008).

Además de la participación de estos genes se sabe que micobacterias virulentas son capaces de regular la apoptosis de macrófagos infectados mediante la inhibición de las dos principales vías apoptóticas, en el caso de la vía extrínseca lo consiguen mediante la regulación de proteínas pro y anti apoptóticas, este fenómeno ha sido asociado con la sobre regulación de los genes anti apoptóticos *mcl-1* y *A-1* ambos encargados de codificar proteínas vinculadas a la familia Bcl-2 residentes en la mitocondria. Por otro lado se ha observado que *M. tuberculosis* puede inhibir la vía extrínseca mediante la modificación en la expresión de receptores de muerte como Fas (CD95) y el receptor soluble 2 de TNF (sTNFR2) (Behar *et al.*, 2011; Briken and Miller, 2008).

1.6. Proteínas micobacterianas implicadas en la apoptosis

Poco se conoce acerca de las proteínas micobacterianas que pudieran estar involucradas en los diferentes procesos de inhibición e inducción de apoptosis, la mayor parte de los estudios se han enfocado en la caracterización de antígenos que presenten una elevada inmunoreactividad con el objeto de utilizarlos para el mejoramiento de los métodos diagnósticos o en el diseño de nuevas vacunas contra la tuberculosis, entre las pocas proteínas que han podido ser asociadas con la inducción de una respuesta apoptótica en distintas líneas celulares se pueden mencionar la lipoproteína de 38-kDa o PstS-1 de *M. tuberculosis*, la cual en concentraciones entre 0.05 a 50µg es capaz de incrementar la apoptosis observada en macrófagos derivados de monocitos humanos en comparación con proteínas obtenidas a partir de *M. smegmatis* (Sanchez *et al.*, 2008) por otro lado la lipoproteína de 19-kDa LpqH y la proteína PE_PGRS33 se ha reportado que

también son capaces de inducir apoptosis en macrófagos vía la estimulación de receptores TLR2 y posterior activación de una vía dependiente de caspasas (Basu S. *et al.*, 2007) así mismo otras proteínas que también parecen inducir apoptosis en macrófagos son ESAT-6 y la proteína MPT64 (Mustafa *et al.*, 2007; Vega-Manriquez *et al.*, 2008).

En el caso de *M. bovis* se ha observado que tanto el extracto celular como la bacteria viva inducen fragmentación del DNA en macrófagos bovinos y que esta fragmentación es independiente de la participación de caspasas, además mediante el uso de técnicas de inmuno-histoquímica se ha logrado detectar una traslocación del factor de inducción de apoptosis (AIF) al núcleo celular lo que sugiere que esta muerte por apoptosis en macrófagos bovinos podría estar siendo regulada por una vía independiente a las caspasas (Vega-Manriquez *et al.*, 2007).

II. Justificación.

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular regulado genéticamente, que es esencial en muchos procesos biológicos normales incluyendo la regulación de la respuesta inmune. En este sentido se ha observado que durante infecciones micobacterianas la apoptosis está asociada con la eliminación del patógeno, lo que ha sugerido que provee un mecanismo de defensa en contra de estos agentes infecciosos; esto ha sido probado en diversos estudios *in vitro* en los cuales se observa que la activación de este proceso reduce la viabilidad bacteriana mediante la remoción de nichos celulares de los cuales el bacilo depende. Sin embargo y debido a que la mayor parte de los estudios realizados se han centrado en conocer cuales son los mecanismos celulares involucrados en la inducción de apoptosis y como es que regulan este proceso durante la respuesta inmune del hospedador, poco se conoce acerca de la forma en que los elementos constitutivos de las micobacterias están interactuando a nivel celular con el hospedador para inducir apoptosis.

En el caso de las proteínas micobacterianas, la mayor parte de ellas han sido estudiadas con el objeto de conocer su capacidad para modular la respuesta inmune como antígenos, con perspectivas a generar métodos de diagnóstico o vacunas contra la tuberculosis más eficientes. Pocos estudios han explorado la participación que tienen las distintas proteínas generadas por estos patógenos en los procesos de inducción o inhibición de apoptosis durante la respuesta inmune del hospedador, por lo que el estudio de estas proteínas y sus interacciones con las células del sistema inmune permitiría ampliar la comprensión de los distintos eventos ocurridos durante la patogenia de la tuberculosis.

III. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de las proteínas APA, ESAT-6, Lpr6 (P27) y PE_PGRS-33; así como los dominios PE y PGRS de la proteína PE_PGRS-33; de *Mycobacterium tuberculosis* en la inducción de la muerte celular en macrófagos murinos de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos obtenidos a partir de cultivo primario.

3.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar la capacidad de las proteínas recombinantes APA, ESAT-6, Lpr6 (P27) y PE_PGRS-33; así como los dominios PE y PGRS de *Mycobacterium tuberculosis* como inductores de fragmentación de DNA en macrófagos murinos de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos.
2. Determinar la capacidad de las proteínas recombinantes APA, ESAT-6, Lpr6 (P27) y PE_PGRS-33; así como los dominios PE y PGRS de *Mycobacterium tuberculosis* como activadores de la vía de las caspasas en macrófagos murinos de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos.

IV. Hipótesis.

Las diferentes proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* son capaces de inducir muerte celular por apoptosis en células murinas de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos, en forma independiente de la activación de las caspasas.

V. Materiales y Métodos.

5.1. Aislamiento y cultivo de macrófagos derivados de monocitos Bovinos y cultivo de macrófagos murinos de la línea celular J774.

Los macrófagos derivados de monócitos bovinos fueron obtenidos de sangre venosa periférica por medio de punción yugular, la cual provenía de ganado adulto sano de un hato libre de tuberculosis (no vacunado, expuesto o desafiado) alojado en el CEPIPSA de la Universidad Nacional Autónoma de México. La sangre se colectó en jeringas de 60ml las cuales contenían una solución de ACD a razón de 3.5 ml por cada 30 ml de sangre. Posteriormente esta sangre fue procesada en el laboratorio en un tiempo no mayor a cuatro horas a partir de su obtención, primero fue centrifugada a 1000 x g por 30 min, la capa flogística obtenida fue diluida 1:1 con una solución buffer de fosfatos más citrato (PBS-C), una vez hecho esto se colocó en proporción de 2:1 en un gradiente de Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB) con una densidad específica de 1.077 y se centrifugó nuevamente a 1200 x g por 30 min. Transcurrido este tiempo la interface de leucocitos libres de eritrocitos fue colectada y se realizaron tres lavados con 45 ml de una solución de PBS-C y plasma (30 y 15 ml respectivamente) con un periodo de centrifugación de 15 min a 500 x g entre un lavado y otro. Finalmente el pellet celular recuperado se re-suspendió en medio RPMI-1640 (Gibco) que contenía 4% de suero autólogo para facilitar la adherencia de los monocitos al fondo del matraz, se incubaron por 18 hrs a 37°C con atmosfera húmeda y 5 % de CO₂; transcurrido este tiempo el fondo del matraz fue lavado con medio RPMI-1640 removiendo completamente las células no adheridas y las células se mantuvieron por 12 días en RPMI-1640 suplementado con 12% de suero autólogo en las condiciones ya descritas, tiempo en el cual se diferenciaron hacia macrófagos, se realizaron lavados periódicos

(cada tres días) con RPMI-1640 lo que permitió la purificación de los macrófagos de otras células.

Los macrófagos murinos fueron crecidos en cajas para cultivo celular de 75 cm. en medio Advanced-DMEM (Gibco), una vez alcanzado el crecimiento máximo posible en la caja, a las células se les retiro el medio y fueron lavadas con 15 ml de una solución de PBS-C, posteriormente se colocaron en hielo por 10 min. y fueron despegadas mediante el uso de un descamador celular, hecho esto las células se centrifugaron a 500 x g por 10 min. después fueron resuspendidas en 5 ml de medio y contadas mediante una tinción con azul de tripan. Finalmente las células se colocaron en placas para cultivo celular de seis y veinticuatro pozos a razón de 1×10^6 y 25×10^4 células por pozo respectivamente, y se incubaron durante seis horas a 37°C con atmosfera húmeda y 5 % de CO₂ para posteriormente ser utilizadas.

5.2. Proteínas Micobacterianas

Las proteínas estudiadas fueron donadas por la Dra. Clara Espitia Pinzon del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México; estas proteínas fueron producidas de manera recombinante en la bacteria *E. coli*, y su purificación se realizo por medio de cromatografía de afinidad a niquel. En el caso del dominio PE de la proteína PE_PGRS-33 su expresión fue realizada en una proteína de fusión a glutatión S transferasa o GST.

5.3. Inducción de apoptosis y Determinación de la fragmentación del DNA.

Para la inducción de apoptosis, las células J774 y los macrófagos bovinos fueron sembrados en placas para cultivo celular de seis pozos a razón de 1×10^6 en las condiciones ya mencionadas. Trascurrido un periodo de estabilización del cultivo de seis y veinticuatro horas respectivamente, las células fueron tratadas con cada una de las diferentes proteínas a una concentración de $10 \mu\text{g/ml}$ e incubadas por 16 horas, el control positivo fue inducido con $25 \mu\text{g/ml}$ de camptotecina (Sigma Aldrich) e incubado también por 16 hrs. Trascurrido este periodo de tiempo las células se lavaron con 1 ml de PBS-1x y se fijaron en hielo con una solución de para formaldehído al 2% durante 10 min. seguido de esto las células fueron nuevamente lavadas con 1 ml de PBS-1x y se permeabilizaron durante una noche utilizando una solución de etanol al 70% e incubando a -20°C , terminado el paso de permeabilización las células fueron lavadas de nueva cuenta con 1 ml de PBS-1x y se procedió a incubar con la mezcla de reacción de TUNEL (de acuerdo con las especificaciones de proveedor) durante 60 min a 37°C . Finalmente las células fueron analizadas por citometría de flujo para detectar la fragmentación del DNA inducida por los diferentes tratamientos.

5.4. Determinación de la actividad de Caspasa 3.

Para la determinación de la actividad de caspasa 3 las células tratadas con las diferentes proteínas por 16 hrs, fueron lavadas con 1 ml de PBS-1x, seguido a esto se les adicionó $100 \mu\text{l}$ de un buffer de lisis (10mM Tris-HCl, 10mM NaH_2PO_4 , 130mM NaCl y Triton x100 al 1%) y se incubaron en agitación por 15 min a 4°C , transcurrido el tiempo de incubación se separaron $10 \mu\text{l}$ de la muestra para determinar la concentración de proteína existente en ella y al resto se le agregaron $100 \mu\text{l}$ del buffer de ensayo (40 mM HEPES, 20% Glicerol, 1M DTT, 10mM Ac-

DEVD-AM) y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente; finalmente se determinó la fluorescencia que emitía la muestra en un rango 380/430-460nm por 30 min. utilizando un lector de micro placas de detección múltiple Synergy HT BioTek.

5.5. Análisis estadístico.

Con objeto de comparar el efecto de los diferente tratamientos en la inducción de la fragmentación del DNA y la actividad de caspasa 3, se utilizo un análisis de varianzas y una comparación de medias por el método de Tukey; lo que permitió determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes experimentos realizados, para esto se utilizo el programa estadístico GraphPad Prism 5.0

VI. Resultados.

6.1. Inducción de la fragmentación del DNA por seis proteínas micobacterianas, en macrófagos murinos de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos obtenidos a partir de sangre periférica.

Para conocer si las proteínas de origen micobacteriano APA, ESAT-6, P-27, PE_PGRS-33 y los dominios que constituyen esta última: PE y PGRS son capaces de inducir muerte celular por apoptosis en macrófagos de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos, las células fueron tratadas con 10µg/ml con cada una de estas proteínas e incubadas por 16 hrs a 37°C y 5 % de CO₂; posteriormente se analizó el grado de fragmentación del DNA presente en cada uno de los tratamientos mediante un ensayo de TUNEL.

En el caso de macrófagos de la línea celular J774 los resultados indican que las proteínas APA, ESAT-6, P-27, PE_PGRS-33 y el dominio PE, inducen 19.8, 14.8, 16.7, 13.4 y 14.8 % de apoptosis respectivamente; lo que de acuerdo con el análisis estadístico no resulta significativo ($p > 0.05$) en comparación al control negativo, sin embargo en el caso del dominio PGRS de la proteína PE_PGRS-33 se observa un 40% de apoptosis lo que de acuerdo con el análisis estadístico resulta significativo con respecto al control ($p < 0.05$) Fig. 3.

Para macrófagos bovinos la cantidad de células apoptóticas inducidas por las proteínas APA, ESAT-6, P-27, PE_PGRS-33 y el dominio PGRS fue de 6, 5.8, 10.5, 3.9 y 28.3% respectivamente, sin embargo estos resultados corresponden a un único experimento realizado por lo que no se puede establecer que existan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y el control Fig. 4.

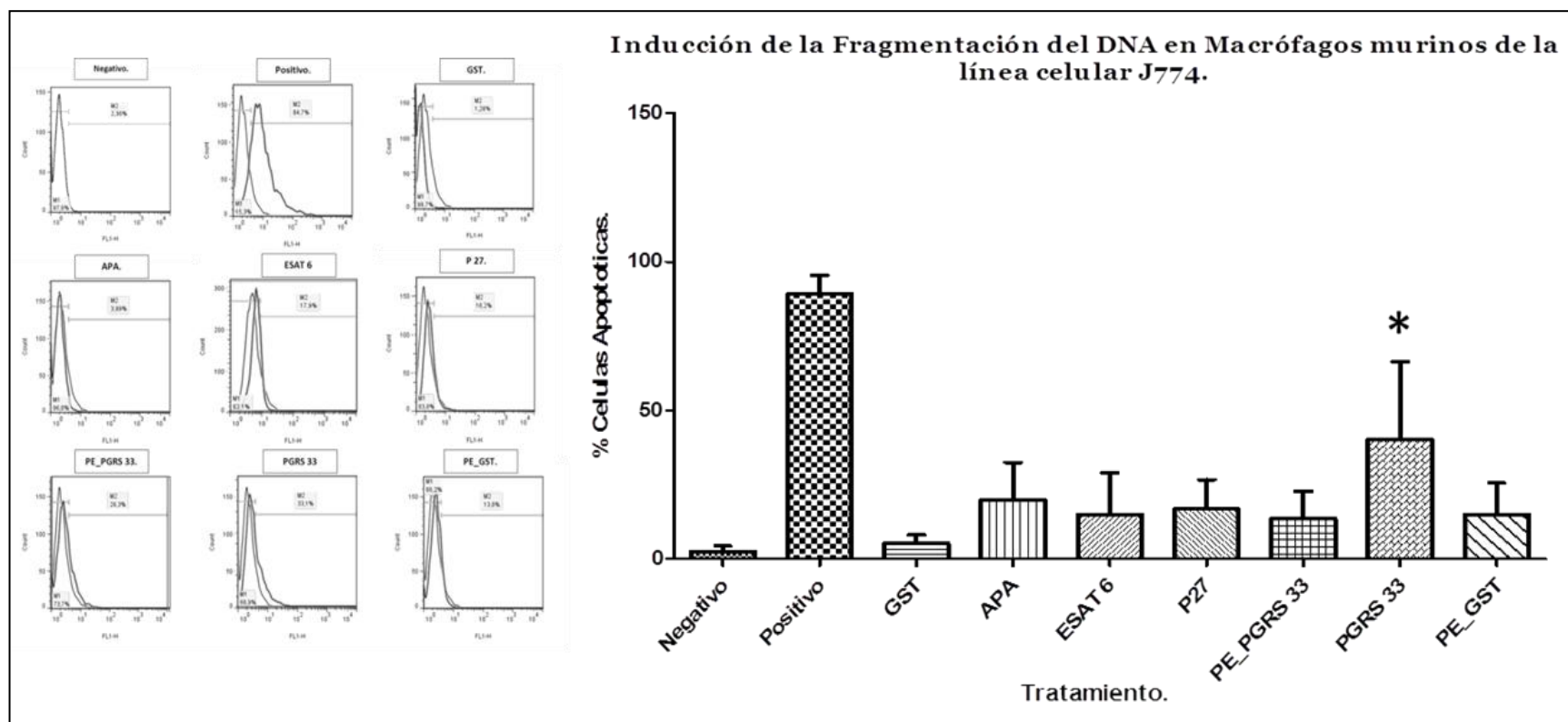


Fig. 3: Inducción de la Fragmentación del DNA en macrófagos murinos J774 por cuatro proteínas de origen micobacteriano y dos dominios constitutivos de una de ellas. 16 hrs post tratamiento con 10 μ g de proteína o 25 μ g de camptotecina (control +) las células fueron marcadas mediante la técnica de túnel y analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células apoptóticas. Los datos que se muestran son el resultado de cuatro experimentos independientes. * Indica un valor significativo de $p < 0.05$

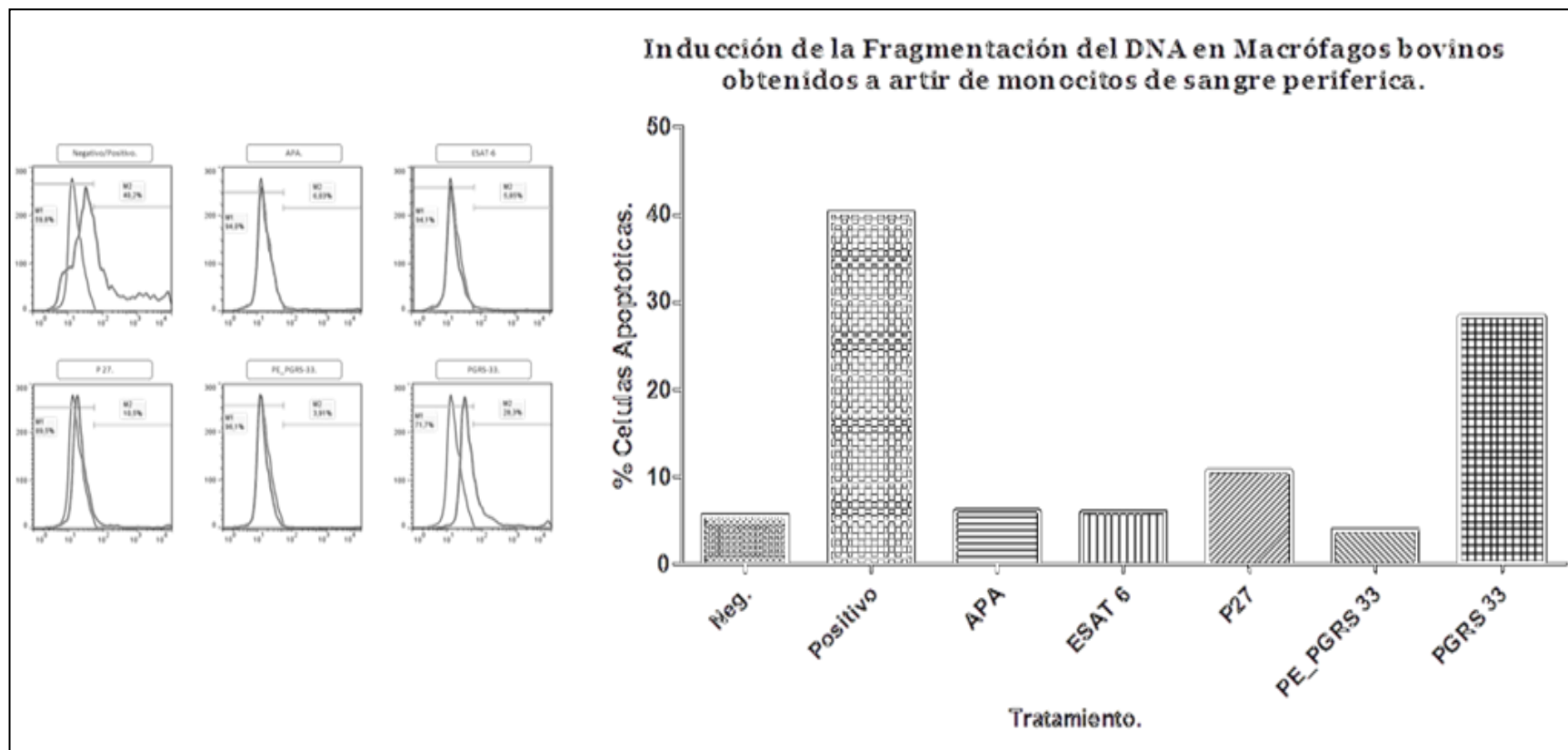


Fig. 4: Inducción de la Fragmentación del DNA en macrófagos bovinos obtenidos a partir de sangre periférica y expuestos a 4 proteínas de origen micobacteriano y al dominio PGRS de una de ellas. Después de 16 hrs post tratamiento con 10 μ g de proteína o 25 μ g de camptotecina (control +) las células fueron marcadas mediante la técnica de túnel y analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células apoptóticas. Los datos que se muestran son resultado de un único experimento realizado.

6.2. Determinación de la actividad de caspasa 3 en macrófagos murinos de la línea celular J774 y en macrófagos bovinos, tratados con seis proteínas de origen micobacteriano.

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de fragmentación del DNA y para conocer si la muerte celular por apoptosis, observada en macrófagos J774 y macrófagos bovinos es consecuencia de la activación de alguna de las vías de caspasas, se determinó la actividad de caspasa 3 en cultivos tratados con las seis diferentes proteínas de origen micobacteriano. Para esto 2.5×10^4 células fueron sembradas en placas de cultivo celular de 24 pozos y expuestas por dieciséis horas a los diferentes tratamientos en las condiciones ya mencionadas.

Los resultados indican que después de dieciséis horas de tratamiento con $10 \mu\text{g/ml}$ de las diferentes proteínas, macrófagos murinos de la línea celular J774 no presentan cambios significativos ($p > 0.05$) en la actividad de caspasa 3 detectada en el lisado de estas células comparado con el control negativo (Fig. 5); de igual forma resultados de un único experimento realizado en macrófagos bovinos obtenidos a partir de sangre periférica no muestran que exista actividad de caspasa 3 a las dieciséis horas de tratamiento con cuatro proteínas micobacterianas (APA, ESAT-6, P-27 y PE_PGRS-33) y la región PGRS-33 de la proteína PE_PGRS-33 (Fig.6).

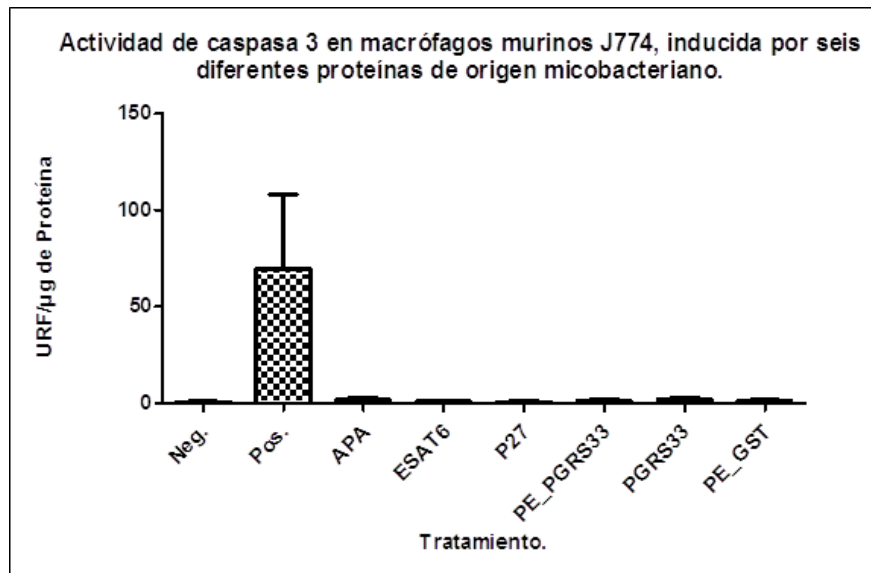


Fig. 5: Actividad de caspasa 3 en macrófagos murinos J774 inducida por cuatro proteínas de origen micobacteriano y dos regiones constitutivas de una de ellas. Después de 16 hrs post tratamiento con 10 µg de proteína o 25 µg de camptotecina (control +) las células fueron lisadas y se agregó un sustrato fluorogénico específico de caspasa 3 la cantidad de fluorescencia emitida se determinó en un rango de 380/430-460nm por 30 min utilizando un lector de micro placas de detección múltiple Synergy HT BioTek. Los datos que se muestran son el resultado de cuatro experimentos independientes.

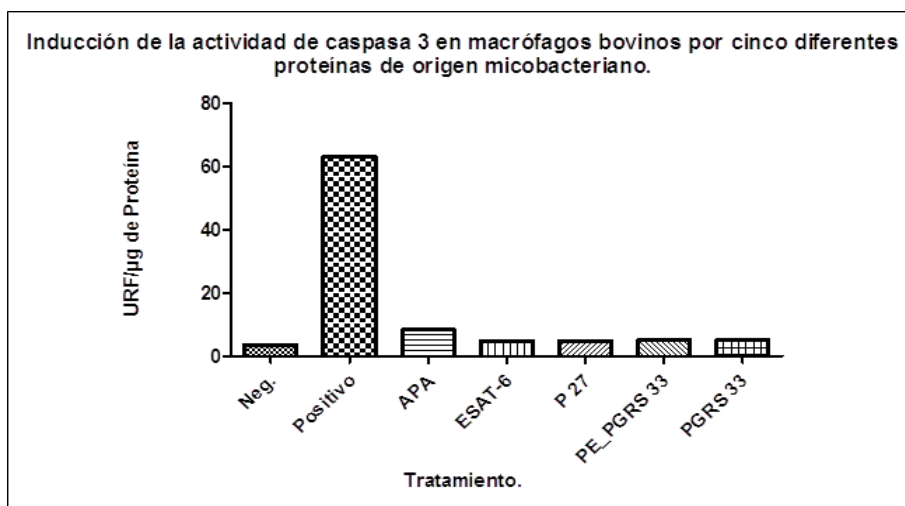


Fig. 6: Actividad de caspasa 3 en macrófagos bovinos inducida por 4 proteínas de origen micobacteriano y a la región PGRS-33 de una de ellas. Después de 16 hrs post tratamiento con 10 µg de proteína o 25 µg de camptotecina (control +) las células fueron lisadas y se agregó un sustrato fluorogénico específico de caspasa 3 la cantidad de fluorescencia emitida se determinó en un rango de 380/430-460nm por 30 min utilizando un lector de micro placas de detección múltiple Synergy HT BioTek. Los datos que se muestran son resultado de un único experimento realizado.

VII. Discusión.

Recientemente muchos de los trabajos desarrollados para el estudio de la tuberculosis se han enfocado en ampliar el conocimiento existente asociado con los mecanismos de la patogénesis de esta enfermedad, así como el rol que proteínas individuales pudieran estar jugando como factores de virulencia durante el desarrollo de la infección. En este trabajo nosotros analizamos la capacidad de cuatro proteínas micobacterianas (APA, ESAT-6, P27 y PE_PGRS-33) y dos regiones constitutivas de una de ellas (región PE y región PGRS-33) para conocer su capacidad como inductores de muerte celular por apoptosis y si la vía por la cual pudiera estar ocurriendo este fenómeno depende de la activación de caspasas.

Los resultados sugieren que únicamente el dominio PGRS de la proteína PE_PGRS-33 estaría generando muerte celular por apoptosis de manera significativa; aunque no existen otros trabajos en los cuales hayan sido evaluadas las dos regiones de la proteína en forma independiente, se conoce que la proteína completa es capaz de inducir apoptosis en diferentes líneas celulares. Por ejemplo Basu S. y colaboradores (2007) reportan que la utilización de una proteína PE_PGRS-33 recombinante puede inducir apoptosis en células RAW 264.7 de manera dependiente al tiempo y la dosis de exposición, también establecen que esta proteína estimula la liberación de TNF- α de forma dosis/tiempo dependiente lo que resulta en una activación secuencial de las caspasas 8, 9 y 3; detonando con esto un proceso apoptótico regulado por caspasas. Esta activación de caspasas también ha sido reportada en células T Jurkat y en células T murinas obtenidas a partir de hibridomas (Balaji *et al.*, 2007) en las cuales su exposición a la proteína PE_PGRS-33 induce muerte celular por apoptosis principalmente regulada por activación de la caspasa 8. Por otro lado Cadieux N. y colaboradores (2011) utilizando células de rhabdomyosarcoma humano transfectadas con diferentes construcciones encontraron que la línea celular que expresa la proteína

completa (PE_PGRS-33) presenta una reducción dramática en el número de células viables 72 hrs post inducción, de igual forma observan que la muerte celular principalmente es causada por apoptosis (61.7%) aunque también es posible observar muerte celular por necrosis primaria (24.3%), finalmente ellos mencionan que resultados preliminares de ensayos realizados mediante RT-PCR muestran que la expresión de FADD y caspasa 8 se encuentran sobre reguladas después de la inducción de la síntesis de la PE_PGRS-33 lo que indicaría que la apoptosis observada ocurre mediante la activación de la vía extrínseca o vía receptores de muerte.

El hecho de que en este trabajo identificáramos una inducción de apoptosis por parte del dominio PGRS-33 sin observar una aparente activación de alguna de las vías de caspasas, sugiere que tal vez este fragmento de la proteína PE_PGRS-33 pudiera estar generando apoptosis de manera independiente a las caspasas; anteriormente ya ha sido reportado que cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* pueden inducir muerte por apoptosis de forma independiente de caspasas en macrófagos humanos (Kelly *et al.*, 2008) y en macrófagos bovinos (Vega-Manriquez *et al.*, 2007) mediante la liberación de factores mitocondriales como puede ser el caso de AIF, y aunque no hay estudios en los que haya sido reportada ninguna asociación directa de esta proteína (PE_PGRS-33) con factores mitocondriales capaces de inducir apoptosis, estudios como el de Cadieux *et al.*, 2011 o el de Balaji *et al.*, 2007, muestran que existe una asociación de la presencia de la proteína PE-PGRS-33 en la mitocondria de las células expuesta a ella y la inducción de la muerte celular por apoptosis.

En el caso de la proteína ESAT-6 existen pocos reportes que asocian su presencia con inducción de muerte celular por apoptosis; en el más reciente Choi y colaboradores (2010) utilizando una proteína recombinante de ESAT-6 en concentraciones $\geq 5\mu\text{g/ml}$ observan una disminución significativa en la viabilidad de células de epitelio alveolar humano A549; posteriormente al determinar el tipo de muerte por el cual esta proteína induce citotoxicidad observan que a las 6 horas post tratamiento con ESAT-6 78.6% de las células presentan apoptosis temprana mientras que el 5.5% de las células presentan apoptosis tardía, lo que desde su punto de vista sugiere que esta proteína induce preferentemente apoptosis por encima de necrosis o autofagia. De igual forma Derrick y Morris (2007) reportan que tratamientos con $5\mu\text{g/ml}$ de ESAT-6 por 16 horas en células humanas THP-1 inducen apoptosis temprana en el 94% de ellas, observan además que este fenómeno se repite en células BHK y células dendríticas de la línea celular DC 2.4; sin embargo ellos mencionan que fibroblastos murinos o macrófagos murinos RAW 264 no presentan la misma respuesta apoptótica al ser incubados con ESAT-6. Con respecto a la vía por la cual se estaría activando este proceso Derrick y Morris mencionan que en células THP-1 sería un proceso parcialmente dependiente de caspasas ya que el uso de un inhibidor general de la actividad de estas, reduce la apoptosis que se presenta después de su tratamiento en aproximadamente un 50%. Por su parte Choi y colaboradores sugieren que la estimulación con ESAT-6 causa un eflujo de calcio en el citosol e induce estrés en el retículo endoplasmico (RE) vía la generación de ROS lo que finalmente resulta en apoptosis, de acuerdo con ellos esta apoptosis es mediada por la activación de las caspasas 12 o caspasa 4 las cuales pueden residir en el RE y que posteriormente pueden activar a la caspasa 3 y escindir a la poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP).

Por su parte APA es una proteína la cual no ha sido claramente definido su rol en la patogénesis de la tuberculosis, sin embargo es reportada como una adhesina capaz de unirse a la fibronectina y que puede inducir una respuesta limfoproliferativa en individuos positivos a PPD (Gamboa-Suasnavart R.A. *et al.*, 2011; Lara M. *et al.*, 2004) Entre los datos que se han logrado recabar de esta proteína se ha observado que la proteína homóloga en *M. bovis* BCG induce de manera importante la generación de anticuerpos y células T en cerdos de guinea inmunizados con bacterias vivas, sin embargo no es el caso para aquellos inmunizados con bacterias muertas. De igual forma células T CD4 y CD8 humanas responden a la proteína APA de *M. tuberculosis* sintetizando INF- γ en niveles significativamente mayores en controles sanos positivos a PPD comparado con pacientes que presentan tuberculosis pulmonar (Kumar P. *et al.*, 2003). En el caso de P27, también conocida como LprG es una lipoproteína cuya localización ha sido predicha en la pared celular, se conoce que al unirse con otras proteínas presentes en su operón puede funcionar como una bomba de membrana, Knockout de LprG o su operón presentan una atenuación de su crecimiento y sobrevivencia en ratones y macrófagos. De igual forma deleciones del operón de LprG en *M. smegmatis* resultan en una disminución de su motilidad y altera su morfología celular lo que sugiere que su función puede estar asociada a la biosíntesis de la pared celular (Drage *et al.*, 2010). Además se ha visto que el lisado de *M. tuberculosis* en el cual esta proteína se encuentra en abundancia posee un efecto coestimulador en células T CD4, de manera independiente a células presentadoras de antígenos y mediados por un aumento de TLR2/1; sumado a esto se ha visto que sobre regula la producción de citosinas TH1 y la proliferación celular (Lancioni *et al.*, 2011), algo que también ha sido observado es que esta proteína puede inhibir el procesamiento de antígenos por parte del MHC II lo que sugiere que puede modular la respuesta inmune en infecciones con micobacterias en favor de su persistencia (Bianco *et al.*, 2011).

Desafortunadamente no existen reportes que mencionen una asociación de la presencia de APA o P27 con muerte celular inducida por apoptosis, pero de acuerdo con nuestros resultados estas proteínas pudieran no estar involucradas en la activación de muerte celular por apoptosis en macrófagos murinos J774 y en macrófagos bovinos obtenidos a partir de sangre periférica ya que no logramos observar un efecto significativo en la cantidad de células que presentan fragmentación del DNA, así como en la actividad de caspasa 3, lo cual sería un indicativo en la activación de una vía de muerte celular dependiente de caspasas.

VIII. Conclusión.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que de las cuatro proteínas micobacterianas evaluadas en este trabajo: APA, ESAT-6, P-27 y PE_PGRS 33; y los dominios de esta última: PE y PGRS, únicamente el dominio PGRS es capaz de inducir apoptosis en macrófagos murinos de la línea celular J774 de manera significativa comparado con células no tratadas, además observamos que la muerte por apoptosis que genera este dominio no induce actividad de caspasa tres lo que sugeriría que el dominio PGRS pudiera estar activando una vía de muerte celular independiente de caspasas, aunque para afirmar esto sería necesario la realización de más experimentos. Por otro lado, en el caso de macrófagos bovinos los datos obtenidos son insuficientes para afirmar de forma concluyente que los efectos observados pudieran ser significativos, sin embargo la inducción de muerte celular generada por las diferentes proteínas micobacterianas, parecen tener una tendencia similar a la que presentan macrófagos murinos, siendo más elevada en aquellas células tratadas con el dominio PGRS; de igual forma en el caso de la actividad de caspasa 3 no se observa que este fragmento induzca su activación después del tratamiento con la proteína.

IX. Referencias.

1. Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya, Yang Z, Talarico S, Kundu M and Basu J. (2007). Execution of Macrophage Apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is Mediated by Toll-like Receptor 2-dependent Release of Tumor Necrosis Factor- α . *J Biol Chem.* 282(2):1039-1050.
2. Balaji KN, Goyal G, Narayana Y, Srinivas M, Chaturvedi R, Mohammad S (2007). Apoptosis triggered by Rv1818c, a PE family gene from *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by mitochondrial intermediates in T cells. *Microbes Infect.* 9(3):271-281.
3. Bianco MV, Blanco FC, Imperiale B, Forrellad MA, Rocha RV, Klepp LI, Cataldi AA, Morcillo N, Bigi F. (2011). Role of P27-P55 operon from *Mycobacterium tuberculosis* in the resistance to toxic compounds. *BMC Infect Dis.* 16;11:195.
4. Briken V and Miller JL (2008). Living on the edge: Inhibition of Host Cell Apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* 3:415-422.
5. Cadieux N, Parra M, Cohen H, Maric D, Morris SL, Brennan MJ (2011). Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 protein. *Microbiology.* 157(3):793-804.

6. Choi HH, Shin DM, Kang G, Kim KH, Park JB, Hur GM, Lee HM, Lim YJ, Park JK, Jo EK, Song CH. (2010). *FEBS Letters*. 584:2445-2454.
7. Corner LA, Murphy D, Gormley E. (2011). Mycobacterium bovis infection in the Eurasian badger (*Meles meles*): the disease, pathogenesis, epidemiology and control. *J Comp Pathol*. 144(1):1-24.
8. Danial Nika N. (2007). BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clin Cancer Res*. 13(24):7254-7263.
9. Derrick SC, Morris SL (2007). The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol*. 9(6):1547-1555.
10. Dietrich J and Doherty TM. (2009). Interaction of Mycobacterium tuberculosis with the host: consequences for vaccine development. *J Compilation*. 440-456.
11. Dmitri V, Kryzsko DV, Agostinis P, Kryzsko O, Abhishek D, Bachert C, Lambrecht BN and Vandenabeele P. (2011). Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol*. 32(4):

12. Drage M.G, Tsai HC, Pecora ND, Cheng TY, Arida AR, Shukla S, Rojas RE, Seshadri C, Moody DB, Boom WH, Sacchettini JC, Harding CV. (2010). Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprG (Rv1411c) binds triacylated glycolipid agonists of Toll-like receptor 2. *Nat Struct Mol Biol.* 17(9):1088-95

13. Donoghue HD. (2011). Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clin Microbiol Infect.* 17:821-829.

14. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 11(13):1050-62

15. Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35:495-516.

16. Ernst JD. (1998). Macrophage Receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immunity.* 1277-1281.

17. Gamboa-Suasnavart RA, Valdez-Cruz NA, Cordova-Dávalos LE, Martínez-Sotelo JA, Servín-González L, Espitia C, Trujillo-Roldán MA. (2011). The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from Mycobacterium tuberculosis in Streptomyces lividans is affected by culture conditions in shake flasks. *Microb Cell Fact.* 20;10:110

18. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 46(8):497-510.
19. Hernandez-Pando R, Orozco H and Aguilar D. (2009). Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch Immunol Ther Exp.* 57:355-3676.
20. Huai J, Schrader K, Borner C. (2010). Role of caspases and non-caspase proteases in cell death. *F1000 Biol Rep.* 2 (48): 1-6.
21. Jordao L and Vieira OV. (2011). Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. *International J Cell Biol.* Pp.1-13.
22. Kelly DM, ten Bokum AM, O'Leary SM, O'Sullivan MP, Keane J. (2008). Bystander macrophage apoptosis after Mycobacterium tuberculosis H37Ra infection. *Infect Immun.* 76(1):351-60.
23. Kitazumi I and Tsukahara M. (2011) Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J.* 278(3):427-41.
24. Kroemer G, Galuzzi L, and Brenner C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev.* 87: 99-163.

25. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B and Melino G. (2008). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Diff.* 1-9.
26. Kromer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner ME, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B and Melino G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ.* 16(1):3-11.
27. Krzyzowska M, Malewski T, Hamasur B, Augustynowicz-Kopeć E, Schollenberger A, Pawłowski A, Niemiałtowski M. (2008). Gene expression profiling of lipoarabinomannan-treated mouse macrophage cultures infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *Pol J Microbiol.* 57(2):125-33
28. Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V. (2003). The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model. *Infect Immun.* 71(4):1929-37

29. Kuranaga E. (2011). Caspase signaling in animal development. *Dev Growth Differ.* 53(2):137-48
30. Lancioni CL, Li Q, Thomas JJ, Ding X, Thiel B, Drage M.G, Pecora ND, Ziady AG, Shank S, Harding CV, Boom WH, Rojas RE (2011). Mycobacterium tuberculosis lipoproteins directly regulate human memory CD4(+) T cell activation via Toll-like receptors 1 and 2. *Infect Immun.* 79(2):663-73.
31. Lara M, Servín-González L, Singh M, Moreno C, Cohen I, Nimtz M, Espitia C (2004). Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of Mycobacterium tuberculosis in Streptomyces lividans. *Appl Environ Microbiol.* 70(2):679-85.
32. Lee J, Hartman M and Kornfeld H. (2009). Macrophage Apoptosis in Tuberculosis. *Yonsei Med J.* 50(1): 1-11.
33. Li J. and Yuan J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 27: 6194-6206.
34. Miche LA, Müller B and van Helden PD. (2010). *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not?. *Vet Microbiol.* 140:371-381.

35. Meikle V, Alito A, Llera AS, Gioffré A, Peralta A, Buddle BM, Cataldi A. (2009) Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. *Clin Vaccine Immunol.* 16(9):1352-9.
36. Mustafa T, Wiker HG, Mørkve O, Sviland L. (2007) Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculous compared to non-tuberculous mycobacteria: role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response. *Clin Exp Immunol.* 150(1):105-13.
37. Pollock JM, Rodgers JD, Welsh MD and McNair J. (2006). Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Vet Microbiol.* 112: 141-150.
38. Portt L, Norman G, Capp C, Greenwood M and Greenwood MT. (2010). Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim Biophys Acta.* 1-16.
39. Schrader K, Hai J, Jöckel L, Oberle C and Borner C. (2010). Non-caspase proteases: triggers or amplifiers of apoptosis?. *Cell Mol Life Sci.* 67:1607-1618.
40. Spira A, Carroll JD, Liu G, Aziz Z, Shah V, Kornfeld H, Keane J. (2003). Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated *Mycobacterium tuberculosis*: a pivotal role for tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29(5):545-51.

41. Tail SWG and Green DR. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Mol Cell Biol.* 11:621-632.
42. Vega-Manriquez X, Lopez-Vidal Y, Moran J, Adams LG and Gutierrez-Pabello JA. (2007). Apoptosis-inducing factor participation in bovine macrophage *Mycobacterium bovis*-induce caspase-independent cell death. *Infect Immun.* 75 (3): 1223-1228.
43. Vega-Manriquez X, López-Vidal Y and Gutiérrez-Pabello JA. (2008) Inducción de apoptosis por especies del género *Mycobacterium*. *Rev Latin. Microbiol.* 50(1):48 – 58
44. Wilson NS, Dixit V and Ashkenazi A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol.* 10(4): 348-353.