



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

Detección de proteínas con actividad antimicrobiana en macrófagos humanos estimulados con Tri-DAP y loperamida en un contexto de infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

Paola Varimmia Jiménez Flores

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL

MÉXICO, D.F.

2017





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.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Este éxito es dedicado a Dios, a mi madre la virgen María y a todos aquellos que desde el cielo colaboraron.

A mi mamá Maribel y mi papá Mauricio, los amores de mi vida, quienes desde el día que aceptaron darme la oportunidad de vivir han dedicado su vida entera en hacerme feliz y un buen ser humano. Es de ellos esté triunfo y es a ellos a quien primeramente se les debe felicitar por este logro pues yo solo soy fruto de los excelentes padres que han sido.

De aquí en adelante el orden de las dedicatorias no tiene que ver con que sean más o menos queridas.

A mi abuela Paula Olivares, mi segunda madre y Leonardo Flores mi más grande ángel guardián.

A mi abuela Elvia Arriaga quien siempre se ha preocupado por mí y me ha impulsado en mi superación profesional. A mi abuelo Raúl Jiménez quien con sus palabras, consejos y cariño ha hecho de mí una mejor persona. Los quiero mucho.

A mis guías espirituales, mi padrino y padre Oscar, padre Franklin, padre Joshio y los seminaristas Iván y Cristián. A Luis Bonilla quién con sus consejos y amor de Dios me ha guiado. Al padre Paco quien desde el cielo sigue cuidando mi vida espiritual.

A mi mejor amiga Andrea Flores, que desde hace más de 10 años ha caminado a mi lado, me ha sostenido y levantado, una mujer que es ejemplo de fuerza, independencia, sencillez y ternura.

A mi mejor amigo Irvin Morales, que desde hace 10 años se ha convertido en mi hermano, a quien admiro por su sinceridad, su madurez y fortaleza.

A mis primos-tíos, Adriana, Roberto, Adrián, Sandro, Sandy e Israel. Gracias por su amor, regaños consejos y apoyo para poder terminar.

A mi familia Méndez Flores, mi familia Romero Emigdio que con su cariño, motivación, apoyo incondicional y su alegría me han fortalecido para concluir esta etapa.

A mis tíos, Maribel Jiménez, Ubaldo Jiménez, Emma Domínguez, Selene Jiménez, Leonel Rosas, Silvia Flores, Héctor Flores, Hortencia Romero, etc. que me han brindado su apoyo incondicional.

A mi hermano Mauricio y a mis primos Derek, Lineth, Libertad, Luis, etc. por siempre mis bebés y hermanos. A Fergie la niña de mi corazón gracias por tu apoyo, motivación y cariño.

A Juventino, Mariana y Karen Meléndez gracias por su apoyo y cariño, que orgullo decir que son parte de mi familia.

A mis padrinos Mario Ortiz, Tania Siglinde y a la maestra Lulú, gracias por su amor, su apoyo y por creer en mí. Los quiero mucho.

A Margarita Zuñiga y Ulises Bernal que me ha brindado su amor, sus consejos, su apoyo, su confianza y que no han dejado de motivarme para continuar en cada meta y sueño, los quiero mucho. A Marco Antonio Bernal Zuñiga, aunque no estuviste desde el inicio de este sueño si no desde la mitad te convertiste en un pilar en mi vida ya que con tu fuerza, paciencia, amor, tolerancia, confianza, apoyo, comprensión, motivación y bondad hiciste este camino más fácil, gracias mi amor y gracias a Dios por habernos reencontrado después de tanto años.

A mis amigas, Itzel Beltrán quien se ha convertido en una hermana a quien agradezco darme todos los días palabras de aliento y que también me ha sostenido, a Miriam Guerrero que con su humildad y sencillez me ha impulsado con su noble amistad. Por cada momento compartido, risas, llantos, enojos, me ha hecho saber que son parte de mi familia, las quiero mucho.

A mi amiga Norma Rodríguez, que me acompañó en toda la carrera y que me enseñó admirar a las aves, y quien es un ejemplo de vida.

A mis amigos Jorge Moncayo, Brian Alvarado, Javier Sánchez, gracias por su apoyo y brindarme su amistad.

A mi maestro Ernesto Celer, quien fortaleció mi gusto por las ciencias y quien siempre ha creído en mi capacidad para ser científica.

A Rosita quien en estos años se ha convertido para mí en un ejemplo de mujer, quien me dio consejos y se convirtió en mi confidente en el laboratorio, a quien quiero mucho.

A mi Tutora por haberme guiado en esta investigación, por su paciencia y sus enseñanzas.

A la Dra. Yolada González, Dra. Ma. Teresa Barrios, Dra. Martha Torres, Dra. Silvia, y M. en C. Fidencio Mejía por su apoyo, motivación y preocupación para poder concluir este ciclo.

Índice

Resumen	8
Antecedentes	10
1. Generalidades de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
1.2 Patogenia	12
1.3 Diagnóstico y Tratamiento	16
1.4 Autofagia	21
1.5 Tipos de autofagia	21
2. Xenofagia	25
2.2 Mecanismo de muerte bacteriana asociadas a Xenofagia	25
2.3 La autofagia contribuye a la eliminación de <i>M. tuberculosis</i>	27
2.4 Inductores de autofagia	29
3. Péptidos antimicrobianos (AMPs)	31
3.2 Mecanismo de acción	31
3.3 AMPs en humanos	34
3.4 Defensinas	34
3.5 Catelicidinas	37
3.6 Lipocalinas	38
3.7 AMPs y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
Hipótesis	41
Objetivos	41
Métodos	41
Obtención de macrófagos a partir de células mononucleares de sangre periféric	42
Diferenciación de monocitos a macrófagos	42
Estimulación	42
Infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa H37Rv	43
Procesamiento de la imagen	44

Análisis estadístico	44
Resultados	45
Controles de la tinción	45
Expresión de Lipocalin-2 en macrófagos humanos	48
Expresión de LL37 y Hepsidina en macrófagos humanos	52
Colocalización de M. tuberculosis H37Rv con LCN2, LL-37 y hepcidina	56
Discusión	57
Conclusión	58
Bibliografía	59

Lista de abreviaturas

AMP: péptidos antimicrobianos (antimicrobial peptide)

APCs: células presentadoras de antígeno (antigen presenting cell)

CMA: autofagia mediada por chaperonas (chaperone-mediated autophagy)

DAMPs: patrones moleculares asociados al daño (damage associated molecular pattern)

DAP: ácido meso-diaminopimelico (diaminopimelic acid)

DCs: células dendríticas

DNA: ácido desoxirribonucleico

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration)

FPN1: ferroportina1

G+C: Glutamina más Gentamicina

GAS: grupo A *Streptococcus*

HBDs: β -defensinas

IFN- γ : interferón gamma

IL: interleucina

IMF: intensidad media de fluorescencia

iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible

LAM: lipoarabinomanano

LAP: fagocitosis asociada a LC3 (LC3-associated phagocytosis)

LC3: cadena ligera 3 asociada a los microtúbulos (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)

LCN2: Lipocalin 2

LM: lipomannano

LPS: lipopolisacárido

LTBI infección de tuberculosis latente (Latent Tuberculosis Infection)

MDMs: macrófagos diferenciados a monocitos

MDP: muramil dipéptido

MDR-Tb: Tuberculosis multifarmaco resistente (multidrug resistant tuberculosis)

MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II (major histocompatibility complex)

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (major histocompatibility complex)

NDP52: proteína de punto nuclear (nuclear domain 10 protein 52)

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NKs: células asesinas naturales (natural killers)

NLR: receptores tipo NOD

NO: óxido nítrico

NOD: dominio de oligomerización de unión a nucleótido (nucleotide oligomerization domain)

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns)

PBMC: células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononucleated cell)

PI(3)K: cinasa fosfatidilinositol-3-OH clase III

PIM: fosfatidilinositol manosido

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones (PRR de Pattern recognition receptor)

RNA: ácido ribonucleico

ROS: especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)

Tb: Tuberculosis

TLR: receptores tipo Toll (Toll-like receptor)

TLR-2: receptores tipo Toll 2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor)

Tri-DAP: ácido-tri-diaminopimelico

XMDR-Tb: tuberculosis extensivamente resistente (extensively drug resistant tuberculosis)

Resumen

Recientemente se reportó que el ácido Tri-diaminopimérico (Tri-DAP) y la loperamida pueden estimular la actividad antimicrobiana del macrófago humano para el control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Estos inmunomoduladores son de distinta naturaleza, uno es un componente de la pared microbiana y el otro es un fármaco antidiarreico. Se sabe que ambos pueden inducir autofagia y limitada o nula producción de citocinas pro-inflamatorias. En los últimos años se ha reconocido que la autofagia está implicada en la inmunidad innata y adaptiva y en la eliminación de patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*. La autofagia es un mecanismo catabólico que mantiene la homeostasis celular por medio de la degradación de componentes intracelulares innecesarios como proteínas y orgánulos, así como de patógenos (virus, bacterias, hongos y protozoos). Uno de los mecanismos asociados al control microbiano de la autofagia es la lisis enzimática y el otro es la posibilidad de que péptidos antimicrobianos se recluten al autofagosoma y ejerzan su función. Lipocalin-2, LL-37 y hepcidina son péptidos con actividad antimicrobiana y se ha reportado que participan en el control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Ninguno de estos péptidos se ha asociado ni con Tri-DAP ni con loperamida en el proceso de autofagia pero son buenos candidatos porque Lipocalin-2 y hepcidina participan en el bloqueo de los sideróforos bacterianos, captación de hierro y quimioatracción de neutrófilos, LL-37 participa en la quimioatracción de leucocitos al sitio de infección, neutralización de LPS y reparación de tejidos. En este trabajo se investigó si los péptidos antimicrobianos Lipocalin-2, LL-37 y hepcidina se inducen por la estimulación de Tri-DAP y loperamida y si existe una asociación entre ellos y la micobacteria.

A partir de paquetes leucocitarios de donadores sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) se obtuvieron monocitos que fueron diferenciados a macrófagos humanos (MDMs). Los MDMs se estimularán loperamida y Tri-DAP (Tri-diaminopimérico) y MDP (muramil dipéptido). Un duplicado de MDMs de cada sujeto se dejó sin infectar y el otro se infectaron con *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Se realizó la tinción para LCN2, LL-37 y hepcidina y las muestras fueron visualizadas en el microscopio de fluorescencia Axio Scope 1.A (Carl Zeiss) y se tomaron fotografías de cada condición de las muestras. Se obtuvo el porcentaje de células positivas para los péptidos en estudio y se midió la intensidad media de fluorescencia con el software Zen Pro 2.1 (Carl Zeiss).

Los resultados obtenidos mostraron que loperamida induce significativamente la expresión de LCN2 y el reclutamiento de este péptido al sitio de localización de la micobacteria. LL-37 y hepcidina mostraron que hay producción de estos péptidos por loperamida aunque no fueron estadísticamente significativos, además, de que son reclutados al sitio de localización de la micobacteria.

Continuar con el estudio sobre la colocalización de los péptidos y la micobacteria así como de la expresión de estos péptidos con el inmunomodulador loperamida contribuirá al conocimiento sobre su mecanismo antimicrobiano y para que en un futuro se desarrolle un tratamiento donde pueda ser administrado para la eliminación de la tuberculosis.

Antecedentes

El sistema inmune está conformado por un conjunto de órganos y tejidos linfoides así como células y moléculas especializadas, quienes llevan a cabo una respuesta coordinada para lograr mantener la integridad fisiológica y genética del organismo (Cadavid, 2009). Los microorganismos como virus, bacterias, hongos y parásitos así como algunas moléculas orgánicas externas son reconocidos por el sistema inmune los neutralizar, elimina y repara el daño que han generado (Danilova, 2008).

En los vertebrados el sistema inmune se caracteriza por dos principales líneas de defensa, esta división se basa en la naturaleza de sus receptores: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Owen *et al.*, 2014). La inmunidad innata es la primera respuesta ya que esta se activa en minutos, en cuanto el agente infeccioso se enfrenta a las barreras físicas (epitelios) y químicas (moléculas solubles) (Méndez *et al.*, 2008). La inmunidad innata se caracteriza por tener especificidad limitada, generar componentes solubles como péptidos antimicrobianos (por sus siglas en inglés AMP), activa el Sistema del Complemento y algunas citocinas (por ejemplo TNF, IL-1, IL-12 e IL-18). En esta primera respuesta participan un subconjunto de células tales como macrófagos, natural killers (por sus siglas en inglés NKs) y células dendríticas (por sus siglas en inglés DCs), así como diversos tipos de leucocitos polimorfonucleares. Estas células expresan en su membrana Receptores de Reconocimiento de Patógenos (por sus siglas en inglés PRRs) como TLRs, NLRs, y RLRs lo cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés PAMPs,) ya sean bacterias o virus (Mandrekar & Muralidharan, 2013).

La inmunidad innata no sólo tiene la función de defensa si no también la inducción e inmunoregulación de la respuesta inmune adaptativa o también llamada la segunda línea de defensa (Méndez *et al.*, 2008). La inmunidad adaptativa se activa en días posteriores al reconocimiento del agente patógeno, es específica, tiene componentes de memoria, los linfocitos B y T son quienes se encargan principalmente de regular esta respuesta, a su vez se divide en inmunidad humoral e inmunidad celular (Owen *et al.*, 2014).

Ambas respuestas se complementan, conformando una red de mecanismos especializados como la inmunidad celular y humoral, la regulación negativa y la autofagia. El mecanismo de la autofagia actúa en tres eventos principales de la respuesta inmune; 1) en el reconocimiento y eliminación del patógeno (mecanismos innatos), 2) en la presentación de antígenos por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (mecanismos adaptativos) y 3) regulando la respuesta inflamatoria removiendo cuerpos apoptóticos (regreso a la homeostasis) (Peña-Sanoja & De Sanctis, 2013; Gomes & Dikic, 2014). En el proceso de co-evolución huésped-patógeno, diversos patógenos han desarrollado mecanismos para evadir o subvertir la respuesta inmune y así sobrevivir dentro del huésped, uno de los patógenos con más éxito es *Mycobacterium tuberculosis* (Baena & Porcelli, 2009).

1. Generalidades de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis pertenece al género *Mycobacterium*, este género se agrupa con base en su tasa de crecimiento en dos grupos; las especies de lento crecimiento como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium africanum*, el de crecimiento rápido que en general son oportunistas o no patógenas, como *Mycobacterium smegmatis* (Mc Murray, 1996; Forrellad *et al.*, 2013). *M. tuberculosis* es un bacilo gram-positivo, aerobio, inmóvil, rico en Guanina y Citocina (G+C), su genoma consta de $4,4 \times 10^6$ pares de bases y contiene 4.000 genes aproximadamente, es ácido-alcohol resistente (Mc Murray, 1996; Cook *et al.*, 2009).

Estructuralmente se caracteriza por tener una pared y una membrana rica en lípidos. La capa interna es la membrana citoplasmática conformada por glicolípidos, lipoglicanos y lipoproteínas (Angala *et al.*, 2014). La capa externa es la pared celular compuesta de peptidoglicanos unidos al heteropolisacarido arabinogalactano, estos se encuentran esterificados con los ácidos micólicos los cuales representan un 60% de la composición de la pared celular de *M. tuberculosis* (Fig.1) (Angala *et al.*, 2014). Esta composición externa de la pared la hace hidrófoba, resistente a diversos agentes terapéuticos, detergentes así como al alcohol y a los ácidos. Esta propiedad permite visualizarla con la tinción Ziehl Neelsen en color rojo (Hernández *et al.*, 2001; Gengenbacher & Kaufmann, 2012). Otra característica de *M. tuberculosis* es su metabolismo versátil, puede adaptarse a cambios de niveles de oxígeno como aerobiosis, hipoxia e inclusive anaerobiosis, además es capaz de utilizar diversas fuentes de carbono, como los ácidos grasos (principal fuente de carbono) (Hernández *et al.*, 2001; Cook, *et al.*, 2009).

M. tuberculosis crece a 37°C con tiempo de duplicación lenta entre 18-24 horas, el aumento de la tensión de CO₂ estimula su crecimiento (Ahmad, 2011). *M. tuberculosis* crece en medio de Meddlebrook y medio Lowenstein-Jensen, formando colonias de color blanco a amarillo dentro de 3-4 semanas (Hernández *et al.*, 2001; Gengenbacher & Kaufmann, 2012).

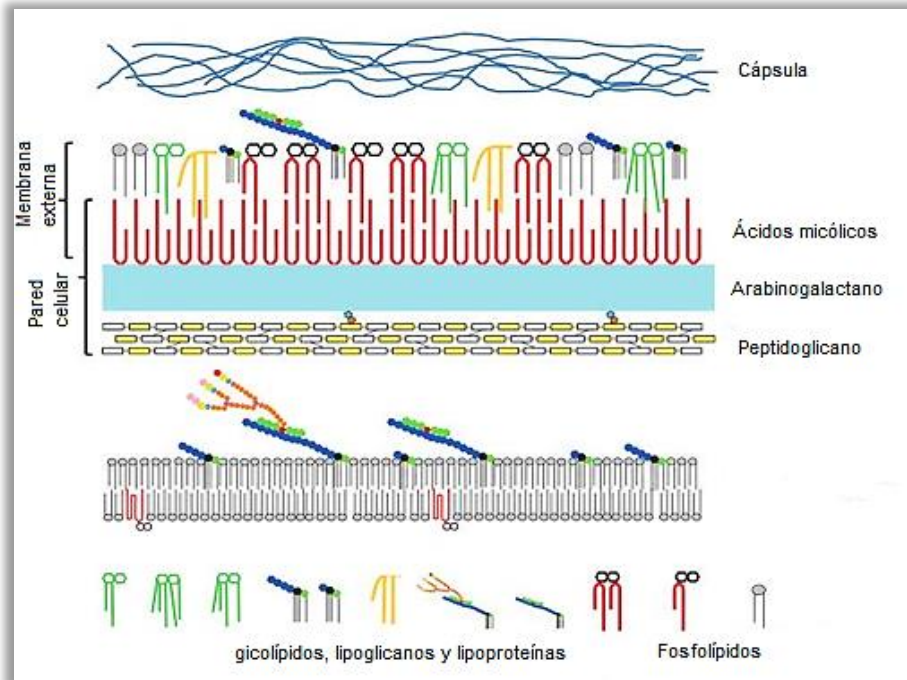


Figura 1. Representación esquemática de la composición estructural de la pared celular de *M. tuberculosis*. Los lípidos le confieren su baja permeabilidad así como su forma y rigidez. Modificado de Angala *et al.*, 2014.

1.2 Patogenia

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad sistémica causada por *M. tuberculosis* se ha considerado como un problema de salud pública a nivel mundial ya que se estima que una tercera parte de la población humana del mundo están infectados con este patógeno (Cliff *et al.*, 2015). Además es, junto con la infección por VIH, una de las principales causas de mortalidad, según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015). *M. tuberculosis* se propaga a través del aire, la principal fuente de infección surge de la expulsión en aerosoles de la micobacteria por personas infectadas, ya sea al toser estornudar o al hablar (Herrera *et al.*, 2005; Gengenbacher & Kaufmann, 2012). La infección inicia cuando pequeñas gotas, con un diámetro aproximado de 1-5µm de diámetro que contienen máximo 3 bacilos de *M. tuberculosis*, son inhaladas, debido a su tamaño las gotas pueden permanecer suspendidos en el aire de minutos a horas (Ahmad, 2011; Korb *et al.*, 2016).

Dentro del organismo, *M. tuberculosis* se disemina a través de los conductos linfáticos, la corriente sanguínea, los bronquios y el aparato gastrointestinal, la forma clínica de la infección más común es la Tb pulmonar (Mc Murray, 1996; Herrera *et al.*, 2005; Forrellad *et al.*, 2013). *M. tuberculosis* llega a los alveolos porque evade la defensa de los bronquios, posteriormente la respuesta inmune innata inicia y se reconoce *M. tuberculosis* en el espacio alveolar por los PRRs. Diferentes tipos celulares dentro del espacio alveolar contribuyen en los mecanismos de defensas, principalmente macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos, células NK así como las células epiteliales de las vías respiratorias (Sia *et al.*, 2015). Los PRRs predominantes son los TLR-2 de macrófagos, las lectinas tipo C además de otros receptores como, receptores scavengers, receptores del complemento, receptores de la proteína surfactante A y los receptores del colesterol (Ahmad, 2011; Korb *et al.*, 2016). La interacción de *M. tuberculosis* con TLR-2 inicia una cascada de señalización intracelular que finaliza con una respuesta proinflamatoria, antimicrobiana y la producción de citocinas y quimiocinas, la señalización de TLR-2 es el mecanismo principal de la respuesta inmune innata durante la infección por *M. tuberculosis* (Ahmad 2011; Fogel, 2015; Korb *et al.*, 2016).

La pared celular de *M. tuberculosis*, como se mencionó anteriormente, está compuesta de diversos lípidos de los cuales los principales ligandos de la superficie que interactúan con receptores TLRs de 19 y 27 kDa, glicoproteínas de 38kDa, y glicolípidos (lipomannano (LM) lipoarabinomannano (LAM) y fosfatidilinositol manosido (PIM) (Ahmad, 2011; Korb *et al.*, 2016). Estos ligandos al interactuar con TLRs activan el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) $-\alpha$, la producción de interleucina (IL)-1, IL-12, óxido nítrico (NO) y quimiocinas inflamatorias (CCL2, CXCL10) (Juárez & Rivas-Santiago, 2007; Fogel, 2015; Korb *et al.*, 2016). Los macrófagos se mantienen relativamente permisivos una vez que han fagocitado a *M. tuberculosis* por lo que la micobacteria se replica exponencialmente y resiste los mecanismos bactericidas bloqueando la fusión fagosoma-lisosoma causando la muerte del macrófago (Ahmad, 2011; Fogel, 2015; Korb *et al.*, 2016).

Por otro lado, al mismo tiempo, las DCs transportan a *M. tuberculosis* hacia los ganglios linfáticos locales, donde las células presentadoras de antígeno (APCs) activan las células T (Ahmad 2011; Fogel, 2015). Las APCs presentan los antígenos micobacterianos en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) a linfocitos T CD4⁺ o en asociación con MHC-I a linfocitos T CD8⁺ (Herrera *et al.*, 2005; Korb *et al.*, 2016). La respuesta inmune adaptativa ha comenzado, se producen mastocitos (primed cells) las cuales por medio de quimiocinas producidas por las células infectadas se dirigen al sitio de infección (Ahmad, 2011).

Los mastocitos activan al macrófago lo cuales mediante la secreción de interferón gamma (IFN γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) inducen mecanismos antimicrobianos que controlan la replicación de la micobacteria pero no la erradican, acumulando células inmunes y originando la formación de granulomas. (Korb *et al.*, 2016). El granuloma mantiene aislada a la micobacteria del resto de tejido pulmonar, algunos pueden suprimir o promover la persistencia de *M. tuberculosis* (Ahmad, 2011). Esta primer fuente de daño en el tejido tiene características variables en cada hospedero, se pueden distinguir tres tipos principales: 1) granulomas sólidos, 2) granulomas necróticos y 3) granuloma caseoso (Gengenbacher & Kaufmann, 2012). Las diferentes formas de granulomas son característicos de la progresión de la infección (Fig.2) (Gengenbacher & Kaufmann, 2012).

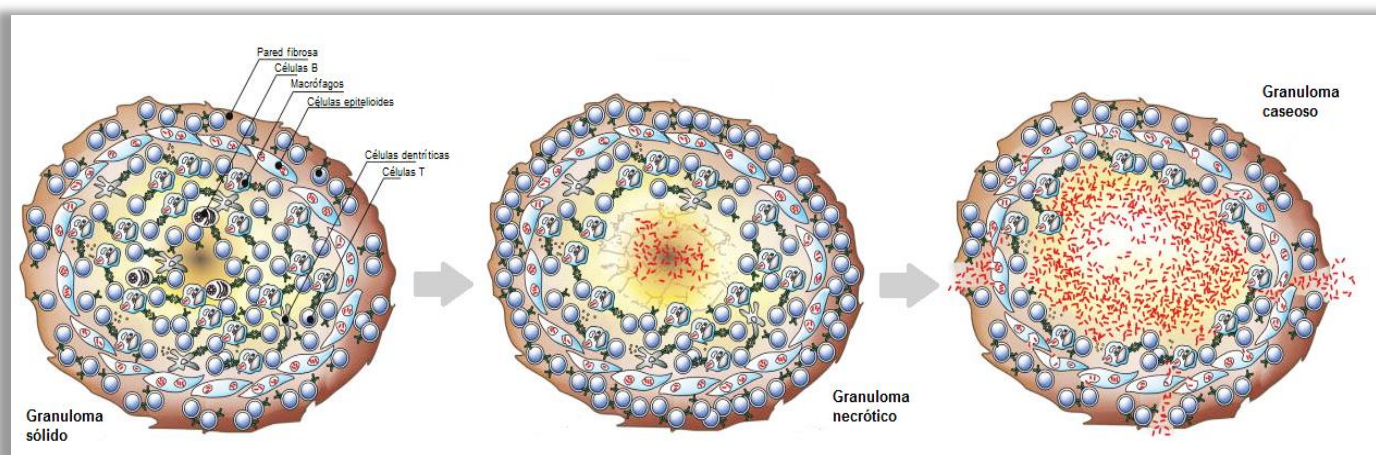


Figura 2. Formación y evolución del granuloma. Las células alveolares infectadas (fibroblastos, células epiteliales, macrófagos, DC, neutrófilos) inducen una respuesta proinflamatoria que atrae a las células mononucleares y linfocitos T formando un granuloma. La maduración del granuloma (sólido, necrótico, caseoso) se produce a diferentes velocidades y por lo general culmina en la convivencia de todas las formas de lesión durante la tuberculosis activa. *Mycobacterium tuberculosis* crece exponencialmente y se libera en las vías respiratorias. Modificada de Gengenbacher & Kaufmann, 2012.

El granuloma sólido se caracteriza por prevalecer durante la infección latente, está compuesto de macrófagos, DCs, infectados o no infectados sin necrosis y linfocitos, está rodeado por una pared fibrótica separándolo del resto de tejido pulmonar. En su interior la carga de *M. tuberculosis* es baja así como su actividad metabólica por lo que es nula o baja la replicación (Gengenbacher & Kaufmann, 2012; Korb, *et al.*, 2016). Estudios en ratones knockout en IL-10, muestran que *M. tuberculosis* puede alterar la contención del granuloma al utilizar a su propio beneficio la actividad inducida por IL-10, ya que esta interleucina suprime la actividad de las células T y macrófagos (Fogel, 2015).

La maduración del granuloma de sólido a caseoso (lesión cavitaria) va disminuyendo el número de vasos sanguíneos y formando un ambiente hipóxico (Korb *et al.*, 2016). Se caracteriza por ser un granuloma neutrofílico o necrótico se caracteriza por tener un extenso infiltrado granulocítico y/o supuración en el núcleo central del granuloma. *M. tuberculosis* se puede reactivar convirtiéndose en metabólicamente activa (Gengenbacher & Kaufmann, 2012; Korb, *et al.*, 2016). Esto facilita la caseificación del granuloma, proporcionando un ambiente fértil de nutrientes benéfico para el crecimiento de *M. tuberculosis* (Gengenbacher & Kaufmann, 2012). La necrosis aumenta en este tipo de granuloma y en su núcleo la licuefacción de las células muertas conduce a la formación de cavidades, restableciendo la concentración de oxígeno (Korb, 2016).

La mayoría de las personas que inhalan la micobacteria, tienen una respuesta inmune capaz de controlar el progreso de la infección al detener el crecimiento de *M. tuberculosis* (Ahmad, 2011). Este proceso se denomina Tuberculosis latente (por sus siglas en inglés LTBI, latent TB infection), en la mayoría de los casos de LTBI el individuo infectado es asintomático y no transmite la enfermedad a otras personas (Fogel, 2015). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en los últimos años ha hecho público que 1/3 de la población mundial está infectada con LTBI, del cual entre 5-10% están en riesgo de desarrollar la enfermedad activa (Ahmad, 2011; Fogel, 2015). La reactivación de *M. tuberculosis* puede ser ocasionada por generarse un estado de inmunosupresión, esto es, el hospedero inmunocompetente con LTBI puede verse afectado por mal nutrición, consumo de drogas, tratamientos farmacológicos, envejecimiento y enfermedades inmunosupresoras, ejemplo infección por VIH, cáncer y diabetes (Brighenti & Maria, 2012).

Sin embargo la progresión de LTBI a Tb activa respecto a la maduración del granuloma es diferente en cada hospedero, lo que indica una evolución dinámica y procesos inmunológicamente diferentes en el sitio de infección para cada individuo (Fig. 3) (Fogel, 2015, Korb *et al.*, 2016). La epidemia actual por *M. tuberculosis* se ve favorecida principalmente por dos factores: la inmunosupresión causada por VIH y su relación con individuos con LTBI, el aumento y mutaciones espontáneas que generan cepas resistentes a los fármacos de primera línea (Ahmad, 2011; Fogel, 2015).

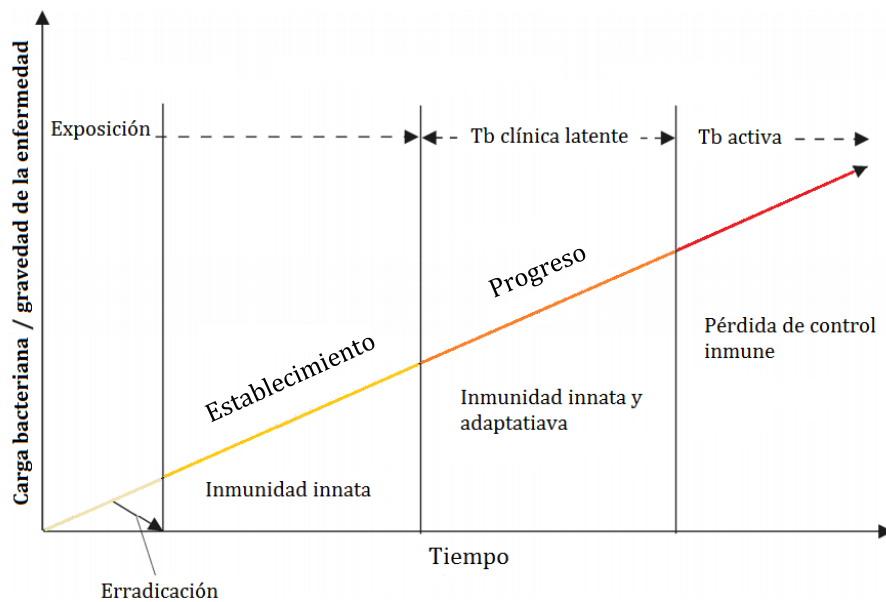


Figura 3. Evolución de la infección por *M. tuberculosis*. En la primera etapa *Mtb* se establece al evadir los primeros mecanismos de la inmunidad innata. En la segunda etapa *Mtb* progresa, la transición de la inmunidad innata a la inmunidad adaptativa comienza. En la tercera etapa es derrotada la respuesta inmune adaptativa, la replicación de la micobacteria es incontrolable por lo que hay necrosis y se disemina a otros tejidos. Modificada de Brighenti & Maria, 2012.

1.3 Diagnóstico y Tratamiento

La Tb sigue siendo una de las principales enfermedades de mayor mortalidad en el mundo. En 2015 la OMS reportó 10,4 millones de nuevos casos de Tb, de los cuales 1,8 millones murieron por esta enfermedad (0,4 millones de personas estaban infectadas con VIH) (OMS, 2015). En México el Sistema Único para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) informa que ha registrado cada año en promedio desde 1990 hasta 2015, 15 mil casos nuevos de Tb pulmonar (Fig. 4).

ENTIDAD	1990	2000	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Aguascalientes	84	93	62	46	34	39	30	41
Baja California	770	880	1,337	1,426	1,507	1,432	1,514	1,564
Baja California Sur	100	84	118	143	136	151	141	156
Campeche	106	98	99	126	119	138	106	124
Coahuila	411	397	438	411	461	524	431	496
Colima	162	121	113	143	132	97	130	125
Chiapas	814	952	1,096	952	1106	1109	1161	1184
Chihuahua	339	458	574	621	630	568	556	577
CDMX	432	602	484	470	480	506	484	476
Durango	93	333	149	172	175	137	147	151
Guanajuato	194	256	254	265	203	247	233	241
Guerrero	777	1,076	994	1,111	1,074	1,213	1,192	1,224
Hidalgo	230	299	241	213	243	198	156	155
Jalisco	166	706	637	605	692	658	693	773
México	476	810	489	470	550	460	480	513
Michoacán	279	357	266	284	242	265	258	249
Morelos	83	201	142	140	126	164	136	139
Nayarit	325	256	282	239	224	238	242	255
Nuevo León	1,055	1,034	961	1,030	1,072	1,060	919	1,148
Oaxaca	859	765	646	580	612	577	663	487
Puebla	489	488	369	408	404	406	494	415
Querétaro	161	163	104	122	135	134	137	111
Quintana Roo	121	132	222	213	250	204	249	266
San Luis Potosí	229	304	297	262	279	260	264	281
Sinaloa	304	602	722	714	773	795	877	869
Sonora	352	480	733	726	749	775	828	842
Tabasco	315	468	457	500	479	568	607	603
Tamaulipas	813	1,041	1,065	1,027	1,025	1,008	971	948
Tlaxcala	47	30	42	41	42	43	47	32
Veracruz	1,428	1,954	1,787	1,736	1,673	1,846	1,852	1,748
Yucatán	153	152	147	195	181	201	181	202
Zacatecas	75	57	57	66	50	59	58	67
NACIONAL	12,242	15,649	15,384	15,457	15,858	16,080	16,237	16,462

Figura 4. Casos nuevos de Tb pulmonar en México. Reportados desde el año 1990 hasta 2015, información recaba por el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología. SS.

Clínicamente la infección por *M. tuberculosis* se clasifica como TBLI, cuando el paciente es asintomático y no es transmisible la micobacteria, o como tuberculosis activa, esta infección es transmisible y presenta síntomas como: fatiga, dolor de pecho, fiebre, falta de apetito y pérdida de peso, en los pacientes con la enfermedad avanzada pueden presentar tos permanente y esputo con sangre (Pai *et al.*, 2016). El progreso a Tb activa puede detenerse si se diagnostica oportunamente y proporciona un tratamiento anti-Mtb en individuos con LTBI, sin embargo actualmente existen deficiencias en un diagnóstico eficaz y en el tratamiento (Cliff *et al.*, 2015; OMS, 2015).

Actualmente la prueba estándar para determinar si una persona está infectada con *M. tuberculosis* es la prueba cutánea de la Tuberculina (por sus siglas en inglés TST), sin embargo, la TST puede dar como resultado falsos positivos (Ruhwald & Ruhwald, 2016). Este resultado se debe a que las personas fueron vacunadas con el bacilo de Calmette y Guérin (BCG), *M. bovis*, comparte antígenos con la especie patógena del complejo *M. tuberculosis* (Kantor & Ritacco, 2009). Este es el principal inconveniente para poder ser una prueba fiel y eficiente para la detección de la infección por *M. tuberculosis*.

Otro de los métodos utilizados frecuentemente para la detección de *M. tuberculosis* es la baciloscopia y el cultivo microbiológico. La baciloscopia normalmente se realiza a partir de una muestra de esputo, la tinción de Ziehl-Neelsen es utilizada para el reconocimiento de bacilos ácido-alcohol resistente (Riello *et al.*, 2016). Este método aunque es sencillo y de bajo costo tiene baja sensibilidad ya que se requieren 5 000 bacilos/ml aproximadamente para que se declare positiva, además es incapaz de determinar si hay farmacoresistencia (OMS, 2015; Uribarren, 2016).

El cultivo se puede realizar en medio sólido o líquido a base de huevo como Löwenstein-Jensen y el de Coletsos, permite detectar y aislar a *M. tuberculosis*, en general las micobacterias crecen más rápido en un medio líquido como Middlebrook 7H10 (Caulfield & Wengenack, 2016). Esta es una prueba estándar para detectar si se tiene Tb activa, además puede reconocer la subespecie de la micobacteria y la susceptibilidad a los antibióticos (Belo dos Santos *et al.*, 2014). Sin embargo la desventaja de este método de diagnóstico es el tiempo que tarda en que se pueda visualizar las colonias de *M. tuberculosis*, para tener un resultado definitivo. Los medios comúnmente utilizados son Lowenstein-Jensen (LJ) y Middlebrook (7H10 o 7H11), el primero permite visualizar el crecimiento de las colonias entre 10-12 días y en el medio de Middlebrook entre 18-24 días (Caulfield & Wengenack, 2016). Estos métodos de diagnóstico de rutina así como las pruebas serológicas (medición de IFN- γ producida por las células T) y pruebas moleculares tienen limitaciones tales como, el tiempo, el costo, la sensibilidad y la distinción entre infección de Tb latente o activa (Fatima, 2009; Al-Zamel, 2014).

El tratamiento de la Tb, requiere de un diagnóstico preciso y temprano para poder detectar la resistencia a los fármacos aprobados por la OMS para tratar y en algunos casos curar al paciente. Actualmente el tratamiento de la Tb está conformado por una combinación de un grupo de antibióticos que se administra en un tiempo mayor a 6 meses, según se determine si la cepa es multifármaco resistente (por sus siglas en inglés MDR-Tb) o extra multifármaco resistente (por sus siglas en inglés XDR-Tb) (Van den Boogaard *et al.*, 2009; Schito *et al.*, 2015). La OMS ha determinado una estrategia de terapia directamente supervisada (por sus siglas en inglés DOT) con el fin de obtener un resultado eficaz en la eliminación de la infección por *M. Tuberculosis* y la adherencia al tratamiento (Zumla *et al.*, 2013).

Desde 1994 la combinación de los fármacos isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol ha sido el tratamiento conocido como de primera línea, en los primeros 2 meses de tratamiento se suministran estos fármacos (Dartois, 2014). Los siguientes cuatro meses se suministra solo isoniazida y rifampicina (Pai *et al.*, 2016). La tasa de éxito (curación) de este tratamiento es mayor al 95% bajo administración de DOT (Van den Boogaard *et al.*, 2009; Zumla *et al.*, 2013). Este tratamiento es aplicado para Tb pulmonar y las formas extrapulmonares.

La elección de los fármacos para el tratamiento se determina por 1) el patrón de resistencia a los medicamentos, 2) que medicamentos se le ha administrado al paciente previamente, 3) si el paciente tiene condiciones médicas subyacentes y los efectos secundarios que están reportados para cada fármaco. Los fármacos contra Tb se clasifican en 5 grupos según la evidencia de su eficacia, potencia, clase de fármaco y la experiencia de uso, teniendo así cinco grupos, tabla 1. Los nombres de los fármacos de primera línea se pueden abreviar en una o tres letras. El grupo 1 se administra en una combinación de cuatro fármacos para el tratamiento de Tb sensible a los medicamentos. Los grupos 2, 3, y 4 son medicamentos anti-Tb de segunda línea y se administran en pacientes con MDR-Tb. El grupo 5 se recomienda en pacientes XMDR-Tb, son los fármacos que presentan mayor toxicidad para el paciente (Zumla *et al.*, 2013).

La administración de múltiples fármacos afecta el cumplimiento y la adherencia al tratamiento debido a su complejidad y al extenso tiempo (1-2 años) que implica (Van den Boogaard *et al.*, 2009). El paciente abandona el tratamiento antes de que se encuentre totalmente esterilizada la zona de infección, causando el fracaso del tratamiento (Dartois, 2014). La recaída y aparición de resistencia a los fármacos de primera línea requiere de un tratamiento con fármacos de segunda o tercera línea y un tiempo mayor de administración (Pai *et al.*, 2016). La MDR-Tb, indica la resistencia a isoniazida y la rifampicina, para su tratamiento requiere de un tratamiento bajo DOT y la combinación de al menos cuatro fármacos de segunda línea incluyendo un agente inyectable como un aminoglucósido, con duración de al menos 18-20 meses (Zumla *et al.*, 2013; Dartois, 2014). En los últimos años la OMS ha reportado aumento de casos aún más graves de XMDR-Tb, para la cual se recomienda la administración de fármacos de tercera línea, los cuales son costosos y causan más efectos secundarios en comparación con los fármacos de primera y segunda línea, (Zumla *et al.*, 2013).

Tabla 1. Clasificación de los fármacos contra Tuberculosis

Clasificación	Agrupación de fármacos	Características del tratamiento	
Primera Línea	Grupo 1: Isoniazida	(H/Inh)	Es un tratamiento oral, estos fármacos se recomiendan actualmente en una combinación de cuatro fármacos en pacientes diagnosticados con Tb o con recaída. La administración de estos fármacos es de al menos 8 meses.
	Rifampicina/rifampicina	(R/Rif)	
	Pirazinamida	(Z/Pza)	
	Etambutol	(E/Emb)	
	Rifapentina o rifabutina	(P/Rpt) o (Orp)	
Segunda Línea	Grupo 2: Estreptomina	(S/Stm)	Los fármacos de segunda línea se dividen en 4 grupos los cuales están constituidos por aminoglucósidos y polipéptidos inyectables, además de fluoroquinolonas orales e inyectables. Para curar la MDR-TB el tratamiento dura entre 18-24 meses consiste en la combinación de cuatro y seis fármacos, incluyendo una fluoroquinolona y un agente inyectable (por ejemplo, un aminoglucósido o capreomicina el antibiótico péptido).
	Kanamicina	(Km)	
	Amikacina	(Amk)	
	Capreomicina	(Cm)	
	Viomicina	(Vim)	
	Grupo 3: Ciprofloxacina	(Cfx)	
	Levofloxacina	(Lfx)	
	Moxifloxacina	(Mfx)	
	Ofloxacina	(Ofx)	
	Gatifloxacina	(Gfx)	
	Grupo 4: Ácido paraaminosalicílico	(Pas)	
	Cicloserina	(Dcs)	
	Terizidona	(Trd)	
Etionamida	(Eto)		
Protionamida	(Pto)		
Tioacetazona	(Thz)		
Linezolid	(Lzd)		
Tercera Línea	Grupo 5: Clofazimina	(ZLC)	Estos fármacos se recomiendan en pacientes XMDR-TB, tienen tasas muy altas de efectos secundarios. El tiempo de administración es mayor al tratamiento para pacientes con MDR-TB.
	Linezolid	(LZD)	
	Amoxicilina más ácido clavulánico	(Amx/Clv)	
	Imipenem más cilastatina	(IPM/CLN)	
	Claritromicina	(CLR)	

La prevalencia e incremento MDR-Tb y XMDR-Tb a nivel mundial muestran una amenaza sobre el control de la Tb (Juárez *et al.*, 2016; Pai *et al.*, 2016). El aumento de cepas resistentes a los fármacos actuales provoca una necesidad urgente de mejorar la administración del tratamiento actual o desarrollar nuevos fármacos lo que podría sugerir una terapia adyuvante (Juárez *et al.*, 2016; Zumla *et al.*, 2016). Una nueva estrategia deberá reducir el tiempo de administración del tratamiento, tener un perfil de tolerabilidad aceptable, ser capaces de actuar en casos de MDR/XMDR-Tb y contra la LTBI (Van den Boogaard *et al.*, 2009; Zumla *et al.*, 2016).

Comprender la interacción huésped-patógeno en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis* contribuye al desarrollo de inmunoterapias nuevas que podrían ayudar al tratamiento de la Tb (Abate & Hoft, 2016). Los diversos escenarios y limitaciones que hay para el uso de fármacos que actúan directamente sobre *M. tuberculosis* han sugerido un nuevo camino para el tratamiento contra la infección de *M. tuberculosis*, la terapia dirigida al huésped (por sus siglas en inglés HDTs) (Zumla *et al.*, 2016). Generalmente HDTs involucra mecanismos biológicos de defensa del huésped como la regulación de la homeostasis fisiológica y la intervención en los mecanismos de la respuesta inmune (vías mediadas por la señalización de citoquinas, procesos antimicrobianos y establecimiento de memoria) (Ordonez *et al.*, 2014; Zumla *et al.*, 2016).

El uso de inmunomoduladores como HDT es de gran interés como tratamiento adyuvante para contrarrestar la Tb ya que al manipular los mecanismos de la respuesta inmune se podría disminuir la duración del tratamiento, el número de fármacos actualmente usados para el tratamiento así como mejorar la función pulmonar (Hawn *et al.*, 2013; Ordonez *et al.*, 2014). Como anteriormente se mencionó una de las principales células de la respuesta inmune innata que participan en la detección y eliminación de la Tb pulmonar son los macrófagos, estudios recientes han demostrado que la autofagia es un mecanismo que llevan a cabo los macrófagos para la eliminar *M. tuberculosis* (Juárez *et al.*, 2016).

2. Autofagia

La autofagia es un mecanismo catabólico que mantiene la homeostasis celular por medio de la degradación de componentes intracelulares innecesarios como proteínas mal ensambladas y orgánulos disfuncionales, así como de patógenos (virus, bacterias, hongos y protozoos), conservado desde levaduras hasta mamíferos (Nakatogawa *et al.*, 2009; Kanayama & Shinohara, 2016). Este mecanismo puede ser inducido por diversos estímulos de estrés extra e intracelulares, como niveles bajos de oxígeno, limitación de nutrientes, estrés oxidativo, la infección por patógenos y el tratamiento con algunos fármacos (Bento *et al.*, 2015; Escoll *et al.*, 2016).

2.2 Tipos de autofagia

La autofagia tiene tres variantes en la forma de llevar a cabo el mecanismo de degradación lisosomal, estos son la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas (CMA) y la macroautofagia (Fig.5) (Yang & Klionsky, 2010).

La microautofagia se caracteriza por llevar acabo el reclutamiento del material citosólico (proteínas u orgánulos) por medio de la invaginación de la membrana lisosomal, la cual se va alargando en forma de tubo (tubo autofagico), posteriormente la membrana proximal del tubo autofagico forma una protuberancia (cuerpo autofagico) que lleva los componentes citosólicos atrapados, finalmente la carga o contenido autofagico es degradada (Pereira *et al.*, 2012; Parzych & Klionsky, 2014) Actualmente hay pocos estudios sobre este mecanismo y su regulación. Se ha descrito que la microautofagia es inespecífica, a diferencia de la CMA que es específica (Parzych & Klionsky, 2014).

La CMA exclusivamente degrada proteínas citosólicas que tienen un motivo pentapeptido KFERQ, este motivo está constituido por los aminoácidos Lys-Phe-Glu-Arg-Gln, el cual es reconocido por un complejo de proteínas chaperonas de choque térmico Hsc70, Hsp40 y Hsp90, denominadas en conjunto HSP, de este complejo Hsc70 reconoce específicamente el motivo KFERQ de la proteína sustrato, el resto de las proteínas del complejo HSP modulan la actividad de Hsc70 (Pereira *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015). Una vez formado el complejo chaperona/sustrato interactúa con una proteína transmembranal del lisosoma que funciona como receptor denominada LAMP-2A, para poder ingresar al lumen lisosomal y posteriormente ser degradada (Cuervo & Wong, 2014; Wu *et al.*, 2015).

Otro de los mecanismos es la macroautofagia (a menudo denominado solo como autofagia), se caracteriza por la formación de vesículas citosólicas de doble membrana denominadas autofagosomas, los cuales secuestran agregados de proteínas, orgánulos dañados y organismos patógenos (bacterias, parásitos y virones), posteriormente los autofagosomas se fusionan con lisosomas formando autofagolisosomas (Zhou & Xhang, 2012; Valdor & Macián, 2013; Wu *et al.*, 2015). Finalmente se degradan los componentes secuestrados y los productos de esta degradación (aminoácidos, azúcares y lípidos) se reciclan para la biosíntesis de proteínas o para participar en la producción de energía (Gomes & Dikic, 2014; Feng *et al.*, 2014).

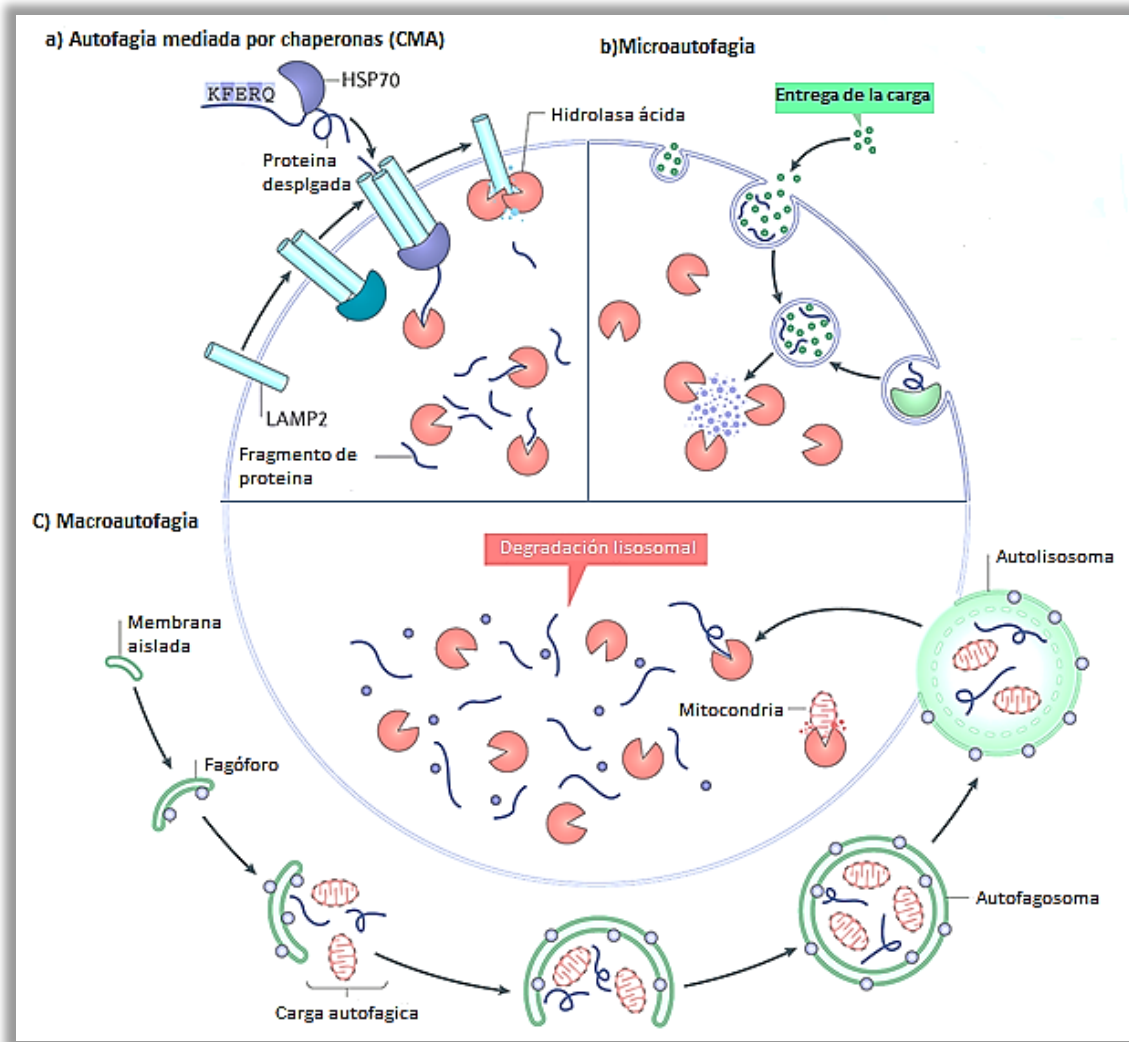


Figura 5. Tipos de autofagia. Todos los tipos de autofagia culminan en la entrega de sustratos autofágicos al lisosoma y la degradación de estos sustratos por hidrolasas lisosomales: a) CAM, implica el reconocimiento de sustratos autofágicos que llevan un motivo KFERQ por miembros de la familia de proteínas de choque térmico (HSP). Este paso es seguido por la interacción con el receptor LAMP2, para que la carga sea ingresada al lumen lisosomal, b) por el contrario, la entrega de carga durante la microautofagia se produce tras la invaginación directa de la membrana lisosomal, c) durante macroautofagia, la carga está destinada a su eliminación progresiva en el autofagosoma. El autofagosoma maduro se fusiona con el lisosoma para formar los autolisosomas y finalmente la carga es degradada por hidrolasas. Modificado de Galluzzi *et al.*, 2016.

La macroautofagia se lleva a cabo en varias etapas: en la primera etapa participa la fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3K) la cual es crucial para la nucleación y ensamblaje del fagóforo o membrana aislada, estudios han demostrado que el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, la mitocondria y la membrana citoplásmica contribuyen al surgimiento del fagóforo (Pereira *et al.*, 2012; Lamb *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015).

Posterior a la nucleación, la siguiente etapa es la expansión del fagoforo y el secuestro de la carga, dos conjuntos de ubiquitina son requeridos, el complejo Atg16L1 (Atg12-Atg5-Atg16L1) y el sistema de conjugación LC3 (microtubule-associated light chain 3), Atg16L1 contribuye a la expansión para formar el autofagosoma y promueve la lipidación de LC3 la cual se conjuga con fosfatidiletanolamida (PE) y forma LC3-II este se une a la membrana para ayudar al cierre y formar el autofagosoma, LC3-II permanece en la membrana hasta que el autofagosoma se fusiona con el lisosoma (Lamb *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015).

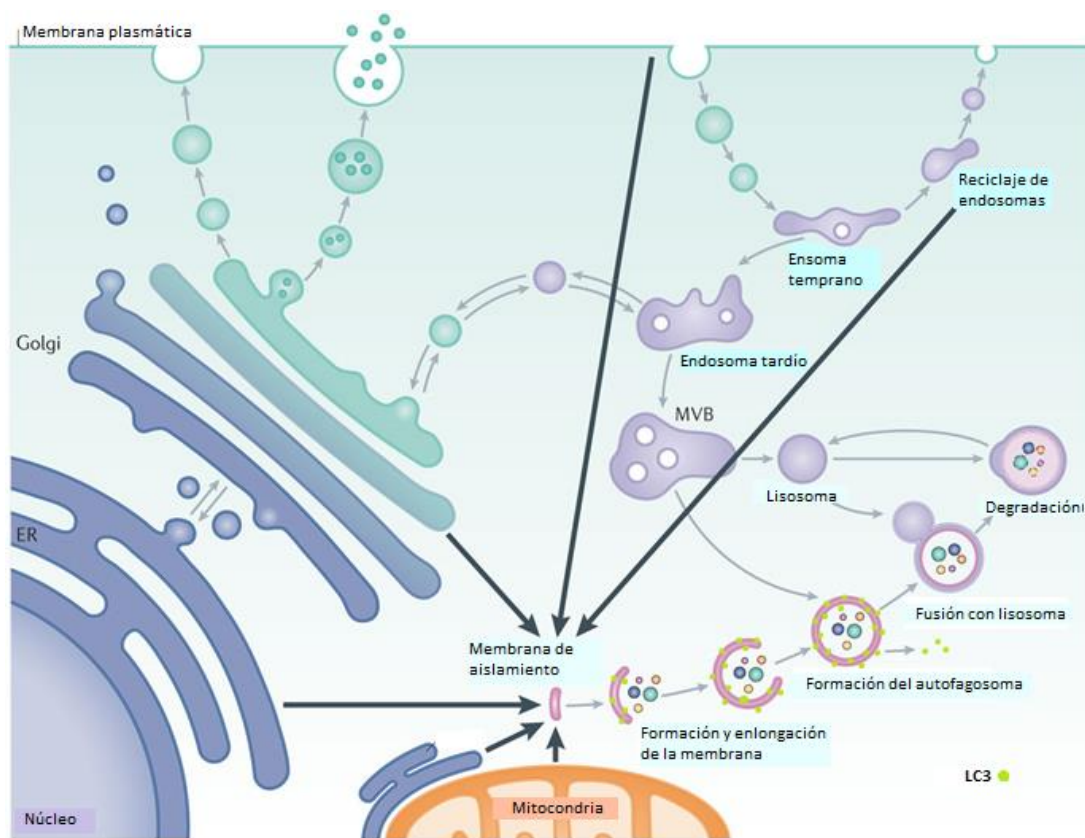


Figura 6. Mecanismo de la macroautofagia o autofagia. Varios orgánulos, incluyendo el retículo endoplásmico (ER), mitocondrias, las membranas de las mitocondrias, el aparato de Golgi, los endosomas de la membrana plasmática están implicados en la nucleación de la membrana de aislamiento (fagoforo) y en el posterior crecimiento de la membrana. El autofagosoma completamente formado se fusiona con un lisosoma para crear un autolisosoma en el que el material secuestrado se degrada y se libera en el citoplasma para su uso en procesos celulares, incluyendo la biosíntesis de proteínas y la producción de energía. MVB cuerpo multivesicular. Modificado de Lamb *et al.*, 2013.

Las proteínas p62 (nucleoporina 62), NBR1 (receptor de carga de autofagia), NDP52 (proteína de punto nuclear de 52 kDa) participan como receptores de la carga (organelos disfuncionales, agregados de proteínas y agentes infecciosos), uniéndose a través de residuos de ubiquitina, posteriormente se unen a LC3 mediante la interacción con los dominios LIR (Bento *et al.*, 2016). La última etapa es la formación del autofagolisosoma, el autofagosoma maduro se fusiona con el lisosoma y se entrega la carga al lumen para ser degradada por las hidrolasas lisosomales y ser liberado (Fig.6).

3. Xenofagia

La autofagia es la suma de distintas vías que degradan componentes intracelulares inespecíficos y sustratos de manera selectiva, por ejemplo, mitocondrias (mitofagia), peroxisomas (pexofagia), cuerpos lipídicos (lifofagia), ribosomas (ribofagia), patógenos intracelulares (xenofagia), etc. (Feng *et al.*, 2014; Bauckman *et al.*, 2015).

En los últimos años se ha reconocido que la autofagia está implicada en la inmunidad innata y adaptiva, ya que contribuye con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) en la presentación de antígenos expresados endógenamente, al ser un sistema citoplásmico que puede eliminar de forma directa bacterias intracelulares y finalmente como un sistema antimicrobiano (Deretic, 2011; Bauckman *et al.*, 2015). La Xenofagia es un proceso específico de la autofagia por el cual se eliminan patógenos intracelulares como bacterias, virus, hongos y parásitos, además de liberar metabolitos utilizados por el patógeno durante la infección para así promover la supervivencia celular (Hale *et al.*, 2013; Mathieu, 2015). Los patógenos de importancia médica que se ha reportado su degradación *in vitro* por xenofagia, son: bacterias, como el grupo A *Streptococcus* (GAS), *M. tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, virus como HSV-1 (virus del herpes simple tipo I) y parásitos como *Toxoplasma gondii* (Levine & Kroemer, 2008).

3.2 Mecanismo de muerte bacteriana asociadas a Xenofagia

Los mecanismos de eliminación por xenofagia se dirigen a bacterias intracelulares localizadas dentro de los fagosomas, vesículas o en el citosol, así como intervenir en distintas etapas de la invasión bacteriana (Yuk *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 2015). Los distintos mecanismos de xenofagia (Fig. 7) empiezan por el reconocimiento de patógenos, la exposición de DAMPS (patrones moleculares asociados a daño) y/o PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), estos últimos son moléculas que se derivan de los patógenos durante la infección por ejemplo, lipopolisacáridos (componente de la pared celular de

bacterias Gram negativas), flagelina, ácidos nucleicos de virus, zymosan y manano (componente de la pared celular de hongos) (Wileman, 2013; Lapaquette *et al.*, 2015).

En las células de mamíferos los PAMPs y los DAMPs son reconocidos por PRRs que se encuentran en la superficie celular o en las membranas de los endosomas como los TLRs y en el citosol los NLRs, las proteínas NOD1 y NOD2 son las responsables de inducir xenofagia y el procesamiento de antígenos bacterianos (Lapaquette *et al.*, 2015; Steele *et al.*, 2015). Una vez reconocido el patógeno puede ser capturado por proteínas con función de adaptadoras específicas de autofagia denominados p62 / SQSTM1 (sequestosome 1/p62-like receptors (SLRs) y por el receptor NDP52 (proteína nuclear de 52 kDa), p62 / SQSTM1 forma un puente entre el patógeno y el autofagosoma, *S. enterica serovar Typhimurium* (*S. Typhimurium*) es un ejemplo de este mecanismo de xenofagia. *S. enterica* expone una señal de daño que es reconocida por la galectina-8 (lectina citosólica) está a su vez es reconocida por NDP52 y recluta a LC3 (Wileman, 2013; Vural & Kehrl, 2014).

Otro mecanismo de xenofagia es la internalización directa de la bacteria para ser capturada en estructuras vesiculares que contiene el marcador autofagosomal LC3 que posteriormente se fusionan con lisosomas, este mecanismo es no selectivo. El grupo A *Streptococcus* (GAS) es eliminado por este mecanismo, al entrar GAS en las células epiteliales por endocitosis es capturado en compartimentos similares a autofagosomas, que maduran en autolisosomas y así eliminan las bacterias (Levine, 2005).

Un tercer mecanismo de xenofagia es la fagocitosis asociada a LC3 (LAP), después de la internalización de la bacteria por fagocitosis convencional, la maduración del fagosoma facilita la señalización de TLRs y el reclutamiento de algunos miembros de la maquinaria de autofagia, como el complejo de Clase III PI3K y los elementos del sistema de ubiquitinación (ATG5, ATG7), complejos Beclin1-VP34 y sistemas LC3 conjugados (independientes de kinasa) (Desai *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2015). Este mecanismo hace más eficiente la captura de micobacterias en autofagosomas (Vural & Kehrl, 2014).

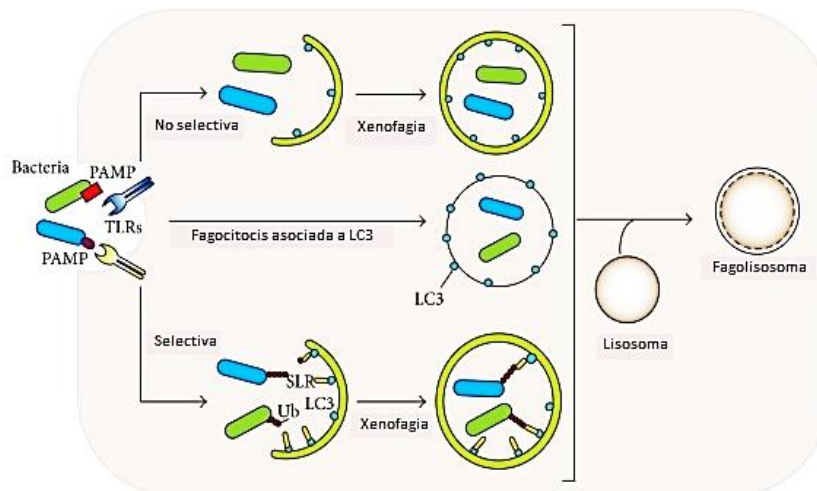


Figura 7. Diferentes mecanismos de Xenofagia. La xenofagia inicia por el reconocimiento de PAMPs de diferentes bacterias por TLRs, las bacterias pueden ingresar de forma selectiva o no selectiva posteriormente son fagocitadas y se entregan a autofagosomas. En la captación selectiva participan SLR o se ubiquitina la bacteria. Otro mecanismo de la xenofagia es la fagocitosis asociada a LC3, esto es el reclutamiento de LC3 a los fagosomas después de la activación de TLR. El reclutamiento de LC3 a los fagosomas desencadena la fusión con lisosomas. Los tres mecanismos distintos de la xenofagia terminan con la fusión lisosomal que conduce a la degradación del patógeno envuelto. Modificado de Vural & Kehrl, 2014.

3.3 La autofagia contribuye a la eliminación de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis infecta, persiste y se replica en los macrófagos, se conocen pocos mecanismos bactericidas en macrófagos que sean capaces de eliminar a la micobacteria (Deretic *et al.*, 2009; Koster *et al.*, 2015). Hasta ahora, la autofagia se reconoce como un mecanismo que contribuye en la defensa a patógenos (xenofagia) (Deretic *et al.*, 2009).

La autofagia en macrófagos ha mostrado ser un mecanismo eficiente en la eliminación de *M. tuberculosis*, se sabe que los autolisosomas contienen fragmentos de ubiquitina que actúan como péptidos micobactericidas (Deretic, 2009). Hay estudios que vinculan la estimulación de TLR y la autofagia, se ha informado también que la estimulación con ATP a los receptores P2X7 conduce a la eliminación de micobacterias intracelulares por autofagia. Además se ha mostrado que la inhibición de la vía mTOR, la vitamina D y el interferón- γ contribuye a la eliminación intracelular de *M. tuberculosis* y la maduración fagosomal (Yuk, *et al.*, 2012). De manera indirecta la autofagia participa en la fagocitosis de *M. tuberculosis*, por medio de la regulación de receptores scavenger y contribuye a su eliminación (Espert *et al.*, 2015). Rapamicina es un inhibidor de la vía mTOR, en células de mamífero, este fármaco forma un complejo con la inmunofilina FKBP12, que al unirse a mTORC1 inhibe su actividad, mTORC2 también se ha reportado que es inhibido por rapamicina (Renna *et al.*, 2010).

Luego de la infección, la xenofagia inicia cuando el ADN de *M. tuberculosis* es detectado por el sensor citosólico de ADN cGAS ('cyclic GMP-AMP synthase'), posteriormente proteínas miembros de la familia ATG, relacionadas con la autofagia, regulan distintos eventos secuenciales que dan origen a la nucleación de la membrana del autofagosoma, su posterior elongación, maduración y su fusión con lisosomas (Koster *et al.*, 2015). La eliminación de *M. tuberculosis* es dependiente de ubiquitina. Los fagosomas que han internalizado a *M. tuberculosis* son etiquetados con cadenas de ubiquitina las cuales son reconocidas por los adaptadores p62 y NDP52, posteriormente estos reclutan la maquinaria de la autofagia para degradar a la micobacteria (Fig. 8) (Watson *et al.*, 2012; Bento *et al.*, 2015). P62 además ejerce su acción antimicrobiana al reclutar proteínas citosolicas al autofagosoma como conjuntos de ubiquitina y proteínas ribosomales, posteriormente, por proteólisis son degradadas a péptidos los cuales tienen actividad antimicrobiana y son capaces de eliminar a *M. tuberculosis* (Ponpuak & Deretic, 2011; Moraco & Kornfeld, 2014). *M. tuberculosis* puede permanecer resguardada dentro de los autofagosomas evitando la maduración a autofagolisosomas (Bento *et al.*, 2015).

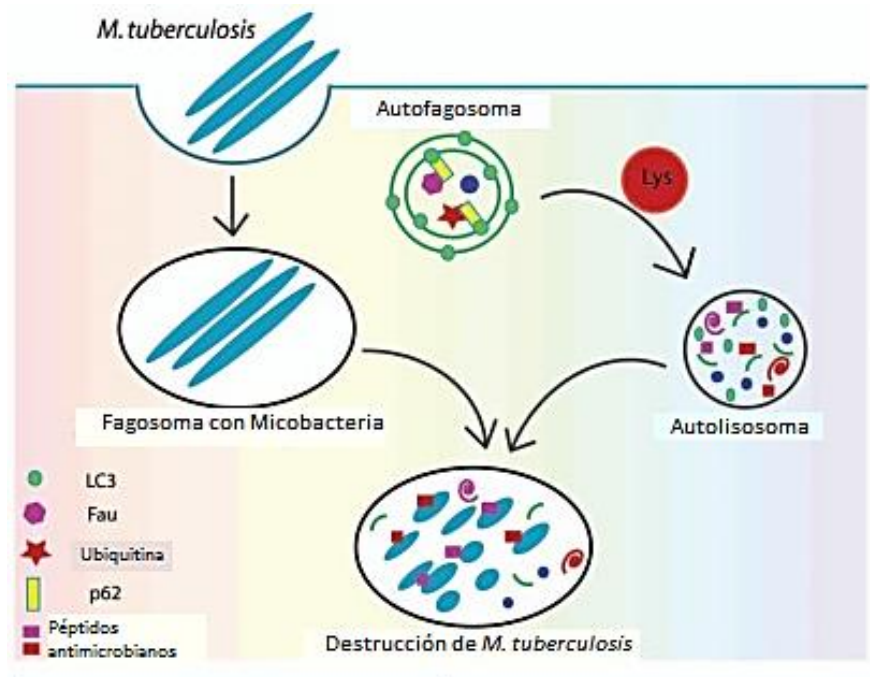


Figura 8. Eliminación de *M. tuberculosis* mediante la autofagia y p62. Las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos y son capturadas dentro de fagosomas. Tras la inducción de la autofagia, p62, como un agente bifuncional interacciona con la maquinaria de la autofagia (LC3, Fau, ubiquitina) y recluta al autofagosoma sustratos citosólicos e hidrolasas lisosomales, que tras la maduración del autofagosoma conduce a la escisión proteolítica de los sustratos formando péptidos antimicrobianos. Modificado de Ponpuak & Deretic, 2011.

3.4 Inductores de autofagia

Actualmente se sabe de algunos estímulos tanto fisiológicos como farmacológicos que inducen autofagia, como la rapamicina que promueve la maduración de los fagosomas, esto mismo se observa al inducir la autofagia con IFN-gamma o con LRG-47 (Juárez *et al.*, 2016; Muciño *et al.*, 2016). Otros fármacos como carbamazepina, el ácido valproico, el verapamilo, la amiodarona y la loperamida están aprobados para el consumo humano y se han reportado como inductores de autofagia (Juárez *et al.*, 2016). A continuación se describen solo algunos de los estímulos reportados como inductores de autofagia y que han estado relacionados con *M. tuberculosis*.

Los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular, controlan la formación del autofagosoma y la fusión fagosoma-lisosoma (Sarkar, 2013). La inhibición de los niveles Ca^{2+} intracelular promueve la autofagia, por lo que este es un mecanismo de regulación positiva (Zhang *et al.*, 2007). Otros fármacos usados en la clínica como verapamil y loperamida actúan como reguladores positivos de la autofagia (Gros & Muller, 2014).

Loperamida es un fármaco que ha sido aprobado por la FDA (por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) contra la diarrea causada por gastroenteritis o por la enfermedad intestinal inflamatoria. Se ha reportado que la acción de este fármaco es bloquear los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, en neuronas ganglionares de la raíz dorsal. Por lo que la loperamida puede estar implicado en la inducción de la autofagia o ser un regulador positivo de este mecanismo. También se ha reportado que loperamida tiene actividad antimicrobiana en macrófagos humanos y en macrófagos de ratón al disminuir el crecimiento celular de *M. tuberculosis*. Previamente se había observado esta actividad en un modelo de THP-1 infectadas con *Coxiella burnetii*. Hay una asociación entre la actividad bactericida en los macrófagos humanos y la autofagia, hay evidencia de la degradación de p62. Lo que sugiere que este fármaco inductor de autofagia puede ser utilizado como terapia adyuvante para eliminar la infección contra Tb (Juárez *et al.*, 2016).

Dentro de los estímulos fisiológicos que se han reportado como inductores de autofagia, se encuentran los relacionados con los receptores tipo NOD (por sus siglas en inglés NLRs). Los NLR pueden ser activados por microorganismos que invaden el citosol o que evaden los fagosomas, así como los que son resguardados en vacuolas y logran traslocar sus productos al citosol (Juárez *et al.*, 2009). Estos receptores están constituidos por un dominio central de oligomerización (NOD) y un dominio de señalización que recluta y activa caspasas y por un dominio de reconocimiento rico en repeticiones de leucina (Juárez *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2012).

NOD1 y NOD2 reconocen derivados del peptidoglicano de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, como, ácido meso-diaminopimelico (meso-DAP) ligando de NOD1 y muramil dipeptido (MDP) es ligando de NOD2 (Juárez *et al.*, 2014).

El ácido meso-diaminopimelico (por sus siglas en inglés DAP), existe en forma sintética como L-Ala- γ -D-Glu-ácido-tri-diaminopimelico (por sus siglas en inglés Tri-DAP) es un aminoácido que forma parte del peptidoglicano de *M. tuberculosis*, se encuentra en los enlaces peptídicos de las cadenas de NAM-NAG de la pared celular de las micobacterias. Además, se ha reportado que es esencial en el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis* (Usha *et al.*, 2012). Al reconocer NOD1 a DAP, se induce la producción de IL-6, IL-8, CXCL1, MIP-2, CCL2 y CCL5, así como la producción de péptidos anti-microbianos (beta-defensinas) y la autofagia en células epiteliales (Juárez *et al.*, 2014). La estimulación con Tri-DAP en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* ya ha sido reportada y se observó que la activación por NOD1 disminuyó la carga intracelular de micobacterias. Lo que lleva a la eliminación de patógenos como *M. tuberculosis* (Juárez *et al.*, 2014).

MDP es un constituyente del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias. El reconocimiento de MDP por NOD2 origina la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleucina (IL)-1 β , factor de necrosis tumoral (TNF) - α y IL-6 (Van den Boogaard *et al.*, 2009). Recientemente se ha reportado su participación en la autofagia y la presentación de MHC de clase I y clase II. NOD2, además, se ha reportado que induce la expresión de los péptidos antimicrobianos (beta-defensinas) en células epiteliales humanas y participa en la regulación de la respuesta inflamatoria y el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos (Juárez *et al.*, 2014; Landes *et al.*, 2015).

La inducción de la autofagia implica una mayor eficacia para eliminar *M. tuberculosis* por los distintos componentes que participan en ella. Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) son requeridos en la autofagia ya que son los principales componentes de la maquinaria bactericida de los fagocitos (Yuk *et al.*, 2012; Mathieu, 2015).

4. Péptidos antimicrobianos (AMPs)

Los AMPs son componentes importantes del sistema inmune innato tienen una doble función, la destrucción del agente patógeno y su participación en la modulación de la respuesta inmune adaptativa tras la infección (Wang, 2014). Son secuencias cortas de entre 12 y 50 residuos de aminoácidos, pueden presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiviral, se clasifican en función de su composición de aminoácido, tamaño y conformación (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Haney & E.W. Hancock, 2013). Los AMPs se caracterizan por tener residuos hidrófobos (Leu, Ile, Val, Phe, y Trp), la mayoría tiene un exceso de aminoácidos catiónicos por lo que tiene carga positiva, esta propiedad permite que los AMPs, ante membranas ricas de fosfolípidos puedan tener distintas estructuras anfipáticas, tales como alfa-helicoidal, β -hoja, conformación extendida y en bucle que contienen puentes disulfuro (Haney & E.W. Hancock, 2013).

4.2 Mecanismo de acción

En general se sabe que los AMPs, al adoptar estructuras anfipáticas interactúan con la membrana, la cual está constituida en su mayoría de fosfolípidos con carga negativa, tales como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina, y la fosfatidiletanolamina zwitter ión (PE), por lo que los AMPs siendo catiónicos se acumulan en la superficie de la membrana formando un complejo específico péptido-lípido este provoca alteraciones en la membrana bacteriana como adelgazamiento, formación de poros, alteración de la curvatura, modificación electrostática y perturbaciones localizadas (Fig. 9) (Abedinzadeh *et al.*, 2015).

A partir de la perturbación de la membrana, los AMPs ingresan a través de la membrana al citoplasma de la bacteria e interactúan con ácidos nucleicos, enzimas e incluso orgánulos. El ingreso es diferente para cada AMPs, depende de la composición específica de lípidos de la membrana bacteriana y del péptido dirigido, se conocen básicamente tres formas diferentes de ingreso: 1) el mecanismo de “barrel-stave”, 2) el modelo toroidal y 3) el modelo de alfombra (Fig. 10) (Zaslhoff, 2002; Guilhelmelli *et al.*, 2013).

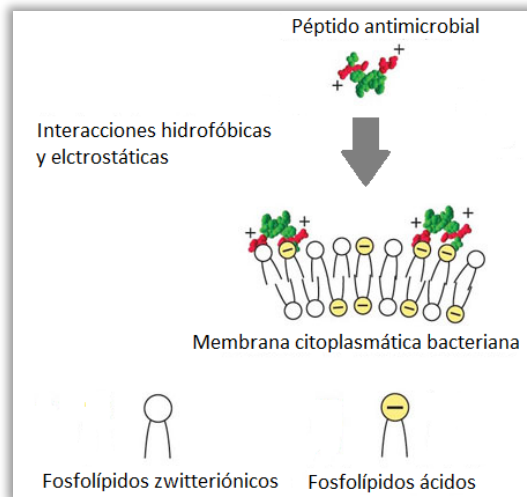


Figura 9. Interacción de AMPs con la membrana bacteriana. Los péptidos catiónicos adoptan estructuras anfipáticas que presentan regiones hidrófobas e hidrófilas para unirse por medio de interacciones electrostáticas a las membranas bacterianas constituidas por fosfolípidos ácidos. Modificada de Zasloff, 2002.

En el mecanismo “barrel-stave” los péptidos forman poros transmembranales ya que su inserción es en anillo en forma de barril, directa en el núcleo lipídico, AMP como monómero se une a la superficie de la membrana bacteriana posteriormente se oligomeriza y forma los poros, la estructura del péptido hidrófoba ya sea α -hélice y/o β -hoja, son las que permiten la formación de poros al interactuar con los lípidos, la región hidrofílica del péptido forma el revestimiento del poro (Silvaa, *et al.*, 2016). Mientras que en el modelo “toroidal” los péptidos se insertan intercalándose entre los lípidos en la membrana bacteriana en forma de paquete, esto induce que la monocapa lipídica se doble a través del poro, al final la cabeza de ambos péptidos y lípidos se posicionan hacia el centro del poro (Nguyen *et al.*, 2011; Guilhelmelli *et al.*, 2013).

En el modelo de “alfombra”, el AMP se alinea de forma paralela a la superficie de la membrana, formando una capa extensa tipo alfombra, la interacción con la membrana se da por atracción eléctrica al aumentar la cantidad de AMP hasta su concentración umbral, la membrana se desintegra lo que provoca lisis celular o la formación de poros por debajo de la concentración del umbral, por lo que permeabilización de la membrana depende de la concentración de AMP (Nguyen *et al.*, 2011; Silvaa, *et al.*, 2016). Hay otros mecanismos no comunes que se han descrito, como el modelo de detergente, en el cual la alta concentración de AMPs en la membrana forma poros en forma de micela, colapsando la membrana bacteriana (Wimley, 2010). La mayoría de modos de acción de AMPs influye en la integridad de la membrana microbiana, sin embargo no siempre es letal (Wimley, 2010).

Algunos AMPs atraviesan la membrana bacteriana sin causar su permeabilización y se dirigen a objetivos diana intracelulares como ADN, ARN y proteínas, al unirse a ellos interfieren en vías intracelulares (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Wang, 2014). La inhibición de vías intracelulares sugiere que puede haber mecanismos de captación celular de AMP, como la penetración directa y la endocitosis (Adem & Dacheng, 2013).

Hasta el día de hoy no se ha reportado una relación entre la estructura de un AMP y su mecanismo de acción, puede haber AMPs con estructuras muy similares pero con diferentes mecanismos de acción y objetivos diana, algunas otras características fisicoquímicas (tamaño, carga, hidrofobicidad, anfipaticidad, y solubilidad) son las que han permitido definir la actividad antimicrobiana de los diversos AMPs (Adem & Dacheng, 2013). De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas se han agrupado en familias, en humanos se reconocen principalmente tres familias: defensinas, catelicidinas e histaminas (Rivas-Santiago *et al.*, 2006).

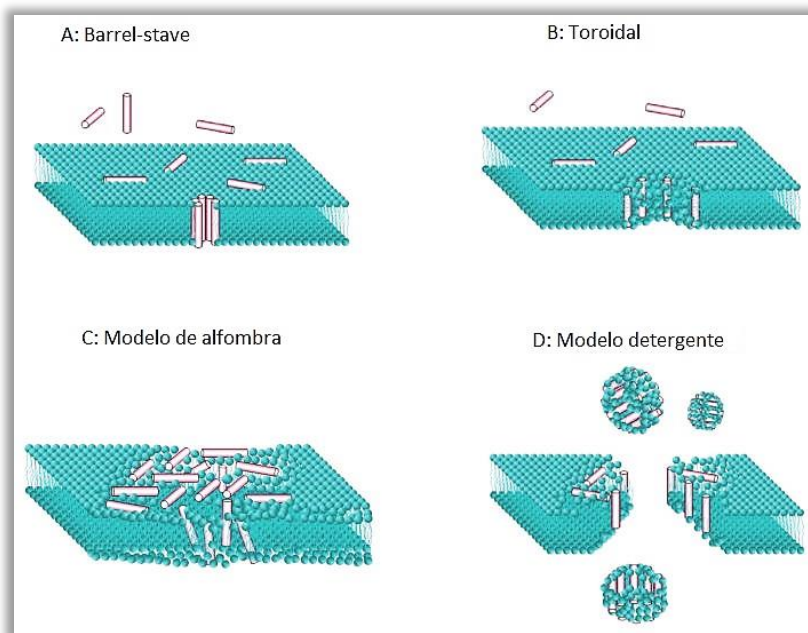


Figura 10. Ingreso de los AMPs. A) En el mecanismo “barrel-stave” los péptidos se extienden sobre la membrana, la estructura del péptido hidrófoba ya sea α -hélice y/o β -hoja son las que permiten la formación de poro en forma de barril. B) En el mecanismo toroidal la formación de poros implica un menor número de péptidos, estos se insertan en la membrana formando intercalándose con los lípidos de la formando el poro. C) en el mecanismo de “alfombra” la interacción de AMPs con la membrana bacteriana es accionado por atracción eléctrica y, cuando la cantidad de AMPs sobre la superficie de la membrana alcanza una concentración umbral, se desintegra la membrana, lo que lleva a la lisis celular. D) a alta concentración de péptidos la integridad de la membrana colapsa, formando una micela. Modificada de Wimley, 2010.

4.3 AMPs en humanos

Las defensinas y las catelicidinas han sido muy estudiados por su importancia médica ya que tienen otras funciones como inmunomoduladores, participan en la apoptosis y la cicatrización de heridas (Wang, 2014). Sin embargo existe una amplia variedad de péptidos en el ser humano de los que hasta el momento se desconoce su modo de acción (Haney & E.W. Hancock, 2013). A continuación se describen algunos de los péptidos que se han relacionado con la autofagia y *M. tuberculosis*.

4.4 Defensinas

Las defensinas son los AMPs más comunes en el ser humano, su conformación puede ser entre 29-42 aminoácidos, son ricos en arginina y se caracterizan por tener una estructura hoja- β y tres enlaces disulfuro (Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2013). Se clasifican en función a su estructura y la posición del enlace disulfuro en dos clases, α -defensinas y β -defensinas, en los seres humanos se ha reconocido la expresión de 6 α -defensinas y 31 β -defensinas (Wang, 2014). Las α -defensinas se subdividen en péptidos mieloides (HNP1-4) y entéricos (defensina humana (HD) 5 y 6) (Wilson *et al.*, 2013). HNP1 a HNP4 se expresan principalmente en los neutrófilos a concentraciones altas, macrófagos, monocitos, células NK, algunas células T, células B y células dendríticas inmaduras. HD5 y HD6 se expresan principalmente en las células de Paneth del intestino delgado (Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Zasloff, 2007). Las β -defensinas (HBDs) se expresan principalmente en las células epiteliales y las mucosas de superficie que están en contacto con el medio ambiente, además de los macrófagos, los monocitos y las células dendríticas inmaduras (Zasloff, 2007; Wilson *et al.*, 2013).

Una tercera clase de defensina se ha identificado en los leucocitos de macaco rhesus, tienen 18 aminoácidos y se le ha denominado como θ -defensina, hasta el momento se han identificado seis θ -defensinas todas en primates no humanos, se ha reportado que tienen mayor actividad antiviral que antibacteriana o antifúngica (Hazlett & Wu, 2011). Las defensinas tienen un papel esencial en la inmunidad innata al expresarse principalmente en epitelios y mucosas, son mejor conocidas por llevar a cabo su mecanismo de acción directamente sobre la membrana de los agentes patógenos (Gutsmann, 2016). Las defensinas han mostrado tener un amplio espectro bactericida en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como capacidad para inactivar a una amplia variedad de virus, hongos y parásitos (Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Hazlett & Wu, 2011).

Los detalles del mecanismo antimicrobiano de todas las defensinas aún no se tiene claro, sin embargo se especula que por ser moléculas anfipáticas con cadenas de aminoácidos cargados positivamente y cadenas hidrofóbicas, actúan directamente en la membrana microbiana por atracción electrostática con los fosfolípidos, formando canales dependientes de voltaje permeable a iones, además se ha reportado que en bacterias algunas α -defensinas inhiben la síntesis de la pared celular (Hazlett & Wu, 2011; Gutschmann, 2016). Parte de su actividad antimicrobiana, su función inmunomoduladora contribuye a la eliminación del patógeno, ya que actúan como quimioatrayentes de células como neutrófilos, linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y células dendríticas las cuales liberan mediadores inflamatorios (Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Hazlett & Wu, 2011).

La aplicación clínica de las defensinas en enfermedades infecciosas es muy amplia, por ejemplo su aplicación por vía tópica en pacientes con quemaduras graves disminuye el 90% de infecciones recurrentes, además de contribuir en la cicatrización. También se consideran como posibles candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, ya que se ha reportado que la infección con *M. tuberculosis* induce la secreción de defensinas, que al asociarse a la membrana micobacteriana ocasionan lisis celular (Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Gutschmann, 2016). Una de las defensinas que se ha reportado que posee actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *M. tuberculosis* es la hepcidina (Sowa *et al.*, 2011). La hepcidina es un péptido antimicrobiano que está codificado por el gen HAMP, ubicado en el cromosoma 19q13, su nombre se debe a que se aisló de orina humana en 2001, *hep* por hepatocito y *cidina* por su actividad antimicrobiana (García *et al.*, 2010). Este péptido además actúa como hormona reguladora de hierro, al inhibir la absorción de hierro por el duodeno y reciclaje del hierro por macrófagos de los eritrocitos senescentes (Sowa *et al.*, 2011). Se expresa en respuesta a una sobrecarga de hierro para mantener la homeostasis y ante estímulos inflamatorios (vía de la interleucina 6 / STAT3), hepcidina disminuye durante la anemia o hipoxia (Sowa *et al.*, 2011; Armitage & Moran, 2016).

El hierro es una molécula que en condiciones infecciosas es indispensable, ya que los patógenos invasores requieren hierro para replicarse, esto se relaciona con la actividad antimicrobiana de Hepcidina ya que priva del hierro a los patógenos (Paéz *et al.*, 2014; Armitage & Moran, 2016). El organismo ya sea durante una infección o trauma secuestra y reduce el hierro por distintos mecanismos con la finalidad de disminuir su disponibilidad para los patógenos invasores, los niveles en circulación y la síntesis de hepcidina aumentan (Paéz *et al.*, 2014).

El mecanismo de hepcidina para regular la salida del flujo de hierro es mediante su unión a la proteína de membrana ferroportina1 (FPN1), esta proteína es esencial para el transporte de hierro, transporta el hierro del interior de las células hacia la circulación (Paéz *et al.*, 2014). El complejo FPN1- hepcidina se fosforila y estimula la formación de una vesícula por invaginación de la membrana celular para que sea internalizado en la célula, el complejo se ubiquitina y se degrada por enzimas lisosomales, de esta forma hepcidina reduce la concentración de FPN1 y en consecuencia se reduce la capacidad de la célula para exportar hierro, además el hierro disponible en citoplasma es secuestrado por ferritina (Fig.11) (Sowa *et al.*, 2011; Paéz *et al.*, 2014). Hecpidina se expresa principalmente en el hígado, se ha detectado también en otros órganos como el pulmón, páncreas y corazón (Sowa *et al.*, 2011). El impacto de los niveles de hierro es variable según el nicho (órgano, tejido o tipo celular) de invasión del patógeno (Armitage & Moran, 2016). En fagosomas que contienen micobacterias se reportó que hepcidina poseía actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *M. tuberculosis* (Sowa *et al.*, 2011).

M. tuberculosis utiliza diversos métodos para acarrear el hierro de la célula huésped, ya sea por absorción directa de transferrina (proteína transportadora de hierro en el plasma) y de hierro-cargado y por sideróforos (Armitage & Moran, 2016). La capacidad de hepcidina para perturbar la membrana bacteriana se ve afectada por el pH del medio, la disrupción es más evidente a pH ácido que a pH neutro (Wang, 2014). Las micobacterias adquieren hierro por medio de sideróforos, además de poseer micobactinas asociadas a la membrana que captan el hierro del huésped, además de transportar transferrina y lactoferrina al fagosoma (Mahendra *et al.*, 2014). El hierro es indispensable para la supervivencia de *M. tuberculosis*, sin la presencia de micobactinas Mtb pierde la capacidad de crecer dentro de los macrófagos (Mahendra *et al.*, 2014). Estudios en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* muestran inducción y mayor producción de hepcidina, además Rodríguez *et al.*, en 2014 publicó un aumento de este péptido estimulando con MDP y Tri-DAP. Esta actividad sugiere que la actividad antimicrobiana de hepcidina contra *M. tuberculosis* es eficaz, por lo que una mayor comprensión de este mecanismo podría incidir en el desarrollo de tratamientos contra la Tb (Sowa *et al.*, 2011; Johnson & Wessling-Resnick, 2012; Armitage & Moran, 2016).

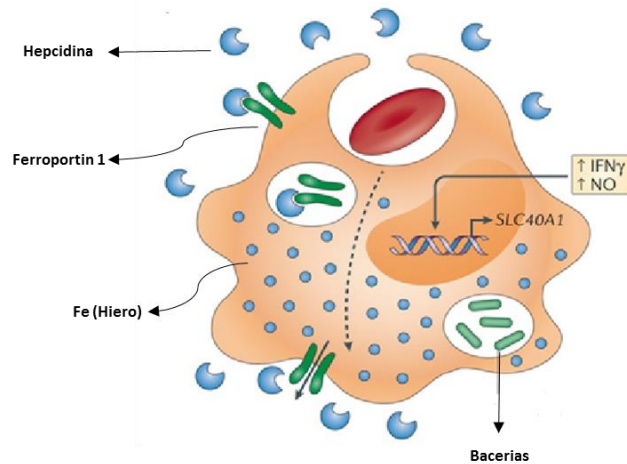


Figura 11. Mecanismo antimicrobiano de Hepcidina. Hepcidina se une al transportador de hierro del macrófago ferroportin 1 (FPN1), el complejo FPN1-hepcidina es endocitado y el hierro es secuestrado por la ferritina (su actividad es estimulada por el secuestro de FPN1), restringiendo la disponibilidad de hierro para las bacterias. El efecto favorable sobre las bacterias se opone por la producción local de interferón γ (IFN γ) y el óxido nítrico (NO), que estimulan la transcripción del gen que codifica la ferroportina (SLC40A1) de una manera autocrina o paracrina. Modificada de Ganz & Nemeth, 2015.

4.5 Catelicidinas

Las catelicidinas, inhiben la proteasa catepsina-L, tienen un dominio N-terminal conservado llamado dominio catelina, son una familia de péptidos lineales y anfipáticos, que en contacto con la membrana adquieren una estructura α -helicoidal (Zasloff, 2007; Duplantier *et al.*, 2013). En su forma de precursor, estos péptidos normalmente se encuentran en los gránulos de las células NK, así como en los neutrófilos y en los epitelios de las mucosas de los pulmones (Duplantier *et al.*, 2013). Dentro de esta familia se han descrito en mamíferos alrededor de 30 péptidos, sin embargo en el ser humano solo se ha localizado e investigado una, LL-37 (Piktel *et al.*, 2016). A partir de neutrófilos humanos, se aisló una proteína precursora de 18kD denominada hCAP-18, el péptido que se origina a partir de este precursor está conformado por 37 aminoácidos y comienza por un par de leucinas por lo que se le denominó LL-37 (Duplantier *et al.*, 2013; Wang, 2014). LL-37 se induce y produce en células epiteliales, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y células cebadas, (Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Gutschmann, 2016). Su capacidad antimicrobiana es de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y virus, además tiene diversos efectos de neutralización de lipolisacáridos, como inmunomodulador (proinflamatorio y antiinflamatorio), quimioatrayente y en la promoción de cierre de heridas (Dürr *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2015).

Se ha sugerido que el mecanismo antimicrobiano de LL-37 es similar al de un detergente, al formar poros provoca la disrupción de la membrana y la posterior fuga de iones (Lee *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2016). El mecanismo antimicrobiano de LL-37 se ha descrito por ensayo de microscopia de fluorescencia con *E. coli*. Primero LL-37 se une a la membrana externa y a su lipopolisacárido (LPS) saturándola, luego LL-37 entra al espacio periplásmico deteniendo el crecimiento de *E. coli*, finalmente LL-37 llega a la membrana citoplasmática y la permeabiliza (Dürr *et al.*, 2006; Sochacki *et al.*, 2011). Se han propuesto tres modelos (barrel-stave, toroidal y alfombra) para la forma de permeabilizar de LL-37. En el modelo “barrel-stave”, LL-37 se insertaría en la membrana interior con la cara hidrofóbica del péptido alineado con la región del núcleo lipídico y la cara hidrofílica formando la región interior del poro. El modelo toroidal sería, péptidos de LL-37 unidos podrían agregarse y doblar las monocapas lipídicas de forma continua a través del poro de tal manera que en el centro del poro se alinean la cabeza de los péptidos insertados y la monocapa lipídica. En el modelo de alfombra, péptidos de LL-37 permeabilizarían la membrana al orientarse paralelamente a la superficie de la bicapa lipídica y formando una capa extensa o de alfombra (Lee *et al.*, 2011).

En los tres modelos el mecanismo general resultaría en la formación de poros en la membrana seguido de la lisis bacteriana (Duplantier & Van Hoek, 2013). Varios estudios han reportado que la importancia de LL-37 en otros patógenos como *M. tuberculosis*, el cual interfiere en el crecimiento durante las primeras etapas de la infección en macrófagos humanos (Torres *et al.*, 2015). Se ha propuesto que LL-37 debe tener doble función en la eliminación de *M. tuberculosis*. En la infección temprana LL-37 es un factor expresado por células epiteliales del pulmón y los macrófagos alveolares, contribuyendo al control del crecimiento de las micobacterias, y en la infección avanzada es un factor inmunomodulador ya que participa en la supresión de la inflamación excesiva (Rivas-Santiago *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2015). Se ha reportado que existe una relación en la expresión de este péptido y el reconocimiento de muramilo dipéptido (MDP) de *M. tuberculosis* por el receptor NOD2. NOD2 está involucrado en el control del crecimiento de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos y murinos, se ha sugerido que es a través de la liberación de péptidos antimicrobianos y la inducción de autofagia, ya que MDP aumenta la expresión de LL-37, IRGM y LC3 y elimina de los macrófagos alveolares a la micobacteria (Arnett *et al.*, 2016).

4.6 Lipocalinas

Las lipocalinas son AMPs, sus funciones están relacionadas con procesos biológicos como la respuesta inmune, el crecimiento celular, la proliferación y el metabolismo, así como el transporte de hierro (Alcayaga *et al.*, 2017). Una de las proteínas que pertenecen a este grupo y se ha relacionado con la infección de la Tb es Lipocalin-2 (Lcn2).

Se ha reportado que este péptido tiene una participación antimicrobiana importante en la respuesta inmune innata y que ejerce un papel indirecto contra los patógenos (Du *et al.*, 2015; Alcayaga *et al.*, 2017). Lcn2 o también denominada lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (por sus siglas en inglés NGAL) o siderocalina, 24p3 o uterocalina, tiene una estructura terciaria en forma de barril con una parte hidrofóbica, de 25kD. Fue identificada primeramente en los gránulos de neutrófilos, posteriormente fue reportada en otras células como macrófagos, adipocitos, células madre mesénquimales y células epiteliales (Guglani *et al.*, 2012; Alcayaga *et al.*, 2017). Una de las funciones por las que se caracteriza este péptido es el secuestro de sideróforos bacterianos cargados de hierro, esta actividad antimicrobiana limita del hierro esencial a las bacterias deteniendo su crecimiento (Fig. 12) (Alcayaga *et al.*, 2017).

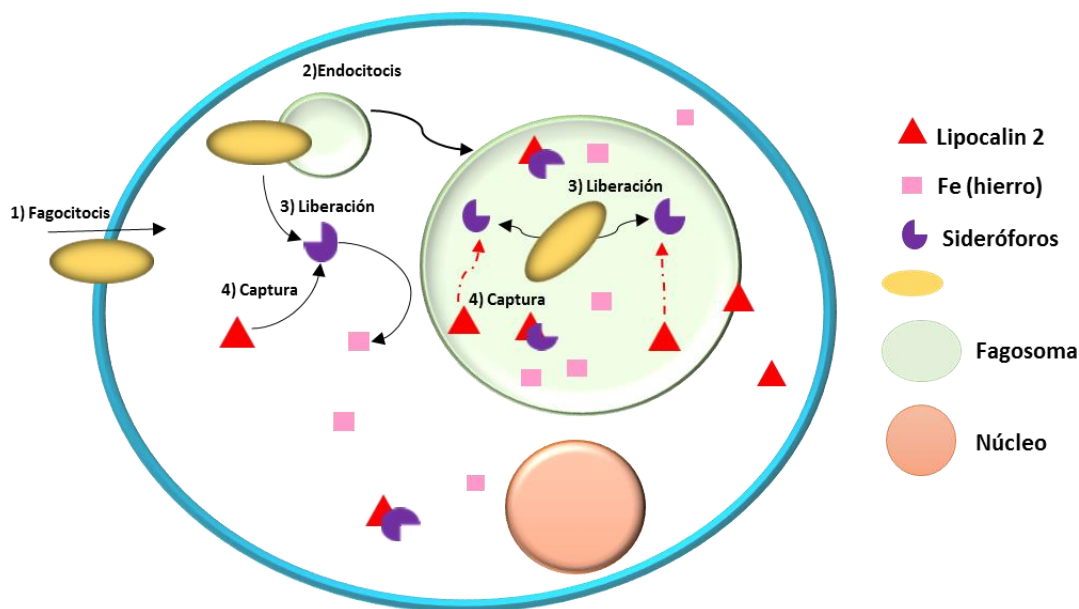


Figura 12. Mecanismo de acción de Lcn2. *M. tuberculosis* es 1) fagocitada por el macrófago y 2) endocitada en fagosomas, al mismo tiempo que 3) libera sus sideróforos para captar Fe. 4) Lcn2 desde el citoplasma comienza a secuestrar los sideróforos para bloquear la captura del Fe. Esto sucede dentro y fuera del fagosoma.

En las micobacterias se ha reportado que Lcn2 secuestra sideróforos llamados micobactinas, además de que inhibe *in vitro* el crecimiento de *M. tuberculosis* y su replicación intracelular en líneas celulares de macrófagos (Guglani *et al.*, 2012). En ratones knockout en Lcn2 se ha reportado que muestran mayor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* H37Rv y una mayor carga bacteriana en las células epiteliales de pulmón (Randall *et al.*, 2015). Saiga *et al.*, en 2008 mostraron que en los macrófagos alveolares, Lcn2 colocaliza con *M. tuberculosis*, dentro del fagosoma en que se internaliza a la micobacteria pero se desconoce el mecanismo antimicrobiano de Lcn2. Se ha propuesto que al entrar la micobacteria al endosoma toma el hierro al liberar la micobactinas y a su vez Lcn2 se une al complejo micobactina-hierro bloqueando la adquisición de hierro por la micobacteria (Saiga *et al.*, 2008). Lcn2 recientemente está siendo estudiada por su actividad antimicrobiana y también se ha sugerido ser un biomarcador para enfermedades pulmonares, lesión en riñón, insuficiencia hepática y en la formación de tumores por lo que la relevancia clínica sobre este péptido aumenta a pesar de que hoy en día se desconoce sus mecanismos de acción exactos (Alcayaga *et al.*, 2017).

4.7 AMPs y *Mycobacterium tuberculosis*

El escenario actual del tratamiento contra la Tb sugiere la investigación y el desarrollo urgente de nuevas terapias. Una de las líneas de investigación se ha centrado en compuestos naturales o sus derivados, ya que la adquisición de resistencia a los compuestos de origen natural es un fenómeno raro. Se sabe que los péptidos antimicrobianos son fundamentales en la defensa contra infecciones y/o enfermedades humanas (Abedinzadeh *et al.*, 2015). Los avances en la investigación sobre los mecanismos de regulación y su función exacta durante la inflamación, de distintos péptidos antimicrobianos en la infección por *M. tuberculosis* aún no son claros, por lo que, comprender su participación, expresión y su papel como inmunomoduladores en la respuesta inmune innata contra *M. tuberculosis* ayudaría al diseño de nuevas terapias contra la Tb (Silva *et al.*, 2016; Alcayaga *et al.*, 2017).

Hipótesis

La estimulación con Tri-DAP y loperamida del macrófago humano infectado con *M. tuberculosis* H37Rv genera la producción de Lipocalin-2, LL-37 y hepcidina proteínas con actividad antimicrobiana y su reclutamiento al sitio de localización de la bacteria.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de Tri-DAP y loperamida sobre la expresión de Lipocalin-2, LL-37 y hepcidina en macrófagos humanos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.

Objetivos particulares

- Determinar la presencia de LCN2, LL-37 y hepcidina en MDMs.
- Determinar la colocalización de estos antimicrobianos con *M. tuberculosis* H37Rv en MDMs.

Métodos

Obtención de macrófagos a partir de células mononucleares de sangre periférica.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica a partir de paquetes leucocitarios de donadores sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. En tubos falcon de 50mL se añadieron 20mL de sangre proveniente del paquete leucocitario, y se diluyó con 20 mL de medio RPMI G+G (RPMI (Lonza)) suplementado con 50µg/ml de sulfato de gentamicina (Lonza) y 200mM de L-glutamina (Sigma Aldrich), y se añadió 10mL de solución separadora de linfocitos, posteriormente los tubos se centrifugaron a 1200rpm/18°C por 45 minutos. El anillo leucocitario se recuperó con una pipeta de transferencia a un tubo falcon de 50mL y se lavó tres veces completando cada vez el volumen a 50mL con medio RPMI G+G a 1500rpm/10°C por 15 minutos.

El sobrenadante se desechó y el paquete celular fue resuspendido con 600µL de Buffer de Miltenyi y 150µL de perlas anti-CD14 (Miltenyi Biotech), esto se incubó por 15 minutos a 4°C, posteriormente se lavó con 2 mL Buffer de Miltenyi y se centrifugó a 1200rpm a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos y se transfirió por una columna magnética (Miltenyi Biotech) prelavada con 2mL de Buffer de Miltenyi a un tubo falcon de 50mL. La columna se lavó dos veces con 3mL de Buffer de Miltenyi. Después fue centrifugado a 1200rpm/TA por 10 minutos, el sobrenadante se desechó y el paquete celular fue resuspendido en 5mL de RPMI-10%SH (suero humano descomplementado). Finalmente las células se contaron en la cámara de Neubauer, en una dilución 1:1 (10µL azul de tripano y 10µL de la suspensión celular), se ajustó la suspensión celular a 1×10^6 células/ml. La viabilidad fue de 90% en todos los casos.

Diferenciación de monocitos a macrófagos

Los monocitos de cada sujeto se colocaron en cámaras de poliestireno de 8 pozos (Chamber slides, Costar) a razón de 5×10^5 células por pozo, dos réplicas de cada sujeto y se incubaron durante 7 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió por medio fresco a los 3 días.

Estimulación

Para estudiar la LCN2 los MDMs se estimularon con 3µM de loperamida (Sigma Aldrich), 5 µg/ml de Tri-DAP (Ácido tri-diaminopimélico, Invivogen) y 10 µg/ml de MDP (muramil dipéptido, Invivogen) y para Hepcidina y LL37 solamente fueron estimulados con 3µM de loperamida (Sigma Aldrich) durante 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

Infección con *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv

Los MDMs se infectaron con *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv a razón de 5 bacterias por macrófago durante 1 h, después se lavaron los pozos tres veces con medio RPMI para eliminar las bacterias que no fueron fagocitadas y se incubaron 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente las células para el estudio de LCN2 fueron estimulados con 3µM de loperamida (Sigma Aldrich), 5 µg/ml de Tri-DAP (Ácido tri-diaminopimélico, Invivogen) y 10 µg/ml de MDP (muramil dipéptido, Invivogen). Para el caso de Hepcidina y LL37 solamente fueron estimulados con 3µM de loperamida (Sigma Aldrich). Para cada péptido se estimuló durante 24 h adicionales.

Microscopía de Fluorescencia

Tinción

Para llevar a cabo la tinción, se eliminó el medio de cultivo de cada pozo por aspiración suave y se lavaron con solución de lavado 1 (PBS, 0.1% albúmina BSA) dos veces. Posteriormente fueron fijadas con 400µl de paraformaldehído al 4% por cada pozo y posteriormente almacenadas a 4°C durante 24 h.

Después fueron lavadas con solución de lavado 1 (PBS, 0.1% albúmina BSA) dos veces y se bloquearon con 400µl de solución de bloqueo (PBS, 10 % SFB, 1 % BSA, 0.3 % Tritón X-100) durante 45 minutos, por pozo. Sin lavar se añadió el anticuerpo primario Anti-LCN2 mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:100, Anti-Hepcidina mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) diluido, Anti-LL37 mouse polyclonal IgG (NOVUS) diluido 1:75 para estos anticuerpos primarios se utilizó la solución de dilución (PBS, 1 % BSA, 1 % SFB, 0.3 % Tritón X-100, 0,01 % NaN₃). Posteriormente se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavaron dos veces por 5 minutos con solución de lavado 2 (PBS, 1 % BSA, 0.05 % Tween 20). Luego se añadió el anticuerpo secundario Alexa 488 goat anti- mouse IgG (Life Technologies) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. En los últimos 10 minutos de la incubación se añadió 50µl de Hoescht (Enzo) diluido 1:1000 en solución de dilución y se incubó durante 10 minutos en oscuridad. Una vez terminado este tiempo se lavó la muestra dos veces con solución de lavado 2 (PBS, 1 % BSA, 0.05 % Tween 20) y se desmontó la cámara, se añadió 25µl de medio de montaje ProLong Gold Antifade Reagent (Life technologies) y se dejaron curar las laminillas durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron a 4° C en oscuridad hasta su visualización en un microscopio de fluorescencia Axio Scope 1.A (Carl Zeiss) y se trataron como las muestras anteriores.

Sin lavar se añadieron, 10 minutos antes de terminar la incubación, 50 µl de Hoescht (Enzo) diluido 1:1000 en solución de dilución (PBS, 1 % BSA, 1 % SFB, 0.3 % Tritón X-100, 0,01 % NaN₃) y se dejó incubar por 10 minutos, después se lavaron dos veces con solución de lavado 2(PBS, 1 % BSA, 0.05 % Tween 20), se desmontó la cámara y se añadió 25µl de medio de montaje (ProLong Gold Antifade reagent, Life technologies).

Finalmente se dejaron curar las laminillas durante 24 horas en oscuridad y a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron a 4° C hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia.

Procesamiento de la imagen

Las células se visualizaron en un microscopio Axio Scope.A1 (Carl Zeiss) a inmersión. Se utilizó un ocular 10x y un objetivo N-ACHROPLAN de 100x, apertura numérica 1.25 con anillo de fases ph3. La fluorescencia se detectó con distintos juegos de filtros (Carl Zeiss). Para Alexa Fluor 488 (fluorescencia verde) se usó el juego de filtros 38 (excitación: BP 450-510, beamsplitter: FT 495, emisión: BP 500-550), para Alexa Fluor 594 (fluorescencia rojo) el juego de filtros 64 HE (excitación: BP 575-599, beamsplitter: FT 605, emisión: BP 612-682) y para Hoechst (fluorescencia azul) el juego de filtros 49 (excitación: G 365, beamsplitter: FT 395, emisión: BP 420-470).

Las imágenes fueron tomadas con una cámara monocromática Mrm (Carl Zeiss) y analizadas con el software Zen Pro 2.1 (Carl Zeiss).

Análisis estadístico

Para comparar la expresión de las proteínas en muestras relacionadas entre sí, se realizó una ANOVA de Friedman seguida de la prueba de Dunn para comparación de pares de muestras. Para comparar pares de muestras relacionados en la localización se realizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Se utilizó el software GraphPad Prism 6.0 y se consideró cualquier valor de p menor a 0.05 como significativo.

Resultados

Controles de la tinción

Se incluyeron controles de la tinción que se realizaron en dos experimentos independientes de la siguiente manera. Los controles positivos de las proteínas se realizaron en células estimuladas con MDP ya que se ha reportado que MDP induce la expresión de péptidos antimicrobianos (Juárez *et al.*, 2014; Landes *et al.*, 2015). Las células sin estímulo y las estimuladas con MDP se tiñeron por separado para cada péptido según el anticuerpo primario Anti-LCN2, Anti-LL37, Anti-hepcidina y revelado con el anticuerpo secundario Alexa 488 goat anti-mouse IgG. Se compararon ambas tinciones de las dos condiciones para cada anticuerpo primario (Fig. 13a) y se observó que las células estimuladas con MDP son positivas para cada péptido.

El control positivo de *M. tuberculosis* H37Rv se realizó en una muestra de solo bacterias fue teñida con el suero hiperinmune de conejo Anti-Mtb y se reveló con el anticuerpo secundario Alexa 594 goat anti-rabbit IgG y se observó que si se tiñó Mtb (Fig. 13b).

Los controles negativos de las tinciones (Fig. 14) se realizaron en células no estimuladas. Para analizar si las células presentaban autofluorescencia. Al respecto no se observó autofluorescencia significativa. En la Fig. 14a se muestra la superposición (merge) de las fluorescencias azul y verde y en la Fig. 14b se muestra la superposición de las fluorescencias azul y roja. Para analizar si los anticuerpos secundarios Alexa 488 goat anti-mouse IgG y Alexa 594 goat anti-rabbit IgG tienen unión inespecífica, la tinción se realizó sin el anticuerpo primario pero si con el secundario y tiñendo el núcleo (Hoescht) (Fig. 14a y 14b). Se observó que ninguno de los anticuerpos secundarios presentan marcaje inespecífico.

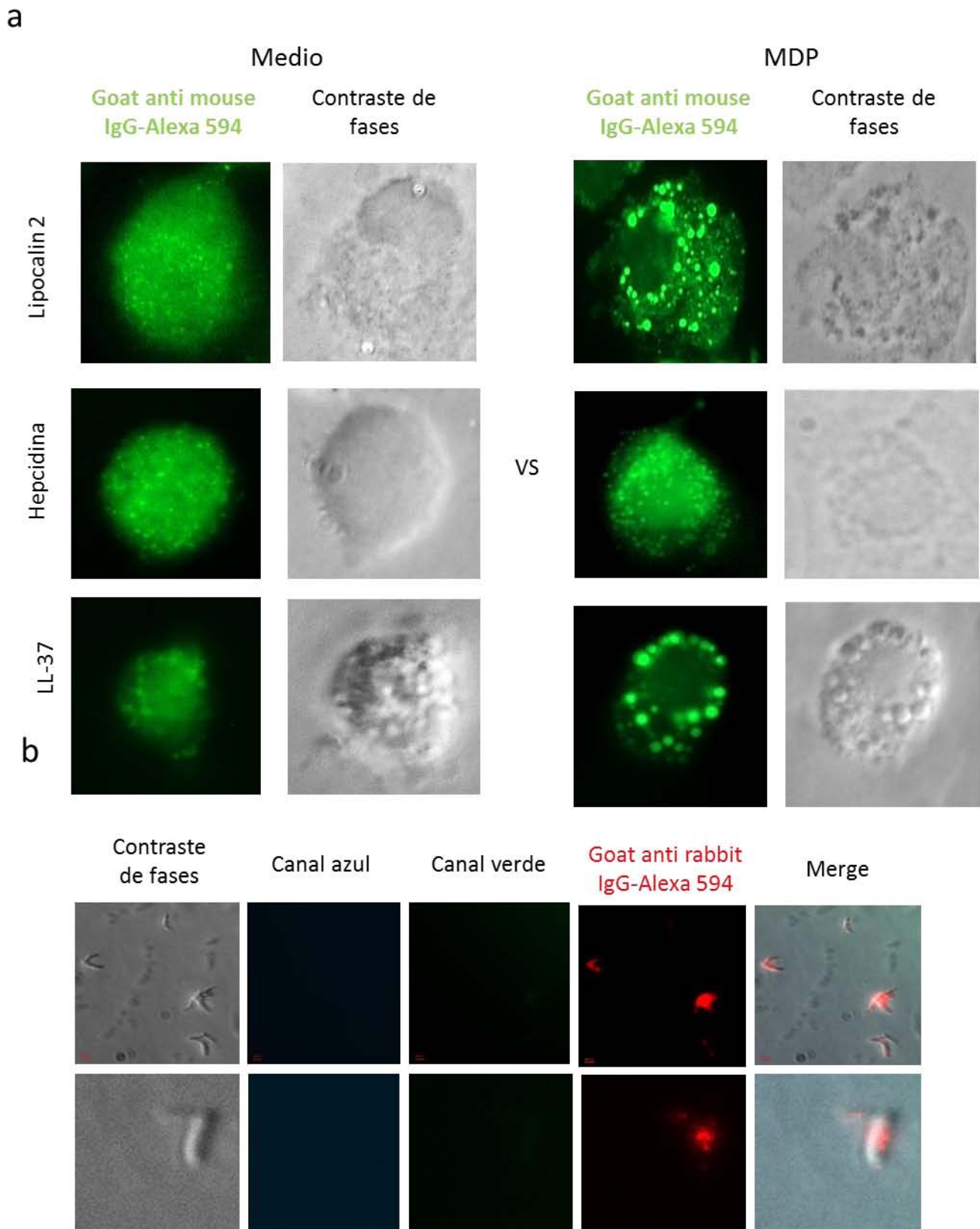


Figura 13. Controles positivos de las tinciones. a) Control de la tinción de la fluorescencia verde y b) control de la fluorescencia roja. Las células sin estímulo y con MDP fueron fijadas con la tinción del anticuerpo primario Anti-LCN2, Anti-LL37 y Anti-hepcidina y se reveló con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488. *M. tuberculosis* H37Rv fue teñida con el anticuerpo primario Anti-Mtb y revelado con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 594. Se fotografiaron en las mismas condiciones experimentales.

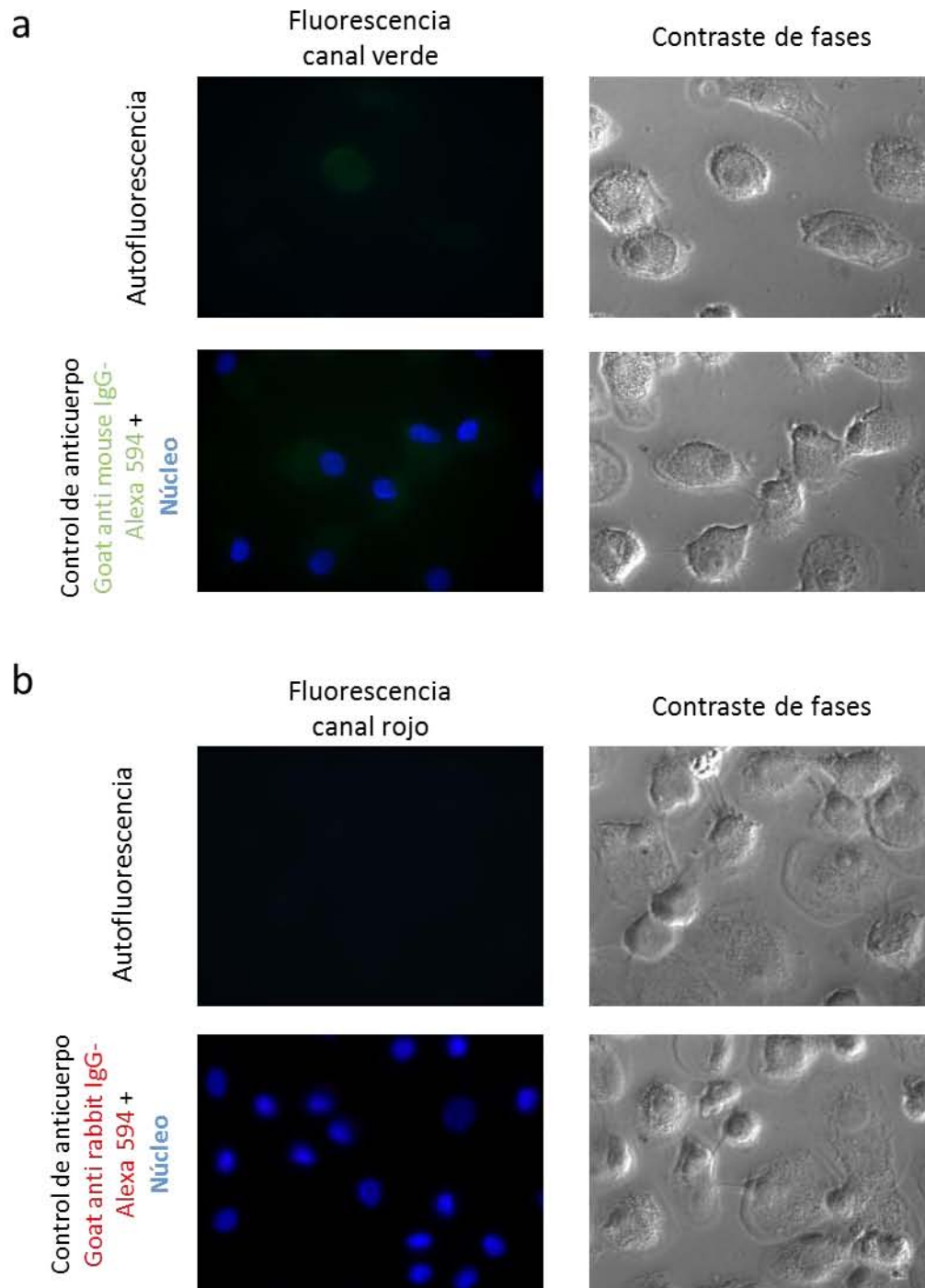


Figura 14. Controles negativos de las tinciones. a) Control de la tinción de fluorescencia verde y b) control de tinción de fluorescencia roja. Las células fueron fijadas sin tinción (autofluorescencia) y con la tinción normal pero en ausencia del primer anticuerpo (control de anticuerpo) y fotografiadas en las mismas condiciones experimentales.

Expresión de Lipocalin-2 en macrófagos humanos

Para conocer si los inmunomoduladores en estudio inducen la expresión de la proteína de Lipocalin 2 se estudiaron MDMs. La expresión de este péptido se evaluó por microscopía de fluorescencia en MDMs no infectados pero estimulados con MDP, Tri-DAP y loperamida durante 24 h (Fig.15), así como en MDMs infectados con la cepa virulenta de Mtb y estimulados 1h post-infección con los mismos inmunomoduladores por otras 24 h (Fig.16). Todas las células tuvieron un nivel basal de expresión (Tabla 2), el porcentaje de células positivas para este marcador aumentó al estimular las células con Tri-DAP y loperamida aunque no de manera significativa.

Tabla 2. Efecto de MDP, Tri-DAP y loperamida sobre la expresión de los péptidos antimicrobianos en MDMs infectados y sin infectar.

Péptido	Estímulo	Mediana	Mínimo	Máximo
LCN2 n= 4	Medio	80	60	100
	MDP	90.48	72.73	96.43
	Tri-DAP	100	75	100
	Loperamida	100	83.33	100
	Mtb	87.3	60.71	88.89
	Mtb+MDP	96.22	89.29	100
	Mtb+Tri-DAP	98.22	95.83	100
Hepcidina n= 3	Mtb+Loperamida	100	100	100
	Medio	73.68	41.67	80
	Loperamida	67.86	65.38	84.62
	Mtb	80	40	85.71
LL-37 n= 3	Mtb+Loperamida	77.78	56.52	94.74
	Medio	85.71	80	88
	Loperamida	100	100	100
	Mtb	93.1	44.78	93.33
	Mtb+Loperamida	100	51.72	100

* Porcentajes de MDMs positivos para LCN2, hepcidina y LL-37.

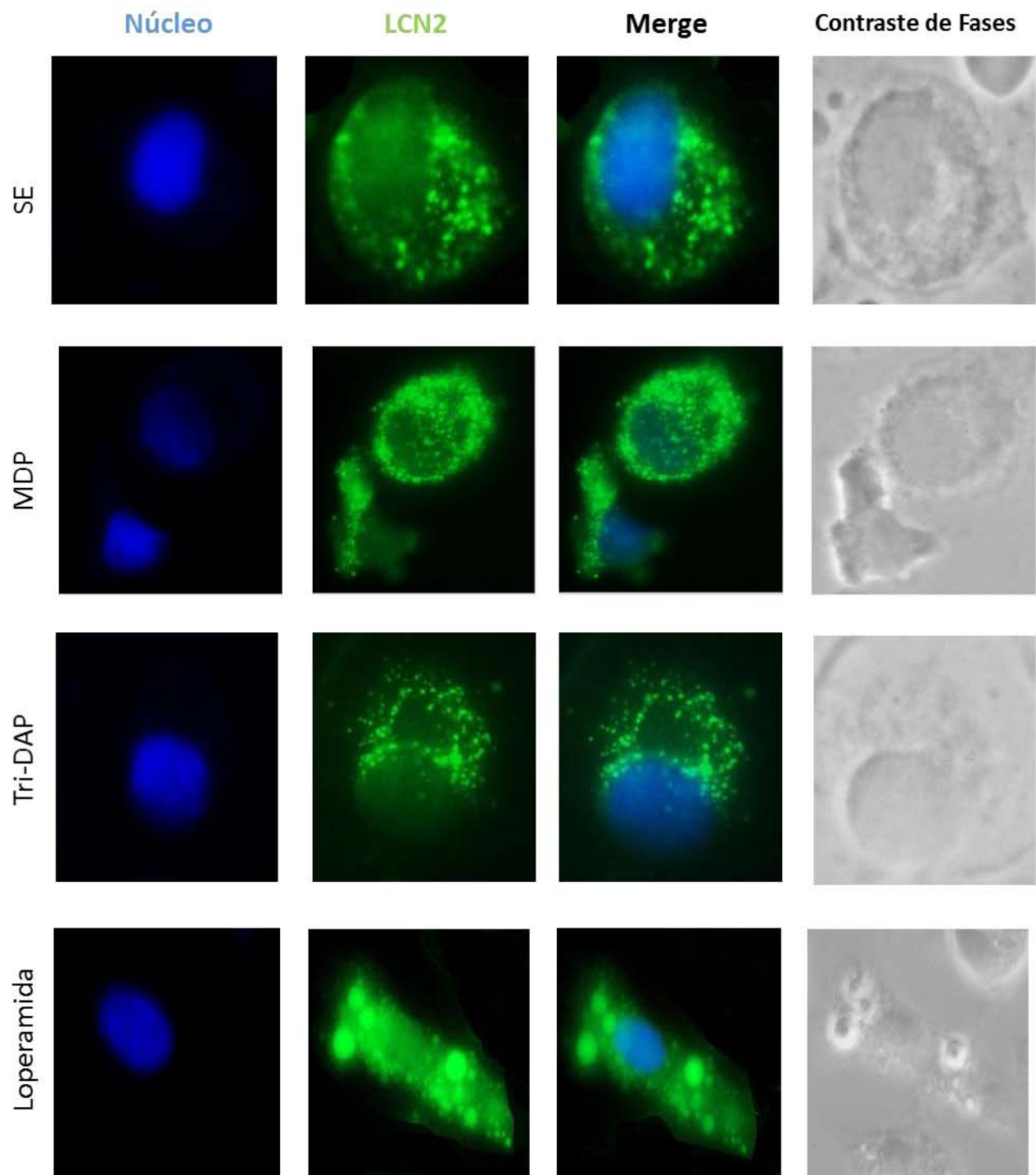


Figura 15. Expresión de Lipocalin-2 en células no infectadas. Las células fueron estimuladas durante 24h con 5 μ g/ml de Tri-DAP o 3 μ M de loperamida. Posteriormente fueron teñidas con el anticuerpo primario monoclonal Anti-LCN2 y revelado con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Los núcleos fueron teñidos con Hoescht. Las células fueron visualizadas x 1000. Se muestran imágenes representativas de 4 experimentos independientes.

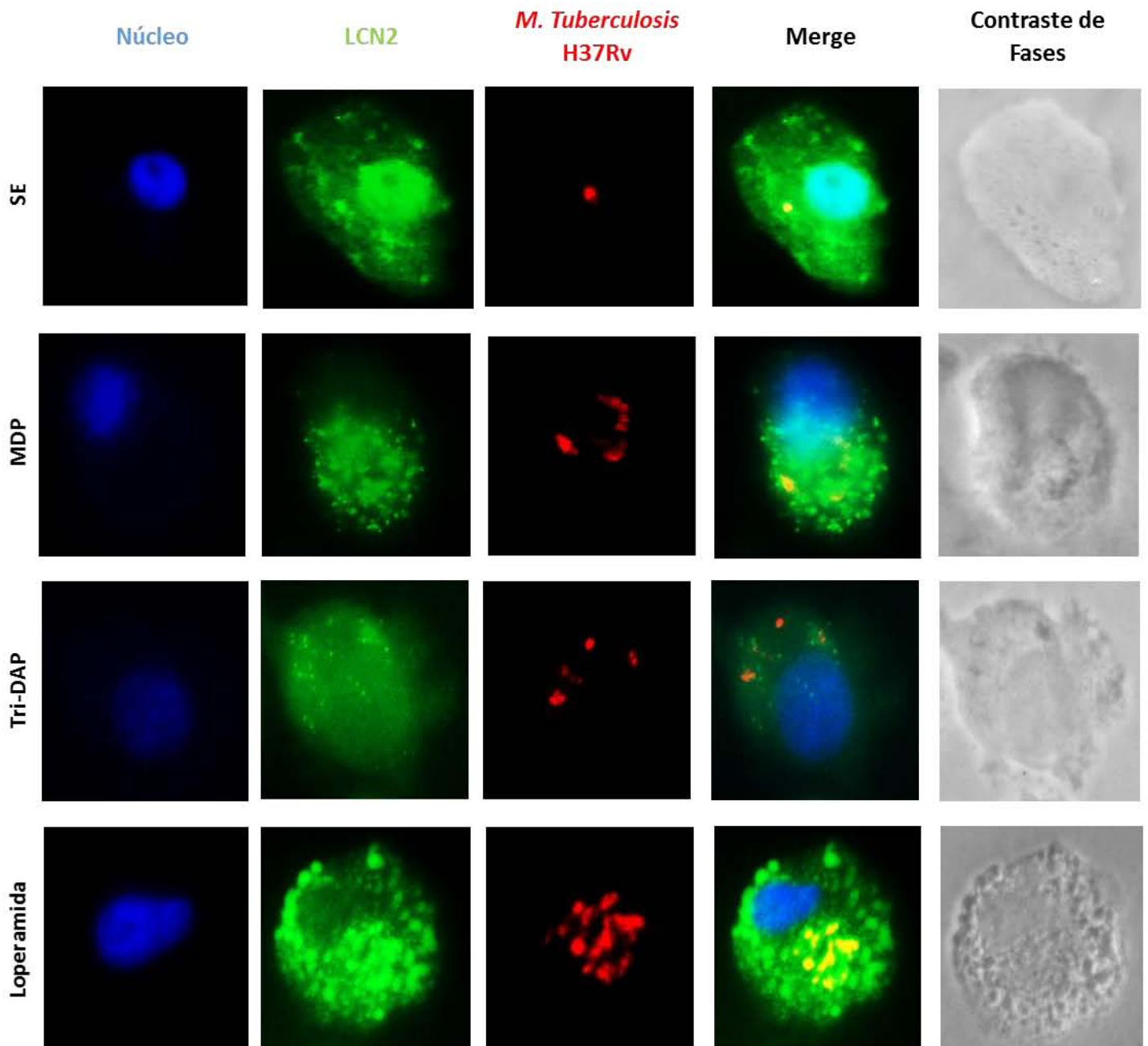


Figura 16. Expresión de Lipocalin-2 en células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv.

Las células se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv MOI 1:5 estimuladas con 10 µg/ml de MDP, 5 µg/ml de Tri-DAP o 3 µM de loperamida durante 24 h post-infección. Posteriormente fueron teñidas con el anticuerpo primario monoclonal Anti-LCN2 y revelado con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. *M. tuberculosis* H37Rv fue teñida con el anticuerpo primario Anti-Mtb y revelado con el anticuerpo secundario Alexa 594. Los núcleos fueron teñidos con Hoescht. Las células fueron visualizadas en x 1000.

Debido a que no hubo diferencias en el porcentaje de células positivas, pero si había una aparente diferencia en la intensidad de fluorescencia, la cual es un indicativo de la cantidad de la proteína presente en la célula, evaluamos el nivel de expresión en función de la intensidad media de fluorescencia con el software Zen Pro 2.1 (Fig. 17). Para tomar en cuenta que el tamaño de las células es variable y éste influye en la intensidad total de fluorescencia de la célula, calculamos la intensidad por micra cuadrada. Observamos que solamente loperamida induce un aumento significativo en la producción de esta proteína tanto en células no infectadas ($p < 0.05$, Fig 17a) como infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv ($p < 0.01$, Fig 17b) según la prueba de Friedman.

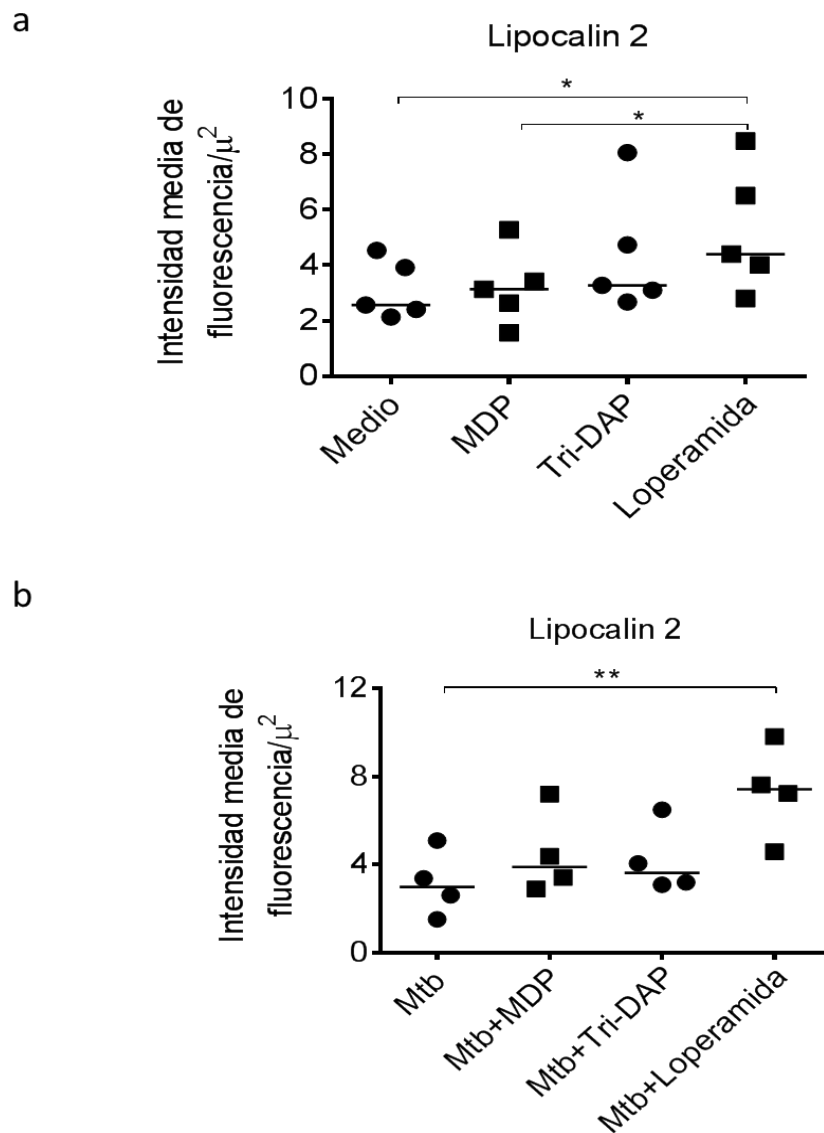


Figura 17. Cambios en la expresión de Lipocalin 2 en macrófagos humanos estimulados.

La expresión de Lipocalin 2 se midió por microscopía de fluorescencia. Se midió la intensidad de fluorescencia/ μ^2 en a) células no infectadas y b) células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv MOI5 estimuladas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de MDP, 5 $\mu\text{g/ml}$ de Tri-DAP o 3 μM de loperamida durante 24 h post-infección. Se muestran resultados individuales de experimentos independientes y la línea señala la mediana, * $p < 0.05$ vs medio, ** $p < 0.01$ vs. Mtb.

Expresión de LL37 y Hecidina en macrófagos humanos

De acuerdo a la diferencia estadística obtenida en LCN2 (Fig. 17a, Fig. 17b) entre los distintos inmunomoduladores y siendo loperamida la que presenta significativamente mayor inducción de la expresión se decidió continuar solo con este estímulo para el estudio de la expresión de LL-37 y hepcidina. La expresión de ambos péptidos se observó en las células estimuladas con loperamida y sin estímulo (medio) (Tabla 2), el porcentaje de células positivas aumentó con el estímulo de loperamida aunque no de manera significativa. Por microscopía de fluorescencia se evaluó en función de la intensidad media de fluorescencia la expresión de LL-37 (Fig.18) y de hepcidina (Fig.19) en células no infectadas (Fig. 18a y Fig. 19a) y células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv (Fig. 18b y Fig. 19b). Observamos que la loperamida induce mayor expresión de LL-37 y hepcidina en células no infectadas (Fig. 20a y 20b) y células infectadas (Fig.20c y 20b) aunque no de manera significativa según la prueba de Wilcoxon.

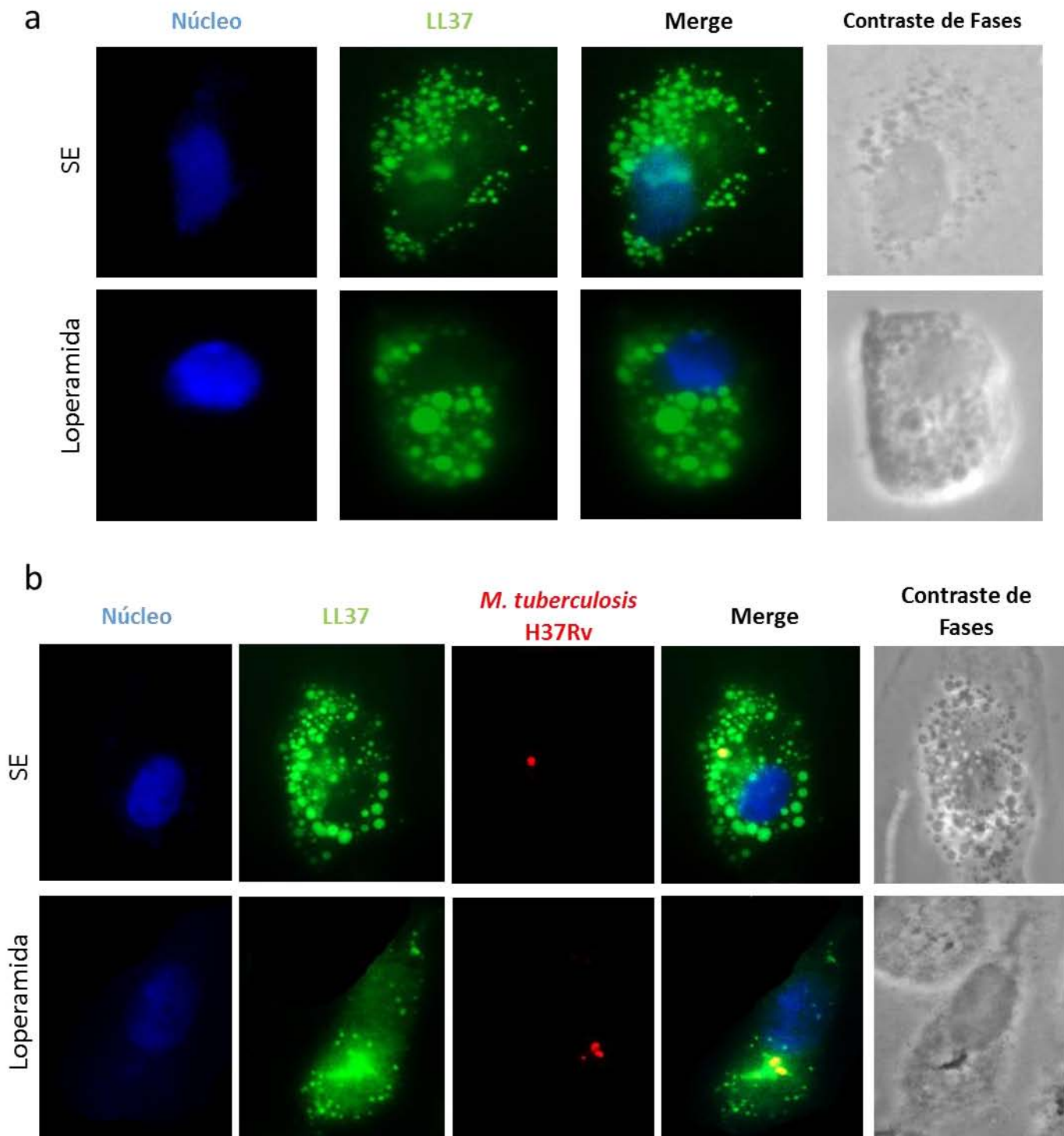


Figura 18. Expresión de LL-37 en macrófagos humanos estimulados con Loperamida. La expresión de LL-37 se observó en a) células no infectadas y b) células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv MOI 1:5 estimuladas con 3 μ M de loperamida durante 24 h post-infección. Las células fueron teñidas con el anticuerpo primario Anti-LL37 y se reveló con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor/Alexa 488. Mtb fue teñida con el anticuerpo primario Anti-Mtb y revelado con el anticuerpo secundario Alexa 594. Los núcleos fueron teñidos con Hoescht. Las células fueron visualizadas en x 1000. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

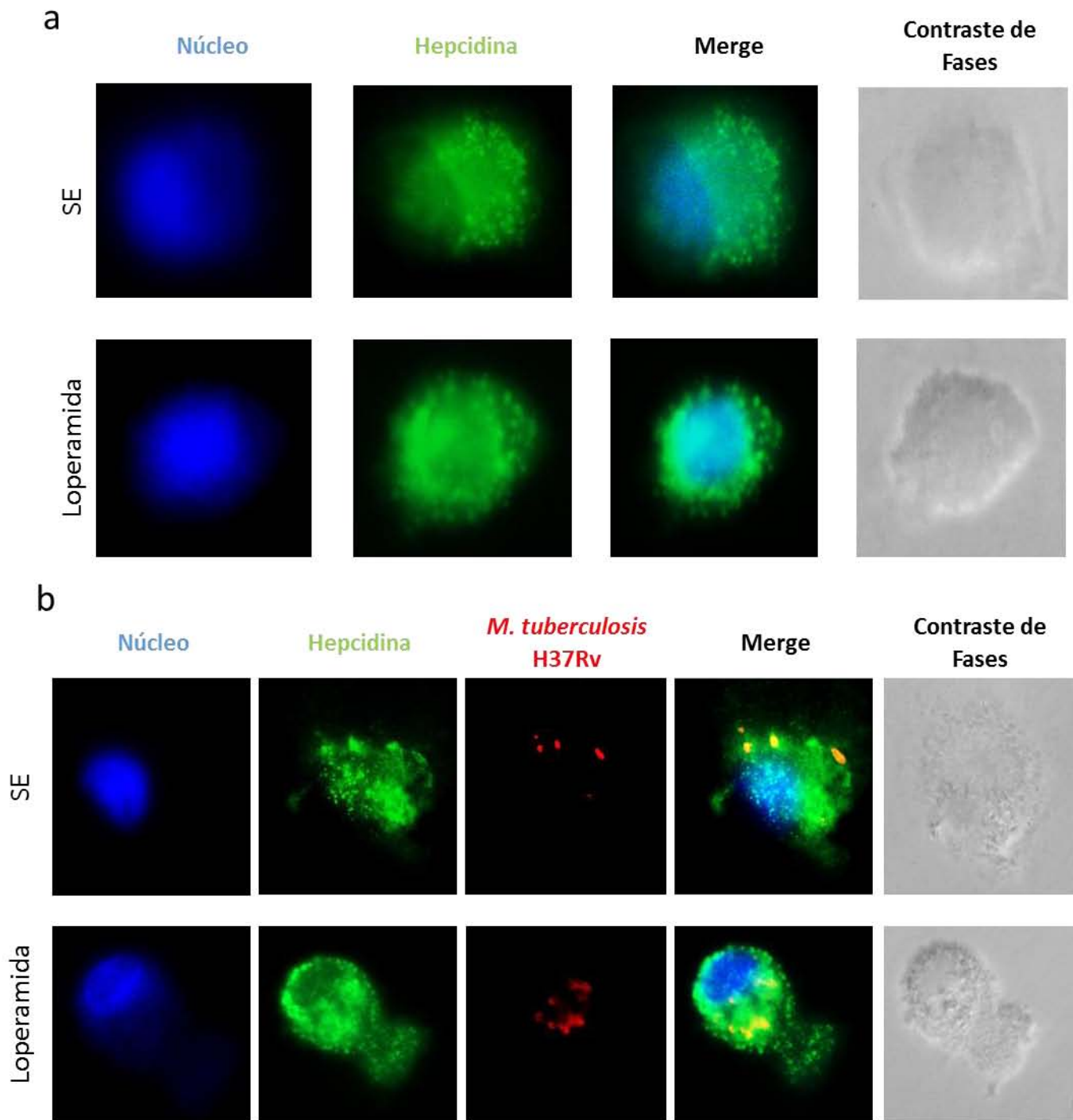


Figura 19. Expresión de hepcidina en macrófagos humanos estimulados con Loperamida. La expresión de hepcidina se observó en a) células no infectadas y b) células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv MOI 1:5 estimuladas con 3 μ M de loperamida durante 24 h post-infección. Las células fueron teñidas con el anticuerpo primario Anti-Hepcidina y se reveló con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Mtb fue teñida con el anticuerpo primario Anti-Mtb y revelado con el anticuerpo secundario Alexa 594. Los núcleos fueron teñidos con Hoescht. Las células fueron visualizadas en x 1000. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

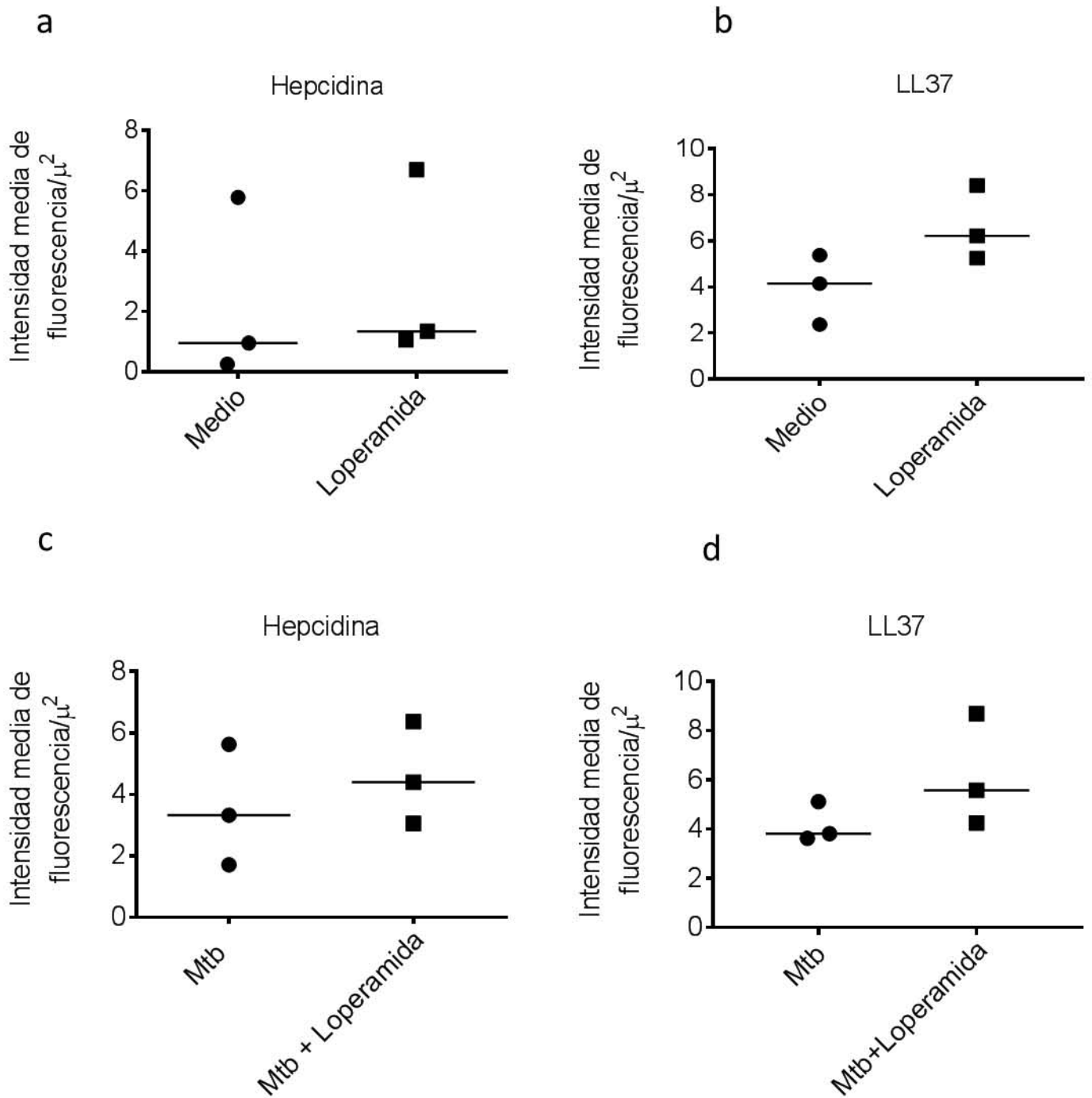


Figura 20. Cambios en la expresión de hepcidina y LL-37 en macrófagos humanos estimulados con Loperamida. La expresión de Hepcidina y LL-37 se midió por microscopía de fluorescencia. Se midió la intensidad de fluorescencia/μ² en a) y b) células no infectadas así como de c) y d) células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv MOI 1:5 estimuladas 3 μM de loperamida durante 24 h post-infección. Se muestran resultados individuales de experimentos independientes y la línea señala la mediana.

Colocalización de *M. tuberculosis* H37Rv con LCN2, LL-37 y hepcidina.

Las células infectadas además fueron evaluadas para determinar el porcentaje de colocalización del péptido con las bacterias (Fig. 21). Para conocer si hay interacción de las proteínas con *M. tuberculosis* H37Rv a partir de las imágenes obtenidas de las células infectadas se contabilizaron las bacterias por célula y cuántas de estas presentaban colocalización. La colocalización fue determinada al detectar la localización en el mismo sitio de la célula entre la tinción de la bacteria y la del péptido observado en amarillo. El porcentaje de colocalización de la micobacteria con LCN2 (Fig.21a), LL-37 (Fig. 21b) y Hecpidina (Fig. 21c) aumentó utilizando el estímulo con loperamida, sin embargo estadísticamente no fue significativo.

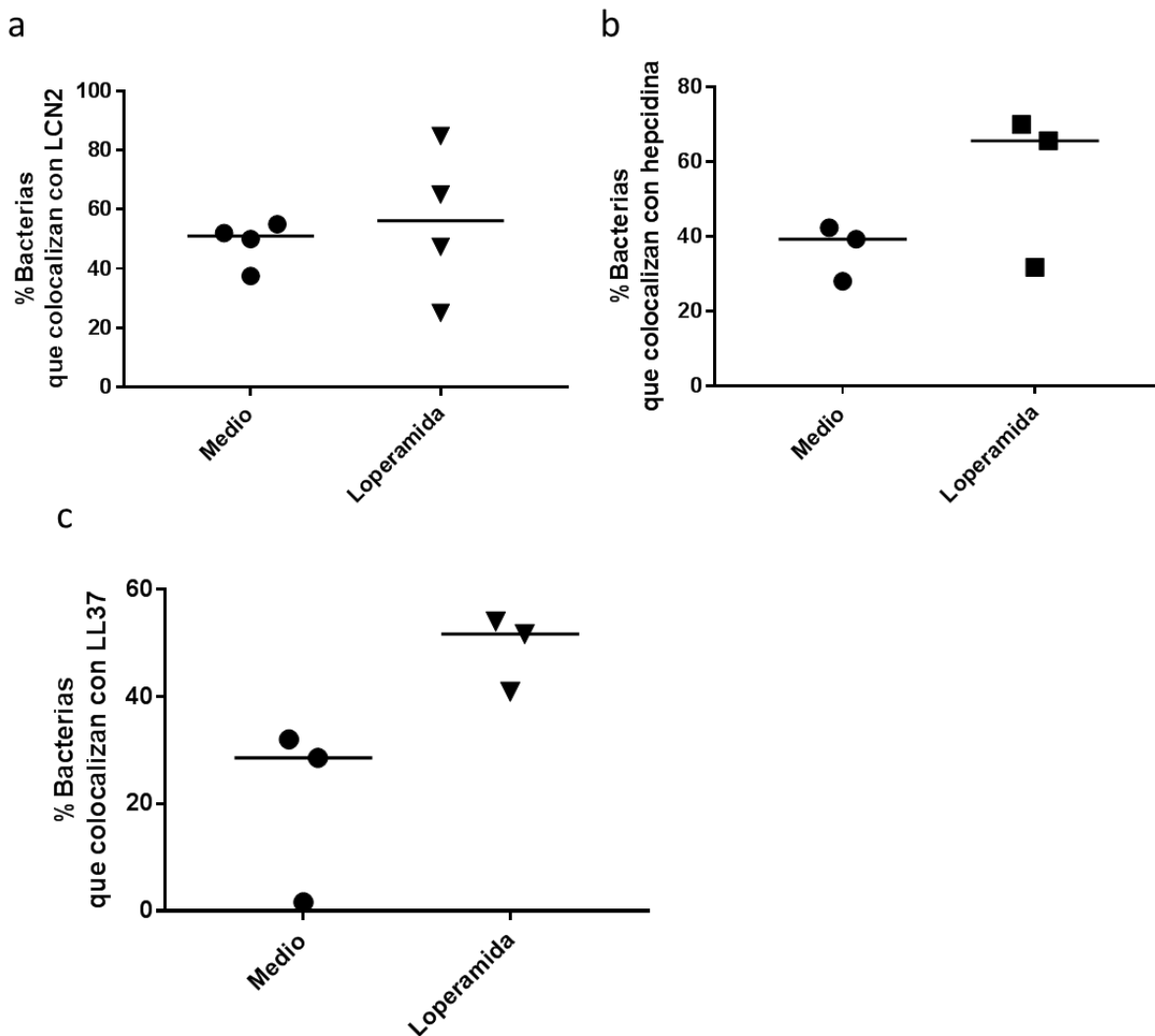


Figura 21. Colocalización de *M. tuberculosis* H37Rv en macrófagos humanos estimulados con loperamida. En las células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv y estimuladas con loperamida se calculó el porcentaje de colocalización del número de bacterias de *M. tuberculosis* H37Rv por células con la expresión de a) LCN2, b) hepcidina y c) LL-37. Se muestran resultados individuales de experimentos independientes y la línea señala la mediana

Discusión

El uso de inmunomoduladores como adyuvantes podría ayudar a reducir las limitaciones en el tratamiento actual (resistencia, largo tiempo del tratamiento y alto costo) contra la infección por *M. tuberculosis*. Tanto Tri-DAP como loperamida son buenos candidatos para ser usados como adyuvantes en el tratamiento de la Tb pulmonar; en este trabajo evaluamos su potencial para inducir la expresión de proteínas con actividad antimicrobiana como parte de la definición de sus mecanismos inmunomoduladores sobre el macrófago humano.

Observamos que existe una expresión basal de Lipocalin 2, LL-37 y hepcidina en MDMs. LCN2 parece tener mayor nivel de expresión y evaluamos si era posible su inducción con los inmunomoduladores en estudio. Observamos que el porcentaje de células que expresan LCN2 no se modifica significativamente con la adición de ninguno de los inmunomoduladores probados pero la intensidad de fluorescencia si mostró cambios. Loperamida es el que mayor expresión de LCN2 induce. Este fenómeno se replicó en los MDMs infectados.

La elevada expresión de LCN2 inducida por loperamida podría estar relacionada con su actividad reportada como un inductor de autofagia porque se ha reportado la producción de LCN2 durante el mecanismo de autofagia (Saiga *et al.*, 2011). Tri-DAP y MDP también son inductores de autofagia y se ha reportado que inducen la producción de péptidos antimicrobianos, pero no observamos la inducción significativa de LCN2, probablemente porque LCN2 es un péptido de naturaleza distinta a las defensinas y catelicidinas tiene algún mecanismo distinto de regulación de su expresión que no fue abordado en este estudio.

Con respecto a la expresión de LL-37 y hepcidina en MDMs humanos únicamente estimulamos con loperamida, ya que presentó la mayor inducción de la expresión de LCN2. No se observó inducción significativa de hepcidina en MDMs no infectados estimulados con loperamida y aunque hubo aumento no significativo en la expresión de LL-37. En MDMs infectados observamos una ligera inducción de hepcidina y LL-37 por estimulación con loperamida. Tanto hepcidina como LL-37 son importantes en el control de la infección por *M. tuberculosis* en distintas condiciones experimentales (Torres *et al.*, 2015) por lo que su inducción por loperamida podría ser un factor que se suma a su capacidad bactericida.

Posteriormente investigamos si los péptidos antimicrobianos inducidos por loperamida son reclutados al sitio de localización de la bacteria. Observamos que la colocalización de LCN2, hepcidina y LL-37 con la micobacteria en MDMs con loperamida fue mayor, probablemente debido a que la autofagia inducida funge también como un movilizador o acarreador de péptidos antimicrobianos. No se usaron inhibidores de transporte extracelular, por lo que podemos suponer que los péptidos antimicrobianos fueron retenidos en autofagosomas. Desafortunadamente, al no contar con una cinética de tiempo de la expresión de estos péptidos probablemente no hayamos registrado el tiempo de mayor expresión al interior de las células de los péptidos en caso de que hayan sido exportados.

La colocalización nos sugiere que los péptidos participan de manera directa en la eliminación de la micobacteria, de ser así, una mayor estimulación de estas proteínas podría hacer que la eliminación de las micobacterias por los MDMs fuera más eficiente. Sugerimos continuar con el estudio sobre la colocalización de los péptidos y la micobacteria así como de la expresión de estos péptidos con el inmunomodulador loperamida ya que este fármaco ha mostrado tener alta actividad antimicobactericida en MDMs humanos para así saber cómo se lleva a cabo este mecanismo y en futuro desarrollar un tratamiento donde pueda ser administrado para la eliminación de la Tb. Además, sugerimos realizar estudios de la actividad antimicrobiana de estos péptidos ante otros patógenos como *Plasmodium spp.*, *Candidas spp.*, *Clostridium tetani* y VIH, que actualmente son difíciles de eliminar por el sistema inmune y el tratamiento para su eliminación es costoso y/o de larga duración.

Conclusión

La estimulación con Tri-DAP y loperamida del macrófago humano infectado con *M. tuberculosis* H37Rv genera la producción de las proteínas con actividad antimicrobiana Lipocalin-2, LL-37 y hepcidina, además loperamida participa en su reclutamiento al sitio de localización de la bacteria.

Bibliografía

- Abate, G., & Hoft, D. (2016). Immunotherapy for tuberculosis: future prospects. *ImmunoTargets and Therapy*, 37-45.
- Abedinzadeh, M., Gaeini, M., & Sardari, S. (2015). Natural antimicrobial peptides against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1285-1289.
- Adem, A., & Dacheng, R. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 1543-1575.
- Ahmad, S. (2011). Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *Clinical & Developmental Immunology*.
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., & Khoury, M. (2017). Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Frontiers immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2017.00339
- Al-Zamel, F. (2009). Detection and diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 1099-1108.
- Angala, S., Belardinelli, J., Huc-Claustre, E., Wheat, W., & Jackson, M. (2014). The cell envelope glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 361-399.
- Armitage, A., & Moran, E. (2016). HIV-Associated Tuberculosis: Does the Iron-Regulatory Hormone Hepcidin Connect Anemia With Poor Prognosis? *The Journal of Infectious Diseases*, 3-5.
- Arnett, E., Krishnan, N., Robertson, B., & Schlesinger, L. (2016). Host Pathogen Biology for Airborne Mycobacterium tuberculosis. En A. Hickey, A. Misra, & B. Fourie, *Drug Delivery Systems for Tuberculosis Prevention and Treatment* (págs. 11-47). John Wiley & Sons.
- Baena, A., & Porcelli, S. (2009). Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis. *Tissue Antigens*, 189-204.
- Bauckman, K., Owusu-Boaitey, N., & Mysorekar, I. (2015). Selective Autophagy: Xenophagy. *Methods*, 120-127.
- Belo dos Santos, J., Ferraz, C., Gomes da Silva, P., Figueiredo, A., Helena de Oliveira, M., & Sileira de Medeiros, V. (2014). Cutaneous tuberculosis: diagnosis, histopathology and treatment: Part II. 545-555.
- Bento, C., RennaGhita Ghislat, M., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F., & Rubinsztein, D. (2016). Mammalian Auophagy: How does it work? *Annual Review of Biochemistry*, 685-713.
- Brighenti, S., & Maria, L. (2012). How Mycobacterium tuberculosis Manipulates Innate and Adaptive Immunity: New Views of an Old Topic. En S. Brighenti, & L. Maria, *Understanding Tuberculosis: Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity* (págs. 207-234). Pere-Joan Cardona.
- Cadavid, L. (2009). La evolución de sistemas complejos: El caso del sistema inmune en animales. *Acta Biológica Colombiana*, 247-254.
- Caulfield, A., & Wengenack, N. (2016). Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 33-43.
- Cliff, J., Kaufmann, S., McShane, H., Van Helden, P., & O'Garra, A. (2015). The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunological Reviews*, 88-102.

- Cook, G., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R., Danilchanka, O., & Niederweis, M. (2009). Physiology of Mycobacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 81–319.
- Danilova, N. (2008). Evolution of the Human Immune System. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Dartois, V. (2014). The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nature Reviews Microbiology*, 159-167.
- Deretic, V. (2011). Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunology Review*, 92-104.
- Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Maestro, S., De Haro, S., Ponpua, M., & Singh, S. (2009). Autophagy in Immunity Against Mycobacterium tuberculosis: a Model System to Dissect Immunological Roles of Autophagy. *Autophagy in Infection and Immunity*, 169-188.
- Desai, M., Fang, R., & Sun, J. (2015). The role of autophagy in microbial infection and immunity. *ImmunoTargets and Therapy*, 13-26.
- Du, Z.-P., Wu, B.-L., Wu, X., Lin, X.-H., Qiu, X.-Y., Zhan, X.-F., . . . Li, E.-M. (2015). A systematic analysis of human lipocalin family and its expression in esophageal carcinoma. *Scientific Reports*. doi:doi:10.1038/srep12010
- Duplantier, A., & Van Hoek, M. (2013). The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 as a Potential Treatment for Polymicrobial Infected Wounds. *Frontiers in Immunology*. doi:10.3389/fimmu.2013.00143
- Dürr, U., Sudheendra, U., & Ramamoorthy, A. (2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408–1425.
- Escoll, P., Rolando, M., & Buchrieser, C. (March de 2016). *Modulation of Host Autophagy during Bacterial Infection: Sabotaging Host Munitions for Pathogen Nutrition*. Obtenido de Frontiers in immunology: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00081/full>
- Espert, L., Beaumelle, B., & Vergne, I. (2015). Autophagy in Mycobacterium tuberculosis and HIV infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. doi:10.3389/fcimb.2015.00049
- Fatima, N. (2009). Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Respiratory Medicine CME*, 151-154.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., & Klionsky, D. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, 24-41.
- Fogel, N. (2015). Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis*, 527–531.
- Forrellad, M., Klepp, L., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H., Santangelo, M., . . . Bigi, F. (2013). Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*, 3–66.
- Ganz, T., & Nemeth, E. (2015). Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 500-510.
- García, R., Eandi, E., Feliú, T., & Musso, A. (2010). Conceptos actuales sobre fisiología y patología del hierro. *Hematología*, 48-57.
- Gengenbacher, M., & Kaufmann, S. (2012). Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy. *FEMS microbiology reviews*, 514–532.
- Gomes, L., & Dikic, I. (2014). Autophagy in antimicrobial immunity. *Molecular Cell*, 224-233.
- Gros, F., & Muller, S. (2014). Pharmacological regulators of autophagy and their link with modulators of lupus disease. *British Journal of Pharmacology*, 4337–4359.

- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers Microbiology*.
- Guglani, L., Gopal, R., Rangel, J., Fallert, B., Lin, Y., Berger, T., . . . Khader, S. (2012). Lipocalin 2 Regulates Inflammation during Pulmonary Mycobacterial Infections. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0050052
- Gutsmann, T. (2016). Interaction between antimicrobial peptides and mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1034-1043.
- Hale, A., Ledbetter, D., & Gawrilu, T. (2013). Regulation and role in development. *Autophagy*, 951-972.
- Haney, E., & E.W. Hancock, R. (2013). Peptide Design for Antimicrobial and Immunomodulatory Applications. *Biopolymers*, 572–583.
- Hawn, T., Matheson, A., Maley, S., & Vandal, O. (2013). Host-Directed Therapeutics for Tuberculosis: Can We Harness the Host? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 608-627.
- Hazlett, L., & Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell and Tissue Research*, 175-188.
- Hernández, A., Valdés-Dapena, M., & Zuazo, J. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas Tomo I*. Habana: Editorial de Ciencias Médicas.
- Herrera, M. T., Torres, M., Juárez, E., & Sada, E. (2005). Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 327-336.
- Hwa Jung, C., Ro, S.-H., Cao, J., & Otto, N. M.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, 1287–1295.
- Jeon, D.-I., Park, S.-R., Ahn, M.-Y., Ahn, S.-G., Park, J.-H., & Yoon, J.-H. (2012). NOD1 and NOD2 stimulation triggers innate immune responses of human periodontal ligament cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 699–703.
- Johnson, E., & Wessling-Resnick, M. (2012). Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes and Infection*, 207-216.
- Juárez, E., Carranza, C., Hernández-Sánchez, F., Loyola, E., Escobedo, D., Cóntreras, J., . . . Sada, E. (2014). Nucleotide-oligomerizing domain-1 (NOD1) receptor activation induces pro-inflammatory responses and autophagy in human alveolar macrophages. *BMC Pulmonary Medicine*, 1471-2466.
- Juárez, E., Carranza, C., Sánchez, G., González, M., Chávez, J., Sarabia, C., . . . Sada, E. (Diciembre de 2016). Loperamide Restricts Intracellular Growth of Mycobacterium tuberculosis in Lung Macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 837-847. doi:http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2015-0383OC
- Juárez, E., López, J., Torres, M., & Sada, E. (2009). Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, 366-378.
- Kanayama, M., & Shinohara, M. (Febrero de 2016). *Roles of Autophagy and Autophagy-Related Proteins in Antifungal Immunity*. Obtenido de *Frontiers in Immunology*: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00047/full>
- Kantor, I., & Ritacco, V. (2009). ¿Es suficiente la prueba tuberculínica para el diagnóstico de la infección tuberculosa? *Medicina (Buenos Aires)*, 359-369.
- Korb, V., Chuturgoon, A., & Moodley, D. (2016). Mycobacterium tuberculosis: Manipulator of Protective Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*.

- Koster, S., Sakowski, E., Ramkhelawon, B., Solingen, C. v., Oldebeken, S., Karunakaran, D., . . . Philips, J. (2015). Mycobacterium tuberculosis induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism. *Nature Immunology*, 677–686.
- Lamb, C., Yoshimori, T., & Tooze, S. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Biology*, 759-774.
- Landes, M., Rajaram, M., Nguyen, H., & Schlesinger, L. (2015). Role for NOD2 in Mycobacterium tuberculosis-induced iNOS expression and NO production in human macrophages. *Journal of Leukocyte*, 1111–1119.
- Lapaquette, P., Guzzo, J., Bretillon, L., & Bringe, M. (2015). Cellular and Molecular Connections between Autophagy and Inflammation. *Mediators of Inflammation* .
- Laroui, H., Yan, Y., Narui, Y., Ingersoll, S. A., Ayyadurai, S., Charania, M. A., . . . Merlin, D. (2011). l-Ala- γ -d-Glu-meso-diaminopimelic Acid (DAP) Interacts Directly with Leucine-rich Region Domain of Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1, Increasing Phosphorylation Activity of Receptor-interacting Serine/Threonine-protein Kinase 2 and Its Interacti. *Journal of Biological Chemistry* , 31003–31013.
- Lee, C.-C., Sun, Y., Qian, S., & Huang, H. (2011). Transmembrane Pores Formed by Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biophys Journal*, 1688–1696.
- Levine, B. (2005). Eating Oneself and Uninvited Guests. *Cell*, 159–162.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 27–42.
- Mahendra Boradia, V., Malhotra, H., Shrikant Thakkar, J., Ajit Tillu, V., Vuppala, B., Pati, P., . . . Iyengar Rajee, C. (28 de Agosto de 2014). *Mycobacterium tuberculosis acquires iron by cell-surface sequestration and internalization of human holo-transferrin*. doi:10.1038/ncomms5730
- Mandrekar, P., & Muralidharan, S. (2013). Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(6), 1167–1184.
- Mathieu, J. (2015). Interactions between Autophagy and Bacterial Toxins: Targets for Therapy? *Toxins*, 2918-2958.
- Maulen, N. (2011). Factores de virulencia de Mycobacterium tuberculosis. *Revista Médica de Chile*, 1605-1610.
- Mc Murray, D. (1996). Mycobacteria and Nocardia. En S. Baron, *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7812/>
- Méndez, T., Tatevari, T., Huizar, M., García, L., Villalobos, A., Ornelas, M., & Islas, A. (2008). El modelo del peligro: la importancia de los receptores tipo Toll en la inmunidad innata. *Investigación en Salud*, 10(3), 26-33.
- Moraco, A., & Kornfeld, H. (2014). Cell death and autophagy in tuberculosis. *Seminars in Immunology*, 497–511.
- Muciño, G., Castro-Obregón, S., Hernandez-Pando, R., & Del Rio, G. (2016). Autophagy as a target for therapeutic uses of multifunctional peptides. *IUBMB Life*, 259–267.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., & Kama, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 458-467.

- Nairz, M., Schroll, A., Sonnweber, T., & Weiss, G. (2010). The struggle for iron – a metal at the host–pathogen interface. *Cellular Microbiology*, 1691–1702.
- Nguyen, L., Haney, E., & Vogel, H. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 464–472.
- Ordóñez, A., Maiga, M., Gupta, S., Weinstein, E., Bishai, W., & Jain, S. (2014). Novel Adjunctive Therapies for the Treatment of Tuberculosis. *Current Molecular Medicine*, 385-395.
- Organization, W. H. (2015). *Global Tuberculosis Report*. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Owen, J., Punt, J., & Stranford, S. (2014). *KUBY Inmunología*. Mc Graw Hill Education.
- Paéz, M., Cioccia, A., & Hevia, P. (30 de Agosto de 2014). *Papel de la hepcidina y la ferroportina en la regulación hormonal de la homeostasis del hierro*. Recuperado el 25 de Marzo de 2017, de Academia Biomédica Digital: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=114&n=5008&m=5&e=5026>
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., . . . Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*.
- Parzych, K., & Klionsky, D. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 460-473.
- Peña-Sanoja, M. J., & De Sanctis, J. B. (2013). Autofagia y Respuesta Inmunitaria. *Investigación Clínica*, 325-337.
- Pereira, L., Girardi, J., & Bacovik, M. (2012). Forms, Crosstalks, and the Role of Phospholipid Biosynthesis in Autophagy. *International Journal Cell Biology*.
- Piktel, E., Niemirowicz, K., Wnorowska, U., Wątek, M., Wollny, T., Głuszek, K., . . . Bucki, R. (2016). The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. *Archivum Immunologiae Therapiae Experimentalis*, 33-46.
- Ponpuak, M., & Deretic, V. (2011). Autophagy and p62/sequestosome 1 generate neo-antimicrobial peptides (cryptides) from cytosolic proteins. *Autophagy*, 336–337.
- Randall, P., Hsu, N.-J., Quesniaux, V., Ryffel, B., & Jacobs, M. (2015). Mycobacterium tuberculosis infection of the ‘non-classical immune cell’. *Immunology and Cell Biology*, 789–795.
- Renna, M., Jimenez, M., Sarkar, S., & C. Rubinsztein, D. (2010). Chemical Inducers of Autophagy That Enhance the Clearance of Mutant Proteins in Neurodegenerative Diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 11061–11067.
- Riello, F., Brígido, R., Araújo, S., Tomaz, M., Goulart, L., & Goulart, I. (2016). Diagnosis of mycobacterial infections based on acid-fast bacilli test and bacterial growth time and implications on treatment and disease outcome. *BMC Infectious Diseases*, 16(142). doi:10.1186/s12879-016-1474-6
- Rivas Santiago, B., Hernández Pando, R., Carranza, C., Juárez, E., Contreras, J., Aguilar, D., . . . Sada, E. (2008). Expression of Cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis Infection in Human Alveolar Macrophages, Monocytes, Neutrophils, and Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 935-941.
- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, 62-71.

- Rodriguez, R., Jung, C.-L., Gabayan, V., Deng, J., Ganz, T., Nemeth, E., & Bulut, Y. (2014). Hepcidin Induction by Pathogens and Pathogen-Derived Molecules Is Strongly Dependent on Interleukin-6. *Infection and Immunology*, 745–752.
- Ruhwald, M., & Ruhwald, A. P. (2016). New tests for detection of Mycobacterium tuberculosis infection: sufficient to meet the WHO 2035 targets? *Future Microbiology*, 1101-1104.
- Saiga, H., Nishimura, J., Kuwata, H., Okuyama, M., Matsumoto, S., Sato, S., . . . Takeda, K. (2008). Lipocalin 2-Dependent Inhibition of Mycobacterial Growth in Alveolar Epithelium. *The Journal of Immunology*, 8521-8527.
- Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*, 1103-1130.
- Schito, M., Battista, G., Fletcher, H. A., McNerney, R., Centis, R., D'Ambrosio, L., . . . Corrah, T. (2015). Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines. *Advances in Clinical Tuberculosis Research*, S102–S118.
- Sia, J., Georgieva, M., & Ren, J. (2015). Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between Mycobacterium tuberculosis and Innate Immune Cells. *Journal of Immunology Research*. doi:10.1155/2015/747543
- Silvaa, J., Appelberg, R., & Migu, F. (2016). Antimicrobial peptides as novel anti-tuberculosis therapeutics. *Biotechnology Advances*, 924–940.
- Sochacki, K., Barns, K., Bucki, R., & Weisshaar, J. (2011). Real-time attack on single Escherichia coli cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6347–6348. doi:10.1073/pnas.1101130108
- Sowa, F., Nandakumara, S., Velub, V., Kellarc, K., Schlesinger, L., Amarab, R., . . . Sablea, S. (2011). Mycobacterium tuberculosis components stimulate production of the antimicrobial peptide hepcidin. *314–321*, 314–321.
- Steele, S., Brunton, J., & Kawula, T. (2015). The role of autophagy in intracellular pathogen nutrient acquisition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Torres, F., Cardenas, A., Montoya, A., González, I., Garcia, M., Enciso, J., . . . Rivas, B. (2015). LL-37 Immunomodulatory Activity during Mycobacterium tuberculosis Infection in Macrophages. *Infection and Immunity*, 4495–4503.
- Uribarren, T. (7 de Octubre de 2016). *TUBERCULOSIS*. Obtenido de Facultad de Medicina, UNAM. Recursos en Bacteriología: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>
- Usha, V., Lloyd, A. J., Lovering, A. L., & Besra, G. S. (2012). Structure and function of Mycobacterium tuberculosis meso-diaminopimelic acid (DAP) biosynthetic enzymes. *FEMS Microbiol Lett*, 10-16.
- Valdor, R., & Macián, F. (2013). The autophagy and the immune response regulation. *Pharmacol Research*, 475-483.
- Van den Boogaard, J., Kibiki, G., Kisanga, E., Boeree, M., & Aarnoutse, R. (2009). New Drugs against Tuberculosis: Problems, Progress, and Evaluation of Agents in Clinical Development. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 849-862.
- Van der Meer, J. H., Netea, M. G., & Dinarello, C. A. (2009). Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components. *The Journal of Translational Immunology*, 428-433.

- Vural, A., & Kehrl, J. (2014). Autophagy in Macrophages: Impacting Inflammation and Bacterial Infection. *Scientifica*.
- Wang, G. (2014). Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals*, 545–594.
- Watson, R., Manzanillo, P., & Cox, J. (2012). Extracellular M. tuberculosis DNA Targets Bacteria for Autophagy by Activating the Host DNA-Sensing Pathway. *Cell*, 803–815.
- Wileman, T. (2013). Autophagy as a defence against intracellular pathogens. *Essays In Biochemistry*, 153-163.
- Wilson, S., Wiens, M., & Smith, J. (2013). Antiviral Mechanisms of Human Defensins. *Journal of Molecular Biology*.
- Wimley, W. (2010). Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chemical Biology*, 905-917.
- Wu, H., Chen, S., Ammar, A.-B., Xu, J., Wu, Q., Pan, K., . . . Hong, Y. (2015). Crosstalk Between Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy: Implications for the Treatment of Neurological Diseases. *Molecular Neurobiology*, 1284-1296.
- Yang, Z., & Klionsky, D. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 124-131.
- Yuk, J.-M., Yoshimori, T., & Jo, E.-K. (2012). Autophagy and bacterial infectious diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, 99-108.
- Zasloff, M. (2007). Antimicrobial Peptides, Innate Immunity, and the Normally Sterile Urinary Tract. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2810-2816.
- Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., . . . Yuan, J. (2007). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 19023–19028.
- Zhou, X.-J., & Xhang, H. (2012). Autophagy in immunity: Implications in etiology of autoimmune/autoinflammatory. *Autophagy*, 1286-1299.
- Zumla, A., Nahid, P., & Cole, S. (2013). Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature Reviews Drug Discovery*, 388–404.
- Zumla, A., Rao, M., Dodoo, E., & Maeurer, M. (2016). Potential of immunomodulatory agents as adjunct host-directed therapies for multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Medicine*. doi:10.1186/s12916-016-0635-1

