



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**FAGOCITOSIS DE CUERPOS APOPTÓTICOS MICOBACTERIANOS. DEMOSTRACIÓN
DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE MANOSA.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
BIOL. TERESA CONCEPCIÓN GARCÍA AGUILAR**

**TUTOR PRINCIPAL
DR. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
MIEMBROS DEL JURADO
DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA
DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA
DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

MÉXICO, D. F. a 6 de enero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Raúl Mancilla Jiménez del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Agradezco a mi tutor por brindarme los medios necesarios para realizar este trabajo, su valiosa asesoría y enseñanza en la elaboración de esta tesis. También agradezco a Patricia Espinosa Cueto y Miguel Tapia Rodríguez por el apoyo técnico necesario para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento especial al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado por el apoyo obtenido en el Congreso Nacional de Inmunología.

A mis padres por darme la vida y amor.

A mis hermanos, Fernando, Fátima, Paco, Agustín, Isabel, Rodrigo, tías, amigos y Rubén por enseñarme y comprenderme durante esta etapa.

A todos mis amigos del laboratorio con los que tuve la oportunidad de convivir Paty, Erika, Jimena, Toño, Alejandro y Guadalupe.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	7
II. RESUMEN	8
III. ANTECEDENTES	9
III.1. Introducción	9
III.2. Epidemiología de la tuberculosis	9
III.3. El agente etiológico de la tuberculosis	10
III.4. Etiopatogenia de la tuberculosis	11
III.5. Respuesta inmune a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
III.6. Fagocitosis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
III.7. Apoptosis	14
III.8. Apoptosis en la tuberculosis	18
III.9. Fagocitosis de células apoptóticas	18
III.10. Maduración del fagosoma en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos	22
III.11. Carbohidratos en la fagocitosis de células apoptóticas	23
III.12. Receptores de tipo lectina en la fagocitosis de células apoptóticas	25
III.13. Producción de citocinas en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos	26

III.14. Antecedentes directos de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos	26
IV. JUSTIFICACIÓN	30
V. HIPÓTESIS	31
VI. OBJETIVOS	32
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	33
VII.1. Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratones de la cepa Balb/c-J y de la línea monocítica J-774	33
VII.2. Demostración del receptor de manosa en macrófagos J774	33
VII.3. Cultivo de <i>M. smegmatis</i> nativa y <i>M. smegmatis</i> transformada que expresa LpqH y obtención de micobacterias	34
VII.4. Ensayos de inducción de apoptosis	36
VII.5. Purificación de macrófagos apoptóticos con microesferas magnéticas con Anexina V	37
VII.6. Identificación de proteínas micobacterianas en los macrófagos apoptóticos	38
VII.7. Ensayos de fagocitosis de los macrófagos apoptóticos	39
VII.8. Caracterización del fagosoma que contiene macrófagos apoptóticos	39
VII.9. Expresión del receptor de manosa en macrófagos J774	41

VII.10. Ensayos de inhibición de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos con carbohidratos competidores del receptor de manosa, un AcMn en contra del receptor de manosa y un AcMn anti-LpqH	41
VII.11. Ensayos de inhibición de la de la expresión del receptor de manosa por medio de ARN pequeño de interferencia específico para el receptor de manosa	42
VII.12. Ensayos de inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por medio de ARN pequeño de interferencia específico para el receptor de manosa	43
VII.13. Colocalización del receptor de manosa en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por microscopía confocal y de epifluorescencia	43
VII.14. Producción de citocinas en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos	43
VII.15. Análisis estadístico	44
VIII. RESULTADOS	45
VIII.1. Análisis por SDS-PAGE e Immunoblot de <i>Mycobacterium smegmatis</i> que expresa la glicolipoproteína de 19 kDa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45
VIII.2. Análisis de la inducción de apoptosis	46
VIII.3.-Caracterización de los macrófagos apoptóticos por SDS-PAGE e Immunoblot.	49
VIII.4.-Análisis de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por citometría de flujo	49
VIII.5.-Análisis de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por microscopía	53
VIII.6. Análisis de maduración del fagosoma en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos	55

VIII. 7. Expresión del receptor de manosa en los macrófagos apoptóticos J774	58
VIII.8.Análisis de inhibición de la fagocitosis con N-acetilglucosamina, manana, un AcMn bloqueador en contra del receptor de manosa y un AcMn anti-Lp _q H	59
VIII.9. Análisis de inhibición de la fagocitosis con un ARN pequeño de interferencia específico para el receptor de manosa	62
VIII.10.Colocalización del receptor de manosa con los macrófagos apoptóticos	64
VIII.11. Análisis de la producción de citocinas en la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos	65
IX.DISCUSIÓN	67
X.CONCLUSIONES	73
XI. PERSPECTIVAS	74
XII. BIBLIOGRAFÍA	75

I. ABREVIATURAS

ApMØs-LpqH	Macrófagos apoptóticos inducidos por <i>M. smegmatis-LpqH</i>
ApMØs-UV	Macrófagos apoptóticos inducidos por luz U.V.
BcL-2	Linfoma de células B 2
CFSE	Carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GlnNac	N-acetilglucosamina
GalNac	N-acetilgalactosamina
IL-12	Interleucina-12
IL-10	Interleucina-10
LpqH	Glicolipoproteína de 19kDa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ManLAM	Lipoarabinomanana
MR	Receptor de manosa
<i>M. smeg-LpqH</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i> transformada con el plásmido que codifica la glicolipoproteína LpqH de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PS	Fosfatidilserina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio
Sta	Estaurosporina
TB	Tuberculosis
TGF-β	Factor transformante de crecimiento-β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α

II. RESUMEN

La fagocitosis de células apoptóticas es importante en la homeostasis celular, en el desarrollo embrionario y en cáncer. Recientemente se ha hecho evidente su papel en infecciones virales y por bacterias intracelulares como es *Mycobacterium tuberculosis*.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de obtener información acerca de los mecanismos involucrados en la fagocitosis de células apoptóticas micobacterianas. Se sabe que durante la apoptosis se exponen en la superficie celular fucosa, N-acetilglucosamina (GlcNac) y manosa, que son reconocidos por receptores de tipo lectina como es el receptor de manosa (MR). Los ensayos de apoptosis se realizaron en macrófagos derivados de médula ósea mediante exposición a luz ultravioleta (UV) como control de inductor de apoptosis y/o extractos celulares de una recombinante de *M. smegmatis* que expresa la glicolipoproteína apoptogénica de *M. tuberculosis* LpqH (*M. smeg*-LpqH). Los ensayos de fagocitosis de los macrófagos apoptóticos se realizaron en monocitos de la línea J-774, donde se observó significativamente inhibida la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos preincubando con azúcares competidores del MR y con un anticuerpo monoclonal (AcMn) en contra del MR.

El papel del MR se estudió utilizando un siRNA específico para el MR que resultó en una disminución de la expresión membranar del MR y en disminución de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos. Aunado a esto los estudios de epifluorescencia y microscopía confocal se observó la colocalización de los macrófagos apoptóticos con el MR. Además, los macrófagos apoptóticos fagocitados se localizaron en un compartimento ácido que expresaba el marcador fagosomal temprano Rab5 y Lamp-1, un marcador del fagolisosoma. Finalmente se demostró

que la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos resulta en la producción de las citocinas anti-inflamatorias TGF- β e IL-10 por la célula fagocítica.

III. ANTECEDENTES

III.1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, un bacilo ácido-alcohol resistente de acuerdo con su pared bacteriana y es un patógeno intracelular facultativo [1, 2] que se adquiere por la vía aérea al inhalar aerosoles que contienen bacilos [1]. El ser humano ha convivido con el bacilo de la TB por mucho tiempo [3]; se piensa que apareció hace unos 35,000 años por mutación y por transferencia horizontal de una bacteria saprófita que pudo haber existido hace 2, 500,000 años [3].

El conocimiento de su naturaleza microbiana se inició con los estudios de Roberto Koch a fines del siglo XIX quien identificó al agente causal, el bacilo de Koch [4].

III.2. Epidemiología de la tuberculosis

En el 2012, la Organización Mundial de la Salud reportó 8.6 millones de nuevos casos de tuberculosis y 1.3 millones de defunciones incluidos pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [2]. La TB es la segunda causa de muerte en el humano por un agente infeccioso después del VIH/SIDA y en la actualidad su frecuencia se ha incrementado con la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos antifímicos y representa la primera causa de muerte en pacientes con VIH/SIDA. [2]. El número de personas infectadas con cepas multidrogo resistentes se duplicó entre 2011-2012 llegando a 94, 000 en todo el mundo [2].

Se han realizado esfuerzos para controlar y erradicar la TB [5]. La vacunación con la cepa atenuada de *M. bovis* denominada bacilo Calmette-Guérin (BCG) [6] ha disminuido de manera importante la TB de diseminación hematológica, sobre todo la TB meníngea. Sin embargo, en el control de la TB pulmonar en adultos no ha dado los resultados esperados, sobre todo en regiones pobres del mundo debido al hacinamiento y falta de recursos económicos [7, 8].

III.3. El agente etiológico de la tuberculosis

El agente causal más frecuente de la TB es *M. tuberculosis* [9, 10]. De acuerdo a estudios genéticos [11] las micobacterias se clasifican en dos grupos: el complejo *M. tuberculosis* que incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. caprae* y el complejo micobacteriano no tuberculoso que incluye cepas saprofitas como *M. avium*, *M. marinum* y *M. kansasii* que pueden causar enfermedad en individuos inmunosuprimidos.

La clasificación taxonómica de *M. tuberculosis* es:

- DOMINIO: Bacteria
- CLASE: Actinobacteria
 - Actinobacteridae
- ORDEN: Actinomycetales
- FAMILIA: *Mycobacteriaceae*
- GÉNERO: *Mycobacterium*

Complejo *M. tuberculosis*

- ESPECIES: *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*.

III.4. Etiopatogenia de la tuberculosis

La relación entre el agente infeccioso *M. tuberculosis* y el hospedero así como el ambiente, influyen en el curso de la infección [12]. Generalmente, en las personas infectadas, se establece un equilibrio de coexistencia entre el hospedero y el agente infeccioso. En la mayoría de las personas, la infección primaria, independientemente de la edad en la que ocurre, pasa desapercibida sin progresión a la enfermedad activa. Esto sucede si la carga bacilar y la virulencia son bajas al igual que la resistencia del individuo [12]. Cuando la capacidad de replicación del bacilo es alta, la infección progresa a la enfermedad. Lo mismo ocurre cuando hay mal nutrición y/o co-infección en VIH [12]. La infección es detectable con la prueba de la tuberculina, la cual se basa en una reacción de hipersensibilidad retardada frente a un grupo de antígenos del bacilo, obtenidos a partir de un derivado proteico purificado (PPD). De estos el 90% manifiesta una infección latente y el 10% restante desarrolla la enfermedad en algún momento de su vida [12]. De este 10%, sólo la mitad desarrollará TB dentro de los 2 años siguientes y el resto años después. Cuando hay un tratamiento oportuno la mayoría de los pacientes responden; sin tratamiento el 50% muere en los 2 años siguientes [12]. Esto sucede si la exposición es prolongada, la virulencia alta y la resistencia del individuo es baja, como ocurre en individuos desnutridos y en la co-infección con VIH [12].

III.5. Respuesta Inmune a *M. tuberculosis*

M. tuberculosis se introduce por la vía aérea en pequeñas gotitas (conteniendo de 1 a 3 bacilos) hasta llegar a los sacos alveolares del pulmón donde es ingerido por macrófagos alveolares, células del sistema inmune innato que actúan como la primera barrera contra la infección [14]. El bacilo evade la fagocitosis por el macrófago y esto le permite al bacilo replicarse en el nicho intracelular. El macrófago infectado libera quimiocinas, atrayendo monocitos y otras células inflamatorias al pulmón. Los monocitos se diferencian a macrófagos que fagocitan las micobacterias, las cuales pueden bloquear la fusión fagolisosomal impidiendo su destrucción. En este estado la micobacteria crece logarítmicamente y se acumulan dentro de los macrófagos produciendo daño tisular. El éxito de la infección por la micobacteria depende de la red de citocinas establecidas y mantenida por los macrófagos [14].

El reconocimiento inmune de *M. tuberculosis* por las células dendríticas permite la activación celular y una rápida producción de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas y quimiocinas, TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-1, IL-8, IL-4, reclutan células de la inflamación (células dendríticas, células T, neutrófilos, monocitos y células natural killer) en las zonas de la infección, activando la migración celular, coordinando la inflamación y la respuesta inmune adaptativa a *M. tuberculosis* dentro de dos o tres semanas después de la infección las células T son activadas por las células presentadoras de antígeno que han fagocitado bacterias activándose así la respuesta inmune adquirida, liberándose citocinas proinflamatorias como INF- γ y TNF- α las cuales activan a los macrófagos para matar a las micobacterias intracelulares (Fig. 1). En estas condiciones se presentan diferentes escenarios: la infección se vuelve latente de acuerdo a la respuesta del

macrófago o puede ser progresiva en el pulmón y algunas veces puede haber diseminación hematológica [13].

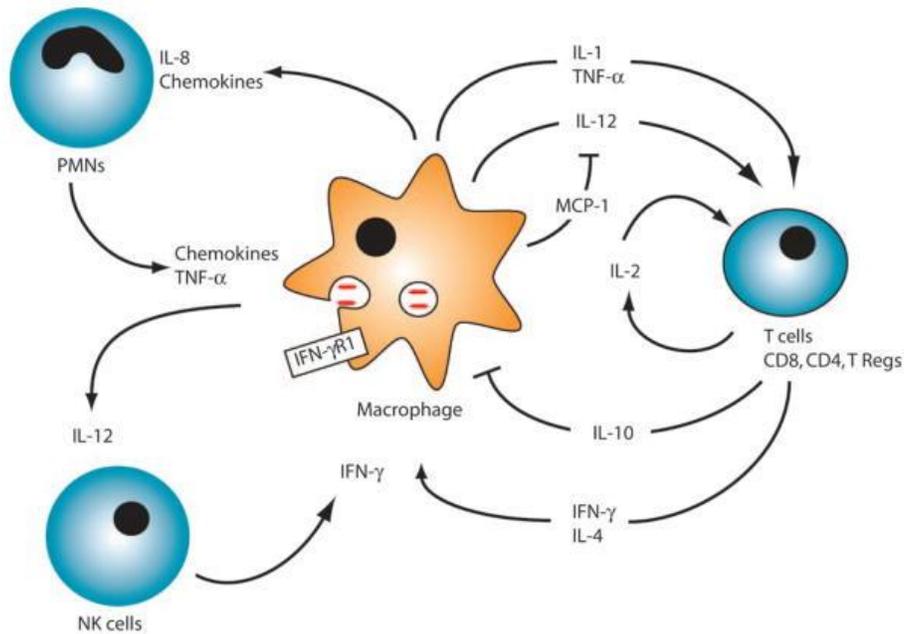


Figura 1. Respuesta inmune celular a *M. tuberculosis*. Después de la infección, los macrófagos activados secretan citocinas y quimiocinas que activan macrófagos, células T, neutrófilos y células NK.

III.6. Fagocitosis de *M. tuberculosis*

En la fagocitosis de las micobacterias, participan los receptores de complemento, el receptor de manosa (MR), el receptor de la proteína surfactante A, el receptor scavenger de clase A y posiblemente también dectina-1. En macrófagos humanos, los receptores primarios para *M. tuberculosis* son el MR y el receptor de complemento 3 [14].

La membrana de *M. tuberculosis* tiene biomoléculas con un alto contenido de manosa, incluyendo lipoarabinomanana fosfomioinositol cubierto o no cubierto (PILAM y AraLAM), manosidos fosfatidilmioinositol de bajo o alto orden (PIM1, PIM2 y PIM6), lipomanana,

arabinomana, manana y glicoproteínas manosiladas como LpqH. El MR participa en la homeostasis de glicoproteínas de alto contenido de manosa o fucosa. En la infección por *M. tuberculosis* el MR regula negativamente la respuesta inflamatoria facilitando la infección, ya que impide la fusión fagolisosomal [15]. Además, el reconocimiento de residuos de manosa en la bacteria por el MR reduce la actividad microbicida del macrófago inhibiendo la producción de óxido nítrico, radicales de oxígeno y citocinas proinflamatorias; reduciendo la actividad de *M. tuberculosis* en la inducción de apoptosis donde se modifica la vía de señalización dependiente de Ca^{2+} [14].

III.7. Apoptosis

El término apoptosis fue por primera vez utilizado por Kerr, Wylie y Currie en 1972 para distinguir morfológicamente una forma distinta de muerte celular, aunque ciertos componentes del concepto apoptosis ya se habían descrito previamente [16, 17]. La apoptosis es una forma de muerte celular programada en la cual actúan mecanismos genéticos de eliminación celular. También se ha descubierto que la necrosis puede ser una forma programada de muerte celular [18, 19]. Se estima que para mantener la homeostasis en el cuerpo humano, alrededor de 10 mil millones de células mueren por apoptosis cada día [20]. La apoptosis es importante en la conformación del repertorio inmunológico; 95% de las células inmaduras que llegan al timo procedentes de la medula ósea mueren por apoptosis [21].

La apoptosis se caracteriza morfológicamente por condensación de la cromatina con picnosis nuclear, disminución del volumen celular y formación de microvesículas [14]. Hay diferentes modificaciones bioquímicas como son la activación de proteasas, como las caspasas y enzimas

que degradan proteínas y el ADN. La apoptosis es un proceso regulado de destrucción celular que confina los contenidos citoplásmicos de las células muertas dentro de vesículas membranales (cuerpos apoptóticos) que expresan señales en su superficie y que promueven la fagocitosis [22]. Una de las señales de las células apoptóticas es la exposición de fosfatidilserina [23]. Los mecanismos de la apoptosis son complejos, dependientes de energía y de cascadas moleculares. La apoptosis puede iniciarse por dos vías: una es la forma extrínseca donde participan receptores y ligandos de muerte y otra la intrínseca o mitocondrial donde participan moléculas mitocondriales; estas vías pueden interactuar (Fig. 2) [24]. La vía extrínseca implica la unión de ligandos a receptores de muerte en la membrana celular (Fig. 3). Entre estos receptores se encuentran la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral que poseen dominios extracelulares ricos en cisteína. Los ligandos y sus correspondientes receptores de muerte incluyen Fas ligando/receptor de Fas ligando (FasL/FasR), el factor de necrosis tumoral alfa/receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF- α /TNFR1), ligando Apo 3/receptor de muerte 3 (Apo3L/DR3), ligando Apo 2/receptor de muerte 4 (Apo2L/DR4) y ligando Apo2/receptor de muerte 5 (Apo2L/DR5) [18, 19, 25, 26]. La unión de FasL a FasR da como resultado la unión de la proteína adaptadora FADD, y la unión del ligando TNF al receptor de TNF permite la unión de la proteína adaptadora TRADD, la cual recluta a FADD y RIP [27, 28]. FADD se une a la procaspasa 8 dimerizando el dominio efector de muerte de la caspasa 8; posteriormente se forma un complejo inductor de muerte (DISC), permitiendo la activación autocatalítica de la vía de la caspasa 8 [29]. Una vez activada la caspasa 8, activa a la procaspasa 3 iniciándose así la cascada de caspasas de la apoptosis. Los dominios de muerte de la apoptosis son regulados mediante proteínas inhibitoras como c-FLIP la cual se une a FADD y caspasa 8 [30, 31].

La vía intrínseca (vía mitocondrial) es activada por daño al DNA y drogas citotóxicas (Fig. 3). Este estímulo causa cambios a nivel de la membrana mitocondrial interna y altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial formando poros y pérdida del potencial de membrana mitocondrial, permitiendo la liberación de dos grupos de proteínas proapoptóticas desde el espacio intermembranal al citosol [32]. El primer grupo está constituido por el citocromo *c*, Smac/DIABLO (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a la proteína inhibidora de apoptosis con bajo PI) y proteasas de serina de temperatura alta (HtrA2/Omi); estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasas. El citocromo *c* se une y activa al factor activador de proteasas apoptótico (Apaf-1) y a la procaspasa 9 formando el apoptosoma, la caspasa 9 activa a la caspasa 3 iniciándose la cascada de caspasas [33, 34]. El segundo grupo de proteínas proapoptóticas está formado por el grupo factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G y DNAasa activada por caspasas (CAD), las cuales son liberadas desde la mitocondria en la apoptosis, pero son eventos tardíos después que se ha iniciado la muerte celular [35]. Las proteínas que regulan la vía mitocondrial de la apoptosis son la familia de proteínas 2 del linfoma de la célula B (Bcl-2) antiapoptóticas y proapoptóticas [34, 36]. Alrededor de 25 proteínas han sido identificados en la familia Bcl-2 incluyendo proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, proteína 1 similar a Bcl-2 (Bcl-x), isoforma larga de la proteína relacionada a Bcl-2 (Bcl-XL), isoforma corta relacionada a Bcl-2 (Bcl-XS), proteína 2 similar a Bcl-2 (Bcl-w), athanogene asociado a Bcl-2 (BAG) y algunas proteínas proapoptóticas incluyen proteínas 10 del linfoma de la célula B (Bcl-10), proteína X asociada a Bcl-2 (Bax), antagonista de muerte 1 Bcl-2 (Bak), agonista que interacciona con el dominio de muerte BH3 (Bid), antagonista de muerte Bcl-2 (Bad), proteína BIM que interacciona con Bcl-2 (Bim), proteína de muerte que interacciona con Bcl-2 (Bik) y proteína de muerte similar a Bik

(Blk). Estas proteínas son importantes porque pueden promover la apoptosis o la pueden suprimir [37].

La vía intrínseca converge con la vía extrínseca por medio de la cascada de caspasas [22, 38]. Esta vía comienza con la activación de la caspasa 3, la cual activa CAD, una enzima que degrada el DNA. Además la caspasa 3 actúa sobre otros sustratos como son proteínas nucleares y del citoesqueleto. Las caspasas tienen una actividad proteolítica y pueden romper proteínas en sus residuos de ácido aspártico, aunque también son específicas en el reconocimiento de amino ácidos. Las caspasas se dividen en iniciadoras, entre las cuales se ubican las caspasas 2, 8, 9 y 10; otro grupo son las efectoras formadas por las caspasas 3, 6, 7 [38, 39].

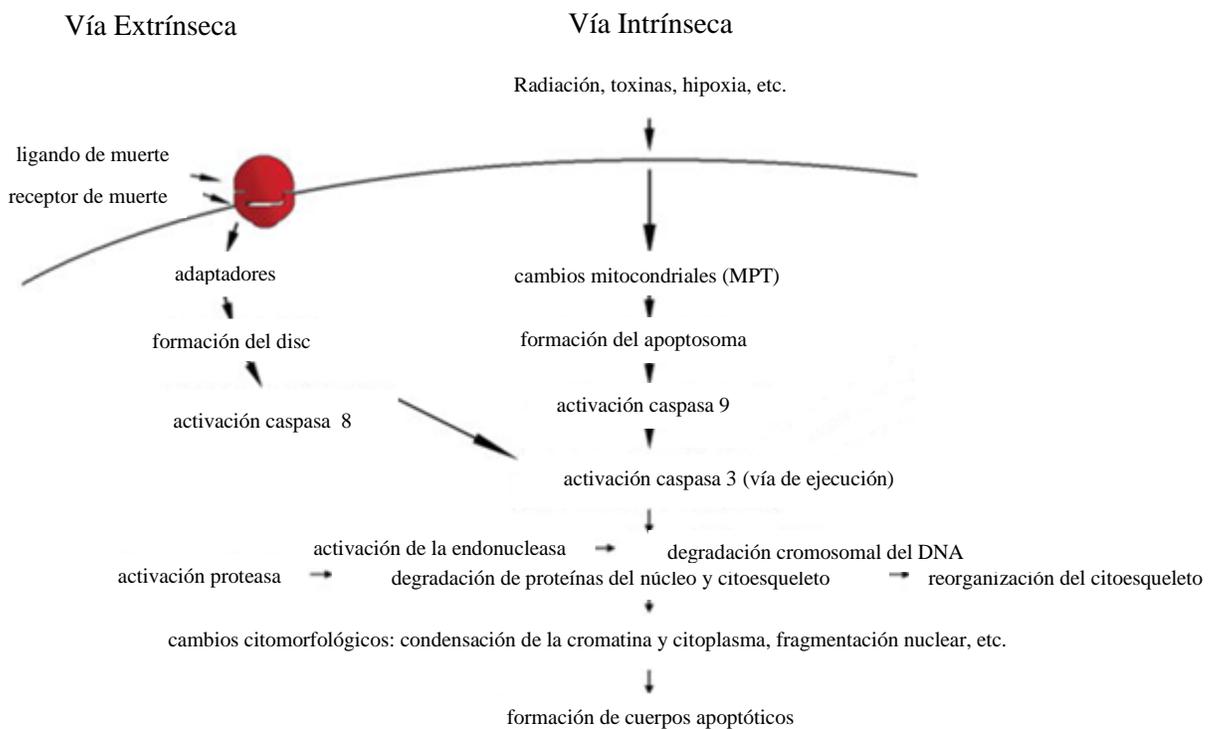


Figura 2. Representación esquemática de los eventos apoptóticos. Las dos principales vías de la apoptosis son la extrínseca y la intrínseca. Cada vía activa su propia caspasa iniciadora (8, 9) las cuales activarán a la caspasa efectora 3. La vía extrínseca resulta en las características cito morfológicas como disminución celular, condensación de la cromatina, formación de blebs citoplasmáticos y cuerpos apoptóticos los cuales son fagocitados por macrófagos.

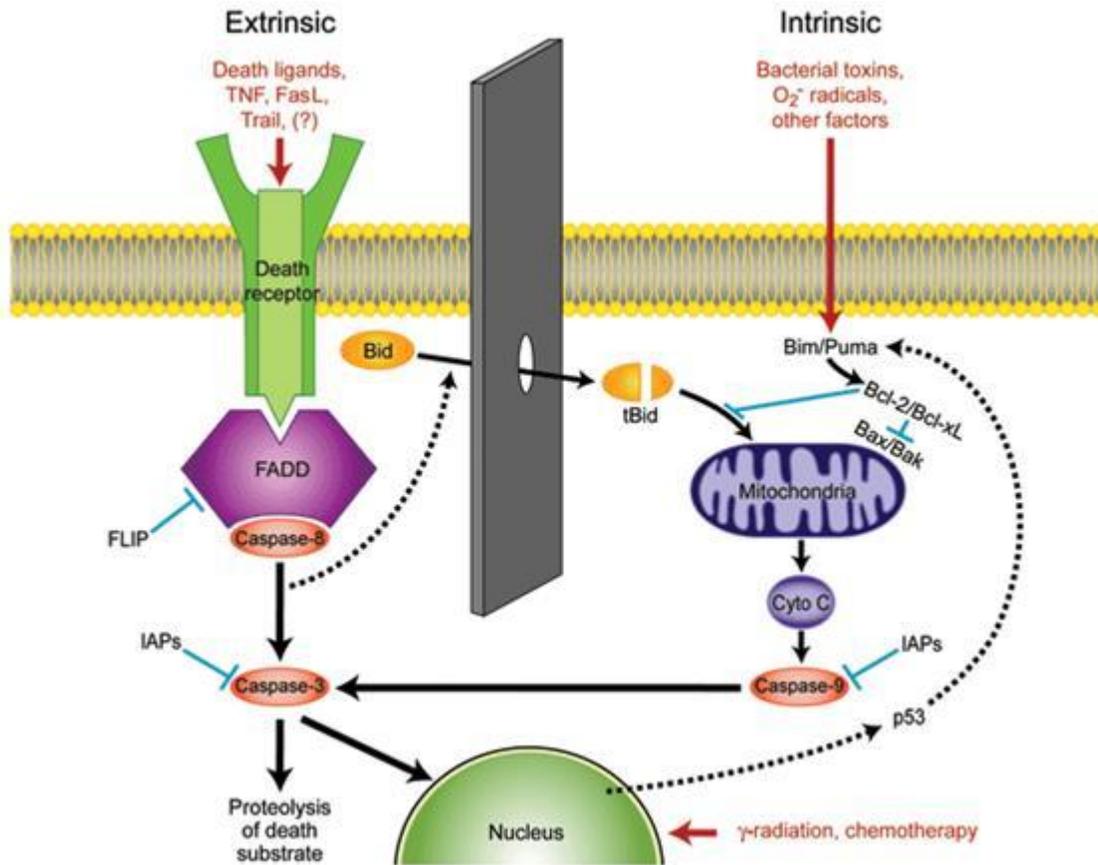


Figura 3. Cascada de señalización de la apoptosis dependiente de caspasas. Mientras que en la vía extrínseca participan ligandos con sus receptores de muerte en la membrana celular, la vía intrínseca es activada por daño al DNA y drogas citotóxicas alterando la permeabilidad de la membrana mitocondrial liberando proteínas proapoptóticas.

III.8. Apoptosis en tuberculosis

En condiciones fisiológicas la apoptosis es un fenómeno de homeostasis cuyo propósito es mantener el equilibrio de las poblaciones celulares, eliminando células muertas para dar paso a nuevas poblaciones celulares y es también una estrategia de la célula hospedero para eliminar patógenos [22]. Cuando la célula hospedero se confronta con un patógeno, este usa los recursos del hospedero para sobrevivir y replicarse, y una estrategia de la célula hospedero para defenderse es activar la apoptosis [22]. Muchos patógenos que sobreviven satisfactoriamente

codifican genes cuyos productos suprimen la apoptosis de la célula hospedero, así conservan el nicho para replicarse, como ocurre en la infección a macrófagos por *M. tuberculosis* [22].

En 1997, Keane et al. [40] fueron los primeros en reportar que la infección de macrófagos alveolares por *M. tuberculosis* da lugar a apoptosis del macrófago. La mayoría de los estudios muestran que la apoptosis se da a través de la vía extrínseca [22]. *M. tuberculosis* activa la expresión de TNF- α y de Fas, así como de sus receptores celulares TNF [41]. Este fenómeno parece relacionarse con la activación río arriba de TLR-2 por componentes micobacterianos. *M. tuberculosis* como patógeno intracelular induce apoptosis por medio de LpqH, un ligando del TLR2; también en esta vía se activan la caspasa 8 y la caspasa 3 independientemente de la vía mitocondrial de la apoptosis [31]. Otras moléculas que inducen apoptosis que han sido identificadas en *M. tuberculosis* son ESAT-6, PE-PGRS-33 y PstS-1 [42, 43]. En cuanto a la apoptosis, se observó que la cepa atenuada de *M. tuberculosis* (H37Ra), induce mucho más apoptosis que la cepa virulenta (H37Rv) a pesar de una producción comparable de TNF- α [44]. De acuerdo con lo anterior es consistente la hipótesis de que *M. tuberculosis* previene la apoptosis como un mecanismo cuyo fin aparente es la preservación de su nicho celular. *M. tuberculosis* H37Rv suprime la apoptosis interfiriendo la señal de TNF- α y FasL por medio de glicoconjugados como lipoarabinomanana (LAM) [45]. Así mismo las cepas virulentas inducen la expresión de Mcl-1, una proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2 [43]. Recientemente, se ha demostrado que las cepas virulentas de *M. tuberculosis* expresan genes que inhiben la apoptosis (a través de proteínas antiapoptóticas) del macrófago infectado y la inactivación de estos genes se asocia con la respuesta protectora de linfocitos T CD8+ [45-47].

En respuesta a la infección contra *M. tuberculosis* se identificó que los macrófagos expresan genes que promueven la apoptosis, mientras que el bacilo induce genes que inhiben dicha expresión [48]. Es de interés, que la viabilidad de la micobacteria disminuye cuando el macrófago entra en apoptosis debido a que se observó que la fagocitosis de macrófagos apoptóticos inducidos por *M. tuberculosis* limita la replicación bacteriana como un mecanismo de la inmunidad innata a través de la eliminación del bacilo [49].

Como parte de la respuesta inmune a *M. tuberculosis* se ha observado inmunidad mediada por la presentación cruzada de cuerpos apoptóticos micobacterianos por células dendríticas a linfocitos T CD8+, y se mostró que la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos micobacterianos por células dendríticas promueve la respuesta inmune por linfocitos T de tipo Th1 CD4+ [50; Mancilla R y col; observaciones no publicadas]. También se ha observado que la vacunación con vesículas apoptóticas de células infectadas inducen protección en contra de la infección de *M. tuberculosis* mediada por linfocitos T CD8+ [50].

III.9. Fagocitosis de las células apoptóticas

El proceso biológico por el cual son fagocitadas las células apoptóticas es crucial para la organogénesis, remoción y homeostasis de tejidos, así como en la resolución de la inflamación [51, 52]. La fagocitosis de las células apoptóticas se lleva a cabo a través de múltiples pasos como son quimioatracción, reconocimiento, unión, ingestión y digestión de células muertas por fagocitos profesionales y no profesionales [51].

Las células apoptóticas expresan señales que promueven o evitan la fagocitosis como son: los diferentes niveles de CD31, CD46 y CD47 [53-55]. También liberan factores quimioatrayentes

como los nucleótidos trifosfatados ATP y UTP reconocidos por su receptor P2Y₂ (*in vivo*), lisofosfatidilcolina reconocido por su receptor G2A, el contenido de macropartículas apoptóticas como ICAM3 y el ligando 1 para la quimocina CX₃C y Anexina 1 procesada por ADAM₁₀, todos estos últimos estudios fueron realizados *in vitro* [56-65]. Durante el proceso de apoptosis se exponen diferentes ligandos, el ligando mas estudiado es la fosfatidilserina (PS) donde puede ser reconocida de forma indirecta por moléculas puente, como MFG-E8, Gas 6, B2-GP1, los cuales son reconocidas por sus respectivos receptores como el receptor $\alpha_v\beta_3$ integrina, Mer y el receptor de B2-GP1; y también de forma directa por los receptores Tim 1,3,4, Bal-1, estabilina-2, los receptores RAGE, entre otros [66-69]. Sin embargo, no se conoce el repertorio de receptores que cooperan en el reconocimiento de PS expuesto en las células apoptóticas para su fagocitosis. Otros ligandos de las células apoptótica son la calnexina y la calreticulina que son transportadas por agregados membranales y son reconocidos por las células fagocíticas a través del receptor CD91 [70]. El rearrreglo de los lípidos de la membrana plasmática de las células apoptótica puede ser por la bomba de ATP ABC1 que también es reconocida en la fagocitosis de células apoptóticas. Otros receptores de los macrófagos que reconocen células apoptóticas para su fagocitosis son los receptores scavenger (el receptor scavenger de la clase A (SR-A), receptor 1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LOX-1), CD68 y CD36) los cuales reconocen sitios oxidados de lipoproteínas de baja densidad (oxLDL). También participa el complemento, los fragmentos inactivos C3b y iC3b, las moléculas solubles C1q, la lectina de unión a manosa (MBL), proteínas surfactantes A y D (SP-A, SP-D), y son reconocidos por sus respectivos receptores como el receptor de complemento 4 ($\alpha\chi\beta_2$), el receptor de complemento 3 ($\alpha m\beta_2$), CD14, los receptores de vitronectina $\alpha v\beta_3$ y $\alpha v\beta_5$ reconoce la molécula puente trombospondina

1 que se une al sitio de la trombospondina, esta unión es facilitada por la interacción de CD31 tanto de la célula apoptótica como del fagocito [66-73].

III.10. Maduración del lisosoma en la fagocitosis de células apoptóticas

La fagocitosis de las células apoptóticas es acompañada por el rearrreglo del citoesqueleto y es regulada por la acción de las proteínas Rab GTPasas pequeñas. Después de la fagocitosis las células apoptóticas son degradadas dentro de 30 a 60 min, por enzimas lisosomales [72].

Las proteínas Rab son un grupo de proteínas GTPasas pequeñas conservadas que actúan como factores que promueven la fusión homotípica (mismo tipo de proteína Rab) y/o heterotípica entre organelos intracelulares y la membrana plasmática [73]. Las Rab GTPasa cambian de su estado inactivo unido a GDP a su estado activo unido a GTP [74]. La conversión de GDP a GTP es catalizado por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina, mientras que las proteínas activadoras de GTPasas estimulan la actividad intrínseca GTPasa de las Rabs, convirtiendo a los Rabs de su forma activa a la forma inactiva [74]. Rab-5 en mamíferos es esencial en la vía endocítica facilitando la fusión de vesículas endocíticas con endosomas tempranos así como en la fusión homotípica entre endosomas tempranos [74, 75]. Estudios recientes han encontrado la incorporación de endosomas tempranos dentro de fagosomas como importante en la degradación de células apoptóticas [76] y Rab-5 participa en la maduración de fagosomas conteniendo células apoptóticas [77, 78]. Rab-5 se une específicamente a endosomas tempranos y a fagosomas que contienen células apoptóticas independientemente de la carga fagocítica y Rab-5 también participa en el reclutamiento y activación de PI3K de la clase III VPS-34 una de las proteínas efectoras de Rab-5 que producen PtdIns3P en los fagosomas [79-81]. Rab-5, Rab-2, Rab-14 y

Rab-7 son secuencialmente reclutadas a los fagosomas en la maduración del fagosoma [82-85]. Rab-5 es detectada en la membrana fagolisosomal inmediatamente después del sellado de las prolongaciones fagocíticas [86], seguida por el reclutamiento simultáneo de Rab-2 y Rab-14 [86, 87]. Rab-7 es posteriormente reclutado después de Rab-2 y Rab-14 [88]. Una vez unido Rab-7 mantiene la asociación con los fagosomas hasta la completa degradación de la célula apoptótica [85].

Se sabe que células dendríticas derivadas de médula ósea fagocitan células apoptóticas y son degradadas colocalizando con Lamp-1 (proteína 1 de membrana asociada al lisosoma) y también colocaliza con compartimentos positivos a MHC II. Las células apoptóticas pierden sus ligandos para TLRs y no inducen la maduración de las células dendríticas (lo que representa la expresión de MHCII), moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas [86-88].

III.11. Carbohidratos en la fagocitosis de células apoptóticas

Las células apoptóticas también son reconocidas por la exposición en la superficie celular de glicoproteínas con patrones de glicosilación intracelulares y los niveles alterados de glicanos se asocian con la exposición de glicoproteínas intracelulares [70, 89, 90]. Este fenómeno es más evidente en fases tardías de la apoptosis, por ejemplo la exposición de lectinas inmaduras con modificación en los residuos terminales de azúcar, estos carbohidratos son fucosa, galactosa, GlcNac y manosa [91, 92]. Para estudiar la exposición de carbohidratos por la célula apoptótica se realizaron ensayos de unión a lectinas de origen vegetal como *Narcissus pseudonarcissus* que interacciona con manosa, *Griffonia simplicifolia* y *Ulex europaeus* (UEA1) que reconocen GlcNac y fucosa respectivamente; estos azúcares de residuos terminales son de glicoproteínas

procedentes del RE y Golgi. En células no apoptóticas estos azúcares son intracelulares (procedentes de RE y Golgi) y en estadios tardíos de la apoptosis, los azúcares son expuestos en la membrana plasmática [93]. También se sabe que los linfocitos apoptóticos tardíos exponen fucosa, manosa y GlcNac, los cuales fueron detectados por UEA1, concanavalina A (Con A) y *Helix pomatia* [94-96]. Por otra parte se ha logrado inhibir la fagocitosis con 80mM de un coctel de azúcares (GlnNac, GlcNac, fucosa y manosa) por las células Kupffer humanas, con manosa, fucosa, manana y fucoidina de neutrófilos apoptóticos por fibroblastos [97, 98], en otros trabajos se ha observado también la inhibición con azúcares la fagocitosis de timocitos apoptóticos por macrófagos peritoneales [94].

Las lectinas son de naturaleza proteica no inmunológica, capaces de reconocer motivos de carbohidratos en los complejos glicoconjugados, sin alteración de su estructura covalente [99]. Ciertas lectinas como ficolina y la MBL se han descrito como moléculas de unión a células apoptóticas para potenciar su obtención por células del sistema inmune innato [92, 97]. Se ha observado que las glicoproteínas membranales forman grupos en la célula oxidada y son ligandos de receptores macrofágicos porque las glicoproteínas expuestas contienen en el medio extracelular polilactosaminoglicanos multivalentes de alta afinidad (hipótesis de agrupamiento de glicoproteínas) [99-107]. Una de estas observaciones es la fagocitosis de células Jurkat apoptóticas por macrófagos debido a la exposición de grupos de glicoproteínas CD43 membranales [98]. Las células apoptóticas tardías Jurkat y los neutrófilos, intercambian calnexina (del RE) a la superficie celular acompañado de glicoproteínas intracelulares inmaduras, incrementando manosa, fucosa y galactosa, a la vez que disminuyen los residuos de ácido sialico en la superficie de las células apoptóticas [93]. Los niveles de expresión de los glicoproteínas alteradas es mediada por la liberación de glicoproteínas membranales ICAM-2 y 3

por el tráfico intracelular de Lamp 1 y 2 (proteína de membrana asociada al lisosoma), calnexina y calreticulina a la superficie celular [70].

III.12. Participación de los receptores tipo lectina en la fagocitosis de células apoptóticas

Por estudios previos en el laboratorio se sabe que el receptor de manosa participa en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por medio de la unión a residuos de carbohidratos, que podrían ser manosa, fucosa y/o GlcNac expuestos en la superficie de los cuerpos apoptóticos. Estos residuos podrían estar presentes en lectinas que se han expuesto o intercambiado a la superficie celular durante el proceso de apoptosis (Mancilla y col; observaciones no publicadas). Las células fagocíticas como los macrófagos, granulocitos y células dendríticas expresan diversos receptores de tipo lectina que podrían reconocer residuos de azúcares modificados por las células apoptóticas, ya que se ha observado la inhibición de la fagocitosis por azúcares, sugiriendo que los carbohidratos están participando en el reconocimiento de células apoptóticas [108]. Se sabe que la MBL, un miembro de la familia de las colectinas, se une a las células apoptóticas y estimula la fagocitosis de las células por la vía de calreticulina, la cual se une al receptor endocítico CD91, también conocido como el receptor de macroglobulina-2 [97].

Los receptores de tipo lectina reportados en la literatura que participan en la fagocitosis de células apoptóticas son: DEC-205 que reconoce células apoptóticas a través de sus dominios conservados de carbohidratos [109] y DC-SIGN que participa en la fagocitosis de linfocitos apoptóticos como parte de la maduración de la célula dendrítica [110]. También el MR participa en la fagocitosis de células apoptóticas en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y se ha asociado con la disminución de la producción de óxido nítrico, radicales de oxígeno y citocinas

proinflamatorias [40, 111, 112]. Además SIGNR1 de macrófagos de la zona marginal del bazo, se une a las células apoptóticas y esta unión es incrementada por la interacción de C1q, el complejo SIGN-R1-C1q inmediatamente media el depósito de C3 en las células apoptóticas, lo que promueve la fagocitosis y el mantenimiento de la tolerancia [113].

III.13. Producción de citocinas en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos

La fagocitosis y degradación de las células apoptóticas se ha propuesto como un proceso silencioso, previniendo la liberación de citocinas proinflamatorias [114-117]. Si las células apoptóticas no son eliminadas, entrarían en necrosis secundaria produciendo inflamación por el contenido liberado al espacio extracelular, contribuyendo a la autoinmunidad e inflamación persistente [118, 119]. El ambiente de citocinas y la naturaleza de los fagocitos en ciertos sitios contribuyen a que la eliminación de las células apoptóticas sea inflamatoria o silenciosa. En condiciones fisiológicas, la remoción de células apoptóticas está confinada a una población de fagocitos con propiedades antiinflamatorias y se ha sugerido la producción de IL-10 por MØ2s en la remoción de células apoptóticas [120]. La remoción de las células apoptóticas estimula la liberación de factores antiinflamatorios, como IL-10, TGF-B y PGE2 [117, 118].

III.14. Antecedentes directos de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos

En vista de que la eliminación de células muertas podría ser importante en la patogenia de la tuberculosis se llevaron a cabo estudios previos. Para inducir apoptosis se obtuvieron macrófagos derivados de médula ósea de ratones de la cepa Balb/c-J los cuales se incubaron con extractos

celulares de la cepa saprófita *M. smeg-LpqH*. Lo anterior resultó en 90% de apoptosis de los macrófagos. Los cuerpos apoptóticos se purificaron por la interacción de la fosfatidilserina expuesta en la membrana de las células apoptóticas y microesferas magnéticas recubiertas con Anexina V. Por Western blot se demostró la presencia de la glicolipoproteína LpqH en los cuerpos apoptóticos (Fig. 4).

Se realizaron ensayos de fagocitosis con macrófagos de la línea J-774 marcados con el colorante vital PKH-26; los macrófagos se incubaron con diferentes gradientes de cuerpos apoptóticos obtenidos a 1500 rpm marcados con carboxifluoresceína succinimidil ester (Fig.5). En vista de que los cuerpos apoptóticos contenían la glicolipoproteína LpqH que contiene manosa se consideró la posibilidad de que el MR participara en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos a través de la interacción con la proteína LpqH. Por lo tanto, se hicieron ensayos de inhibición con azúcares competidores del MR con manana y GlcNac. Además, se hicieron ensayos de inhibición utilizando un AcMn bloqueador en contra del MR. El análisis se realizó por citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia. Por citometría de flujo se demostró fagocitosis a las 4hr, de los cuerpos apoptóticos obtenidos a 1500 rpm en 29 % de las células, en un 45% con los cuerpos apoptóticos obtenidos a 5000 rpm y en un 20 % con los obtenidos a 32,500rpm; de acuerdo a la marca doble positiva en el cuadrante superior derecho, PKH-26 (cuerpos apoptóticos) y PKH-67 (macrófagos fagocíticos). En ensayos de inhibición de la fagocitosis con GlcNac de cuerpos apoptóticos obtenidos a 1500 rpm hubo un 52% de inhibición; con manana la inhibición fue del 43%. Con 5 μ g del AcMn anti-MR fue del 49 % y con 10 μ g fue del 76 %. En un sólo estudio se inhibió la expresión del MR con ARN pequeños de interferencia (siRNA) para el MR y se vio disminuida hasta un 50% la expresión del MR. Igualmente hubo una disminución marcada de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos de hasta un

67%. Estos estudios deben de repetirse para obtener datos estadísticamente válidos y descartar la posibilidad de citotoxicidad del procedimiento utilizando siRNAs. Estas observaciones demuestran la participación del MR en la fagocitosis de macrófagos muertos en apoptosis por extractos celulares de *M. smeg*-LpqH. La fagocitosis de los cuerpos apoptóticos puede ser mediado a través del reconocimiento de los residuos de carbohidratos, como manosa o GlcNac expuestos en la membrana. Estos residuos podrían estar presentes en lectinas que se han expuesto o intercambiado a la superficie celular durante el proceso de apoptosis. También es posible que el MR esté reconociendo residuos de manosa presentes en la glicoproteína LpqH inductora de apoptosis, ya que como se ha demostrado dicha proteína se localiza en la superficie de las células que mueren en apoptosis por extractos celulares de *M. smeg*-LpqH. Hay que señalar que en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos participan múltiples receptores entre ellos el MR. En nuestras condiciones experimentales se sugiere que el MR participa en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por medio de la unión a residuos de carbohidratos, posiblemente que podrían ser manosa o GlcNac expuestos en la superficie de los cuerpos apoptóticos [121].

Inmunoblot de macrófagos apoptóticos con anti-LpqH

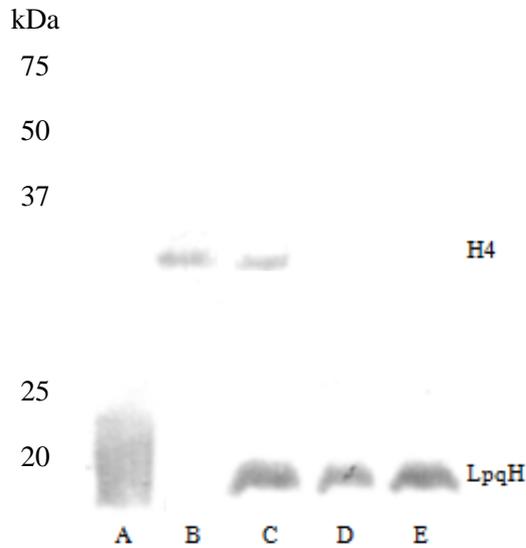


Figura 4. Western blot de cuerpos apoptóticos inducidos con *M. smeg*-LpqH purificados con perlas magnéticas recubiertas con Anexina V y obtenidos por centrifugación a 1500 (C), 5000 (D) y 32,500 rpm (E). Se utilizó el AcMn IT-19 que reconoce LpqH de 19kDa. A, extractos celulares de *M. smeg*-LpqH; B, cuerpos apoptóticos inducidos con luz UV. Con un anticuerpo monoclonal se demostró la presencia de la histona H4 de 35kDa (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA).

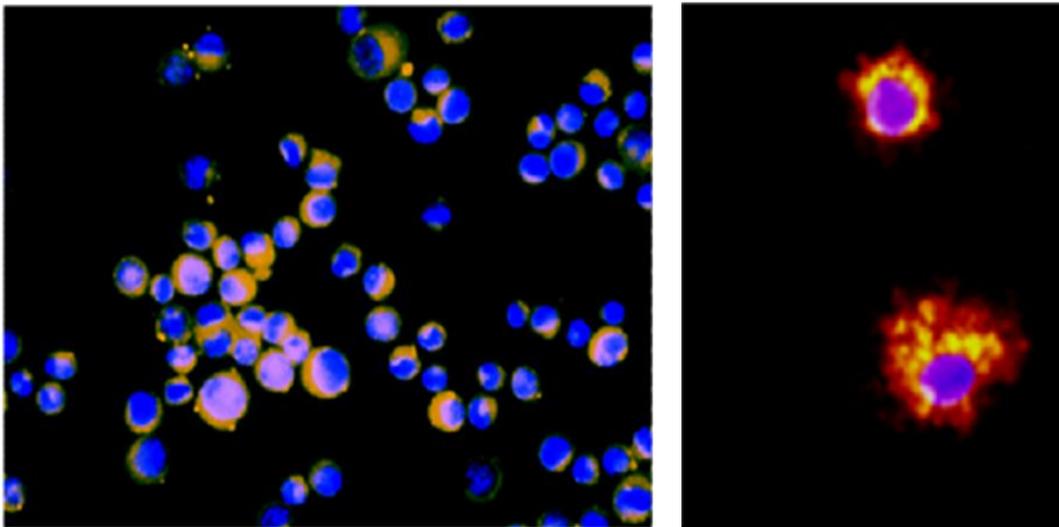


Figura 5. Análisis de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos micobacterianos por microscopía de epifluorescencia. Se observó la mezcla (fluorescencia amarilla) de los cuerpos apoptóticos (CFSE, fluorescencia verde) a 4 hr de incubación en el citoplasma de los macrófagos fagocíticos (PKH-26, fluorescencia roja); los núcleos se marcaron con Dapi. Imagen 40x.

IV. JUSTIFICACIÓN

Se desconocen los mecanismos de remoción de células que mueren en apoptosis durante la infección por micobacterias. Es importante conocer este tema pues se ignora si los macrófagos u otras células fagocíticas se activan al fagocitar cuerpos apoptóticos y participan así en la respuesta antimicobacteriana. Así mismo, se sabe muy poco acerca del papel de los carbohidratos y de los receptores de tipo lectina en la fagocitosis de células apoptóticas. Es por ello que estudiaremos al MR como uno de los receptores tipo lectina que reconocen azúcares de glicoproteínas expuestos en la superficie de las células apoptóticas.

V. HIPÓTESIS

Los macrófagos fagocitan macrófagos apoptóticos micobacterianos a través del MR generando una respuesta anti-inflamatoria.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

- Investigar la participación del MR en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos inducidos con extractos celulares de *M. smegmatis* transformada (LpqH).

Objetivos particulares

- Identificar proteínas micobacterianas por inmunoblot en los macrófagos apoptóticos inducidos con extractos celulares de *M. smeg-LpqH*.
- Hacer ensayos de fagocitosis e inhibición de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos con manana, GlcNac y anti-LpqH por citometría de flujo.
- Identificar la participación del MR de los macrófagos J-774 en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos con un AcMn anti-MR y siRNA del MR por citometría de flujo.
- Analizar el perfil de citocinas del sobrenadante de macrófagos que han fagocitado macrófagos apoptóticos por ensayos de ELISA.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

VII.1. Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratones de la cepa Balb/c-J y de la línea monocítica J-774

Los macrófagos se obtuvieron a partir de la médula ósea de fémures y tibias de ratones de la cepa Balb/c-J, se cortaron las piernas, se limpiaron y se extrajo la médula ósea a presión con jeringa en RPMI-1640 al 20% de suero fetal bovino; la médula ósea se cultivó en RPMI-1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino (Gibco BAL Products, USA) inactivado por calor a 56°C (Gibco BAL Products) y con 0.023 mM de bicarbonato en RPMI-1640, 1mM aminoácidos no esenciales, 100mM piruvato de sodio y 1mM de un antimicótico (Gibco BRL Products, Rockville, MD). Las macrófagos se incubaron a 37°C con 5% CO₂ y se cultivaron durante 10 días, se aislaron por adherencia al plástico en cajas Petri y se despegaron con gendarme. La viabilidad celular se estimó por exclusión del azul tripano en cámara de Neubauer.

Los macrófagos de la línea monocítica J-774 se obtuvieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivaron bajo las mismas condiciones pero con RPMI-1640 suplementado al 10% de suero fetal bovino, con 0.023 mM de bicarbonato RPMI-1640, 1mM aminoácidos no esenciales, 100mM piruvato de sodio y 1mM de un antimicótico (Gibco BRL Products). Para experimentación los macrófagos J-774 se aislaron por adherencia al plástico en cajas de 12 pozos y se despegaron con sargento (Costar, Corning Incorporated, NY). La viabilidad celular se estimó por exclusión del azul tripano en cámara de Neubauer.

VII.2. Demostración del receptor de manosa en macrófagos J774

Para demostrar la expresión del MR en macrófagos J-774 se hicieron los siguientes estudios. Por citometría de flujo los macrófagos J-774 (1×10^6) se incubaron con un AcMn anti-CD16 y anti-CD32 (BioLegend, San Diego, CA) a una dilución 1:1000 por 10 min a 37°C para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos vía el fragmento Fc de la IgG; posteriormente se incubó el AcMn anti-MR (BioLegend) a una dilución 1:1000 por 1h a 37 °C en PBS leche 1%; después de lavar 3 veces con PBS 1x se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488 por 30 min en buffer PBS leche 1% y se lavó 3 veces con PBS 1x. La expresión del MR de los macrófagos se analizó por citometría de flujo, donde se seleccionó una región de acuerdo al tamaño y granularidad de los macrófagos y la marca negativa se tomó con un isotipo control un anti-IgG2a, κ de rata (BioLegend) y la marca positiva se determinó después de la marca negativa.

Para observar el MR por microscopía de epifluorescencia se permeabilizaron las células con PBS-BSA3%-Tritón X-100 al 0.1% durante 5 min a 37°C; después se lavó 3 veces con PBS-BSA 3% y se incubó con el AcMn anti-MR en una dilución 1:100 por 1h a37°C; después se lavó dos veces con PBS 1x y se incubó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con Alexa 488, durante 30 min a 37°C. Se prepararon laminillas por citocentrifugación las cuales se montaron con Dako y ProLong Gold Antifade con DAPI (Invitrogen, Eugene OR) en una dilución 1:8. Se analizó la expresión del MR de los macrófagos en laminillas (cuentas de 100 células en 5 regiones tomadas al azar) por microscopía de epifluorescencia (Olympus IX51, Olympus America Inc. USA) ajustando la emisión de fluorescencia con células sin marca y el isotipo como control de marca anti-IgG2a, κ de rata (BioLegend).

Para determinar la distribución subcelular del MR por inmunoblot se obtuvieron las fracciones membranal, citosólica y nuclear por medio de centrifugaciones y diferentes buffers (Thermo Scientific, Rockford, IL). Brevemente, las células (10×10^6) se centrifugaron a 500 g por 5 min, se obtuvo el sobrenadante, se le adicionó el buffer indicado para extraer el citosol, a 4°C y con inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Se incubó a 4°C por 10 min, se centrifugó a 500 g por 5 min, y se obtuvo el sobrenadante (fracción citosol); al pellet se le adicionó el buffer para obtener la fracción membranal incubando a 4°C con inhibidores de proteasas en agitación por 5 min y a 4°C por 10 min. Después se centrifugó a 3000 g por 5 min a 4°C, obteniéndose la fracción membranal en el sobrenadante. Para obtener la fracción nuclear el precipitado se transfirió a un tubo, a 4°C, se adicionó el buffer para núcleos e inhibidores de proteasas, agitando a 4°C por 30 min. Después se centrifugó a 5000 g por 5 min obteniéndose la fracción nuclear. Se cuantificó la proteína por el método de Lowry y las fracciones obtenidas se analizaron realizando SDS-PAGE al 7.5% e inmunoblot con membranas de PVDF, bloqueando con PBS-leche 3% durante 1h a 37°C. Después se incubó con el AcMn anti-MR en una dilución 1:100 toda la noche a 4°C, se lavó dos veces con PBS-Tween 0.5% y una vez con PBS 1x y se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa diluido 1:1000 por 1h a 37°C. El inmunoblot se reveló por luminol que genera una emisión de color azul al ser oxidado por peróxido de hidrógeno mediante una quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

VII.3. Cultivo de *M. smegmatis* nativa y *M. smegmatis* transformada que expresa LpqH y obtención de micobacterias

Se cultivaron *M. smegmatis* (mc2155) nativa y *M. smeg-LpqH*; esta última es una cepa transformada con el plásmido p16R1 que contiene un fragmento SmaI de 1.8-kb codificador para el gen estructural de la glicolipoproteína LpqH de *M. tuberculosis* (donadas por Y. Zhang, MCR TB and Related Infections Unit, Hammersmith Hospital, London). Por estudios previos realizados en el laboratorio se sabe que esta glicolipoproteína induce apoptosis en macrófagos [41]. Las bacterias se cultivaron en Middlebrook 7H9 (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD) suplementado con 50µ/ml de glucosa e higromicina B en matraces Erlenmeyer de 1 litro durante 4 semanas a 37°C. Se obtuvieron las bacterias de las 2 cepas de *M. smegmatis* de la siguiente manera, las bacterias se lavaron con PBS 1x y se centrifugaron a 2840g por 20 min a 37°C. Posteriormente se ultrasonicaron en hielo (60 ciclos de 1 min a 60 Hz con intervalos de 1 min a 37°C). La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry. La presencia de LpqH en la cepa transformada y su ausencia en la cepa nativa se corroboraron por inmunoblot con el AcMn para LpqH IT-19 donado por TB Vaccines Testing and Research Materials Contract Colorado State University.

VII.4. Ensayos de inducción de apoptosis

Para inducir apoptosis y obtener macrófagos apoptóticos se incubaron macrófagos derivados de médula ósea de la cepa Balb/c-J 10×10^6 en cajas Petri con 1 mg/ml (PBS 1x) de proteínas de *M. smeg-LpqH* y *M. smegmatis* nativa como control durante 1, 12 y 24hr; además como controles se indujo apoptosis exponiendo las células a luz UV y estaurosporina 20µM/ml durante

1, 12 y 24 hr. Para corroborar la apoptosis por microscopía de epifluorescencia las laminillas obtenidas por citocentrifugación se incubaron con Anexina V (BioLegend, San Diego CA) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución 1:1000 por 1×10^6 durante 15 min a 37°C , se montaron las laminillas con Dako (Dako, Denmark) para observar por microscopía de epifluorescencia (Olympus IX51, Olympus America Inc.).

Para corroborar la apoptosis por citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson, Palo Alto CA) se incubaron 1×10^6 macrófagos apoptóticos con Anexina V-FITC en una dilución 1:1000 por 15 min a 37°C (BioLegend) y los macrófagos necróticos (1×10^6) se marcaron con yoduro de propidio en una dilución 1:10000 por 5 min a 37°C y las muestras se analizaron por citometría de flujo, utilizando como control negativo macrófagos sin tratamiento para ubicar la región negativa y la región positiva se obtuvo con los controles estaurosporina y luz UV.

VII.5. Purificación de macrófagos apoptóticos con microesferas magnéticas con Anexina V

La inducción de apoptosis puede resultar en la producción de cuerpos apoptóticos diversos que pueden tener efectos biológicos diferentes [115]. En este estudio se utilizaron macrófagos apoptóticos obtenidos centrifugando las células tratadas con *M. smeg*-LpqH a 500g (5 min). Posteriormente los macrófagos apoptóticos se purificaron con microesferas magnéticas recubiertas con Anexina V, con el kit de purificación celular MACS (Miltenyi Biotec, Germany); este método se basa en la interacción entre la fosfatidilserina translocada en la superficie de las células apoptóticas y la Anexina V de las microesferas magnéticas.

VII.6. Identificación de proteínas micobacterianas en los macrófagos apoptóticos

La concentración de proteína de los extractos celulares micobacterianos y los macrófagos apoptóticos se determinó por el método de Lowry y se separaron en geles de poliacrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE), desnaturalizante al 15% por medio del sistema discontinuo de Laemmli y se corrieron a 120 mV durante 1:30 h. Para observar el perfil de proteínas de los extractos micobacterianos y de los macrófagos apoptóticos, algunos geles se tiñeron con azul de coomasie durante 1 h y se lavaron con solución desteñidora (7% de ácido acético) por 2 h. Otros geles se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF; 250 mA por 40 min) y se bloquearon con leche Svelti al 3% en PBS 1x por 1h a 37°C. Para observar la presencia de LpqH en los extractos micobacterianos y en los macrófagos apoptóticos se incubaron las membranas de PVDF con el AcMn para LpqH (IT-19) en una dilución 1:250 en PBS 1x incubando toda la noche. Después de lavar con PBS-Tween 0.05% (2 veces por 5 min) y PBS 1x (1 vez por 5 min) se utilizó como segundo anticuerpo un anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa en una dilución 1:1000 por 1h a 37°C. Para revelar las membranas de PVDF se utilizó luminol que genera una emisión de color azul al ser oxidado por peróxido de hidrógeno mediante una quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology, Rockford) y después se agregó solución reveladora (10ml de PBS-Tween, 10 μ l H₂O₂ y 3 μ g de 3' 3 tetracloruro de diaminobenzidina, DAB) durante 10 min y se realizaron los lavados con PBS 1x y PBS-Tween 0.05% como se indicó anteriormente.

VII.7. Ensayos de fagocitosis de macrófagos apoptóticos

Se realizaron ensayos de fagocitosis de los diferentes tipos de macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y por UV marcados previamente con el kit PKH-26 un marcador lipofílico rojo (Sigma-Aldrich, St. Louis) con macrófagos de la línea monocítica J-774 marcados con el kit PKH-67 (Sigma-Aldrich) un marcador lipofílico verde. Se incubaron 0.5×10^6 macrófagos con $50 \mu\text{g}$ de macrófagos apoptóticos durante 2, 4, 12 y 24 hr y como control de inhibición de la fagocitosis se utilizó citocalasina D $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ a 4 hr de incubación; posteriormente se fijaron con 1% paraformaldehído en PBS 1x durante 10 min a 37°C y se lavaron dos veces con PBS 1x. Se analizaron por citometría de flujo (FACScalibur, Beckton Dickinson) y se realizó citocentrifugación, se montaron las laminillas con Dako y ProLong Gold Antifade en una dilución 1:8 para observar la fagocitosis por microscopía confocal (ZEISS LSM 5 PASCAL, Software 2.8, Germany) y de epifluorescencia. El porcentaje de células fagocitadas se analizó por citometría de flujo tomando el cuadrante superior derecho como marca doble positiva de macrófagos apoptóticos PKH-26 y macrófagos fagocíticos PKH-67, también se analizaron las marcas dobles positivas por microscopía de epifluorescencia.

VII.8. Caracterización del fagosoma que contiene macrófagos apoptóticos

Para estudiar la acidificación del fagosoma en la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* se marcaron los macrófagos previamente con pHrodo-red (Molecular Probes-Invitrogen, USA) incubando los macrófagos apoptóticos durante 30 min a 37°C con el marcador pHrodo-red en una solución pH neutra PBS 1x, este marcador es fluorescente y se excita en un medio ácido a pH4. Los macrófagos fagocíticos se marcaron con un marcador lipofílico verde

PKH-67 y se realizó una cinética de fagocitosis a 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h.; como control negativo se analizó la fagocitosis a 4°C. Se analizó la fagocitosis por citometría de flujo y se prepararon laminillas por citocentrifugación, se montaron las laminillas con Dako y ProLong Gold Antifade para observación por microscopía confocal y de epifluorescencia.

Para estudiar la maduración del fagosoma se hicieron ensayos de fagocitosis utilizando los AcMn anti-Rab5 que identifica fagosomas tempranos y anti-Lamp1 que caracteriza al fagolisosoma [75, 87]. Se utilizaron macrófagos apoptóticos (50µg/ml) inducidos por *M. smeg-LpqH* y las células fagocíticas (1×10^6) se marcaron con PKH-67, incubando por 0.5, 1, 2 y 4h. Después de la incubación, se fijaron las células con 1% de paraformaldehído en PBS 1x durante 10 min a 37°C y se lavaron dos veces con PBS 1x. Se permeabilizaron las células con PBS 1% SBF 0.025% saponina durante 10 min a 37°C y se lavaron 3 veces con PBS 1% SBF a 37°C. Posteriormente se incubaron las células con un AcMn anti-Fc (CD 16/32, BD Biosciences) durante 10 min y después con AcMn anti-Rab-5 o anti-Lamp-1 (BD Biosciences), en una dilución 1:100 en PBS1x durante 10 min a 37°C; como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG-Cy5 (BioLegend), en una dilución 1:1000 en PBS 1x durante 30 min a 37°C. Se realizó citocentrifugación y se montaron las laminillas con Dako y ProLong Gold Antifade para observar por microscopía confocal y de epifluorescencia.

VII.9. Ensayos de inhibición de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos con carbohidratos competidores del MR, un AcMn en contra del MR y un AcMn anti-LpqH

Para identificar receptores de tipo lectina en los macrófagos e indirectamente los ligandos micobacterianos involucrados en el proceso de fagocitosis, se realizaron ensayos de inhibición preincubando las células previamente marcadas con PKH-67 (0.5×10^6) con GlcNac 50 nM (Sigma-Aldrich Inc.) y manana 15.4 nM a 0.5×10^6 (Sigma-Aldrich Inc.) durante 30 min. Para el mismo fin se preincubaron las células con un AcMn anti-MR 5 y 10 μ g por 0.5×10^6 macrófagos durante 30min. Para estudiar la participación de ligandos micobacterianos con residuos de manosa como LpqH en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH se preincubaron las células con un AcMn anti-LpqH (IT-19), después se incubaron las células con los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y UV previamente marcados con PKH-26 (50ug de proteína) durante 4h, se fijaron con 1% de paraformaldehído en PBS 1x durante 10 min a 37°C y se lavaron dos veces con PBS. Se analizó la inhibición de la fagocitosis por citometría de flujo (FACScalibur) y se realizó citocentrifugación, se montaron las laminillas con Dako y ProLong Gold Antifade para observar por microscopía confocal y de epifluorescencia. El porcentaje de células fagocitadas se analizó por citometría de flujo (FACScalibur) tomando el cuadrante superior derecho como marca doble positiva macrófagos apoptóticos PKH-26 y macrófagos fagocíticos PKH-67.

VII.10. Ensayos de inhibición de la expresión del MR por medio de siRNA

Para identificar la participación del MR en la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos, se utilizó siRNA para inhibir la expresión del MR, con la secuencia

GAACAAAGAUAUCCACUGACU, el cual se obtuvo de Thermo Scientific Dharmacon (USA) y como control se utilizó un siRNA sin blanco específico (Thermo Scientific Dharmacon, USA). Para transfectar a los macrófagos se utilizó oligofetamina 1:800 en medio OptiMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Grand Island, NY) disminuido en suero y sin antibiótico. Se incubaron los macrófagos 0.2×10^6 con 60 pmol del siRNA para el MR durante 64 h. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS, se incubaron con el anti-MR durante 1h y se utilizó como anticuerpo secundario un anti-IgG acoplado a Alexa 488 durante 30 min., como control negativo se utilizó el siRNA no inhibitorio (Thermo Scientific Dharmacon, USA) y como control positivo se utilizaron macrófagos no tratados. La expresión y la inhibición del MR se analizaron por citometría de flujo (FACScalibur). La expresión del MR de los macrófagos fagocíticos se analizó por citometría de flujo tomando la región M1 como negativa en base a un isotipo como control de marca y la región M2 como positiva a la expresión del MR.

VII.11. Ensayos de inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por medio de siRNA

Para demostrar la participación del MR en la fagocitosis se realizaron ensayos de inhibición de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y UV con siRNA del MR se incubaron los macrófagos, previamente marcados con PKH-67 a 0.2×10^6 con 60 pmol de siRNA del MR durante 64 h y se incubaron las células con los macrófagos apoptóticos previamente marcados con PKH-26 (50ug proteína) durante 4h, como control negativo de inhibición de la fagocitosis se utilizó el siRNA no inhibitorio, la cual es una secuencia al azar (Thermo Scientific Dharmacon) en las mismas condiciones experimentales. El porcentaje de células fagocitadas se

analizó por citometría de flujo (FACScalibur) tomando el cuadrante superior derecho como marca doble positiva macrófagos apoptóticos PKH-26 y macrófagos fagocíticos PKH-67.

VII.12. Colocalización del MR en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por microscopía confocal y de epifluorescencia

Para observar por microscopía confocal y de epifluorescencia la participación del MR en la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH*, se realizaron ensayos de fagocitosis 50µg de macrófagos apoptóticos (marcados con PKH-26) por 1×10^6 de macrófagos fagocíticos durante 4h. Se fijaron las células con 1% de paraformaldehído en PBS durante 10 min y se lavaron dos veces con PBS. Se permeabilizaron las células con PBS-BSA3%-Tritón-X-100 al 0.1% durante 5 min y se lavaron 3 veces con PBS-BSA3%. Posteriormente se incubaron las muestras con el anti-Fc (BioLegend) durante 10 min en una dilución 1:500 en PBS y después con el anti-MR durante 1h en una dilución 1:100 en PBS y como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG acoplado a Alexa 488 durante 30 min. Se realizó citocentrifugación y se montaron las laminillas con Dako y ProLong Gold Antifade para observar colocalización del MR con los macrófagos apoptóticos por microscopía confocal y por microscopía de epifluorescencia.

VII.13. Producción de citocinas en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos

Para estudiar el efecto biológico en la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos se midió la producción de las citocinas IL-10, TGF-β, IL-12 y TNF-α en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por ensayos de ELISA (BioLegend), se incubaron los macrófagos con los

macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg*-LpqH (50µg por 1×10^6 células), macrófagos apoptóticos inducidos con luz U.V. (50µg por 1×10^6 células), con extractos celulares de *M. smeg*-LpqH (5µg por 1×10^6 células) y como control de activación LPS (50ng por 1×10^6 células).

VII.14. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con los programas FlowJo 7.6 e Image J y se realizaron las pruebas estadísticas paramétricas ANOVA con la prueba de comparación múltiple Tukey, la prueba t de student simple de una cola y estadísticas no paramétricas como Mann Whitney (MW) y Kruskal-Wallis (KW) utilizando el programa GraphPad Prism. La significancia estadística fue asumida con el valor de $p \leq 0.05$. Las barras representan la desviación estándar (SD).

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Análisis por SDS-PAGE e Immunoblot de *M. smegmatis* transformada

Para observar la expresión de LpqH en *M. smegmatis* transformada primero se realizó un gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15% teñido con azul de Coomassie donde se observó el perfil de proteínas de *M. smegmatis* nativa y de *M. smeg-LpqH* y se observó una proteína de 19kDa la cual corresponde a LpqH. Posteriormente algunos geles se transfirieron a membranas de PVDF y por immunoblot se identificó LpqH en *M. smeg-LpqH* con el AcMn IT-19 (Fig.6).

SDS-PAGE e Immunoblot de *M. smeg-LpqH* y *M. smegmatis* nativa

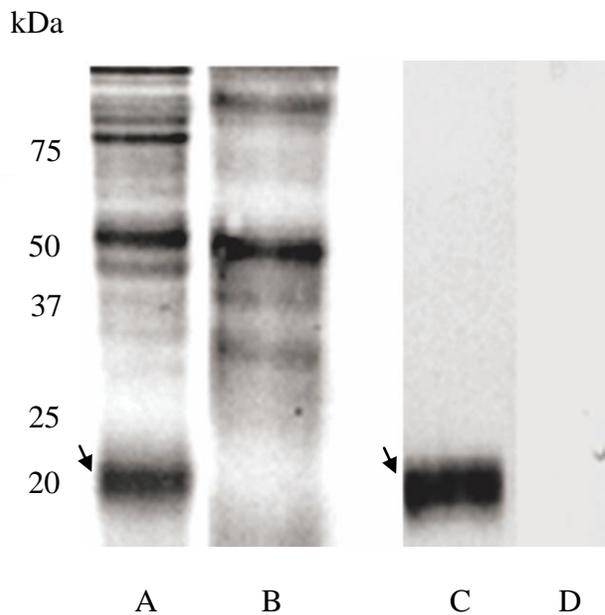


Figura 6. SDS-PAGE e immunoblot de los extractos celulares de *M. smeg-LpqH*. En el gel teñido con azul de Coomassie se observa una banda de 19kDa (A, flecha) que corresponde a LpqH como se demuestra en el immunoblot (C, flecha) con el AcMn IT-19. Esta proteína no se observa en la cepa nativa de *M. smegmatis* (B, D) entre otras proteínas que se observan en *M. smeg-LpqH*.

VIII.2. Análisis de la inducción de apoptosis y necrosis

Para inducir apoptosis a los macrófagos derivados de médula ósea de ratones de la cepa Balb-c/J se utilizó *M. smeg-LpqH* la cual expresa LpqH una glicolipoproteína de *M. tuberculosis* [42, 122]. Se indujo apoptosis con 50 µg/ml de proteínas de *M. smeg-LpqH* a 0.5×10^6 de macrófagos derivados de médula ósea durante 24 hr de incubación a 37°C.

Se analizó la apoptosis por citometría de flujo incubando los macrófagos apoptóticos con Anexina V-FITC durante 15 min a 37°C, Anexina V-FITC se une a fosfatidilserina que durante el proceso de apoptosis temprana se intercambia del citosol a la membrana celular [123]. La inducción de apoptosis fue mayor con luz UV y estaurosporina ya que varió del 80 al 90% a las 24hr, mientras que la inducción de apoptosis a las 24 hr no varió entre *M. smegmatis* nativa y *M. smeg-LpqH* siendo de 60 a 70% de apoptosis (Fig. 7, 8). Se analizó la inducción de necrosis por citometría de flujo utilizando incubando los macrófagos apoptóticos con yoduro de propidio durante 5 min a 37°C. En las células tratadas con UV a las 24 hr fue de 70% y con *M. smeg-LpqH* fue de 40% (Fig 9).

Posteriormente se purificaron los macrófagos apoptóticos con perlas magnéticas recubiertas con Anexina y se analizó la apoptosis por microscopía de epifluorescencia incubando los macrófagos apoptóticos con Anexina V-FITC durante 15 min a 37°C y para identificar los núcleos celulares se utilizó DAPI (Fig. 10A); por citometría de flujo en un ensayo representativo se observó del 70 al 88.4% de macrófagos apoptóticos purificados positivos a Anexina V-FITC (Fig. 10B).

Histogramas representativos de la inducción de apoptosis

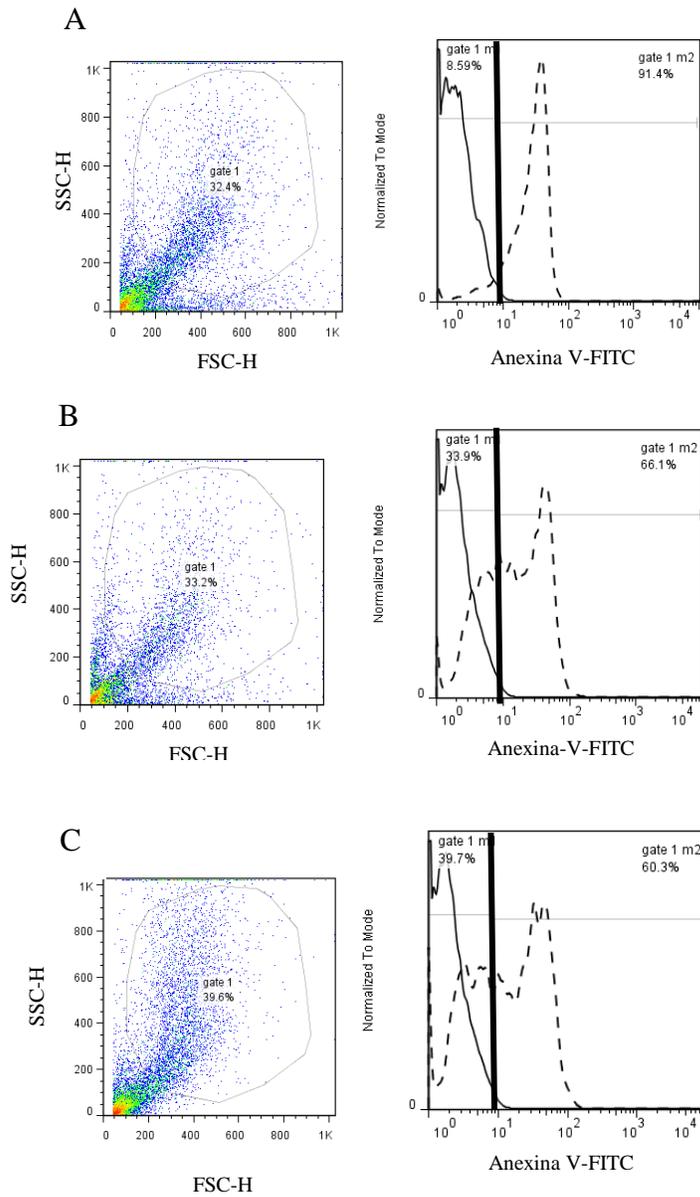


Figura 7. Inducción de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V-FITC. (A) Macrófagos apoptóticos por luz UV. (B) Macrófagos apoptóticos por *M. smegmatis* nativa y (C) Macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH*. Se observó macrófagos apoptóticos AnexinaV-FITC positivos en los tratamientos con las micobacterias y la luz UV es un control de inductor de apoptosis no biológico.

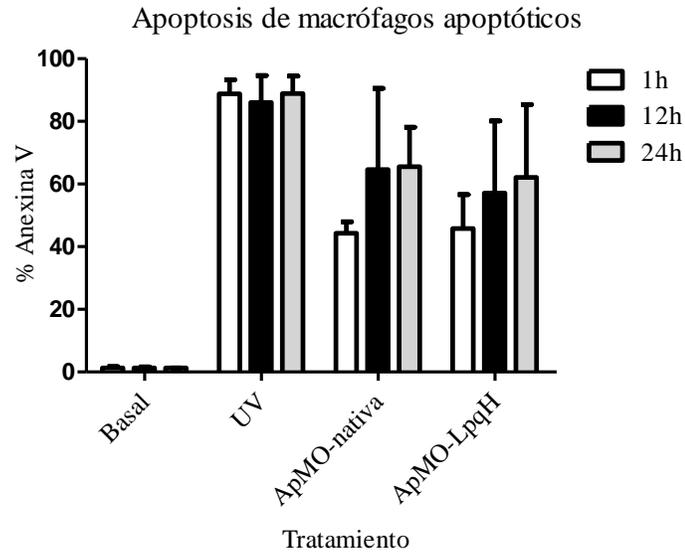


Figura 8. Inducción de apoptosis con micobacterianas a macrófagos derivados de médula ósea. Por citometría de flujo se observó mayor inducción de apoptosis a las 24 hr de incubación con las micobacterianas tanto con *M. smegmatis*-nativa (ApMO-nativa) como con la cepa transformada *M. smeg*-LpqH (ApMO-LpqH); la luz UV es un control de inductor de apoptosis no biológico.

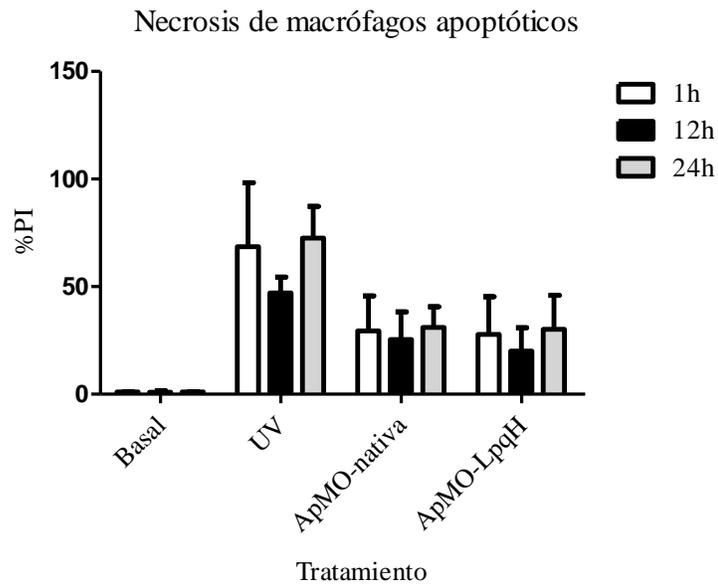
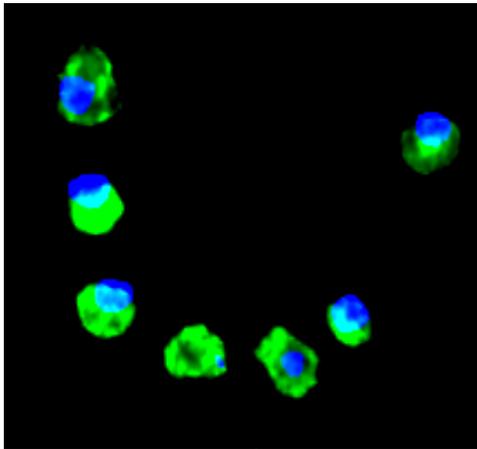


Figura 9. Inducción de necrosis por citometría de flujo utilizando yoduro de propidio. No se observó variación de necrosis conforme aumenta el tiempo de incubación con *M. smegmatis* nativa y *M. smeg*-LpqH y la luz UV es un control de inductor de apoptosis no biológico.

A



B

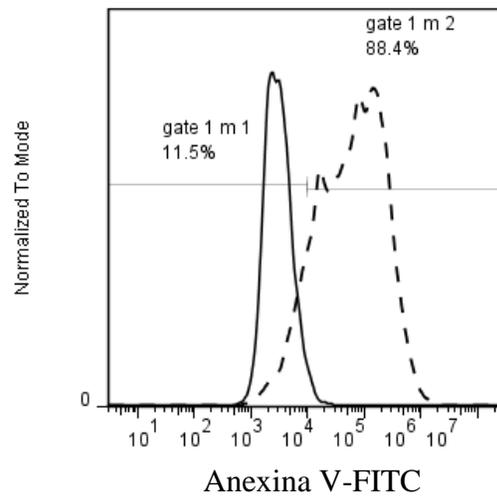


Figura 10. Imagen de epifluorescencia de macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* a 24hr. Las células se purificaron en una columna de Miltenyi usando microesferas magnéticas recubiertas con Anexina V y se prepararon laminillas para su análisis por microscopía de epifluorescencia (A). Las células se marcaron con Anexina V-FITC y Dapi, x40. (B) En un ensayo representativo por citometría de flujo se observó 88.4% de macrófagos apoptóticos purificados (línea punteada tratamiento, línea continua control de macrófagos sin tratamiento). Se obtuvo un mayor rendimiento de macrófagos apoptóticos purificándolos con las perlas magnéticas recubiertas con Anexina V.

VIII.3. Identificación de proteínas de *M. smegmatis* y LpqH en los macrófagos apoptóticos

Para determinar la presencia de LpqH y proteínas micobacterianas en los macrófagos apoptóticos, ya que podrían participar como inductores de apoptosis en los macrófagos derivados de médula ósea, se realizaron tres ensayos por inmunoblot con un suero de antígenos de *M. smegmatis nativa* donde se observaron numerosas bandas en *M. smeg-LpqH* y tres bandas en los macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH* y no se observaron bandas en los macrófagos apoptóticos inducidos con UV (Fig. 11). Con el AcMn IT-19 se identificó LpqH en los macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH*, así como en los extractos celulares de *M. smeg-LpqH* y no en los macrófagos apoptóticos inducidos con UV (Fig. 12).

Inmunoblot incubado con anti-*M. smegmatis* nativa

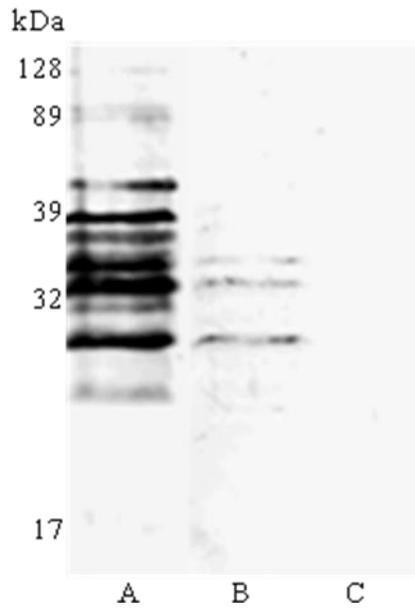


Figura 11. Inmunoblot revelado con un anti-*M. smegmatis* nativa de los macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH* purificados. (A) Proteínas de *M. smeg-LpqH*. (B) Macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH* purificados. (C) Macrófagos apoptóticos inducidos con luz UV purificados. Se observan antígenos micobacterianos en los macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH* correspondientes a la cepa nativa.

Inmunoblot incubado con anti-LpqH

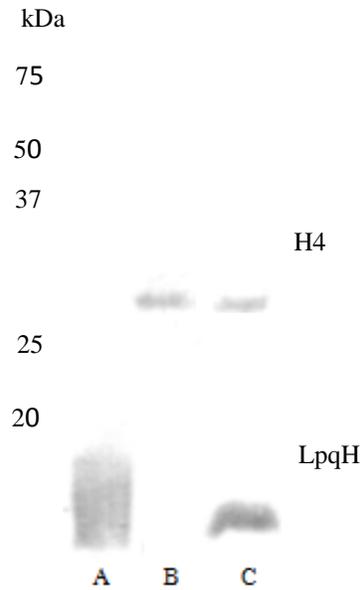


Figura 12. Inmunoblot de los macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg*-LpqH purificados. Se reveló con el AcMn IT-19 que reconoce la glicolipoproteína apoptogénica LpqH de 19kDa de *M. tuberculosis*. (A) Proteínas de *M. smeg*-LpqH. (B) Macrófagos apoptóticos inducidos con luz UV. (C) Macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg*-LpqH. Como control de células apoptóticas se utilizó un AcMn anti-H4 de 35kDa y se observó en los macrófagos apoptóticos por UV (B) y por *M. smeg*-LpqH (C).

VIII.4. Análisis de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por microscopía

Para estudiar la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos se realizaron ensayos de incubación de los macrófagos apoptóticos con los macrófagos J-774. Por microscopía de epifluorescencia se tomaron 50 fotografías de manera aleatoria de 25 laminillas. En base a la tinción de DAPI se contaron al azar por los menos 200 macrófagos y los tiempos de incubación fueron de 2, 4, 12 y 24 hr. Se observó en tres ensayos a 24hr hasta 53.77% de fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y 70.37% por UV, observándose tiempo dependencia de la fagocitosis (Fig. 13). En la imagen por microscopía de epifluorescencia se observa la mezcla amarilla de los macrófagos apoptóticos (rojo) con los macrófagos fagocíticos (verde) (Fig. 13). Por microscopía confocal en un ensayo se observó fagocitosis de los dos tipos de macrófagos apoptóticos (Fig. 16) y en la imagen por microscopía se observaron los macrófagos apoptóticos (rojo) dentro de

los macrófagos fagocíticos (verde) emitiendo una fluorescencia amarilla (Fig. 14), lo cual indica que los macrófagos fagocíticos colocalizan con los macrófagos apoptóticos inducidos por *M. smeg*-LpqH y luz UV. Por lo tanto los macrófagos J-774 fagocitan macrófagos apoptóticos independientemente de su agente inductor de apoptosis.

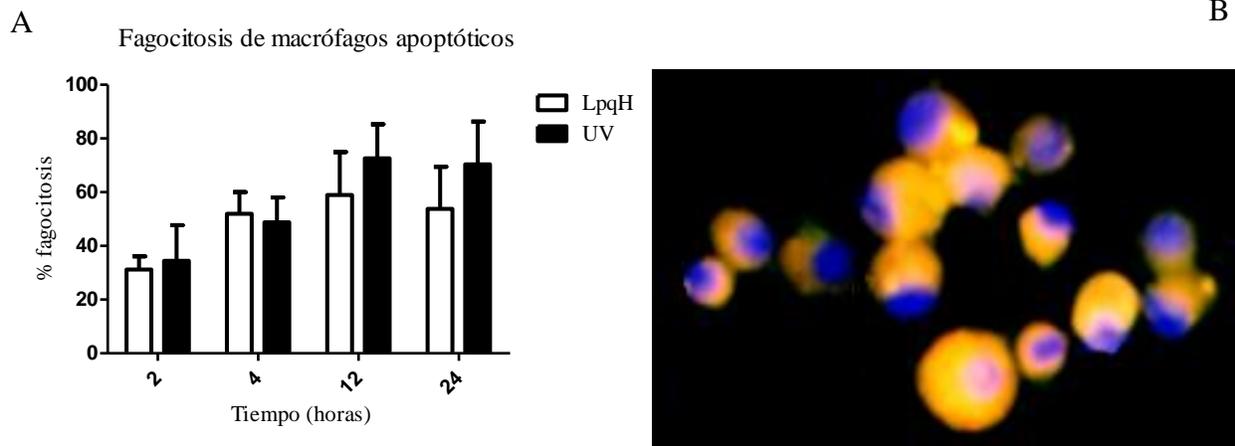
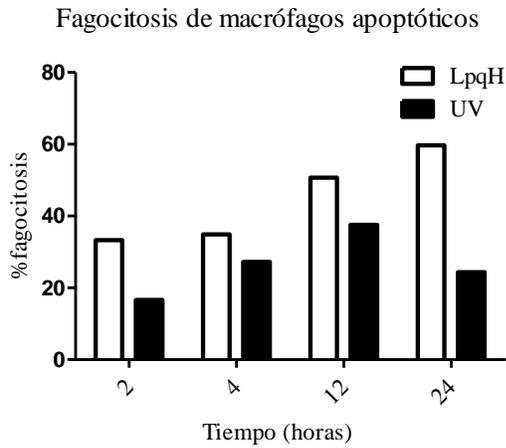


Figura 13. Fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y UV observado por microscopía de epifluorescencia. (A) En tres ensayos se observó que la fagocitosis variaba de acuerdo al tiempo de incubación con los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y UV en los siguientes tiempos 2, 4, 12 y 24 hr. (B) Por microscopía de epifluorescencia se observó la doble marca que emite una fluorescencia amarilla de los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH (rojo) incubados 24 hr con los macrófagos fagocíticos (verde), los núcleos están marcados con Dapi (azul), x40.

A



B

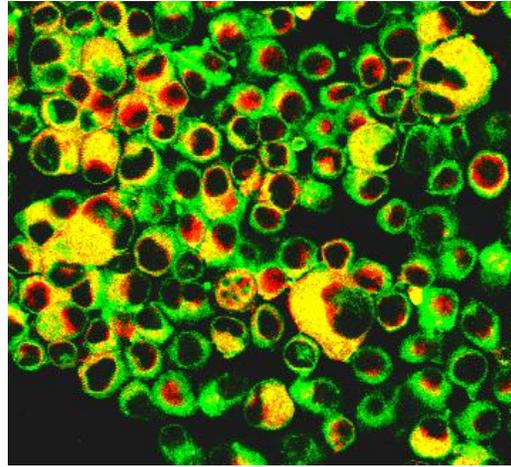


Figura 14. Fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y UV por microscopía confocal. (A) En un ensayo se observó que la fagocitosis variaba de acuerdo al tiempo de incubación con los macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y UV en los siguientes tiempos 2, 4, 12 y 24hr. (B) Por microscopía confocal se observaron los macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* (rojo) a 24 hr de incubación dentro de los macrófagos fagocíticos (verde), x40.

VIII.5. Análisis de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por citometría de flujo

Para corroborar la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por citometría de flujo se realizaron tres ensayos de fagocitosis a 2, 4, 12 y 24 hr obteniendo hasta 46.8% de fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y 41.7% por UV a las 24 hr, donde se observó tiempo dependencia de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y UV. En un ensayo coincubando en presencia de citocalasina D (para inhibir la polimerización de la actina en el rearrreglo del citoesqueleto en la fagocitosis) la fagocitosis fue de solo 15% a las 4 hr, demostrando de esta forma que el bloqueo del rearrreglo del citoesqueleto suprime la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos (Fig. 15).

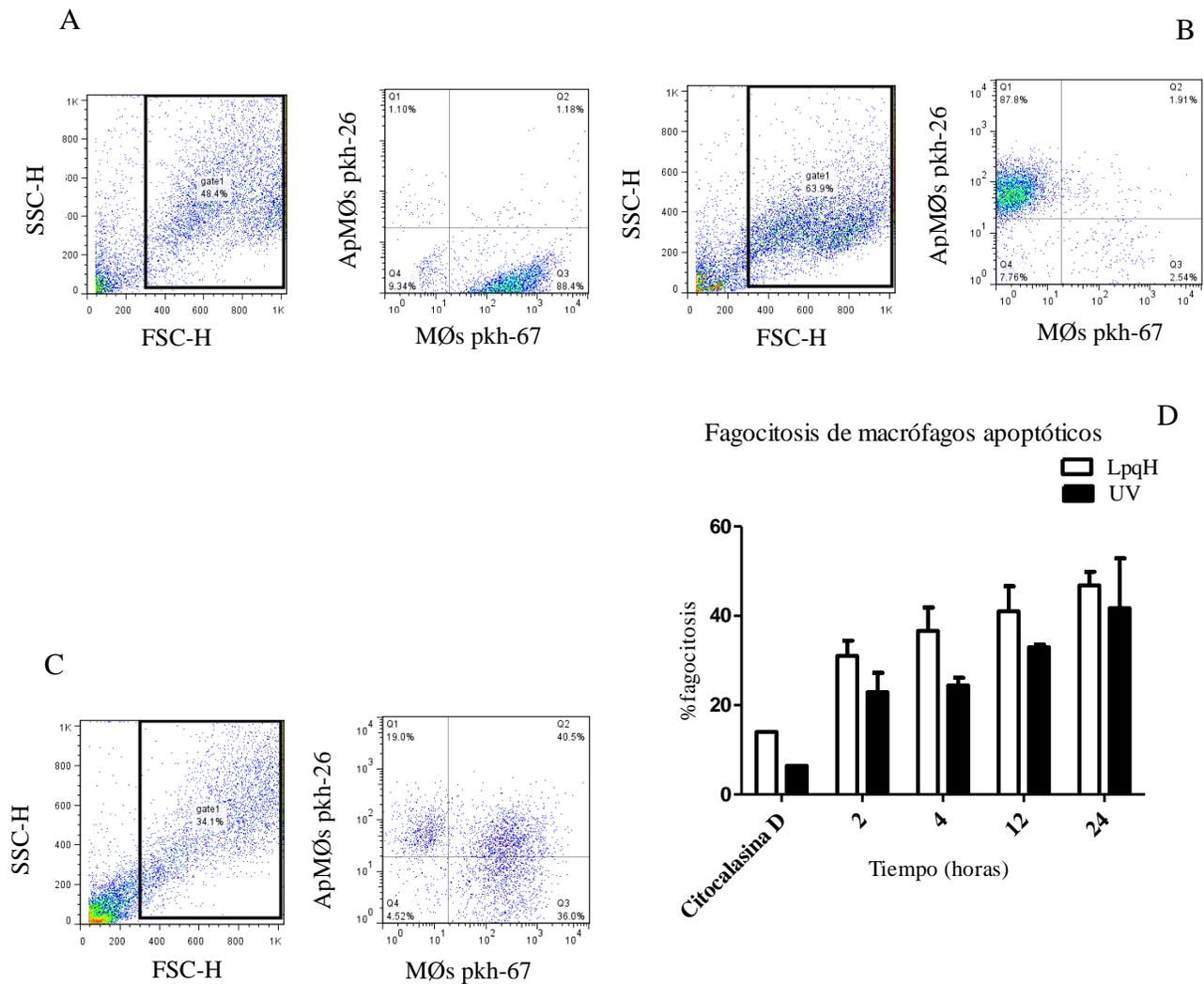


Figura 15. Fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y UV por citometría de flujo. Se hizo primero un gating (gate 1) de acuerdo al tamaño y granularidad de los macrófagos, los cuadrantes se obtuvieron con las marcas (A) PKH-26 y (B) PKH-67; en el cuadrante inferior izquierdo se encuentran las células sin marca, en el cuadrante inferior derecho se encuentran las células marcadas con pkh-67 no fagocíticas, (C) en el cuadrante superior izquierdo se encuentran los macrófagos apoptóticos no fagocitados y en el cuadrante superior derecho se encuentra la marca doble positiva PKH-26 macrófagos apoptóticos a las 24 hr de incubación con los macrófagos fagocíticos PKH-67. (D) En tres ensayos por citometría de flujo se observó fagocitosis de los macrófagos apoptóticos dependiente de los siguientes tiempos 2, 4, 12 y 24hr $*p \leq 0.05$.

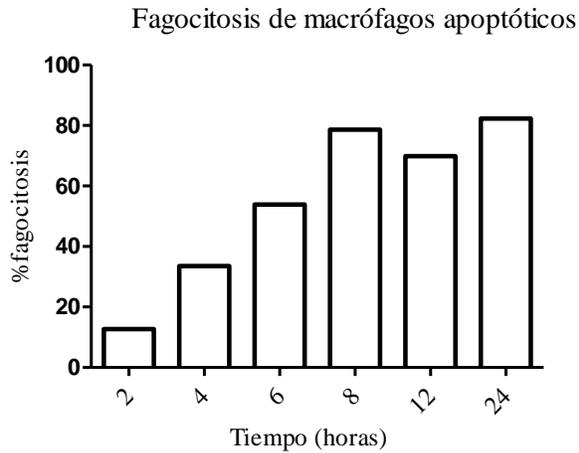
VIII.6. Análisis de la maduración del fagosoma en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos

Nos interesó saber si los macrófagos apoptóticos micobacterianos inhiben la fagocitosis ya que contienen proteínas micobacterianas como se mostró anteriormente, porque se sabe que *M. tuberculosis* bloquea la fusión del fagosoma con el lisosoma a través de glicolipoproteínas [124]. Debido a esto se estudiaron algunas características del fagosoma que contiene cuerpos apoptóticos. Los macrófagos apoptóticos se marcaron con pHrodo-red, un fluorocromo que se excita en un medio ácido (pH 4) característico del fagolisosoma [79]. En un ensayo (Fig. 16 A, C) por epifluorescencia se observaron niveles altos de fagocitosis siendo los macrófagos apoptóticos intensamente fluorescentes (82.3% a las 24 hr) y por citometría de flujo se observó que la fagocitosis era dependiente del tiempo de incubación con los macrófagos apoptóticos y que los índices de fagocitosis eran mayores que los observados con los macrófagos apoptóticos marcados con PKH-26. Por citometría de flujo el mayor porcentaje de fagocitosis se observó a las 24 hr (64.4%), (Fig. 16 B). Las diferencias en los resultados por microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo podrían ser por el número de macrófagos fagocíticos analizados, porque en citometría de flujo se cuentan un mayor número de eventos en comparación con microscopía de epifluorescencia. El análisis por microscopía confocal mostró numerosos cuerpos vesiculares pHrodo positivos (rojo) en la mayoría de las células observadas (verde) (Fig. 16 D).

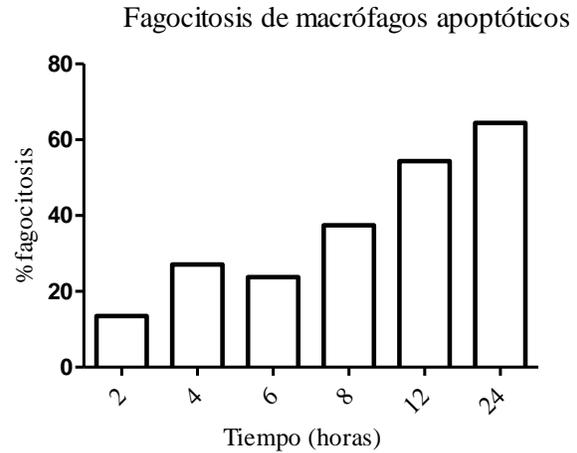
Se estudió la maduración del fagosoma por microscopía de epifluorescencia de los macrófagos apoptóticos con un AcMn anti-Rab5 que reconoce al marcador del fagosoma

temprano [75] y un AcMn anti-Lamp1, el cual reconoce al marcador del fagolisosomal [86]. En 50 células de cinco regiones aleatorias se observaron cuerpos vesiculares Rab5 positivos (Fig. 17 A, B). Además se observaron estructuras semejantes con el anticuerpo anti-Lamp1 (Fig. 17 C, D). Esto significa que en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos hay maduración del fagosoma.

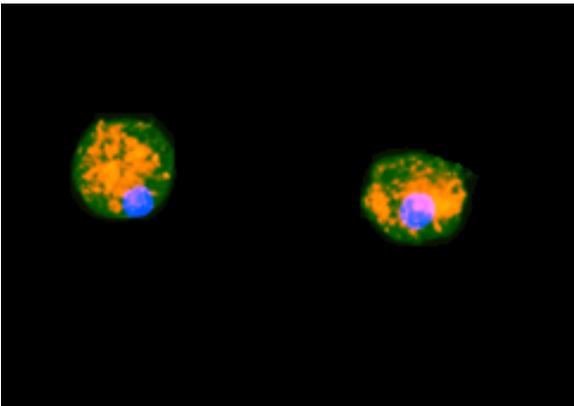
A



B



C



D

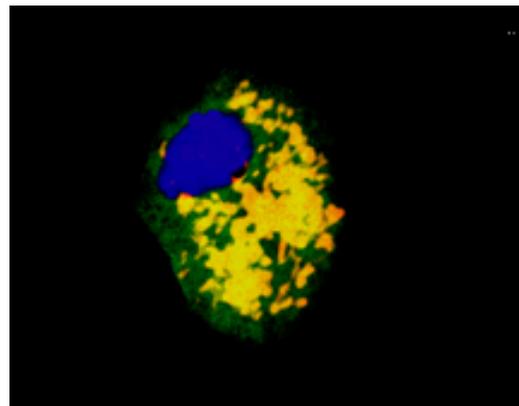


Figura 16. Fagocitosis de macrófagos apoptóticos micobacterianos con pHrodo-red. Se documentó la acidificación del fagosoma en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos inducidos con proteínas micobacterianas. (A) Por microscopía de epifluorescencia, se realizó una cinética de fagocitosis a 2, 4, 6, 8, 12, y 24 hr de incubación, donde se observó que aumenta el porcentaje de macrófagos apoptóticos marcados con pHrodo-red conforme aumenta el tiempo de incubación con los macrófagos fagocíticos con excepción del tiempo 12hr donde no se observa la cinética de incremento probablemente por algún error experimental. (B) Por citometría de flujo se realizó una cinética de la fagocitosis a 2, 4, 6, 8, 12, y 24 hr de incubación, donde se observó que aumentaba el porcentaje de fagocitosis de los macrófagos apoptóticos micobacterianos conforme aumenta el tiempo de incubación. (C, D) En un ensayo por

microscopía confocal se observaron los macrófagos apoptóticos micobacterianos, los cuales emiten una fluorescencia amarilla, ya que resulta de la colocalización de PKH-67 células fagocítica (verde) y pHrodo-red macrófagos apoptóticos micobacterianos (rojo) a las 12hr de incubación. C, x40, D, x100.

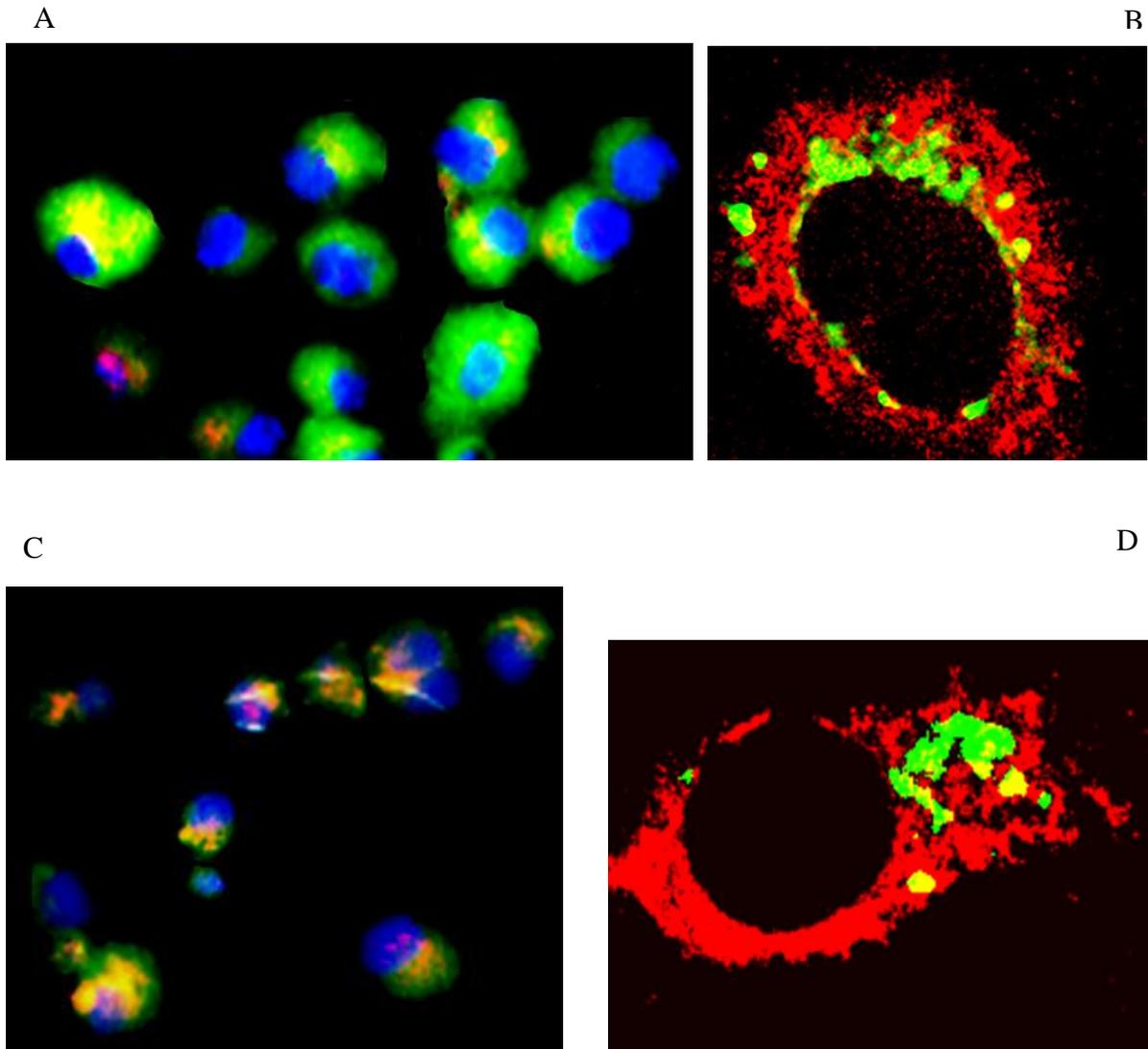


Figura 17. Maduración del fagosoma en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH*. En un ensayo por microscopía de epifluorescencia (A) y confocal (B) se observó colocalización del macrófago apoptótico (1 hr de incubación, verde) con el marcador Rab5 (Cy5, rojo) característico del fagosoma temprano. A x40, B x100. En otro ensayo por microscopía de epifluorescencia (C) y confocal (D) se observó colocalización del macrófago apoptótico (4hr de incubación, verde) con Lamp1 (Cy5, rojo) característico del fagolisosoma. C x40, D x100. Entonces se observa maduración del fagosoma en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos micobacterianos con estos marcadores.

VIII. 7. Expresión del MR en los macrófagos J-774

Para estudiar la expresión del MR en los macrófagos J-774 por microscopía de epifluorescencia se incubaron los macrófagos con un AcMn anti-MR y se utilizó como anticuerpo secundario un anti-IgG-Alexa 488 de ratón (verde). En una cuenta de 100 células en cinco regiones tomadas aleatoriamente se observó 80% de expresión del MR en los macrófagos, observándose un patrón puntiforme en la membrana plasmática (Fig. 18).

Para corroborar lo anterior se realizó un ensayo de inmunoblot; primero se fraccionaron los macrófagos J-774 obteniendo las fracciones citosólica, membranal y nuclear; se transfirieron las fracciones subcelulares de SDS-PAGE al 7.5% a membranas de PVDF incubando toda la noche con un AcMn anti-MR y al siguiente día se incubó la membrana con un anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa por quimioluminiscencia se identificó al MR en las fracciones membranal y citosólica, no siendo así en la fracción nuclear (Fig. 19).

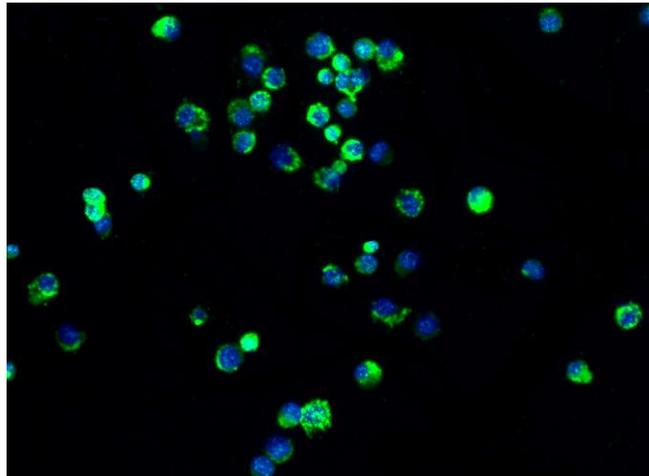


Figura 18. Expresión del MR por microscopía de epifluorescencia. En un ensayo por microscopía de epifluorescencia se observó en esta imagen 87.5% de expresión del MR membranal en los macrófagos J-774 utilizando un AcMn anti-MR y un anticuerpo secundario anti-IgG-Alexa 488 de ratón (verde), los núcleos fueron marcados con Dapi y se observan de color azul, x20.

Inmunoblot incubado con un anti-MR

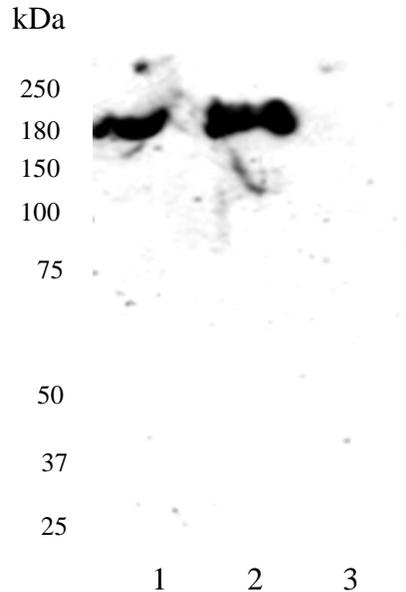


Figura 19. Expresión del MR en macrófagos J-774 en el extracto citosólico y membranal. Por inmunoblot en un ensayo se observó la expresión del MR de los macrófagos fagocíticos utilizando el AcMn anti-MR y como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa; por quimioluminiscencia se observó el MR tanto en la fracción citosólica (1) como en la fracción membranal (2); núcleo (3).

VIII.8. Análisis de inhibición de la fagocitosis con carbohidratos competidores y con anticuerpos en contra del receptor de manosa y LpqH

Para estudiar la participación del MR en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y UV se realizaron cuatro ensayos de inhibición de la fagocitosis preincubando las células 30 min con un AcMn anti-MR bloqueador en contra del MR (5 y 10 μ g) y con los azúcares competidores del MR, GlcNac (50nM) y manana (15.4 nM), se utilizaron estas concentraciones de acuerdo a estudios previos [125]. Por citometría de flujo se observó significativamente 31.9% \pm 3.57 de inhibición con GlcNac y 34.1% \pm 5.91 con manana a 4hr de incubación de los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH, mientras que con los macrófagos apoptóticos por UV se inhibió significativamente 37.9% \pm 4.98 con GlcNac y con manana 37.2% \pm 4.80 (Fig.20). En la inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH a 4hr con el AcMn anti-MR se observó mayor inhibición significativa de la fagocitosis con

10 μ g (52.2% \pm 7.57) que con 5 μ g (39% \pm 6.01) y en la inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por UV se observó 39.1% \pm 6.26 con 10 μ g y con 5 μ g 34.9% \pm 6.08 (Fig. 21). Estos resultados sugieren la participación del MR en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y luz UV. Cabe mencionar que estas inhibiciones son parciales lo que sugiere que participan múltiples receptores en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos.

De acuerdo a los resultados, se sabe que los macrófagos apoptóticos inducidos por *M. smeg-LpqH* contienen antígenos micobacterianos como LpqH y que esta proteína contiene residuos de manosa que podrían ser reconocidos por receptores de tipo lectina como el MR [125]; para estudiar la participación de LpqH se realizaron tres ensayos de inhibición de la fagocitosis utilizando un AcMn anti-LpqH (IT19) donde se obtuvo un 22.7% \pm 9.28 de inhibición de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y no se observó diferencia significativa (Fig. 22). Esto sugiere que la glicolipoproteína apoptogénica LpqH puede ser uno de los múltiples ligandos reconocidos por el MR en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH*.

Fagocitosis de macrófagos apoptóticos incubados con azúcares

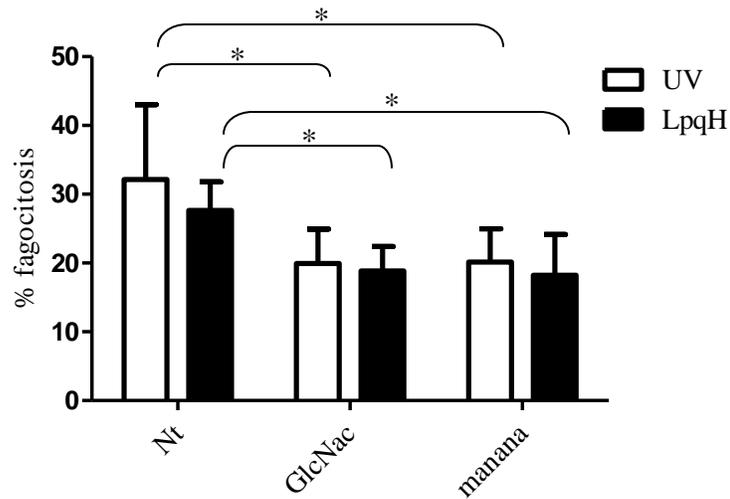


Figura 20. Inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos con azúcares competidores del MR. Por citometría de flujo se observó en cuatro ensayos inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y por UV utilizando GlcNac 50nM y manana 15.4 nM donde se vio significativamente disminuida la fagocitosis de ApMØs por *M. smeg*-LpqH y UV. Las concentraciones utilizadas se obtuvieron de estudios previos [132]. * $p \leq 0.05$.

Fagocitosis de macrófagos apoptóticos incubados con anti-MR

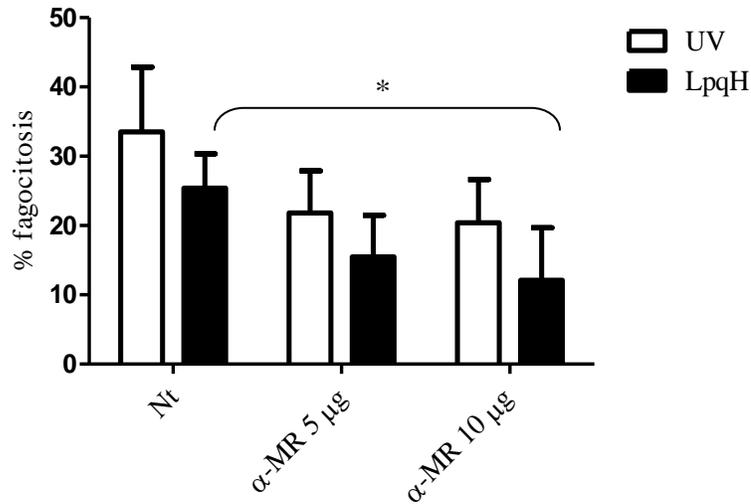


Figura 21. Inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos con un AcMn anti-MR. Por citometría de flujo se observó en cuatro ensayos inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y por UV utilizando un AcMn anti-MR donde se vio significativamente disminuida la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH con 10 µg de AcMn anti-MR. Las concentraciones utilizadas se obtuvieron de estudios previos [132]. * $p \leq 0.05$.

Fagocitosis de macrófagos apoptóticos incubados con anti-LpqH

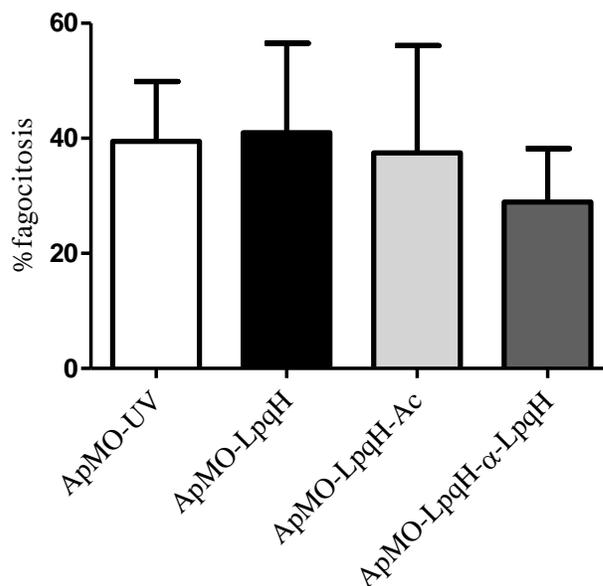


Figura 22. Inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH con un AcMn anti-LpqH. Por citometría de flujo se analizaron tres ensayos de inhibición de la fagocitosis con IT19 (ApMO-LpqH-α-LpqH) y se utilizó un anticuerpo no relacionado como control (ApMO-LpqH-Ac), disminuyendo de 37.3% de fagocitosis control a 28.9% de fagocitosis con IT19, obteniendo 22.7% ± 9.28 de inhibición de la fagocitosis con IT19.

VIII.9. Inhibición de la expresión del MR y de la fagocitosis de macrófagos en células tratadas con siRNA específico para el MR

Para corroborar la participación del MR en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos los macrófagos J-774 se transfectaron con un siRNA específico para el MR, lo que resultó en la inhibición (53.4%±6) de la expresión del MR en relación con los macrófagos tratados con el siRNA control no inhibitorio (Fig. 23). Posteriormente se realizaron ensayos de fagocitosis con células transfectadas con el siRNA para el MR, observándose una disminución del 53.7±0.7% de fagocitosis de los macrófagos por *M. smeg*-LpqH en relación con la fagocitosis tratada con el siRNA no inhibitorio y 22.2±2.7% de inhibición de la fagocitosis con los macrófagos apoptóticos por UV; siendo así la inhibición de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos dependiente de la inhibición de la expresión del MR con el siRNA (Fig. 24).

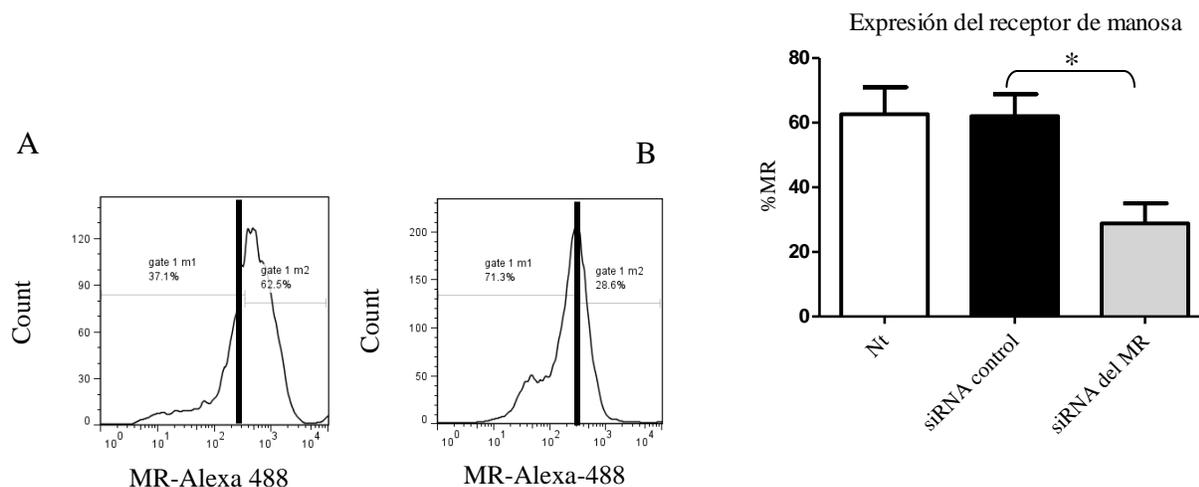


Figura 23. Expresión del MR en macrófagos con siRNA del MR. En tres ensayos por citometría de flujo con el AcMn α -MR y como anticuerpo secundario un α -IgG-Alexa 488 de ratón, se observó inhibición de la expresión del MR utilizando siRNA del MR, en este ensayo representativo observó 62.5% de expresión del MR con el siRNA no inhibitorio, control (A) y 28.6% de expresión del MR con el siRNA del MR (B). (C) En tres ensayos por citometría de flujo se observó significativamente disminuida la expresión del MR membranar con el siRNA del MR (28.8%) con respecto al siRNA no inhibitorio (62%). Nt, células no tratadas (62.6%). * $p \leq 0.05$.

Fagocitosis de macrófagos apoptóticos incubados con siRNA del MR

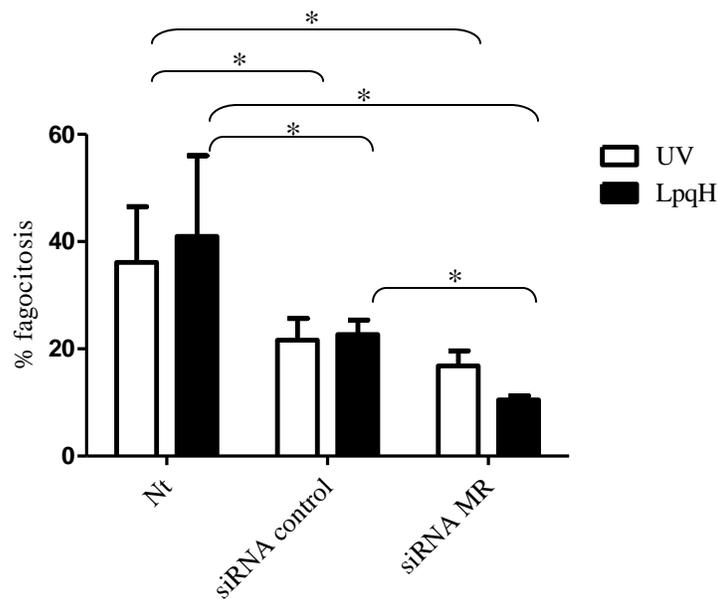


Figura 24. Inhibición de la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por macrófagos transfectados con siRNA específico para el MR. Análisis por citometría de flujo. En tres ensayos se observó que la fagocitosis con células no tratadas (40.9% macrófagos apoptóticos micobacterianos, 36.1% macrófagos apoptóticos por UV) el siRNA no específico redujo la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH* y UV (44.75%; 40.17% respectivamente). De manera interesante el siRNA del MR redujo la fagocitosis en un 53.7% macrófagos micobacterianos y 22.2% macrófagos por UV, en relación con la observada con el siRNA control. $*p \leq 0.05$.

VIII.10. Colocalización del receptor de manosa con los macrófagos apoptóticos

En un ensayo por microscopía confocal examinando múltiples células en el plano ecuatorial se observó la colocalización de cuerpos apoptóticos con el MR. Un ejemplo se muestra en la (Fig. 25) donde se ve una estructura globular que emite fluorescencia amarilla que resulta de la colocalización del AcMn anti-MR Alexa 488 (verde) con los macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* marcados previamente con PKH-26 (rojo), esto sugiere que el MR reconoce células apoptóticas inducidas por extractos celulares micobacterianos como *M. smeg-LpqH*. Hallazgos similares se hicieron utilizando macrófagos apoptóticos inducidos con UV.

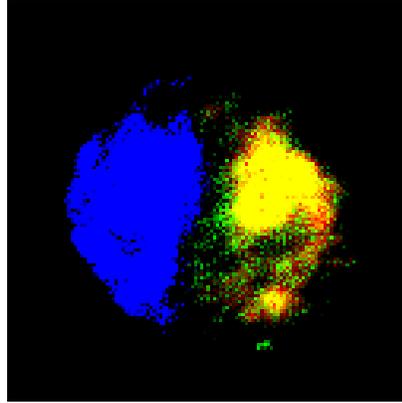


Figura 25. Colocalización del MR con los macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH*. En un ensayo por microscopía confocal se observaron los cuerpos apoptóticos micobacterianos (PKH-26-rojo) dentro de las células fagocíticas colocalizando con el MR (anti-MR-Alexa 488, verde), x40.

VIII.11. Análisis de la producción de citocinas en la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos

Para estudiar la producción de citocinas en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y UV se realizaron cuatro ensayos de ELISA y se midieron dos citocinas anti-inflamatorias TGF- β e IL-10 y dos citocinas pro-inflamatorias IL-12 (Fig. 26 A) y TNF- α (Fig. 26 B) en los sobrenadantes de los ensayos de fagocitosis. Como controles positivos se trataron las células con LPS (20pg) y con los extractos celulares de *M. smeg-LpqH*. En cuatro ensayos se midió (Fig. 26 C) TGF- β liberado en el medio de cultivo a 24 hr por macrófagos cocultivados con macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH* obteniéndose 23718 pg/ml \pm 4816; con macrófagos apoptóticos inducidos con UV se obtuvieron 20174.2 pg/ml \pm 9325. Estas cifras son mucho mayores que las obtenidas al cuantificar IL-10 (270.9 pg/ml \pm 81.24 con macrófagos apoptóticos por *M. smeg-LpqH* y 381.8pg/ml \pm 64.22 con UV) (Fig. 26 D). En cuanto a las citocinas proinflamatorias, no se observó expresión de IL-12, con excepción del control LPS. Algo similar se obtuvo midiendo TNF- α . Estos resultados sugieren que la fagocitosis de

macrófagos apoptóticos induce la producción de citocinas anti-inflamatorias independientemente del inductor de apoptosis.

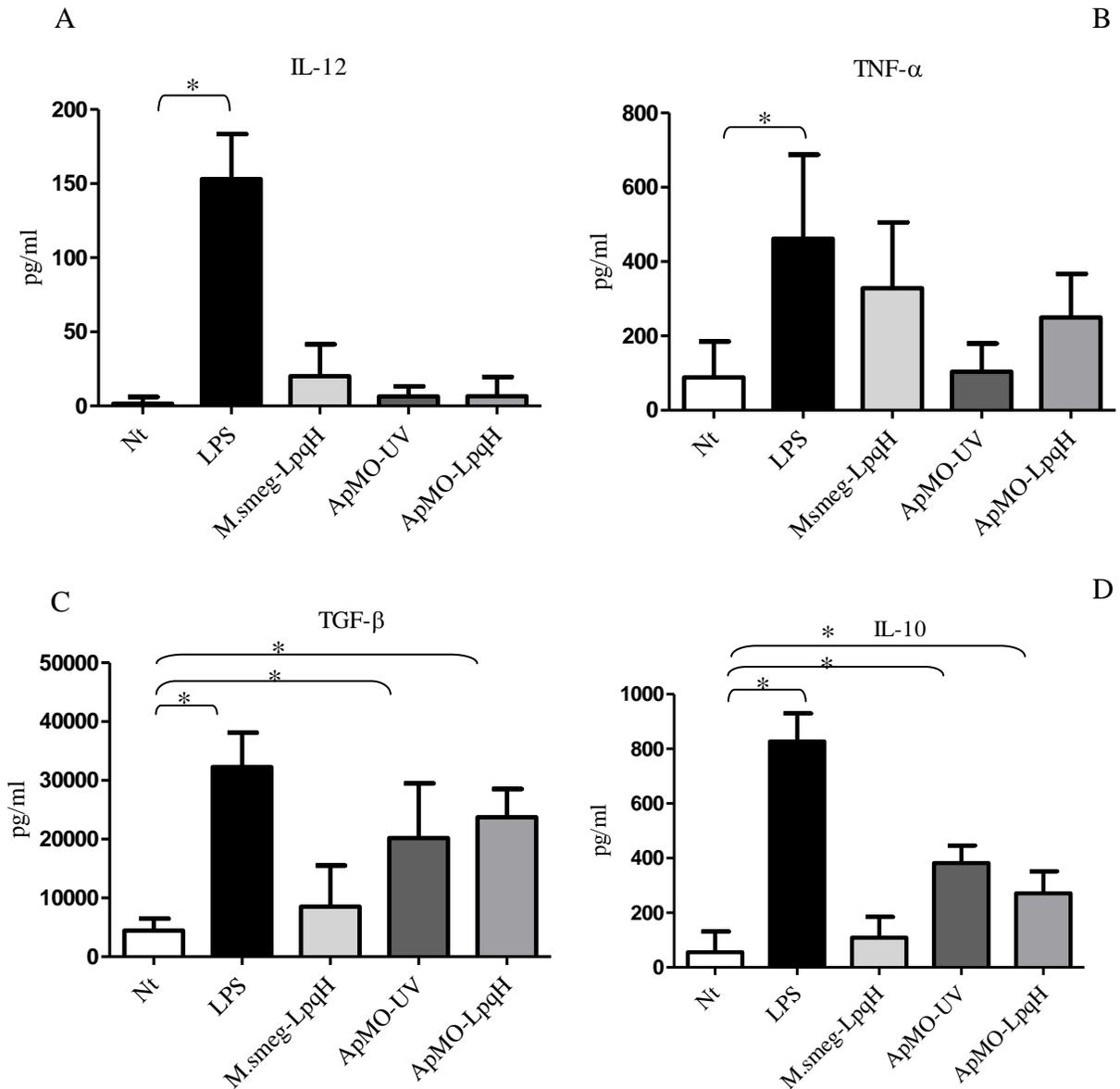


Figura 26. Producción de citocinas en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y UV. Se realizaron cuatro ensayos de fagocitosis de los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y UV a 48 hr de incubación, donde se recolectaron los sobrenadantes y se realizaron ensayos de ELISA. (A) En la producción de la citocina IL-12 a diferencia de lo observado con LPS y con las células no tratadas (Nt) la producción no se incrementó en células que han fagocitado macrófagos apoptóticos o que han sido tratadas con extractos celulares de *M. smeg*-LpqH. (B) En la producción de la citocina TNF- α en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos se observó en comparación con el control no tratado (Nt), un incremento no significativo en la producción de TNF- α con extractos celulares de *M. smeg*-LpqH y con macrófagos apoptóticos inducidos con antígenos micobacterianos; solamente se observó producción de TNF- α con el control LPS. (C) En la producción de la citocina TGF- β en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos se observó en comparación con el control no tratado (Nt), una producción

significativamente mayor de TGF- β con los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y por UV, así como con el control LPS. (D) En la producción de la citocina IL-10 en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos se observó en comparación con el control no tratado (Nt) una producción significativamente mayor de IL-10 con los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH y por UV, así como con el control LPS. * $p \leq 0,05$.

IX. DISCUSIÓN

En esta tesis se demostró que los macrófagos J-774 expresan el MR el cual participa en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos inducidos por extractos celulares de *M. smeg*-LpqH y UV. Esto fue demostrado mediante ensayos de inhibición de la fagocitosis utilizando azúcares competidores del MR, anticuerpos bloqueadores anti-MR y eliminando la expresión del MR con un siRNA específico.

El MR se expresa en macrófagos, la célula principal de la respuesta inmune innata contra bacterias intracelulares [126]. El MR reconoce manosa, fucosa y GlcNac, que se encuentran en la superficie de patógenos como son *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *M. tuberculosis*, *Klebsiella pneumonia*, *Leishmania donovani* y *Trypanozoma cruzi* [127]. Aunque en la literatura se ha cuestionado la participación del MR en la fagocitosis [126, 128], se ha observado que en células no fagocíticas COS-1 transfectadas con el MR adquieren la habilidad de fagocitar levaduras como *P. carinii* [128, 129]. Se ha estudiado la participación del MR en macrófagos J-774 en la fagocitosis de *Francisella tularensis* en ensayos de inhibición de la fagocitosis con un AcMn para el MR [130]. En otros estudios, se documentó la fagocitosis de *P. carinii* no opsonizada a través del MR en ensayos de inhibición de la expresión del MR con siRNA [131]. Además la fagocitosis de *M. tuberculosis* por células THP-1 es inhibida con azúcares competidores del MR, en la ausencia de calcio y con un AcMn para el MR [132]. Como

parte del mecanismo de fagocitosis vía el MR, se ha observado la polimerización de F-actina y la activación de la GTPasas de las proteínas Rho pequeñas [131].

El MR es permisivo a la fagocitosis de *M. tuberculosis* y los macrófagos producen citocinas anti-inflamatorias inhibiendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 y la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) [133-135]. También se ha observado inhibición de la fusión fagolisosomal con microesferas recubiertas con LAM donde se observó al MR [136].

La fagocitosis de patógenos y otras partículas es seguida por una serie de eventos en cadena que culminan con la fusión del fagosoma con el lisosoma. Después de la fagocitosis de partículas el pH intraluminal disminuye de pH 6.5 hasta pH 4.5 cuando ocurre la fusión fagolisosomal. En este punto una variedad de enzimas hidrolíticas son liberadas degradando el material fagocitado. Los bacilos *M. tuberculosis* están contenidos en fagosomas permisivos donde pueden sobrevivir y replicarse. Esta habilidad es atribuida a la capacidad de la micobacteria de bloquear la fusión del fagosoma con el lisosoma [137]. La eliminación de las células apoptóticas infectadas es importante en el control de las infecciones por bacterias intracelulares como en la TB; de acuerdo a estudios de fagocitosis de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* se observa la degradación de cuerpos apoptóticos con bacilos permitiendo el control de la replicación intracelular bacteriana [138].

En este estudio encontramos que los macrófagos apoptóticos inducidos con proteínas micobacterianas contienen a LpqH, una lipoproteína apoptogénica de *M. tuberculosis* (con un AcMn anti-LpqH), por lo tanto estudiamos el estado de maduración de los fagosomas ya que se ha documentado de lipoproteínas como LAM que inhiben la fusión fagolisosomal [136].

Nosotros demostramos que los macrófagos apoptóticos marcados con pHrodo-red adquieren una fluorescencia intensa cuando son fagocitados indicando la fusión de los fagosomas con componentes tardíos de la vía endocítica y los lisosomas [77-86]. En comparación con la abundante información y el esfuerzo de dilucidar las vías fagocíticas, pocos estudios han mostrado la maduración del fagosoma con células apoptóticas fagocitadas [72, 139]. Sin embargo se ha mostrado la acidificación del fagosoma, la fusión fagolisosomal y la activación de Rab5 [78, 140]. En los resultados obtenidos se observó por citometría de flujo, microscopía confocal y de epifluorescencia, la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH* y por luz UV. También se observó la maduración del fagosoma en la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos inducidos con *M. smeg-LpqH*, por medio de un AcMn en contra de los marcadores de maduración Rab-5 y Lamp1 este último es un marcador fagolisosomal.

La apoptosis es primordial durante el desarrollo embrionario y en la vida extrauterina como un mecanismo de control de las poblaciones celulares [16]. Recientemente, se ha estudiado su papel en cáncer, en enfermedades autoinmunes y en enfermedades infecciosas como la TB. En la TB de humanos se ha observado apoptosis de macrófagos en granulomas y en lavados bronquioalveolares de pacientes; así como la expresión de Fas ligando [141]. Es de interés saber si la fagocitosis de macrófagos apoptóticos tiene un impacto en el curso de la inflamación del pulmón por TB. En las enfermedades pulmonares crónicas como la enfermedad obstructiva pulmonaria crónica (COPD), la fibrosis quística y el asma, se ha observado un incremento de células apoptóticas en lesiones pulmonarias y se sugiere que la deficiencia en la fagocitosis de las células muertas podría contribuir a la progresión de la inflamación en estas enfermedades [111, 112].

Durante la década pasada ha habido un incremento en el conocimiento de los mecanismos de eliminación de células apoptóticas. Ahora, es claro que la remoción de las células muertas es un proceso redundante y altamente eficiente en el que participan múltiples sistemas de receptor-ligando. Sin embargo, se ha dado poca atención al papel de los receptores de tipo lectina, a pesar de la exposición de glicanos en la superficie de células apoptóticas. En un estudio pionero Duvall et al [108] muestra que la unión de las células apoptóticas con los macrófagos es inhibida por GlcNac, GlnNac y D-galactosa [108]. Posteriormente, aparecieron reportes que muestran que la apoptosis resulta en cambios en los patrones de glicosilación en la superficie de las células apoptóticas generando ligandos para la vía fagocítica por receptores de tipo lectina. Usando lectinas vegetales, se ha mostrado la exposición anormal de manosa, fucosa y GlcNAc [92]. Además se ha observado que la inducción de apoptosis incrementa la exposición de galactosa en la superficie celular medida por el incremento en la actividad de la neuraminidasa [142]. También el incremento en la expresión de manosa y galactosa en las glicoproteínas es característico de las células apoptóticas de leucemia murina L1210 [143]. Linfocitos apoptóticos periféricos de sangre inducidos por proteínas heat shock y ciclohexamida expresan un incremento en la cantidad de GlcNac, galactosa y manosa los cuales son rápidamente fagocitados por células Kupffer humanas [144]. Recientemente se ha estudiado el papel de los azúcares expuestos en la superficie celular de las células apoptóticas fagocitadas. Se ha mostrado que las células apoptóticas que contienen RE deasialidado inmaduro y residuos de manosa son fagocitadas por macrófagos [145].

Se puede inferir que los receptores tipo lectina participan en la fagocitosis de células apoptóticas por estudios de inhibición de la fagocitosis preincubando las células fagocíticas con cócteles de azúcares que incluyen fucosa, galactosa, GlcNac y manosa. [96, 107, 108]. Los

receptores de tipo lectina en la fagocitosis de células apoptóticas podrían tener un papel importante en la homeostasis de las poblaciones celulares permitiendo la tolerancia inmune a través de la red de citocinas evitando inflamación y daño tisular, y el MR como receptor de tipo lectina genera una respuesta permisiva previniendo daño inflamatorio ya que se ha observado su presencia en sitios estratégicos de eliminación de las células apoptóticas como en los macrófagos de la zona marginal del bazo, en el tejido linfoide y se ha estudiado como un receptor de control de proteínas secretoras en la sangre como hidrolasas lisosomales, mieloperoxidasa, factores de crecimiento, entre otros [126, 146]. Sin embargo, de acuerdo a la inhibición de la fagocitosis obtenida con el siRNA no inhibitorio (control), probablemente la metodología con siRNAs sea citotóxica para los macrófagos pero estos datos sugieren que el MR reconoce residuos de azúcares expuestos por los macrófagos apoptóticos independientemente del agente inductor de apoptosis y probablemente el MR reconozca ligandos micobacterianos expuestos por los macrófagos apoptóticos por *M. smeg*-LpqH debido a que presentan mayor inhibición en la fagocitosis en comparación con los macrófagos apoptóticos por UV utilizando el siRNA del MR.

En este trabajo hemos mostrado que independientemente del factor inductor de la apoptosis la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por macrófagos J-774 induce un programa anti-inflamatorio con la producción de IL-10 y sobre todo de TGF- β la cual es importante en evitar fenómenos de daño tisular en la fagocitosis de las células apoptóticas [114, 115]; porque la participación de TGF- β e IL-10 en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos podría sugerir un mecanismo silencioso de remoción de macrófagos apoptóticos micobacterianos, así como en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos inducidos con UV. En la literatura se ha documentado, que en presencia de células apoptóticas monocíticas las células fagocíticas producen más citocinas anti-inflamatorias como IL-10 que citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-12 [147]. Además, en otros estudios se muestra que la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos produce GM-CSF, IL-1 β , IL-18, IL-10 y eicosanoides la cual fue disminuida, pero la producción de TGF- β 1, PGE2 estaba incrementada [114]. Sin embargo, hay evidencias que

muestran que la apoptosis también puede ser inmunoestimuladora [148-150]. En células apoptóticas se han identificado moléculas con propiedades inmunogénicas, como son las proteínas de choque térmico, antígenos tumorales, calreticulina expuesta en la superficie y la proteína no histona de unión a cromatina (HMGB1) con propiedades adyuvantes que pueden ser liberadas no sólo por células necróticas sino también por células apoptóticas [151]. También se ha mostrado que CD154 expresado por células T apoptóticas se asocia con la respuesta inmune a antígenos en la célula apoptótica [152]. Las células apoptóticas inducen la maduración de células dendríticas a través de la producción de TNF- α y por contacto con TLR4 [110].

Probablemente los carbohidratos de los macrófagos apoptóticos en la fagocitosis participan en remoción de macrófagos apoptóticos, además los receptores de tipo lectina como el MR podrían reconocer macrófagos apoptóticos a través de sus dominios conservados de reconocimiento de carbohidratos. También de acuerdo a los resultados obtenidos la fagocitosis de macrófagos apoptóticos donde podría participar el MR, es independiente del agente inductor de apoptosis como luz UV (control no biológico) y la bacteria *M. smeg-LpqH*, bajo un mecanismo silencioso donde participan las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β .

X. CONCLUSIONES

- Los extractos celulares de *M. smegmatis* transformada que expresa LpqH, la lipoproteína apoptogénica de *M. tuberculosis* inducen apoptosis a macrófagos derivados de médula ósea de ratones de la cepa Balbc/J.
- Los macrófagos apoptóticos inducidos con extractos celulares de *M. smegmatis* transformada contienen antígenos micobacterianos como LpqH.
- La maduración del fagosoma en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos inducidos por proteínas micobacterianas fue observada.
- Independientemente del tipo de inductor de apoptosis utilizado, los macrófagos apoptóticos son fagocitados probablemente por la vía del MR.
- Hubo producción de citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β , y no hubo producción de citocinas pro-inflamatorias IL-12 y TNF- α en la fagocitosis de macrófagos apoptóticos.

XI. PERSPECTIVAS

- Para estudiar los carbohidratos que participan como ligandos en la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos, se realizarán ensayos de inmunoprecipitación con lectinas que reconozcan los ligandos del MR, los cuales son GlcNac, manosa y fucosa.
- Para estudiar la maduración de la fagocitosis de los macrófagos apoptóticos, se realizarán cinéticas de fagocitosis con AcMn de los marcadores de maduración Rab5 y Lamp1.
- Para estudiar la relación del MR con los marcadores de maduración de la fagocitosis, se realizarán cinéticas de fagocitosis con los AcMn para el MR, Rab-5 y Lamp1.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Smith N. H., Hewinson R.G., Kristin Kremer K., Brosch R., Gordon S.V. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*. 2009. 7: 537-544.
2. WHO. Global TB control report 2013. www.who.int/tb/publications/global_report/2013
3. Iwai K., Maeda S., Murase Y. Archaeology of tubercle bacilli and tuberculosis. 2010. 85: 465-475.
4. Robert Koch." *World of Microbiology and Immunology*. Ed. Brenda Wilmoth Lerner and K. Lee Lerner. 2006. *Biography in Context*. Web.
5. Atun R., Weil D.E.C., Eang M. T., Mwakyusa D. Health-system strengthening and tuberculosis control. *Tuberculosis*. 2010. 375: 2169-2178.
6. Brodin P., Majlessi L., Brosch R., Smith D., Bancroft G., Clark S., Williams A., Leclerc C., Cole S. T. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant *Mycobacterium microti* vaccine that induces T cell immunity against region of difference 1 antigens. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004. 190: 115–122.
7. Roche P. W., James A., Triccas J. A., Winter N. BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes. *Elsevier Science*. 1995. 3: 397-400.
8. Xing Z., Charters T.J. Heterologous boost vaccines for bacillus Calmette-Guérin prime immunization against tuberculosis. *Expert Review of Vaccines*. 2007. 6: 539-546.
9. Cox G.L. Sanatorium treatment contrasted with home treatment. After-histories of 4067 cases. *British Journal of Tuberculosis*. 1923. 17: 27-30.

10. Vrba A., Kwiatkowska S. *Mycobacterium tuberculosis*--intracellular pathogen. Relationship between mycobacteria and the host. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009. 27: 508-513.
11. Veyrier F. J., Dufort A., Behr M. A. The rise and fall of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Trends in Microbiology*. 2011. 19: 156-161.
12. Gothi, G.D. Natural history of tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis*. 1997. 25: 1-13.
13. Kang P.B., Azad A.K., Torrelles J.B., Kaufman T.M., Beharka A., Tibesar E., DesJardin L.E., Schlesinger L.S. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005. 202: 987-99.
14. Berrington W. R., Hawn T. R. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunological Reviews*. 2007. 219: 167-186.
15. Sasindran S. J., Torrelles J. B. *Mycobacterium tuberculosis* infection and inflammation: what is beneficial for the host and for the bacterium?. *Frontiers in Microbiology*. 2011. 2: 1-16.
16. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972. 26: 239–257.
17. Kerr J.F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 2002. 181: 471–474.

18. Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G.E., Capaccioli S., Orlandini S.Z. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology*. 2000. 182: 41–49.
19. Sperandio S., Belle I., Bredesen D.E. An alternative, non- apoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000. 97: 14376–14381.
20. Igney F.H., Krammer P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*. 2002. 2: 277–288.
21. Nijhawan D., Honarpour N., Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annual Review of Neuroscience*. 2000. 23: 73–87.
22. Lee J., Hartman M., Kornfeld H. Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei Medical Journal*. 2009. 50: 1-11.
23. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000. 407: 770–776.
24. Opferman J.T., Korsmeyer S.J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology*. 2003. 4: 410–415.
25. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998. 281: 1305–1308.
26. Chicheportiche Y., Bourdon P.R., Xu H., Hsu Y.M., Scott H., Hession C., Garcia I., Browning J.L. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that

- weakly induces apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997. 272: 32401–32410.
27. Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995. 81: 495–504.
28. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002. 296: 1635–1636.
29. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Kramer P.H., Peter M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo Journal*. 1995. 14: 5579–5588.
30. Kataoka T., Schroter M., Hahne M., Schneider P., Irmeler M., Thome M., Froelich C.J., Tschopp J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *The Journal of Immunology*. 1998. 161: 3936–3942.
31. Lopez M., Sly M. L., Luu Y., Young D., Cooper H., Reiner N.E. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *The Journal of Immunology*. 2003. 170: 2409-2416.
32. Saelens X., Festjens N., Walle L. V., van Gurp M., van Loo G., Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004. 23: 2861–2874.
33. Chinnaiyan A.M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*. 1999. 1: 5–15.

34. Hill M.M., Adrain C., Duriez P.J., Creagh E.M., Martin S.J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *European Molecular Biology Organization Journal*. 2004. 23: 2134–2145.
35. Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y., Ravagnan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y.Y., Mak T.W., Zuniga- Pflucker J.C., Kroemer G., Penninger J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001. 410: 549–554.
36. Cory S., Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*. 2002. 2: 647–656.
37. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007. 35: 495–516.
38. Rai N.K., Tripathi K., Sharma D., Shukla V.K. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2005. 4: 138–144.
39. Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. 1997. 326: 1–16.
40. Keane J., Balcewicz-Sablinska M.K., Remold H.G., Chupp G.L., Meek B.B., Fenton M.J., et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infection and Immunity*. 1997. 65: 298-304.

41. Sanchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009. 69: 20-28.
42. Ciaramella A., Martino A., Cicconi R., Colizzi V., Fraziano M. Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection. *Cell Death and Differentiation*. 2000. 7: 1270–1272.
43. Derrick S.C., Morris S.L. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology*. 2007. 9: 1547–1555.
44. Miller JL, Velmurugan K, Cowan MJ, Briken V. The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF-alpha-mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathogens*. 2010. 6: 1-14.
45. Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*. 1998. 160: 5448-5454.
46. Hinchey J., Lee S., Jeon B.Y., Basaraba R.J., Venkataswamy M. M., Chen B., Chan J., Braunstein M., Orme I.M., Derrick S.C., Morris S.L., Jacobs Jr W.R., Porcelli S. A. Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007. 117: 2279-2288.

47. Velmurugan K., Chen B, Miller J.L., Azogue S., Gurses S., Hsu T., Glickman M., Jacobs Jr W.R., Porcelli S.T., Briken V. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. PLoS Pathogens. 2007. 3: 972-980.
48. Klinger K., Kam-Meng Tchou-Wong, Brändli O., Aston C., Kim R., Chuanxiang C., Rom W. N. Effects of Mycobacteria on Regulation of Apoptosis in Mononuclear Phagocytes. Infection and Immunity. 1997. 65: 5272–5278.
49. Fratazzi, C., Arbeit, R.D., Carini, C., and Remold, H.G. Programmed cell death of Mycobacterium avium serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. The Journal of Immunology. 1997. 158. 4320–4327.
50. Winau F., Weber S., Subash S., Juana de Diego, Locatelli H. S., Breiden B., Sandhoff K., Volker B., Kaufmann H.E.S., Schaible U.E. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. Immunity. 2006. 24: 105–117.
51. Kinchen, J. M., Ravichandran, K.S. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. Nature. 2010. 464. 778-782.
52. Poon I. K. H., Lucas C.D., Rossi A. G., Ravichandran K.S. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nature Reviews Immunology. 2014. 166-180.
53. Brown, S., Heinisch I., Ross E., Shaw K., Buckley C. D., Savill J. Apoptosis disables CD31 mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. Nature. 2002. 418: 200-203.

54. Elward, K., Griffiths M., Mizuno M., Harris C. L., Neal J. W., Morgan B. P., Gasque P. CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280: 36342-36354.
55. Nilsson A., Oldenborg P. A. CD47 promotes both phosphatidylserine-independent and phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic murine thymocytes by non-activated macrophages. *Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009. 387: 58-63.
56. Poon I.K.H., Hulett M. D., Parish C.R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death and Differentiation*. 2010. 17: 381–397.
57. Elliott, M. R., Chekeni F. B., Trampont P. C., Lazarowski E. R., Kadl A., Walk S. F., Park D., Woodson R. I., Ostankovich M., Sharma P., Lysiak J. J., Harden T.K., Leitinger N., Ravichandran K. S. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 2009. 461: 282-286.
58. Chekeni, F. B., Elliott M. R., Sandilos J. K., Walk S. F., Kinchen J. M., Lazarowski E. R., Armstrong A. J., Penuela S., Laird D. W., Salvesen G. S., Isakson B. E., Bayliss D. A., Ravichandran K. S. Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*. 2010. 467: 863-867.
59. Lauber, K., Bohn E., Kröber S. M., Xiao Y. J., Blumenthal S. G., Lindemann R. K., Marini P., Wiedig C., Zobywalski A., Baksh S., Xu Y., Autenrieth I. B., Schulze-Osthoff K., Belka C., Stuhler G., Wesselborg S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*. 2003. 113: 717-730.

60. Gude, D. R., Alvarez S. E., Paugh S. W., Mitra P., Yu J., Griffiths R., Barbour S. E., Milstien S., Spiegel S. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. *The FASEB Journal*. 2008. 22: 2629–2638.
61. Devitt, A., Parker K. G., Ogden C. A., Oldreive C., Clay M. F., Melville L. A., Bellamy C. O., Lacy-Hulbert A., Gangloff S. C., Goyert S. M., Gregory C. D. Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14^{-/-} mice. *The Journal of Cell Biology*. 2004. 167: 1161–1170.
62. Moffatt, O. D., Devitt, A., Bell, E. D., Simmons, D. L. & Gregory, C. D. Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. *The Journal of Immunology*. 1999. 162: 6800-6810.
63. Truman, L. A. Ford C. A., Pasikowska M., Pound J. D., Wilkinson S. J., Dumitriu I. E., Melville L., Melrose L. A., Ogden C. A., Nibbs R., Graham G., Combadiere C., Gregory C. D. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*. 2008. 112: 5026-5036.
64. Knies, U. E., Behrendorf H. A., Mitchell C. A., Deutsch U., Risau W., Drexler H. C., Clauss M. Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. 95: 12322-12327.
65. Blume K. E., Soeroes S., Keppeler H., Stevanovic S., Kretschmer D., Rautenberg M., Wesselborg S., Lauber K. Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary

- necrosis generates a monocytic “find-me” signal. *The Journal of Immunology*. 2012. 188: 135-145.
66. Miyanishi M., Tada K., Koike M., Uchiyama Y., Kitamura T., Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. 2007. 450: 435-439.
67. Park D., Tosello-Tramont AC., Elliot MR., Lu M., Haney LB., Ma Z., Klibanov AL., Mandell J.W., Ravichandran KS. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*. 2007. 450: 430-434.
68. Erwig, L.P., Henson P.M. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *The American Journal of Pathology*. 2007. 171: 2–8.
69. Devitt A., Marshall LJ. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *Journal of Leucocyte Biology*. 2011. 90: 447-457.
70. Sato H., Azuma Y., Higai K., Matsumoto K. Altered expression of glycoproteins on the cell surface of Jurkat cells during etoposide-induced apoptosis. Shedding and intracellular translocation of glycoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. 1790: 1198-1205.
71. Gregory CD., Devitt A. CD 14 and apoptosis. *Apoptosis*. 1999. 4: 11-20.
72. Odaka C, Mizuochi T. Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells. *The Journal of Immunology*. 1999. 163: 5346–5352.
73. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009. 10: 513-525.

74. Bucci, C., Parton R G., Mather I.H., Stunnerberg H., Simons K., Hoflack B. The small GTPase rab5 functions as regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*. 1992. 70: 715-728.
75. Gorvel JP., Chavrier P., Zerial M., Gruenberg J. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*. 1991. 64: 915-925.
76. Yu X., Odera S., Chuang C.H., Lu N., Zhou Z. *C. elegans* Dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Cell*. 2006. 10: 743-757.
77. Kinchen J.M. Ravichandran K.S. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008. 9: 781-795.
78. Kitano M., Nakaya M., Nakamura T., Nagata S., Marsuda M. Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature*. 2008. 453: 241-245.
79. Christoforidis S., Miaczynska M., Ashman K., Wilm M., Zhao L., Yip S.C. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. 1999. *Nature Cell Biology*. 1: 249-252.
80. Murray J.T., Panaretou C., Stenmark H., Miaczynska M., Backer J.M. Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic*. 2002. 3: 416-427.
81. Shin H. W., Hayashi M., Christoforidis S., Lacas-Gervais S., Hoepfner S., Wenk M.R., et al. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *The Journal of Cell Biology*. 2005. 170: 607-618.

82. Guo P., Hu T., Zhang J., Jiang S., Wang X. Sequential action of *Caenorhabditis elegans* Rab GTPases regulates phagolysosome formation during apoptotic cell degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. 107: 18016-18021.
83. He B., Yu X., Margolis M., Liu X., Leng X., Etzion Y., Zheng F., Lu N., Quioco FA., Danino D., Zhuo Z. Live-cell imaging in *Caenorhabditis elegans* reveals the distinct roles of dynamin self-assembly and guanoside triphosphate hydrolysis in the removal of apoptotic cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2010. 21: 610-629.
84. Mangahas PM., Yu X., Miller KG., Zhou Z. The small GTPase Rab2 functions in the removal of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology*. 2008. 180: 357-373.
85. Yu X., Lu N. Zhou Z. Phagocytic receptor Ced-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells. *PLoS Biology*. 2008. 6: e61.
86. Magarian Blander, Medzhitov Ruslan. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*. 2006. 440: 808-812.
87. Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nature Medicine*. 1990. 5: 1249-1255.
88. Sauter B., Albert M. L., Francisco L., Larsson M., Somersan S., Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000. 191: 423-434.

89. Bilyy R., Kit Y., Hellman U., Tryndyak V., Kaminsky V., Stoika R. In vivo expression and characteristics of novel a-D-mannose-rich glycoprotein markers of apoptotic cells. *Cell Biology International*. 2005. 29: 920-928.
90. Savill J., Dransfield I., Gregory C., Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2002. 2: 965-975.
91. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1991. 139: 271–279.
92. Franz S., Herrmann K., Frey B., Sheriff A., Gaipf U.S., Voll R.E., Beer A., Kalden J.R., Jäck H.M., Herrmann M. Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *International Society for Analytical Cytology*. 2006. 69: 230-239.
93. Franz S., Herrmann K., Führrohr B., Sheriff A., Frey B., Gaipf U.S., Voll R.E., Kalden J.R., Jäck H.M., Herrmann M. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death and Differentiation*. 2007. 14: 733–742.
94. Chionna A, Panzarini E, Pagliara P, De Luca A, Caforio S, Abbro L, Dini L. Hepatic clearance of apoptotic lymphocytes: simply removal of waste cells?. *European Journal of Histochemistry*. 2003. 47: 97–104.

95. Kuraya M, Ming Z, Liu X, Matsushita M, Fujita T. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology*. 2005. 209: 689–697.
96. Falasca L, A. Bergamini, A. Serafino, C. Balabaud, L. Dini, Human Kupffer cell recognition and phagocytosis of apoptotic peripheral blood lymphocytes. *Experimental Cell Research*. 1996. 224: 152–162.
97. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001. 194: 781–795.
98. Eda S., Yamanaka M., Beppu M. Carbohydrate-mediated phagocytic recognition of early apoptotic cells undergoing transient capping of CD43 glycoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 2004. 279: 5967–5974.
99. Beppu M., Eda, S., Fujimaki, M., Hishiyama, E., and Kikugawa, K. Recognition of poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains on iron-oxidized erythrocytes by human monocytic leukemia cell line THP-1 differentiated into macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1996. 19: 188-194.
100. Beppu M., Yokoyama, N., Motohashi, M., and Kikugawa, K. Poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains of band 3 as determinants for anti-band 3 autoantibody binding to senescent and oxidized erythrocytes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2001. 24: 19-26.

101. Beppu M., Ando, K., Saeki, M., Yokoyama, N., and Kikugawa, K. Binding of oxidized Jurkat cells to THP-1 macrophages and anti-band 3 IgG through sialylated poly-N-acetyllactosaminyl sugar chains. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000. 384: 368-374.
102. Beppu M., Mizukami, A., Ando, K., and Kikugawa, K. Antigenic determinants of senescent antigen of human erythrocytes are located in sialylated carbohydrate chains of Band 3 glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992. 267: 14691-014696.
103. Beppu M., Mizukami, A., Nagoya, M., and Kikugawa, K. Modification of glycophorin A during oxidation of erythrocyte membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990. 265: 3226-3233.
104. Ando K., Kikugawa, K., and Beppu, M. Involvement of sialylated poly-N-acetyllactosaminyl sugar chains of band 3 glycoprotein on senescent erythrocytes in anti-band 3 autoantibody binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994. 269. 19394-19398.
105. Beppu M., Ando, K., and Kikugawa, K. Poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains of band 3 as determinants for anti-band 3 autoantibody binding to senescent and oxidized erythrocytes. *Cellular and Molecular Biology*. 1996. 42: 1007-1024.
106. Ando K., Kikugawa, K., and Beppu, M. Induction of band 3 aggregation in erythrocytes results in anti-band 3 autoantibody binding to the carbohydrate epitopes of band 3. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997. 339: 250-257.

107. Hall S.E., Savill J.S., Henson P.M., Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *The Journal of Immunology*. 1994. 153: 3218-3227.
108. Duvall E., Wyllie A.H., Morris R.G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 1985. 56: 351–358.
109. Shrimpton R. E., Butler M., Morel A. S., Eren E., Hue S. S., Ritter M. A. CD205 (DEC-205): A recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Molecular Immunology*. 2009. 46: 1229-1239.
110. Pathak S.K., Skold A.E., Mohanram V., Persson C., Johansson U., Spetz A.L. Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and β 2 integrins. *The Journal of biological chemistry*. 2012. 287: 13731-13742.
111. Hodge S., Hodges G., Scicchitano R., Reynolds P. N., Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease is deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunology and Cell Biology*. 2003. 81: 289-296.
112. Hodge S., Hodge G., Jersmann H., Matthews G., Ahern J., Holmes M., Reynolds P.N. Azithromycin improves macrophage phagocytic function and expression of mannose

- receptor in COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008. 178: 139-148.
113. Prabagar MG, Do Y, Ryu S, Park J-K, Choi H-J, Yun TJ, Moon J, Choi I-S, Ko K, Ko K, Youn shin C, Cheong C, Kang Y-S. SIGN-R1, a C-type lectin, enhances apoptotic cell clearance through the complement deposition pathway by interacting with C1q in the spleen. *Cell Death and Differentiation*. 2012. 1: 1-11.
114. Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A., Freed P. W., Westcott J. Y., Henson P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998. 101: 890-898.
115. Voll R.E., Hermann M., Roth E.A., Stach C., Kalden J. R., Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells that have captured apoptotic cells. *Nature*. 1997. 390: 350-351.
116. Steinman R.M., Turley S., Mellaman I., Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000. 191: 411-416.
117. Kim S., Elkon K.M., Ma X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*. 2004. 21: 643-653.
118. Fernandez-Boyanapalli, R., McPhillips, K.A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Dinauer, M. C., Riches, D. W. Henson, P. M., Byrne, A. Bratton, D. L. Impaired phagocytosis of

- apoptotic cells by macrophages in chronic granulomatous disease is reversed by INF- γ in a nitric oxide-dependent manner. *The Journal of Immunology*. 2010. 185: 4030-4041.
119. Peng, Y., Elkon, K. B. Autoimmunity in MFG-E8 deficient mice is associated with altered trafficking and enhanced cross-presentation of apoptotic cell antigens. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011. 121: 2221-2241.
120. Wei X., Roos A., Schlagwein N., Woltman AM., Daha MR., van Kooten C. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *BLOOD Journal*. 2006. 107: 4930-4937.
121. García Aguilar TC. Fagocitosis de macrófagos muertos en apoptosis inducida por la glicolipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis*. Facultad de Ciencias, UNAM. 2012. 73p.
122. 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., Fraziano M. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 β by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of Mycobacterial infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004. 190: 1167–76.
123. Pellicciari C, Bottone MG, Biggiogera M. Detection of apoptotic cells by annexin V labeling at electron microscopy. 1997. *European Journal of Histochemistry*. 41: 211–216.
124. Fratti R.A., Chua J., Vergne I., Deretic V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2003. 100: 5437-5442.

125. Díaz-Silvestre H., Espinosa-Cueto P., Sanchez-Gonzalez A., Esparza-Ceron M.A., Pereira-Suarez A.L., Bernal-Fernandez G., Espitia C., Mancilla R. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microbial Pathogenesis*. 2005. 39: 97-107.
126. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 2012. 92: 1177-1186.
127. Allavena P., Chieppa M., Monti P., Piemonti L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Critical Reviews in Immunology*. 2004. 24: 179-192.
128. Le Cabec V., Emorine L.J., Toesca I., Cougoule C., Maridonneau-Parini I. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005. 77: 934-943.
129. Ezekowitz R.A., Sastry K., Bailly P., Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1990. 172: 1785-1794.
130. Ezekowitz R.A., Williams D.J., Koziel H., Armstrong MY., Warner A., Richards FF., Rose RM. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*. 1991. 351: 155-158.
131. Albert M.L., Pearce,S.F., Francisco L.M., Sauter B., Roy P., Silverstein R.L., Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and

- cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 1988. 188: 1359-1368.
132. Dalgaard J., Beckstrom K.J., Jahnsen FL., Brinchmann JE. Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005. 77: 689-698.
133. Sharpe A.H., Freeman G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology*. 2002. 2: 116-126.
134. Astarie-Dequeker C., N'Diaye E.N., Le C.V., Rittig MG, Prandi J., Maridonneau-Parini I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infection and Immunity*. 1999. 67: 469-477.
135. Nigou J., Zelle-Rieser C., Gilleron M., Thurnher M., Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *The Journal of Immunology*. 2001. 166: 7477-7485.
136. Chieppa M., Bianchi G., Doni A., Del Prete A., Sironi M., Laskarin G., Monti P., Piemonti L., Mantovani A., Introna M., Allavena P. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *The Journal of Immunology*. 2003. 171: 4552-4560.
137. Kang PB., Azad AK., Torrelles JB., Kaufman TM., Beharka A., Tibesar E., Desjardin LE., Schlesinger LS. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium*

- tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005. 202: 987-999.
138. Martin C., Booty M., Rosebrock T., Nunes-Alves C., Desjardins D., Keren I., M. Fortune S., Remold H., Behar S. Efferocytosis Is an Innate Antibacterial Mechanism. *Cell Host and Microbe*. 2012. 12: 289–300.
139. Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P.H., Chakraborty P., Haddix P.L., Collins H.L., Fok A.K., Allen R.D., SGluck S.L., Heuser J, Russell D.G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 1994. 263: 678–681.
140. Aziz M., Yang W.L., Wang P. Measurement of phagocytic engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *Current Protocols in Immunology*. 2013. 14: 14.31.
141. Mustafa T., Bjune T.G., Jonsson R., Pando R.H., Nilsen R. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2001. 54: 630–639.
142. McCubbrey A.L., Curtis J.L. Efferocytosis and lung diseases. *Chest*. 2013. 143: 1750-7.
143. Torrelles J.B., Azad A.K., Henning L.N., Carlson T.K., Schlesinger L.S. Role of C-type lectins in mycobacterial infections. *Current Cancer Drug Targets*. 2008. 9: 102-112.

144. Espitia C, Mancilla R. Identification, isolation and partial characterization of Mycobacterium tuberculosis glycoprotein antigens. *Clinical and Experimental Immunology*. 1989. 77: 378-383.
145. Zanetta, J. P., Timmerman, P., Leroy, Y. Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutirate derivatives of O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology*. 1999. 9: 255-266.
146. Bilyy R.O., Shkandina T., Tomin A., Muñoz L.E., Franz S., Antonyuk V., Kit Y.Y., Zirngibl M., Fürnrohr B.G., Janko C., Lauber K., Schiller M., Schett G., Stoika R.S., Herrmann M. Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012. 287: 496-503.
147. Balboa L., Romero M.M., Laborde E., Sabio Y.G.C., Basile J.I., Schierloh P., Yokobori N., Musella R.M., Castagnino J.B.S., Sasiain M.C., Aleman M. Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAPK. *European Journal of Immunology*. 2013. 43: 335-347.
148. Groger M., Holnthoner W., Maurer D., Lechleitner S., Wolff K., Mayr B. B., Lubitz W., Petzelbauer P. Dermal microvascular endothelial cells express the 180-kDa macrophage mannose receptor in situ and in vitro. *The Journal of Immunology*. 2000. 165: 5428–5434.

149. Feng H., Zeng, Y., Graner M.W., Katsanis E. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *BLOOD Journal*. 2002. 100: 4108-4115.
150. Inaba K., Turley S., Yamaide F., Iyoda T., Mahnke K., Inaba M., Pack M., Subklewe M., Sauter B., Sheff D., Albert M., Bhardwaj N., Mellman I., Steinman R.M. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998. 188: 2163-2173.
151. Kono H., K.L., Rock K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*. 2008. 8: 279-289.
152. Gurung,P., Kucaba T.A., Ferguson T.A., Griffith T.S. Activation-induced CD154 expression abrogates tolerance induced by apoptotic cells. *The Journal of Immunology*. 2009. 183: 6114-6123.