



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Identificación de muerte celular necrótica con participación del inflamasoma  
inducida por *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino**

TESIS

QUE PRESENTA: **Omar Escobar Chavarría**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

TUTOR: José Ángel Gutiérrez Pabello (FMVZ, UNAM)

COMITÉ TUTORAL:

Edgar Zenteno Galindo (Facultad de Medicina, UNAM)

Lourdes Andrea Arriaga Pizano (Centro Médico Siglo XXI)

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ciudad Universitaria, Ciudad de  
CD.MX., noviembre 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Dedicatorias**

Dedico este trabajo a mis padres Rene Escobar y Carmen Chavarría por todo el amor, cariño, amor, apoyo y por no dejar de creer en mí. A mis hermanos Rene Escobar y Xóchitl Escobar por su comprensión. A Apolo por llegar a cambiar mi vida. Y a todas las personas que me alentaron a seguir.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas para recibir la educación y preparación que me ha permitido continuar con mi superación académica.

A Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología por brindarme la beca que me ha permitido realizar mis estudios de posgrado.

A los proyectos DGAPA-PAPIIT IN214121, DGAPA-PAPIIT IG201521 and DGAPA-PAPIIT IG200918, que permitieron desarrollar este trabajo.

A José Ángel Gutiérrez Pabello, por aceptarme en su grupo de trabajo, integrarme, guiarme y asesorarme durante esta etapa.

A Alejandro Benítez Guzmán, por la formación académica y personal que me brindaste, porque me brindaste apoyo, guía y recursos de manera desinteresada y sin tu ayuda este proceso no se no se hubiera dado de la forma que paso, gracias, amigo.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Brucella y Tuberculosis de la FMVZ, donde Omar, Itzel, Jacobo, Adriana, Miguel, Laura, Scarlett, Mariana, Daniela, Paola, Ilse y todos lo demás integrantes que me ayudar a alegrarme las tardes, a mejorar mis habilidades y desarrollar una gran familia.

Al grupo de Inmunofisiología y proteómica en el cual Adriana, Yahel, Tzayhri, Monse, Miroslava, Claudia, Aldo, Héctor y todas las demás personas que estuvieron presentes me enseñaron que la amistad puede llegar en cualquier momento y que los cambios siempre son buenos, gracias por ser una gran familia para mí.

A los técnicos Omar Cortez y Adolfo Ortiz, por su capacitación y ayuda técnica en el proyecto, en la toma de muestras y en la capacitación del área de bioseguridad.

A los miembros del departamento de parasitología de la FES-Cuautitlán por su apoyo.

## Índice

Resumen.....	8
Abstract .....	9
1. Introducción .....	10
1.1 Patogenia de la tuberculosis bovina .....	10
1.2 Inflamasomas .....	12
1.3 Inmunidad contra <i>Mycobacterium bovis</i> y activación del inflamasoma.....	14
1.4 inducción de muerte celular por <i>Mycobacterium</i> .....	16
1.5 Antecedentes de muerte celular en macrófagos de bovino infectados con <i>M. bovis</i> .....	17
2. Justificación .....	18
3. Hipotesis.....	19
4. Objetivo General .....	20
4.1 Objetivos específicos.....	20
5. Materiales y métodos .....	21
<b>5.1 Bacteria</b> .....	21
<b>5.2 Extracto filtrado de cultivo (EFC).</b> .....	21
<b>5.3 Macrófagos derivados de monocitos de bovino</b> .....	22
<b>5.4 Infección con <i>M. bovis</i> y tratamiento con EFC.</b> .....	22
<b>5.5 Detección de tipo de muerte celular utilizando anexina V/ Ioduro de propidio (IP)</b> .....	23
<b>5.6 Detección de Lactato deshidrogenasa (LDH) liberada</b> .....	24
<b>5.7 Cuantificación de IL-1<math>\beta</math></b> .....	24
<b>5.8 Detección de motas de ASC</b> .....	25
<b>5.9 Western Blot</b> .....	25
<b>5.10 Conteo de UFC después de la inducción de muerte celular</b> .....	26
<b>5.11 Medición de óxido nítrico.</b> .....	27
6. Resultados .....	27
6.1 <i>M. bovis</i> y EFC inducen muerte celular necrótica en macrófagos de bovino .....	27
6.2 <i>M. bovis</i> AN5 y EFC inducen la liberación de IL-1 $\beta$ en macrófagos de bovino.....	30
6.3 La liberación de IL-1 $\beta$ es dependiente de ASC y caspasa-1 en macrófagos infectados con <i>M. bovis</i> AN5.....	32
6.4 <i>Mycobacterium bovis</i> activa al inflamasoma NLRP3.....	34

6.5 <i>Mycobacterium bovis</i> induce la escisión de gasdermina D.....	36
6.6 Relación entre la inhibición del inflamasoma y disminución de la muerte celular.....	37
6.7 La inducción de la activación del inflamasoma en macrófagos disminuye la supervivencia intracelular de <i>M. bovis</i> .....	38
7. Discusión y conclusiones .....	40
8. Perspectivas.....	46
9. Referencias.....	47

## Índice de Figuras

Imagen 1. Modelo de un granuloma de tuberculosis.....	11
Imagen 2. Vías de activación del inflammasoma AIM2 y NLRP3 inducidas por <i>Mycobacterium</i> .....	15
Imagen 3. Efecto de <i>M. bovis</i> y CFE en la inducción de muerte celular relacionada con la muerte celular de macrófagos bovinos. ....	46
Figura 1. Caracterización de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de bovinos.. ....	27
Figura 2. <i>Mycobacterium bovis</i> y EFC inducen muerte celular necrótica en macrófagos de bovino. ....	29
Figura 3. <i>M. bovis</i> AN5 y EFC promueve la liberación de IL-1 $\beta$ en macrófagos de bovino.....	31
Figura 4. La liberación de IL-1 $\beta$ depende de ASC y caspasa-1 en macrófagos....	34
Figura 5. <i>M. bovis</i> activa el inflammasoma NLRP3.....	36
Figura 6. <i>M. bovis</i> y EFC inducen la escisión de gasdermina D en macrófagos de bovino.....	37
Figura 7. La inhibición del inflammasoma NLRP3 disminuyó el porcentaje de muerte celular de los macrófagos.....	38
Figura 8. La activación del inflammasoma en macrófagos disminuye la supervivencia intracelular de <i>Mycobacterium bovis</i> . ....	39

## **Abreviaturas y Siglas**

Extracto filtrado de cultivo **(EFC)**

*Mycobacterium bovis* **(M. bovis)**

Interleucina-1 beta **(IL-1 $\beta$ )**

Lactato deshidrogenasa **(LDH)**

Suero fetal bovino **(SFB)**

Ioduro de propidio **(IP)**

acetil-tirosina-valina-alanina-aspartato-clorometilcetona **(Y-VAD)**

acetil-tirosina-valina-alanina-aspartato-clorometilo cetona **(Z-VAD)**

dominio de unión a nucleótidos, familia rica en leucina, dominio que contiene pirina-3, del inglés *Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3* **(NLRP3)**

Lipopolisacárido **(LPS)**

Proteína asociada con apoptosis, parecida a una mota, que contiene CARD, del inglés *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* **(ASC)**

Interleucina **(IL)**

Unidades formadoras de colonia **(UFC)**



## Resumen

*Mycobacterium bovis* es una bacteria intracelular facultativa, que tiene la capacidad de inducir necrosis en los tejidos, causando lesiones permanentes en los animales afectados, lo que puede permitir la diseminación y proliferación de la micobacteria. Uno de los mecanismos de control de micobacterias es mediado por procesos inflamatorios, como la activación del inflamasoma que lleva a la inducción de IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33, además de que puede desencadenar una muerte celular necrótica asociada al proceso inflamatorio, conocida como piroptosis. Se sabe que *M. bovis* es capaz de inducir muerte celular en diversos tipos celulares, sin embargo, no existen reportes que demuestren su capacidad para inducir piroptosis en macrófagos de bovino, además se desconoce si la inducción de piroptosis favorece la proliferación o inhibe el crecimiento intracelular de la bacteria. En este trabajo se evaluó la participación del inflamasoma NLRP3 como inductor de necrosis de tipo piroptosis en macrófagos infectados con *Mycobacterium bovis* o estimulados con las proteínas de extracto del filtrado de cultivo (EFC), evaluando la liberación de IL-1 $\beta$  y la oligomerización de la Proteína asociada con apoptosis, parecida a una mota, que contiene CARD (ASC) por microscopia de fluorescencia. Se observó que la infección con *M. bovis* o la incubación con extracto filtrado de cultivo fueron capaces de activar al inflamasoma NLRP3 mediante la ruta canónica de activación en la que se involucran la molécula ASC y caspasa-1, lo cual favorece la producción y liberación de IL-1 $\beta$ . También se verificó la inducción de necrosis mediante citometría de flujo y por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), posteriormente se observó la escisión de gasdermina D, lo que corroboró la generación de piroptosis. Finalmente, se evaluó el efecto que tiene la inducción de piroptosis sobre macrófagos infectados con *M. bovis*, en los que se observó una disminución de unidades formadoras de colonia (UFC). En conjunto estos resultados muestran la capacidad de *M. bovis* para inducir piroptosis en macrófagos de bovino y la capacidad de este tipo de muerte celular para limitar el crecimiento intracelular de las micobacterias.

Palabras clave: Inflamasoma, *Mycobacterium bovis*, muerte celular, piroptosis, caspasa-1.

## **Abstract**

*Mycobacterium bovis* is a facultative intracellular bacterium with the ability to induce tissue necrosis, which causes permanent lesions in affected animals, allowing the dissemination and proliferation of mycobacteria. The control mechanism of mycobacteria is mediated by inflammatory mechanisms. Inflammasome activation leads to the induction of IL-1 $\beta$ , IL-18, and IL-33, in addition to which it can trigger necrotic cell death associated with inflammatory process, known as pyroptosis. It is known that *M. bovis* is capable of inducing cell death in bovine macrophages; however, no reports have demonstrated its ability to induce pyroptosis in bovine macrophages. Furthermore, it is unknown whether the induction of pyroptosis favors the induction of necrosis, allowing proliferation, or inhibits the extracellular growth of bacteria. In this study, we evaluated the participation of the NLRP3 inflammasome as an inducer of pyroptosis-type necrosis in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* or stimulated with its soluble components present in the culture filtrate extract, evaluating the release of IL-1 $\beta$ , activation of Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) by fluorescence microscopy. It was observed that both *M. bovis* infection and culture filtrate extract was able to activate the NLRP3 inflammasome through the canonical activation pathway in which the ASC molecule and caspase-1 are involved, which favors the production and release of IL-1 $\beta$ . The induction of necrosis was also verified by flow cytometry and by the release of lactate dehydrogenase (LDH). Subsequently, the cleavage of gasdermin D was observed, which corroborated the generation of pyroptosis. Finally, the effect of pyroptosis induction on infected macrophages was evaluated, and a decrease in colony forming units (UFC) was observed. Together, these results showed the capacity of *Mycobacterium bovis* to induce pyroptosis in bovine macrophages and the capacity of this type of cell death to limit the intracellular growth of mycobacteria.

Keywords: Inflammasome, *Mycobacterium bovis*, cell death, pyroptosis, caspase 1.

## **1. Introducción**

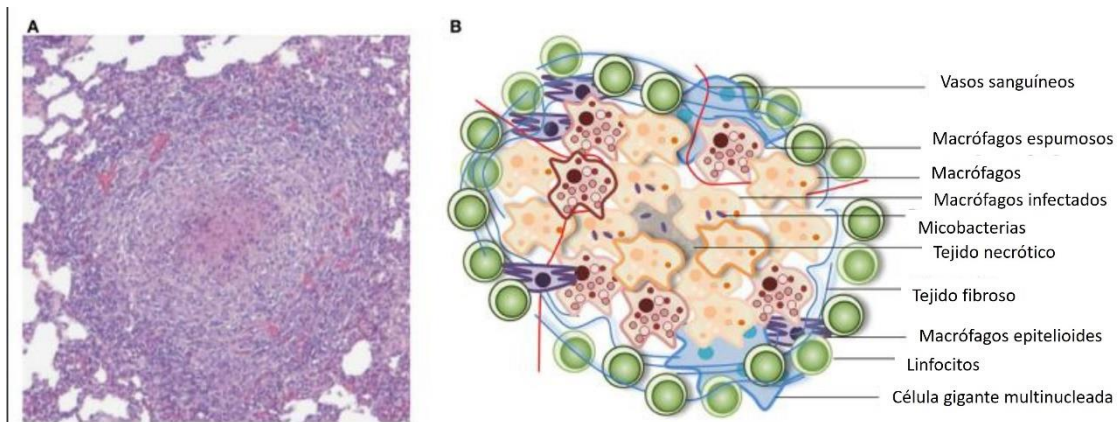
La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica causada por *Mycobacterium bovis*, una bacteria intracelular facultativa, que puede infectar a varias especies de mamíferos incluyendo a los humanos, lo que la convierte en un problema de salud grave (Bobadilla-del Valle et al., 2015; Gormley and Corner, 2018; Torres-González et al., 2016). Esta bacteria afecta principalmente a bovinos provocando emaciación progresiva, fiebre y debilidad; lo que lleva a una baja tasa de desarrollo, disminución de la producción láctea, limita el comercio del ganado en diversas zonas económicas y genera gastos relacionados con la prevención y diagnóstico de la enfermedad que en conjunto provoca grandes pérdidas económicas, estimadas en cientos de millones de dólares cada año a nivel mundial (SAGARPA/SENASICA, 2015; Waters et al., 2012; Zinsstag et al., 2006).

### **1.1 Patogenia de la tuberculosis bovina**

La tuberculosis bovina se transmite por inhalación de aerosoles, ingestión de alimentos contaminados o por lesiones en la piel, pero la vía aérea es la forma de contagio más común entre bovinos, por lo que pulmones y nódulos linfoides asociado son los órganos principalmente afectados (Menzies and Neill, 2000). Las micobacterias entran al hospedero y son reconocidas por células del sistema inmune innato, principalmente macrófagos y células dendríticas, las cuales inician una respuesta contra la bacteria (Salguero, 2018). Los macrófagos producen diversas citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL18 y TNF- $\alpha$ ) que ayudan al reclutamiento de células del sistema inmune innato y adaptativo, a montar una respuesta eficiente contra las micobacterias, permitiendo la formación de la lesión conocida como granuloma (Carrisoza-Urbina et al., 2019; Pollock et al., 2006).

El granuloma es la lesión típica en la tuberculosis bovina y se observa macroscópicamente como un nódulo inflamatorio granulomatoso blanco o

amarillento, de un tamaño que puede variar de un par de milímetros a ocupar una gran parte del órgano afectado, microscópicamente los granulomas están conformados por un conjunto de diversos tipos celulares; neutrófilos, macrófagos, macrófagos epiteliales, células gigantes, linfocitos T y células plasmáticas, los granulomas pueden estar encapsulados por tejido conectivo y frecuentemente contienen zonas con abundante necrosis y mineralización (Gormley and Corner, 2018; Guirado and Schlesinger, 2013; Unter et al., 2015). En 2005 Wangoo y colaboradores propusieron un sistema de clasificación de los granulomas, en el que se diferencian cuatro estadios, de evolución de la lesión granulomatosa en bovinos infectados. El estadio I, se caracteriza por la acumulación de neutrófilos, macrófagos epiteliales y un número limitado de linfocitos y células de Langhans; la lesión progresa al estadio II que es similar al anterior pero con un mayor número de neutrófilos y linfocitos y la formación de una cápsula de tejido conectivo incompleto que rodea la lesión presentándose necrosis ocasional; en el estadio III se observa una capsula fibrinosa completa que delimita al granuloma, además de la lesión necrótica central y mineralización ocasional en el centro del granuloma; en el estadio IV el granuloma está bien delimitado, con infiltrado de células inflamatorias, zonas de tejido necrótico ampliamente extendidas y abundante mineralización (Imagen 1).



**Imagen 1. Modelo de un granuloma de tuberculosis.** A) Granuloma representativo con necrosis central de tejido pulmonar de un modelo animal de infección con *Mycobacterium* en mini-pig. Las muestras histológicas se fijaron con formalina, se cortaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina. B) Esquema de los constituyentes celulares de un granuloma de tuberculosis. Imagen tomada de (Guirado and Schlesinger, 2013).

Experimentos con *M. marinum* en el pez cebra, han permitido estudiar de mejor manera la formación de los granulomas, demostrado que en estos, las micobacterias virulentas inducen la formación del granuloma más rápido que las micobacterias no virulentas, la necrosis e inflamación contribuyen a la generación de la lesión sobre el tejido infectado, aquí los macrófagos y macrófagos epiteliales juegan un papel fundamental en la formación de la lesión granulomatosa (Pollock et al., 2006); en bovinos se ha identificado la edad como un factor que puede interferir en la formación del granuloma, los bovinos jóvenes forman granulomas atípicos, que no se delimitan eficientemente, los cuales muestran una gran zona de tejido necrótico que llega a extenderse ampliamente en el órgano, además de infiltrado de células inflamatorias, mientras que los bovinos adultos general granulomas clásicos bien delimitados por tejido conectivo (Carrisoza-Urbina et al., 2019). En la formación del granuloma en bovinos los macrófagos juegan un papel fundamental al modular la diseminación de las bacterias por la inducción de muerte celular, y por la producción de citocinas inflamatorias que contribuyen a la quimiotaxis de células inmunes, además de la formación y estructuración del granuloma (Carrisoza-Urbina et al., 2019; Pan et al., 2005)

## **1.2 Inflamasomas**

Los inflamasomas son sensores de la respuesta inmune innata, capaces de reconocer patrones moleculares asociado a patógenos (PAMs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los estímulos de activación del inflamasoma derivan en la activación de caspasas inflamatorias, caspasa-1 en la vía canónica de activación y casapasa-11, caspasa 4 o caspasa 5 en la vía no canónica. La activación de caspasas inflamatorias permite el procesamiento y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18, además, puede llevar a procesos de muerte celular entre los que se encuentran apoptosis y piroptosis (Zheng et al., 2020).

Los inflamasomas están constituidos por un receptor citosólico que va a definir el tipo de inflamasoma del que se habla, una caspasa inflamatoria y en la mayoría de

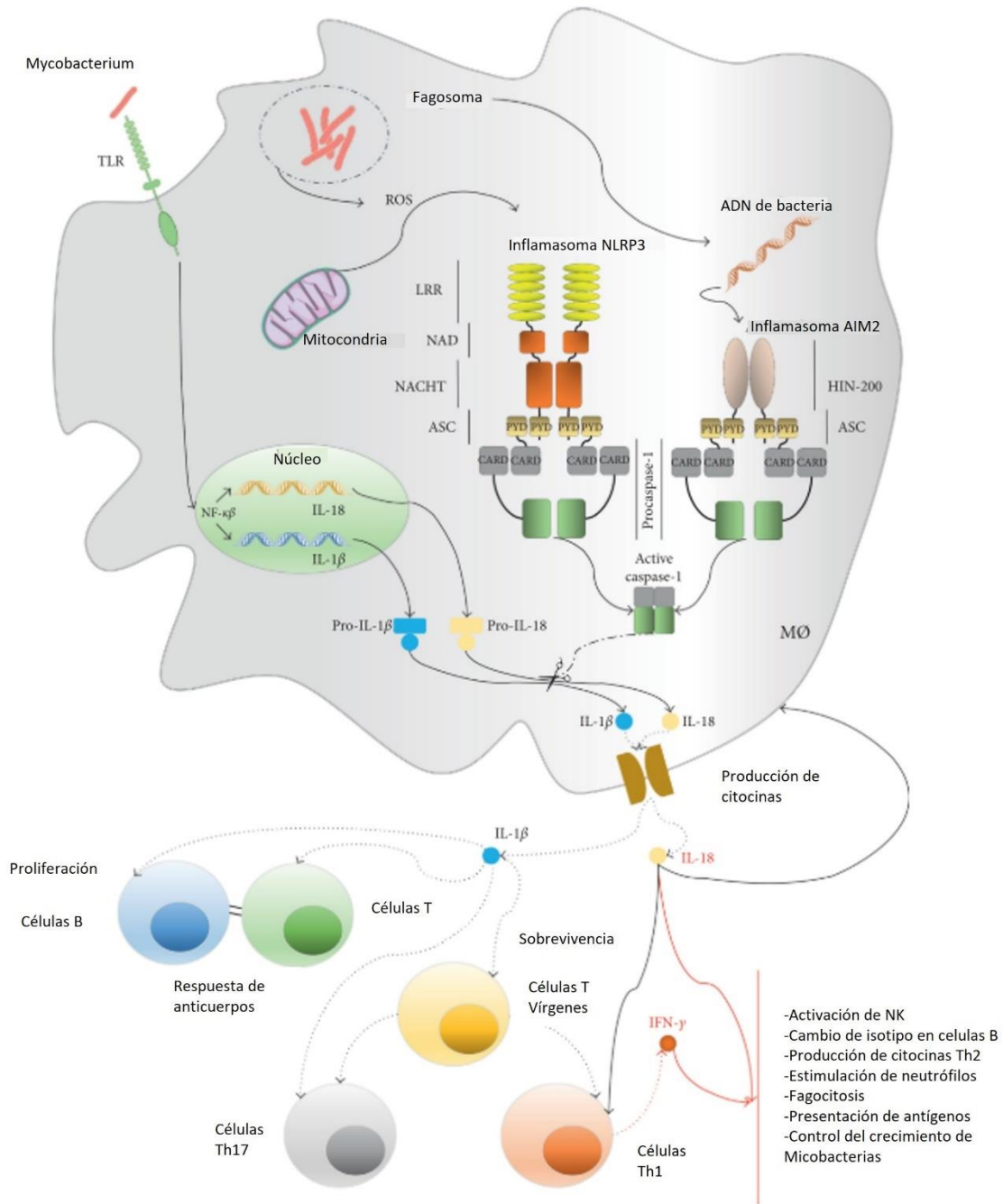
los casos una proteína acopladora. Dentro de los receptores que conforman al inflamasoma existen de dos tipos, los que contienen receptores de tipo dominio de unión a nucleótido o NLR y los que tienen proteínas de tipo proteína ausente en melanoma de tipo 2 o ALR. Dentro de los receptores NLR se encuentran: NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 y NLRC4, cada uno reconoce ligandos específicos que activan el ensamblaje del inflamasoma. Las proteínas NLR contienen un dominio de tipo unión a nucleótido y oligomerización (NACHT o NOD), un dominio N-terminal de reclutamiento de caspasa (CARD), un dominio pirina (PYD) o dominio repetido inhibidor de baculovirus (BIR), y un dominio terminar repeticiones rico en leucina (LRRs). Los miembros del grupo ALR se caracterizan por la presencia del dominio pirina (PYD) y uno o dos antígenos hematopoyéticos inducibles por IFN con 200 aminoácidos repetidos (HIN-200). Los ALR más conocidos son AIM2 (absent in melanoma 2) e IFI16 (IFN y inducible protein 16) (Guo et al., 2016; Wawrocki and Druszczynska, 2017; Zheng et al., 2020).

Los inflamasomas son llamados por el tipo de receptor que los activa. La activación de los inflamasomas inicia con el reconocimiento de un ligando por parte del receptor, sin embargo, no es totalmente claro el proceso específico de activación y ensamblaje de cada inflamasoma. Una señal de ensamblaje es suficiente para acoplar la mayoría de los inflamasomas, sin embargo, existen algunas excepciones como el NLRP3 cuya expresión basal no es suficiente para activar al inflamasoma y requiere un estímulo previo que active a una célula en reposo, este estímulo se desencadena por receptores de membrana que promueven la transcripción del receptor NLRP3 (Latz et al., 2013). Después el receptor NLRP3 se oligomeriza, lo que recluta a la proteína asociada con apoptosis, parecida a una mota y que contiene CARD (ASC) a través de una interacción homotípica de los dominios PYD, posteriormente ASC recluta la pro-caspasa-1 a través del dominio CARD (a excepción de los inflamasomas NLRP1 y NLRC4 donde no se requiere de la proteína ASC). El inflamasoma ensamblado permite que la procaspasa-1 se auto escinda generando caspasa-1, la cual procesa y libera IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 (Wawrocki and Druszczynska, 2017; Zheng et al., 2020).

### 1.3 Inmunidad contra *Mycobacterium bovis* y activación del inflamasoma

Entre las citocinas inflamatorias secretadas por los macrófagos, las citocinas de la superfamilia de la IL-1 (IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33) destacan por su importancia al participar en la generación y amplificación de la respuesta inflamatoria, propiciando una respuesta Th1 protectora y una respuesta inmune eficiente, aunque la producción exacerbada de éstas puede conducir a la inducción de necrosis (Bourigault et al., 2013; Dinarello, 1988; Master et al., 2008). Se sabe que diferentes cepas de *M. bovis* promueven la transcripción de citocinas inflamatorias de la super familia de la IL-1 $\beta$  en macrófagos de bovino (Alfonseca-Silva, Hernández-Pando and Gutiérrez-Pabello, 2016).

Diversas bacterias del género *Mycobacterium* reconocidas por los macrófagos pueden inducir la activación de diferentes inflamasomas (Krishnan et al., 2013; Master et al., 2008). Las infecciones con *M. bovis* inducen la activación de los inflamasomas AIM2, NLRP7 y probablemente del NLRP3 (Briken et al., 2013; Wawrocki and Druszczynska, 2017; Yang et al., 2013; Zhou et al., 2016). La activación del inflamasoma NLRP3 frente a las micobacterias inicia por una señal de estímulo a receptores, donde los receptores tipo Toll 2/6 (TLR2/6) y los receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 2 (NOD2) son los principales, pero también existe estimulación de TLR4 y TLR9. La segunda señal para activar NLRP3 puede darse por la estimulación de ácido hialurónico, ATP, especies reactivas de oxígeno y eflujo de potasio; mientras que para el inflamasoma AIM2 solo se requiere un estímulo de material genético de la doble cadena y en para el inflamasoma NLRP7 solo se requiere el reconocimiento de lípidos de la membrana de micobacterias (Bulut et al., 2001; Kleinnijenhuis et al., 2009). El inflamasoma tiene la función principal de madurar a IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33, pero bajo algunas circunstancias pueden desencadenar muerte celular de tipo necrótico regulado (Imagen 2).



**Imagen 2. Vías de activación del inflammasoma AIM2 y NLRP3 inducidas por *Mycobacterium*.** Diagrama general de la activación de los inflammasomas AIM2 y NLRP3 por micobacterias, además de las principales repercusiones en la respuesta inmune. Tomado y modificado de (Wawrocki and Druszczynska, 2017).



#### **1.4 inducción de muerte celular por *Mycobacterium***

La necrosis causada por las micobacterias en las lesiones granulomatosas, permiten la diseminación de éstas, la infección de células vecinas, la lisis celular, la migración de células inflamatorias y la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que amplifican la inflamación y que en conjunto producen el daño al tejido. En las células infectadas con micobacterias que sufren muerte por apoptosis o autofagia disminuye la diseminación de éstas y su viabilidad, por lo que el tipo de muerte celular que se lleva a cabo está relacionado con el control de las micobacterias (Behar et al., 2011; Fratazzi et al., 1999; Gutierrez et al., 2004; Martin et al., 2012; Molloy et al., 1994; Pan et al., 2005). Las infecciones *in vivo*, donde las bacterias inducen apoptosis en las células y después quedan atrapadas en los cuerpos apoptóticos, los macrófagos pueden fagocitarlas eliminándolas, en un proceso conocido como eferocitosis (Fratazzi et al., 1999).

La capacidad de las micobacterias para inducir apoptosis o necrosis fue inicialmente asociada a la virulencia de la cepa, aunque estudios recientes también contemplan las características genéticas en el hospedero como factor en el tipo de muerte celular que se puede desencadenar (Butler et al., 2012; Chen et al., 2006; Keane et al., 2000; Pan et al., 2005). En modelos *in vivo* se ha demostrado que algunas proteínas como ESAT-6, PE y PPE entre otras son capaces de inducir apoptosis que ayuda a controlar a las infecciones, pero también permite el reclutamiento de células fagocíticas permisivas hacia la infección, las micobacterias utilizan algunas células inflamatorias para diseminarse (Volkman et al., 2010).

El fino balance que existe entre la inducción de apoptosis o necrosis y de la respuesta contra la micobacteria está directamente relacionado con la patogenia de *M. bovis*, por lo que entender los mecanismos de muerte celular que sufren las células afectadas contribuye a entender la patogenia de la enfermedad.

### **1.5 Antecedentes de muerte celular en macrófagos de bovino infectados con *M. bovis***

Nuestro grupo de investigación ha descrito daños histológicos causados por infecciones de *M. bovis* donde se observa un gran daño por necrosis y una presencia de apoptosis mínima en granulomas de bovinos infectados naturalmente. También se evaluó la inducción de muerte celular en macrófagos de bovinos usando diferentes cepas de *M. bovis* (BCG, AN5, 9926 y 129QP) y extractos proteicos derivados de cultivos de *M. bovis*, donde, se encontró que los macrófagos infectados sufren muerte celular en diversos porcentajes, donde la virulencia de la cepa, multiplicidad y tiempo de infección son factores determinantes.

La determinación de muerte celular se realizó por medición de la condensación de cromatina, fragmentación de ADN (TUNEL positivo), traslocación de proteínas mitocondriales (Endo G y AIF) que generan una permeabilidad de membrana mitocondrial inferior al 10% y donde no hay actividad de caspasas 3, 8 o 9. En estos ensayos el tipo de muerte celular aumentó al activar los macrófagos clásicamente con LPS antes de infectarlos con *M. bovis*, la activación clásica de los macrófagos produce un aumento en la producción de óxido nítrico que contribuye a la disminución en la replicación bacteriana (Benítez-Guzmán et al., 2018; Esquivel-Solís et al., 2013 ; Vega-Manriquez et al., 2007).

La muerte celular descrita ha sido definida como apoptosis independiente de caspasas, sin embargo, algunas de las características encontradas en la infección de macrófagos, como la fragmentación de ADN, la producción de especies reactivas de nitrógeno y la transcripción exacerbada de proteínas proinflamatorias como IL-1, IL-18 y TNF- $\alpha$ , nos hacen pensar que es posible que exista algún mecanismo de muerte celular necrótico inflamatorio que se desarrolle al mismo tiempo que el ya descrito.

## **2. Justificación**

La inducción de muerte celular es un mecanismo complejo en el que las micobacterias pueden escapar de la respuesta inmune y proliferar o ser destruidas por células de la respuesta inmune. Existen varios estudios que describen la inducción de procesos de apoptosis en macrófagos de bovino por *M. bovis*, sin embargo, estos estudios no han explorado la inducción y evaluación de procesos necróticos que ocasiona *M. bovis* sobre células de bovino, siendo las lesiones necróticas las principales lesiones encontradas en granulomas de animales infectados crónicamente con la bacteria.

Diversos estudios realizados por nuestro grupo de investigación sugieren que los mecanismos de muerte celular en bovinos inducidos por *M. bovis* son diferentes a los eventos que suceden en otras especies animales, además de que es probable que existan varios tipos de muerte celular que aun no han sido descritos. Por otra parte, actualmente no se conoce un mecanismo por el cual *M. bovis* induzca necrosis regulada en macrófagos de bovinos.

El presente estudio permitirá explorar la inducción de muerte celular necrótica tipo piroptosis, en macrófagos infectados con *M. bovis*, así como el efecto que tiene este tipo de muerte en el crecimiento intracelular de las bacterias, lo que puede permitir comprender mejor la patogenia de la enfermedad y estudiar posibles mecanismos de control para las micobacterias.

### **3. Hipotesis**

La infección de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino induce muerte celular necrótica regulada, con la participación del inflammasoma.

#### **4. Objetivo General**

Identificar el tipo de muerte celular necrótica regulada y asociada al inflamasoma que sufren los macrófagos de bovino infectados con *M. bovis* o estimulados con extracto filtrado de cultivo (EFC), para evaluar su relación con el crecimiento de la bacteria y la producción de citocinas inflamatorias de la superfamilia de la IL-1.

#### **4.1 Objetivos específicos**

- Examinar la inducción de muerte celular necrótica inducida por *M. bovis* o EFC en macrófagos de bovino mediante citometría de flujo y evaluación de LDH liberada.
- Cuantificar la secreción de IL-1 $\beta$  como marcador de activación del inflamasoma en macrófagos de bovino infectados con *M. bovis* o estimulados con EFC.
- Evaluar la participación de la caspasa-1 en la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados con *M. bovis* o estimulados con EFC.
- Evidenciar la presencia de motas de ASC por inmunofluorescencia como indicador de la formación del inflamasoma en macrófagos infectados con *M. bovis* o estimulados con EFC.
- Evidenciar la activación del inflamasoma NLRP3, mediante el uso del inhibidor químico CRID3 en macrófagos infectados con *M. bovis* o estimulados con EFC.
- Valorar el efecto que tiene la inhibición de los componentes del inflamasoma en la disminución de la muerte celular de macrófagos infectados con *M. bovis* o estimulados con EFC.
- Evaluar la escisión de gasdermina D por Western Blot como marcador de inducción de piroptosis en macrófagos de bovino infectados con *M. bovis* o estimulados con CFE.
- Medir el efecto que tienen diferentes tipos de muerte celular (apoptosis y piroptosis) sobre el crecimiento intracelular de *M. bovis*.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Bacteria**

La cepa AN5 de *Mycobacterium bovis*, utilizada en este trabajo fue manipulada dentro de la unidad de bioseguridad de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. La preparación de inóculos se realizó sembrando 3 colonias de *M. bovis*, en 30 mL de medio Middlebrook 7H9, enriquecido con OADC (ácido oleico /dextrosa/catalasa) y 0.5 mL de Tween 80, se incubó 8 días a 37 °C en agitación constante a 100 rpm. Posteriormente el caldo se transfirió a 270 mL de medio Middlebrook 7H9 y se incubó bajo las condiciones previamente descritas, luego las bacterias fueron lavadas 3 veces con PBS y resuspendidas en medio RPMI complementado con 2 mM L-glutamina y 0.1 mM aminoácidos no esenciales, (cRPMI). Se realizaron alícuotas de 1 ml que fueron guardadas a -80° C por al menos un día, el número de micobacterias fue calculado por la siembra de diluciones seriadas en placas de agar Middlebrook 7H11 (Jimenez Vazquez et al., 2023; Maciel Rivera et al., 2019).

### **5.2 Extracto filtrado de cultivo (EFC).**

El extracto filtrado de cultivo (EFC) fue producido por la M. en C. Itzel Jiménez mediante el cultivo de *M. bovis* AN5 en medio Sautón por 8 semanas, posteriormente se realizó la filtración del sobrenadante de cultivo con filtro de 0.22 µm. Las proteínas de este se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio y fueron dializadas, el EFC se mantuvo a -80°C. En este trabajo se utilizó el EFC completo (Jimenez Vazquez et al., 2023).

### **5.3 Macrófagos derivados de monocitos de bovino**

Para la obtención de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica se utilizó una modificación del protocolo de (Campbell and Adams, 1992). Se obtuvo sangre periférica por punción yugular, usando ácido cítrico dextrosa (ACD) como anticoagulante. Se centrifugó a 2200 rpm durante 30 min a temperatura ambiente para separar el plasma y recuperar la capa flogística. Esta fue resuspendida en un volumen final de 30 ml con plasma y se separó por medio de un gradiente isopícnico con histopaque 1.077 ® (Sigma-Aldrich). Las células mononucleares fueron recuperadas y lavadas en tres ocasiones con PBS citrato. Posteriormente, las células se cultivaron en placas de ultra baja adherencia y fueron mantenidas con medio cRPMI adicionado con suero autólogo al 12%, durante 12 días hasta su diferenciación. En los macrófagos obtenidos se evaluó la presencia del receptor CD14, mediante citometría de flujo, usando el anticuerpo CD14-FITC a una dilución 1:1000, human Mylteny Biotec, incubando las células con el anticuerpo por 1 hora con medio PBS 1X, antes de evaluarlas en el citómetro de flujo; además se evaluó la producción de óxido nítrico mediante en ensayo de Griess usando el kit Griess reagent system G2930 (Promega labs) siguiendo las indicaciones del fabricante y estimulando los macrófagos con 300 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich), 30µg de Poly I:C (Santa Cruz) y 30µg de Zimosan (Sigma-Aldrich).

### **5.4 Infección con *M. bovis* y tratamiento con EFC.**

Los macrófagos fueron sembrados en placas de 24 pozos ( $3 \times 10^5$  macrófagos/pozo), posteriormente fueron lavados con PBS y mantenidos con cRPMI adicionado con SFB 10%. La infección de *M. bovis* se realizó a una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1 permitiendo la fagocitosis durante 4 horas, posteriormente se eliminaron las bacterias no fagocitadas por una serie de lavados con cRPMI. El sobrenadante fue recuperado transcurrido el tiempo de infección (varía dependiendo del experimento). Se realizó un estudio de evolución temporal que incluyó 1, 2, 4, 8, 12, 16 y 24 h para el experimento de secreción de IL-1β. Después de dos repeticiones,

identificamos que, en comparación con 4 h, 8 h no mostraron ninguna diferencia y 12 h solo mostraron un ligero aumento. Por lo tanto, se midió la liberación de IL-1 $\beta$  y lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante a las 1, 2, 4, 16 y 24 h después de la incubación. Por el contrario, la inhibición del inflamasoma NLRP3, que disminuyó la tasa de muerte celular de macrófagos, se midió después de 4 h, mientras que el ensayo de inhibición de IL-1 $\beta$ , el ensayo bactericida, el Western Blot y la detección de manchas de ASC se realizaron después de 24 h. El sobrenadante se recuperó transcurrido el tiempo de infección y todos los componentes derivados del experimento con *M. bovis* fueron esterilizados por filtración y sembrados en cultivo.

Se incubaron macrófagos en monocapa (contenían 1 x 10<sup>6</sup> células) con 100  $\mu$ g/ml de EFC (1, 2, 4, 16 y 24 h para los ensayos de cinética de LDH y yoduro de propidio (IP)/anexina V; 24 h para la evaluación de IL- 1 $\beta$  y detección de motas ASC). Para los ensayos de inhibición del inflamasoma, se agregaron inhibidores químicos (CRID3 10  $\mu$ M, un inhibidor de NLRP3 y Y-VAD 50  $\mu$ M, un inhibidor de caspasa-1) (Sigma- Aldrich) 2 h antes de la infección por *M. bovis* o tratamiento EFC y mantenido en el medio de cultivo durante toda la incubación. En los ensayos de inhibición de la muerte celular, los inhibidores químicos (CRID3 a 10  $\mu$ M; Y-VAD a 50  $\mu$ M; Necro-1 a 50  $\mu$ M, un inhibidor de RIPK-1 y Z-VAD a 50  $\mu$ M, un inhibidor de pan-caspasa) (Sigma-Aldrich) también se agregaron 2 h antes de la infección por *M. bovis* o del tratamiento con EFC y se mantuvieron en el medio de cultivo durante toda la incubación.

### **5.5 Detección de tipo de muerte celular utilizando anexina V/ Ioduro de propidio (IP)**

Anexina V/IP es la prueba de detección de muerte celular (apoptosis/necrosis) mediante citometría de flujo y se realizó usando el kit Cell death apoptosis Kit (Invitrogen). Los macrófagos tratados fueron desprendidos de la placa de ultra baja adherencia por pipeteo, lavados en tres ocasiones con cRPMI y mantenidos en suspensión por 10 minutos en el buffer de unión (10 mM HEPES/NaOH pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCL, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>), para preparar las células para



la tinción. Posteriormente, se añadió ioduro de propidio (IP) y Cy5-anexina V en el buffer de unión, la tinción se mantuvo por lo menos 20 min y posteriormente, las células se analizaron por citometría a 488 nm en el láser de argón y a 635 nm en láser diodo en el citómetro FACS-ARIA del Centro Médico Siglo XXI.

### **5.6 Detección de Lactato deshidrogenasa (LDH) liberada**

El ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada se realizó utilizando el kit Cyto96® (Promega labs). La LDH, se midió en el sobrenadante de macrófagos en un tiempo menor a 7 horas desde su recolección. Para la cuantificación se colocaron 50 µL de sobrenadante con 50 µL de reactivo de LDH (12 mg/mL de lactato, 0.66 mg/mL de cloruro de iodo-nitrotetrazolio, 4.5 unidades /mL de diaforasa, 0.01% de BSA, 0.4 % de sucrosa en PBS), se incubó a 37°C durante 20 minutos, posteriormente se agregaron 50 µL de solución de paro y se leyó la absorbancia emitida a 490 nm. Como controles de la prueba se utilizaron: células lisadas con un buffer de lisis para determinar el valor de LDH total, células sin tratamiento y un pozo con medio que sirvió como blanco. Para calcular el % de LDH liberada se consideró el valor de LDH total como un 100% y se estimó el porcentaje de LDH liberado de cada tratamiento.

### **5.7 Cuantificación de IL-1β**

La detección y cuantificación de IL-1β se realizó en los sobrenadantes de las células estimuladas o infectadas, utilizando una prueba de ELISA con el kit “IL-1 beta bovine ELISA Kit” (Thermo Fisher). La técnica ELISA sándwich se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó un espectrofotómetro Multiskan Go Thermo Scientific® para medir la absorbancia de 550 nm y 450 nm, se restaron los valores de las mediciones de longitud de onda de 450 nm para calcular la absorbancia

corregida. Una curva patrón con IL-1 $\beta$  recombinante sirvió para realizar la cuantificación.

### **5.8 Detección de motas de ASC**

Se sembraron macrófagos a una concentración de  $3 \times 10^5$  células en portaobjetos con cámaras para sembrar células (chambered coverslips). Las células se estimularon con 100  $\mu\text{g/ml}$  de EFC o se infectaron con *M. bovis* MOI 10:1 durante 24 h; como control positivo se utilizó LPS 300  $\mu\text{g/ml}$ . En los tratamientos de inhibición se aplicaron inhibidores del inflamasoma 2 h antes de recibir el estímulo correspondiente. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Tritón 100X al 0,15% durante 10 minutos en hielo. Las células se lavaron y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-TMS1/ASC ab15449 (Abcam) en una dilución de 1:1000 a 4 °C durante la noche. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (burro anti-conejo IgG H&L-FITC, ab6881, Abcam) diluido 1:3000 durante 1 h en la oscuridad. Los portaobjetos se lavaron y montaron usando medio Vectashield® con DAPI (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX41 (Shinjuku, JP) con objetivos de 100  $\times$  y 40  $\times$ . Las imágenes fueron capturadas con el software Zen 2.6 edición azul. Se aplicaron los mismos parámetros de captura, tiempo de exposición e intensidad tanto para las muestras de control como para las experimentales.

### **5.9 Western Blot**

Los macrófagos infectados ( $3 \times 10^5$ ) se lisaron con tampón Laemmli. Las proteínas celulares se separaron mediante SDS PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF. La gasdermina D se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal primario (Asp275) (E7H9G) (Cell Signaling, Danvers, EE. UU.) y el anticuerpo secundario

cabra anti-conejo IgG HRP (A50069) (Cell signaling). El control de carga se monitorizó con actina anti- $\beta$  #4967. Las transferencias se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios diluidos 1:1000, se lavaron tres veces y se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios diluidos 1:10,000 y posteriormente se agregó sustrato químico luminiscente (Femto West Super Signal). El análisis de densitometría se realizó utilizando el software Image J. Los resultados se calcularon como la relación proteína de interés/carga de control y se expresaron como un aumento de veces en relación con el control negativo. Este experimento se repitió dos veces.

#### **5. 10 Conteo de UFC después de la inducción de muerte celular**

Se infectaron un total de  $1 \times 10^4$  células por pocillo con *M. bovis* cepas AN5 de en Nunc MiniTrays (Nalge Nunc International) durante 4 h a una MOI de 10:1 y se mantuvieron en una atmósfera humidificada que consistía en 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C. Después de permitir la fagocitosis durante 4 h, las células se lavaron cinco veces con 10  $\mu$ L de cRPMI con 10% de SFB. Las células se trataron con estaurosporina 5  $\mu$ M para inducir la apoptosis, LPS 300  $\mu$ g/ml + nigericina 50  $\mu$ M para inducir piroptosis, o cRPMI con 10% de SFB únicamente (control). El recuento inicial de absorción de micobacterias se cuantificó colocando en placas diluciones en serie de la suspensión celular después de la lisis con Tween 20 al 0,5% (0 h). El crecimiento de micobacterias intracelulares se evaluó 24 h después de la infección y luego se lisaron los macrófagos como se indica. Las unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. bovis* se determinaron colocando diluciones en serie de la suspensión de lisis celular en medio Middlebrook 7H11 con OADC al 10 % después de 18 días de cultivo a 37 °C. Los resultados informados son el promedio de tres experimentos independientes.

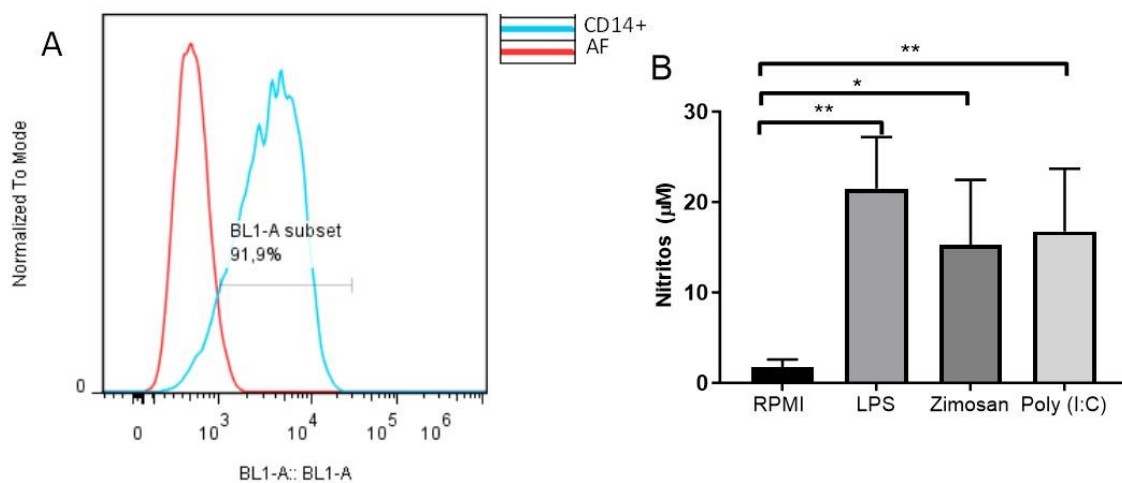
## 5.11 Medición de óxido nítrico.

Evaluamos la producción de óxido nítrico en macrófagos a partir de la acumulación de nitritos. Los nitritos fueron cuantificados usando el kit comercial Griess assay (Promega labs). Se siguieron las especificaciones del fabricante, se generó una curva de referencia de nitrito de sodio basada en diluciones en serie y luego se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras para determinar los nitritos presentes. Se utilizó un espectrofotómetro Multiskan Go Thermo Scientific® a una longitud de onda de 550 nm para medir la absorbancia.

## 6. Resultados

### 6.1 *M. bovis* y EFC inducen muerte celular necrótica en macrófagos de bovino

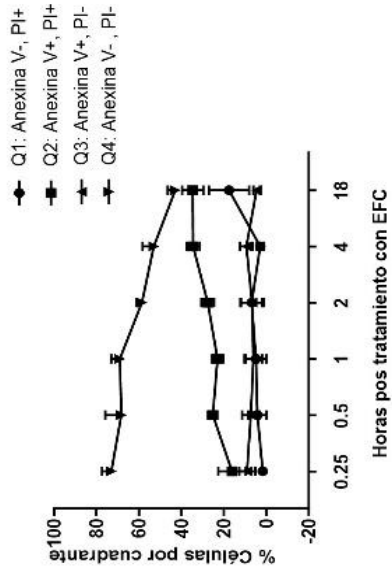
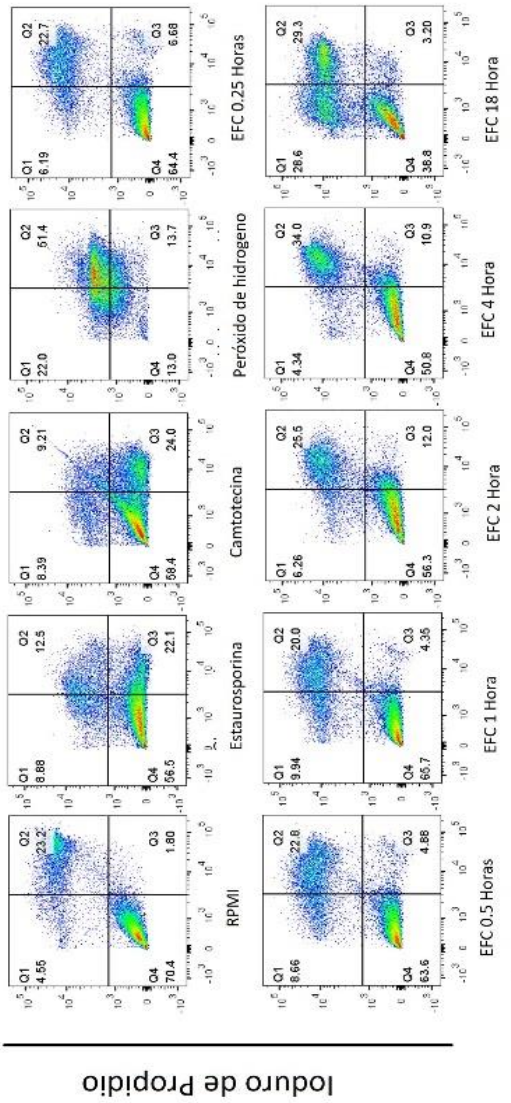
Los macrófagos derivados de monocitos usados en este estudio fueron caracterizados evaluando la presencia del receptor CD14 con un 91% de las células positivas, (Figura 1A), además de evaluar la capacidad de estas células para producir óxido nítrico. Los resultados del ensayo de Griess mostraron que la estimulación con LPS 300 ng/mL, Poly I:C 30  $\mu$ g y Zimosan 30  $\mu$ g aumentó significativamente la producción basal de nitritos de 5  $\mu$ M a 23  $\mu$ M, 18  $\mu$ M y 15  $\mu$ M, respectivamente (Figura 1B), en conjunto las características anteriores sugieren que las células usadas son macrófagos.



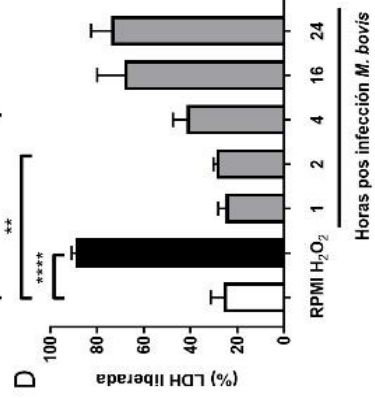
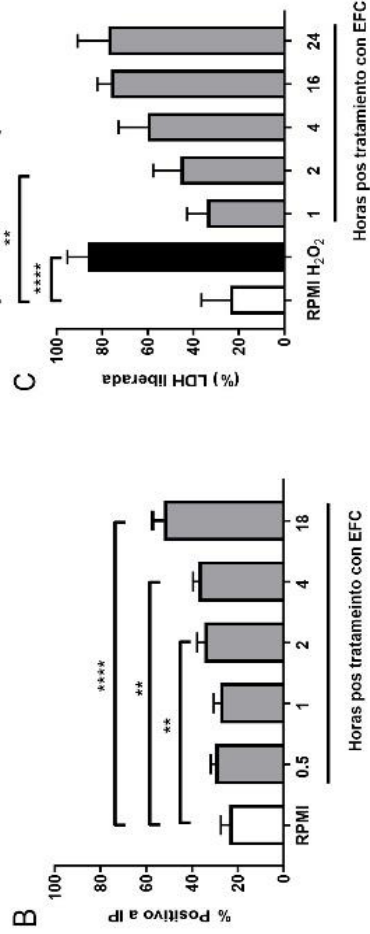
**Figura 1. Caracterización de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de bovinos.** A) Detección de células positivas al marcador CD14 por citometría de flujo. B) Producción de nitritos en macrófagos estimulado con varios ligandos (300 ng/ml de LPS, 30 µg/ml de Poly I:C y 30 µg/ml de Zimosan). Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes con tres réplicas internas cada uno. El ANOVA unidireccional mostró diferencias significativas entre el control negativo (RPMI) versus células tratadas (\* valor de  $p \leq 0,05$ , \*\* valor de  $p \leq 0,01$ ).

Se evaluó la capacidad que tiene *M. bovis* y su EFC para inducir muerte celular en macrófagos de bovino. Esto se realizó mediante citometría de flujo usando anexina V/IP, utilizando como modelo de inducción solamente al EFC y porcentaje de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada para *M. bovis* y EFC. Los macrófagos estimulados con EFC durante diferentes tiempos (0.5, 1, 2, 4 y 18 horas) presentaron una disminución tiempo-dependiente de células vivas (Anexina V-/IP-) iniciando en 70% y disminuyendo hasta el 40% durante 18 horas, mientras que las células en necrosis (Anexina V-/IP+ y Anexina V+/IP+) aumentaron de forma tiempo-dependiente iniciando en 22% y llegando a 55% en 18 horas (Figura 2A). Se seleccionaron las áreas positivas a IP considerando a estas como células en necrosis las cuales aumentaron de 22% a 55% a partir de las 18 horas (Figura 2B). Mientras que al evaluar la LDH liberada por EFC se observó necrosis a partir de las 2 horas (45%), obteniendo el porcentaje mayor de células en necrosis (77%) a las 24 horas posttratamiento (Figura 2C). *Mycobacterium bovis* fue capaz de inducir muerte celular necrótica en cultivos de macrófagos de bovino. Los macrófagos infectados con *M. bovis* AN5 (MOI 10:1) presentaron necrosis a partir de las 4 horas post infección (45% de liberación de LDH) y un rango máximo a las 24 horas (75% de liberación de LDH), como se observa en la Figura 2D.

A



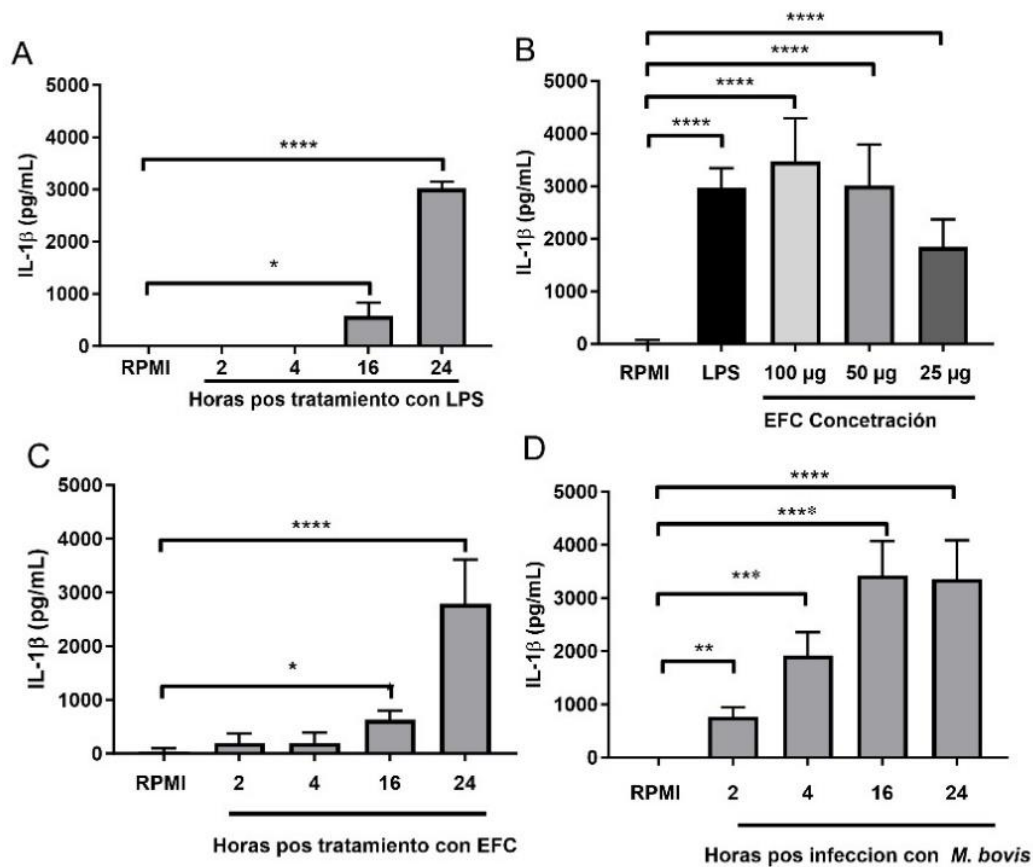
Anexina V-FICT



**Figura 2. *Mycobacterium bovis* y EFC inducen muerte celular necrótica en macrófagos de bovino.** A) Imagen representativa de tres experimentos en los que se trataron macrófagos bovinos con 100 µg/ml de EFC durante diferentes tiempos (0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 18 h), y posteriormente fueron teñidos con anexina V y yoduro de propidio (IP). Los grupos de control correspondieron a 5 µg/mL de estaurosporina, 15 µg/mL de camptotecina y 50 µM peróxido de hidrógeno. B) Porcentaje de células necróticas (positivo a IP) en macrófagos tratados con EFC durante diferentes tiempos (0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 18 h). C) LDH liberada en los sobrenadantes de macrófagos estimulados con EFC en diferentes momentos (1, 2, 4, 16 y 24 h). D) LDH liberada en el sobrenadante de macrófagos estimulados con *M. bovis* en diferentes momentos (1, 2, 4, 16 y 24 h). Los resultados se muestran como la media ± D.E. de tres experimentos independientes con tres réplicas internas cada uno. El ANOVA unidireccional mostró diferencias significativas entre el control negativo y las células tratadas (\*\* valor de  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\* valor de  $p \leq 0,0001$ ).

## **6.2. *M. bovis* AN5 y EFC inducen la liberación de IL-1β en macrófagos de bovino**

Para conocer la posible participación del inflamasoma en los macrófagos infectados con *M. bovis* o estimulados con el EFC, se evaluó la presencia de IL-1β, un producto directo de la activación del inflamasoma. Para conocer el patrón de liberación de IL-1β en los macrófagos de bovino, se estimularon con LPS (300 µg/mL) y se cuantificó su concentración a las 2, 4, 16 y 24 horas encontrando que el inicio de la producción de IL-1β se da a las 16 horas (650 pg/mL) existiendo un nivel máximo de producción a las 24 horas (3200 pg/mL), como se observa en la Figura 3A. Para conocer si el EFC estimula la activación del inflamasoma se probaron diferentes concentraciones (25 µg, 50 µg y 100 µg) durante 24 horas observando una producción de 1850 pg/mL, 3000 pg/mL y 3200pg/mL de IL-1β para 25 µg, 50 µg y 100 µg respectivamente (Figura 3B). Al estimular macrófagos con EFC y cuantificar IL-1β a diferentes tiempos (2, 4, 16, 24 horas), se observó un patrón de producción similar al que observamos con LPS, donde la producción de IL-1β inicio a las 16 horas con una concentración de 500 pg/mL y una mayor producción a las 24 horas con 2900 pg/mL (Figura 3C). En los macrófagos infectados con la bacteria la detección de la citocina inicio a las dos horas (500 pg/mL) y tuvo una detección máxima (3700 pg/mL) a partir de las 16 horas (Figura 3D). En conjunto los datos nos muestran la capacidad de *M. bovis* y del EFC para inducir la liberación de IL-1β.



**Figura 3. *M. bovis* AN5 y EFC promueve la liberación de IL-1β en macrófagos de bovino.** A) Producción de IL-1β en macrófagos de bovino ( $1 \times 10^5$ ) estimulados con LPS a diferentes tiempos (2, 4, 16 y 24 h). B) Producción de IL-1β en macrófagos de bovino estimulados con diferentes concentraciones de EFC (100, 50 y 25 µg/mL) durante 24 horas. C) Producción de IL-1β en macrófagos bovinos ( $3 \times 10^5$ ) estimulados con 100 µg/mL de EFC/mL a diferentes tiempos (2, 4, 16 y 24h). D) Producción de IL-1β en macrófagos ( $3 \times 10^5$ ) de bovino infectados con *M. bovis* AN5 MOI 10:1 a diferentes tiempos (2, 4, 16 y 24h). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas internas. El ANOVA una vía mostró diferencias significativas entre el control negativo y células tratadas en diferentes tiempos o concentraciones (\* valor de  $p \leq 0,05$ , \*\* valor de  $p \leq 0,01$ , \*\*\* valor de  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* valor de  $p \leq 0,0001$ ).



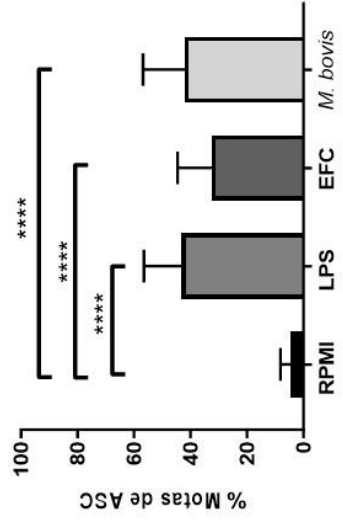
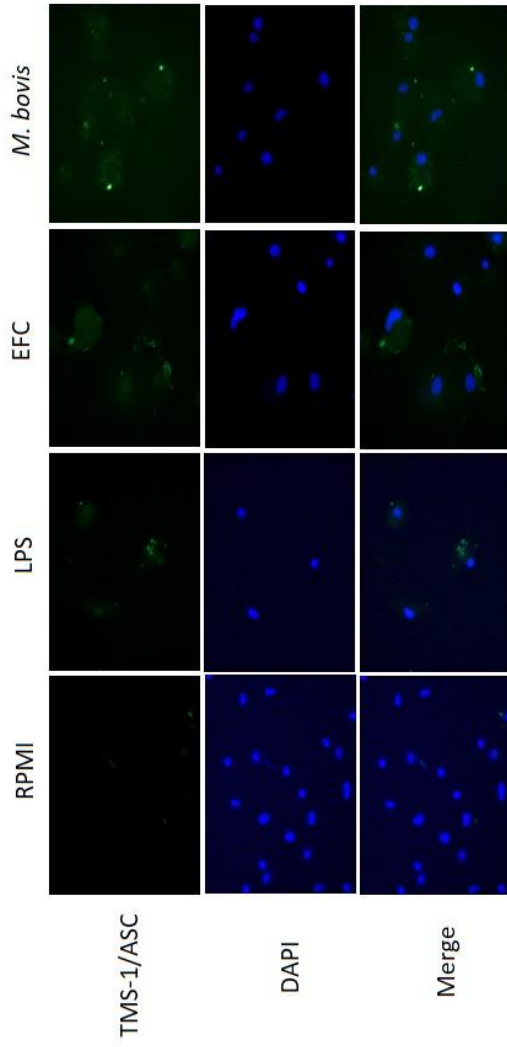
### **6.3 La liberación de IL-1 $\beta$ es dependiente de ASC y caspasa-1 en macrófagos infectados con *M. bovis* AN5.**

La producción de IL-1 $\beta$  mediada por el inflamasoma involucra la participación de la proteína acopladora ASC y la acción de caspasa-1, por lo que se prosiguió a evaluar la presencia de motas de ASC que evidencia la oligomerización de ASC en el ensamblaje del inflamasoma. Observamos un porcentaje de motas de ASC de 35% en macrófagos estimulados con EFC y 43% al infectarlos con *M. bovis* mientras que solo del 5% en macrófagos no estimulados ni infectados (Figuras 4A).

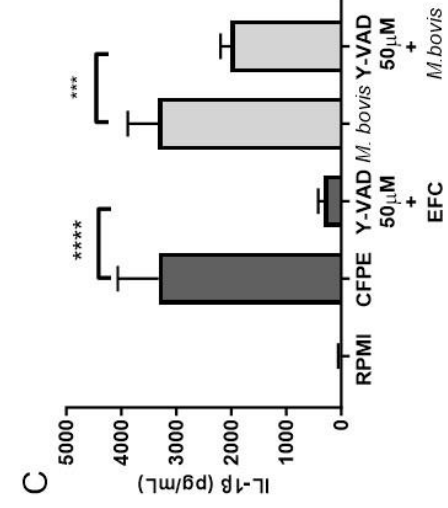
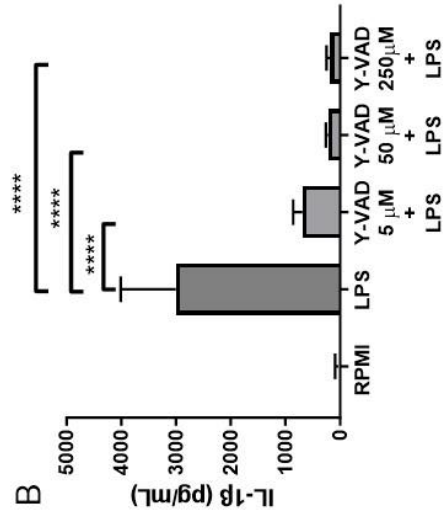
Siguiendo la ruta de activación canónica del inflamasoma evaluamos la participación de caspasa-1, esto se realizó evitando la escisión de caspasa-1 con el inhibidor específico Y-VAD. Se probaron tres concentraciones de Y-VAD (250, 50 y 5  $\mu$ M) y se observó una disminución de IL-1 $\beta$  de 3200 pg/mL a <300pg/ml en macrófagos que se trataron con Y-VAD a 250  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, mientras que la concentración de 5  $\mu$ M disminuyó a (800pg/ml) (Figura 4B). Se eligió la concentración de 50  $\mu$ M para realizar las inhibiciones posteriores.

Se estimularon células con Y-VAD y dos horas después se incubaron con EFC o con *M. bovis* MOI 10:1 durante 24 horas. La concentración IL-1 $\beta$  inducida por el EFC disminuyó de 3700 pg/mL a 470 pg/mL y la inducida por *M. bovis* de 3000 pg/mL a 2300 pg/mL al usar inhibidor caspasa 1, Y-VAD (Figura 4C). Lo anterior sugiere que el ensamblaje del inflamasoma y la participación de caspasa 1 están involucrados en la liberación de IL-1 $\beta$  por los macrófagos de bovino estimulados con EFC y con *M. bovis*.

A



B



C

#### **Figura 4. La liberación de IL-1 $\beta$ depende de ASC y caspasa-1 en macrófagos.**

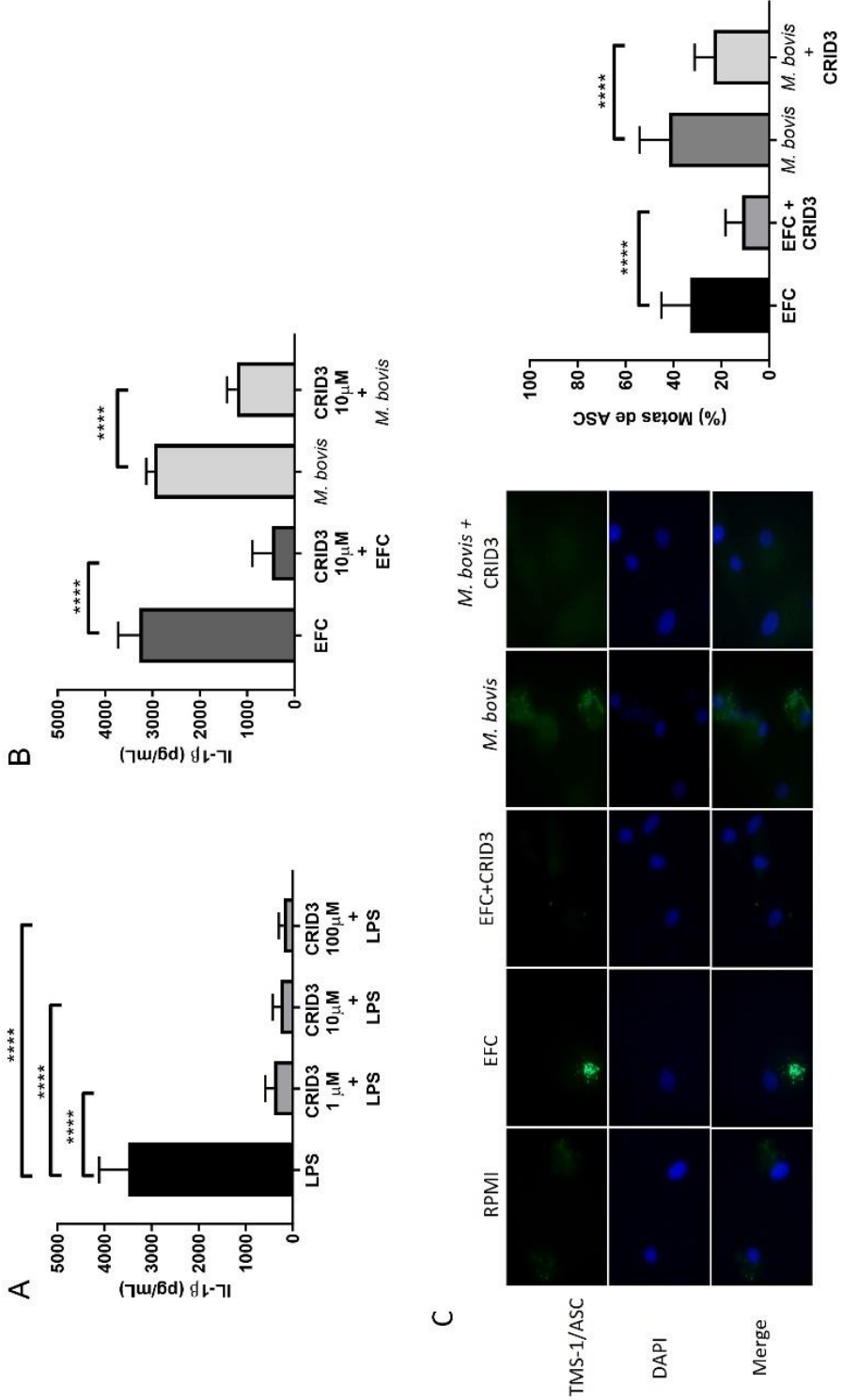
A) Motas de ASC en macrófagos estimulados con LPS, EFC o *M. bovis* durante 24 h. Se utilizó microscopía de fluorescencia con un objetivo de 40 $\times$  y se cuantificaron motas de ASC en macrófagos estimulados con LPS, EFC 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en  $1 \times 10^6$  células o *M. bovis* MOI 10:1 durante 24 h. Las motas de ASC se muestran en verde y el núcleo celular se muestra en azul. B) Producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos bovinos tratados con 250, 50 y 5  $\mu\text{M}$  de Y-VAD 2 h antes de la estimulación con LPS. C) Producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos bovinos tratados con Y-VAD (50  $\mu\text{M}$ ) durante 2 h antes de la estimulación con EFC (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o *M. bovis* MOI 10:1, respectivamente. El porcentaje de motas de ASC se calculó contando más de 100 campos para cada condición utilizando imágenes de microscopía de fluorescencia con un aumento de 40 $\times$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas internas. El ANOVA una vía mostró diferencias significativas entre las células tratadas con LPS, *M. bovis* o EFC contra las células tratadas con Y-VAD más LPS, *M. bovis* o EFC, respectivamente (\*\*\*) valor de  $p \leq 0,001$  y \*\*\*\* valor de  $p \leq 0,0001$ ).

#### **6.4 *Mycobacterium bovis* activa al inflammasoma NLRP3**

El inflammasoma NLRP3 es el inflammasoma más ampliamente estudiado y este se activa por los múltiples estímulos como el eflujo de potasio, la presencia de especies reactivas de oxígeno o por componentes de los lisosomas, entre otros. Para identificar la participación de este inflammasoma por efecto de *M. bovis* utilizamos el inhibidor químico CRID3 que inhibe específicamente la oligomerización y ensamblaje del NLRP3. Incubamos macrófagos de bovino con diversas concentraciones de CRID3 (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) y 2 horas después los estimulamos con LPS (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), siendo las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  las que presentaron un mejor efecto inhibitorio, disminuyendo la producción de IL-1 $\beta$  de 3200  $\text{pg}/\text{mL}$  a menos de 300  $\text{pg}/\text{mL}$  (Figura 5A).

Se usó la dosis de 10  $\mu\text{M}$  para los experimentos de inhibición posteriores. Se observó que la concentración de IL-1 $\beta$  disminuyó de 3200  $\text{pg}/\text{mL}$  a 750  $\text{pg}/\text{mL}$  en los macrófagos estimulados con EFC y de 3000  $\text{pg}/\text{mL}$  a 1220  $\text{pg}/\text{mL}$  en macrófagos infectados con *M. bovis* AN5 (MOI 10:1) después de usar el inhibidor CRID3 (Figura 5B). La formación de motas de ASC también disminuyó cuando se trataron los macrófagos con 10  $\mu\text{M}$  de CRID3, pasando de 35% a 8% en macrófagos estimulados con EFC y de 42 % a 21% en macrófagos infectados con *M. bovis*

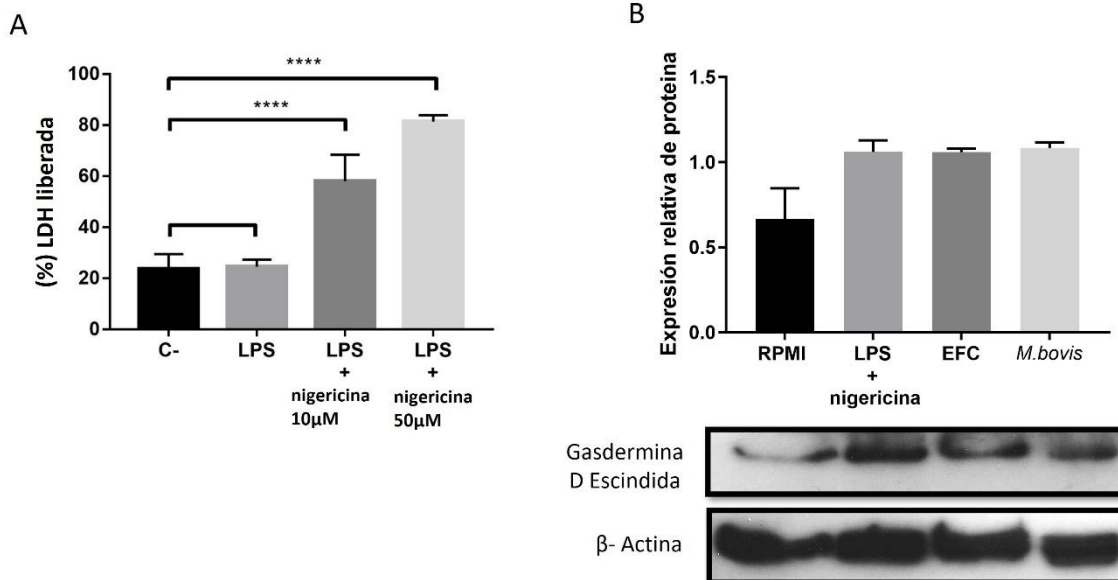
(Figura 5C). Estos datos sugieren la participación del inflamasoma NLRP3 en la maduración de IL-1 $\beta$  en infecciones con *M. bovis*.



**Figura 5. *M. bovis* activa el inflammasoma NLRP3.** A) Producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos bovinos tratados con CRID3 (1, 10 y 100  $\mu$ M) durante 2 h antes de la estimulación con LPS (300  $\mu$ g/ml). B) Producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos bovinos tratados con CRID3 10  $\mu$ M durante 2 h antes de la estimulación con 100  $\mu$ g/ml de extracto filtrado de cultivo (EFC) o *M. bovis* MOI 10:1. C) Motas de ASC en macrófagos estimulados con CRID3 + 100  $\mu$ g/ml de EFC o *M. bovis* MOI 10:1. Se utilizó microscopía de fluorescencia con un objetivo de 40  $\times$  para cuantificar las motas de ASC. Las motas ASC son se muestra en verde y el núcleo celular se muestra en azul. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas internas. El ANOVA una vía mostró diferencias significativas entre las células tratadas con LPS, *M. bovis* o EFC contra las células tratadas con CRID3 y LPS, *M. bovis* o EFC, respectivamente (\*\*\*\* valor de  $p \leq 0,0001$ ).

### **6.5 *Mycobacterium bovis* induce la escisión de gasdermina D**

La gasdermina es una molécula escindida por caspasa 1, la cual está fuertemente relacionada con la inducción de piroptosis. La inducción experimental de piroptosis se puede lograr mediante la aplicación de dos estímulos que puedan activar al inflammasoma NLRP3, por lo general el primer estímulo es un ligando de receptores tipo Toll y el otro un inductor del ensamblaje del inflammasoma. En este trabajo se utilizó como primer estímulo el LPS (300  $\mu$ g/mL) y como segundo estímulo nigericina a diferentes concentraciones (10 y 50  $\mu$ M), se observó que el estímulo de LPS por sí solo no fue capaz de inducir necrosis, sin embargo, al agregar LPS y nigericina el porcentaje de liberación de LDH aumento de 20% a 55% usando 10  $\mu$ M de nigericina y de 20% a 80% al usa 50  $\mu$ M nigericina (Figura 6A). Posteriormente se evaluó la presencia de gasdermina D en macrófagos infectados con *M. bovis* o estimulados con EFC durante 24 horas. Se utilizó Western Blot utilizando el anticuerpo Cleaved Gasdermin D (Asp275) y se observó la presencia de bandas de 30 kDA que también se encontraron en el control de inducción de piroptosis (LPS mas nigericina), lo que indica que tanto *M. bovis* como el EFC tienen la capacidad de escindir gasdermina D (Figura 6B).

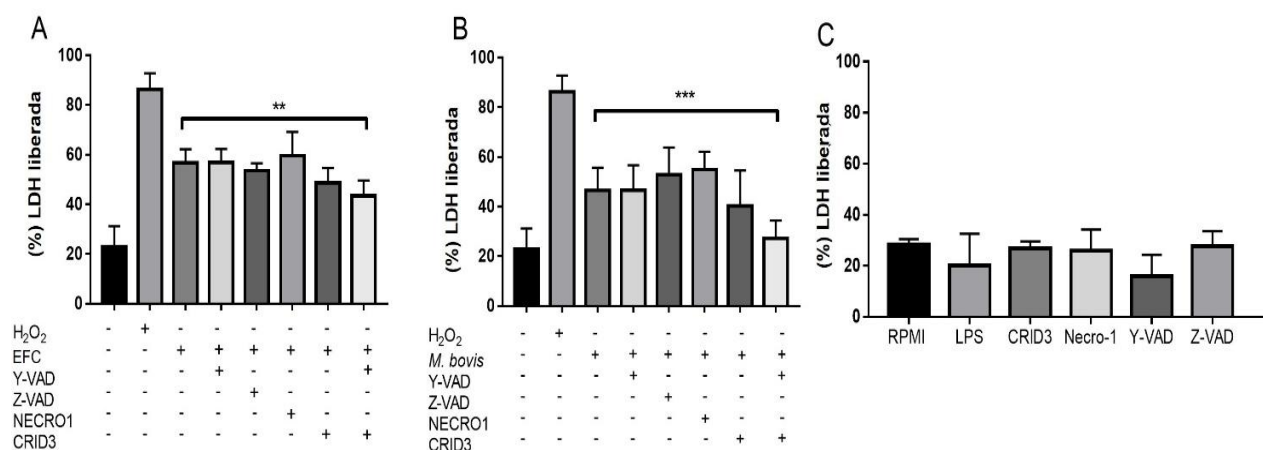


**Figura 6. *M. bovis* y EFC inducen la escisión de gasdermina D en macrófagos de bovino.** A) Se estimularon macrófagos bovinos con 300 µg/ml de LPS más nigericina (10 µM o 50 µM) durante 24 h. Los resultados se muestran como la media ± E.D. de tres experimentos independientes con tres réplicas internas cada uno. Los grupos fueron probados para diferencias estadísticas con un ANOVA una vía (\* valor de  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\* valor de  $p \leq 0,0001$ ). B) Western blot realizados con lisado proteico de macrófagos de bovino infectados con *M. bovis* AN5 MOI 10:1 o se trataron con EFC (100 µg/ml) durante 24h. Se utilizó LPS (300 µg/ml) más nigericina (50 µM) como control positivo. β-Actina fue utilizada como control de carga. Se realizó la densitometría de las bandas del gel usando el programa ImageJ. Los resultados representan dos experimentos independientes y se expresan como la proporción de gasdermina D/β actina escindida (expresión relativa de proteína).

### 6.6 Relación entre la inhibición del inflamasoma y disminución de la muerte celular

La relación que existe entre activación del inflamasoma NLRP3 y la necrosis fue probada inhibiendo diversos componentes del inflamasoma con inhibidores químicos. Al inhibir la oligomerización de NLRP3 usando CRID3 y la activación de caspasa-1 usando Y-VAD y posteriormente estimular las células con EFC o *M. bovis* durante 4 horas, se observó una disminución de la liberación de LDH del 56% al 43% y del 50% al 27%, respectivamente (Figuras 7A y 7B). Se probó la posible participación de otros tipos de muerte celular no relacionados a la actividad del

inflammasoma utilizando inhibidores químicos. La liberación de LDH no disminuyó al usar el inhibidor general de caspasas Z-VAD relacionado a apoptosis ni el inhibidor de necroptosis necro-1, por lo que posiblemente no están involucrados en la generación de necrosis causada por *M. bovis* o por los componentes del EFC. Todos los inhibidores químicos fueron probados y no alteraron la viabilidad de macrófagos sin infectar Figura (7C).

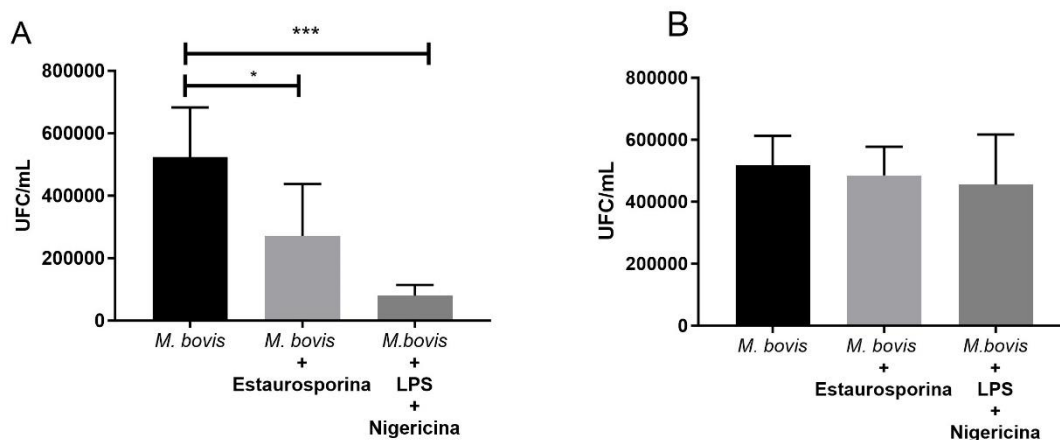


**Figura 7. La inhibición del inflammasoma NLRP3 disminuyó el porcentaje de muerte celular de los macrófagos.** A y B) LDH en el sobrenadante de macrófagos estimulados con Y-VAD de 50  $\mu$ M, Z-VAD de 50  $\mu$ M, Necro-1 de 50  $\mu$ M, CRID3 de 10  $\mu$ M e Y-VAD más CRID3, 2 h antes de la estimulación con 100  $\mu$ g /mL de EFC o *M. bovis*, durante 4 h. C) LDH en el sobrenadante de macrófagos estimulados con 50 m Y-VAD, 50 m Z-VAD, 50 m Necro-1, 10 m CRID3 e Y-VAD + CRID3. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. El ANOVA una vía mostró una diferencia significativa entre el porcentaje de muerte celular en macrófagos infectados con *M. bovis* o CFPE contra macrófagos infectados con *M. bovis* o EFC con inhibidores de la muerte celular (Y-VAD, Z-VAD, Necro-1 y CRID3). \*\* valor de  $p \leq 0,01$ , \*\*\* valor de  $p \leq 0,001$ . H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o peróxido de hidrógeno como control positivo.

### 6.7 La inducción de la activación del inflammasoma en macrófagos disminuye la supervivencia intracelular de *M. bovis*.

La inducción de los diferentes tipos de muerte celular se ha relacionado con la supervivencia o control de *M. bovis*. Se estimularon macrófagos con estaurosporina 5  $\mu$ M como inductor de apoptosis y LPS más nigericina (50  $\mu$ M) como inductores de

muerte necrótica relacionada con el inflamasoma, células infectadas y no tratadas fueron utilizadas como. Las células infectadas y posteriormente tratadas con estaurosporina presentaron una disminución en el crecimiento de las micobacterias comparado con células infectadas no tratadas ( $5.2 \times 10^5$  a  $2.7 \times 10^5$  UFC respectivamente), las células infectadas y tratadas con LPS más nigericina presentaron una disminución de crecimiento más evidente (de  $5.2 \times 10^5$  a  $8 \times 10^4$  UFC, respectivamente), como se observa en la Figura 8A. Para verificar que los inductores de muerte de no generaban daño a las micobacterias por si solos, se expuso a  $1 \times 10^5$  micobacterias a estaurosporina  $5 \mu\text{M}$  o LPS  $300 \mu\text{M}$  más nigericina  $50 \mu\text{M}$ , posteriormente se sembraron en agar Middlebrook 7H11 y no se observó una disminución en el número de UFC de *M. bovis* comparado con el control de bacterias no tratado (Figura 8B).



**Figura 8. La activación del inflamasoma en macrófagos disminuye la supervivencia intracelular de *Mycobacterium bovis*.** (A) UFC bacterianas/mL en  $1 \times 10^4$  macrófagos infectados con *M. bovis* durante 4 h, lavados para eliminar bacterias no fagocitadas e incubados con estaurosporina ( $5 \mu\text{M}$ ) para inducir apoptosis o con LPS ( $300 \text{ ng/mL}$ ) y nigericina ( $50 \mu\text{M}$ ) para inducir piroptosis. Los macrófagos infectados anteriormente se lisaron 24 h después, y el contenido del lisado se diluyó y se sembraron en agar Middlebrook para calcular las UFC/ml. (B) UFC/mL de *M. bovis* expuesto a estaurosporina ( $5 \mu\text{M}$ ) o LPS ( $300 \mu\text{g/mL}$ ) y nigericina ( $50 \mu\text{M}$ ) durante 24 h. Las micobacterias expuestas se recuperaron y se sembraron en agar para calcular UFC/ml. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. Las diferencias entre



tratamientos se probaron con un ANOVA una vía, (\* valor de  $p \leq 0,05$ , \*\*\* valor de  $p \leq 0,0001$ ).

## 7. Discusión y conclusiones

La tuberculosis bovina es una enfermedad que genera grandes pérdidas económicas a la industria ganadera, además de significar un importante riesgo a la salud pública al ser una enfermedad zoonótica (Pérez-Morote et al., 2020; Torres-González et al., 2016). *M. bovis*, es el agente causal de la tuberculosis bovina, una bacteria intracelular facultativa, que genera lesiones características conocidas como granulomas, estos son cúmulos de diversas células entre las que se encuentran macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células detriticas y células gigantes, que en conjunto delimitan el crecimiento de micobacterias, pero también proporciona un nicho de sobrevivencia para micobacterias (Carrisoza-Urbina et al., 2019; Ehlers and Schaible, 2012; Wangoo et al., 2005). Es frecuente encontrar tejido necrótico dentro de los granulomas y esta necrosis se ha asociado de manera general con la invasión y proliferación de la bacteria un ambiente inflamatorio, sin embargo, no es claro el mecanismo por el cual *M. bovis* genera necrosis y si la formación de esta se asocia siempre con la proliferación de la bacteria, por lo que en este trabajo evaluamos la inducción de piroptosis como un mecanismo que contribuye a la generación de necrosis, además del efecto que tiene este tipo de muerte En el crecimiento intracelular de micobacterias.

La inducción de muerte celular en células fagocíticas y presentadoras de antígenos es una estrategia que siguen las micobacterias para poder evadir la respuesta inmune, poder propagarse y proliferar (Beckwith et al., 2020; Behar et al., 2010; Molloy et al., 1994). Existen diversos mecanismos por los cuales *M. bovis* puede inducir muerte celular, uno de ellos es mediante las proteínas Endo G y AIF que producen apoptosis independiente de caspasas, en macrófagos de origen bovino (Benítez-Guzmán et al., 2018; Gutiérrez-Pabello et al., 2002; Vega-Manriquez et al., 2007). En este trabajo se muestra la capacidad de *M. bovis* para inducir necrosis

mediada por la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos de bovino y el posible papel de este tipo de muerte con el control de la proliferación intracelular de micobacterias.

*M. bovis* tiene diversas proteínas estructurales y de secreción capaces de inducir muerte celular, entre las proteínas de secreción capaces de inducir necrosis se encuentran PPEG68, PE25/PPE41, PPE31, ESAT-6, CFE-10, CpnT, entre otras, las cuales generan daño y permeabilidad en mitocondrias, fagosomas y lisosomas. (Dallenga et al., 2017; Danelishvili et al., 2016; Danilchanka et al., 2014; Feng et al., 2021; Tundup et al., 2014). En este trabajo se demostró que tanto los productos de secreción contenidos en el EFC, como las bacterias viables indujeron muerte celular necrótica evidenciada por daño de la membrana celular que permitió la permeabilización de IP y eflujo de LDH. La inducción de necrosis fue más rápida (desde las 2 horas) en células tratadas con el EFC que en células infectadas con *M. bovis* (4 horas). Entre las proteínas del EFC nuestro grupo de investigación ha identificado a Mpb70, Mpb83, sodB/sodA, que podrían tener relación con la inducción de muerte celular, aunque también es posible que otras proteínas no identificadas o macromoléculas diferentes presentes en el EFC le confieran la capacidad para inducir necrosis (Jiménez-Vázquez., 2023).

Se sabe que las micobacterias pueden inducir necrosis por diferentes rutas de muerte celular como son como son necroptosis (Butler et al., 2017), ferroptosis (Xie et al., 2016) y piroptosis (Beckwith et al., 2020), en particular existen varios reportes de la capacidad de *M. bovis* para inducir muerte por piroptosis en diversas líneas celulares y cultivos derivados de ratones y humanos, relacionados con la activación de diversos inflamasomas, sin embargo, no existen estudios que demuestren que *M. bovis* induce piroptosis en células de bovino (Yang et al., 2013; Zhou, et al., 2016). Un marcador inicial de la activación del inflamasoma es la producción de IL-1 $\beta$ , y nuestros datos muestran que tanto *M. bovis* como el EFC son capaces de inducir la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos de bovino, la producción de dicha citocina fue considerablemente más rápida al exponer las células a las bacterias viables. Esto se puede deber a que la producción de IL-1 $\beta$  es mediada por el

inflammasoma, un complejo multiproteico que necesita por lo menos dos estímulos para ser activado, y posiblemente las micobacterias viables estimulan de diversas maneras a las células propiciando una activación del inflammasoma más rápido, mientras que los componentes del filtrado de cultivo tienen una acción más lenta al interactuar con el macrófago. Dentro de los mecanismos capaces de estimular al inflammasoma se encuentran el estímulo de receptores tipo Toll, la producción de especies reactivas de oxígeno y por el reconocimiento de material genético de la bacteria (Briken et al., 2013; Dorhoi et al., 2012; Wawrocki and Druszczynska, 2017).

La activación del inflammasoma es un evento complejo que no solo puede ser verificado por la producción de IL-1 $\beta$ , por lo que buscamos identificar la presencia de moléculas claves que demostraran la activación de este complejo multiproteico. La activación del inflammasoma está mediada por la activación y oligomerización de moléculas clave, entre ellas ASC y la molécula efectora caspasa-1 (Compan et al., 2012; Guo et al., 2015), por lo que se evaluaron la presencia de motas de ASC utilizando microscopia de fluorescencia y la participación de caspasa-1 usando el inhibidor Y-VAD. La infección con *M. bovis* y el estímulo con EFC indujeron la formación de motas de ASC y al inhibir la activación de caspasa-1 se disminuyó la producción de IL-1 $\beta$ , lo que demuestra que ambas moléculas están involucradas en la activación del inflammasoma por el mecanismo canónico de activación. De manera interesante se observó que el número de motas de ASC y la dependencia de caspasa-1 en la producción de IL-1 $\beta$  fue mayor con el estímulo de la infección con *M. bovis* lo que refuerza la idea de que la micobacteria tiene la capacidad de activar al inflammasoma de manera más eficaz que el estímulo con EFC.

En los últimos años se han descrito varios inflammasomas diferentes entre los que se encuentran el NLRP3, NLRC4, NLRP1b, AIM2, Pyrin, y NLRP7, la principal diferencia entre estos inflammasomas son el receptor que tienen y la especificidad de cada receptor (Latz et al., 2013; Petr Broz and Vishva, 2016). Existen reportes en líneas celulares THP1, J77.4 y RAW 264.7 que *M. bovis* tiene la capacidad de activar diversos inflammasomas, NLRP3, NLRP7 o AIM2; sin embargo, no existen

reportes de lo que sucede en células de bovino (Briken et al., 2013; Dorhoi et al., 2012; Yang et al., 2013; Zhou et al., 2016), en este trabajo se demostró que el inflammasoma NLRP3 es el principal involucrado en la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos de bovino después de estimularlos con EFC o con *M. bovis*. Sin embargo, la IL-1 $\beta$  y la formación de motas de ASC no se redujeron completamente, lo que nos puede sugerir que en este modelo otros inflammasomas participan de manera menos importante en la producción de IL-1 $\beta$  en este modelo, se sabe que *M. bovis* puede activar a los inflammasomas AIM2 por medio de reconocimiento de ADN, además del inflammasoma NLRP7 por medio del reconocimiento de lipoproteínas (Yang et al., 2013; Zhou et al., 2015).

La información generada del presente estudio permitía saber que tanto *M. bovis* como EFC son capaces de inducir la activación del inflammasoma NLRP3 por vía canónica y la inducción de necrosis, sin embargo, no existía evidencia para saber si estos fenómenos estaban relacionados. Existen reportes que mencionan que el proceso de muerte celular está directamente relacionado con la activación del inflammasoma es la piroptosis, en este tipo de muerte existe la escisión de la molécula gasdermina D que genera poros de membrana los cuales permiten la liberación adecuada de IL-1 $\beta$ , sin embargo, esto puede llevar a la muerte celular con la salida del contenido celular (Miao et al., 2011; Sborgi et al., 2016). *M. bovis* y EFC indujeron la escisión de gasdermina D en macrófagos de bovino, lo que nos sugería la capacidad de la micobacteria para inducir piroptosis y la posible participación de esta vía de muerte celular en la patogenia de la bacteria. En trabajo conjunto se realizó la evaluación de gasdermina D en cortes histológicos de linfonodos de bovinos infectados naturalmente con *M. bovis* y se observó marca positiva a gasdermina D dentro y fuera de los granulomas generados por *M. bovis* (Escobar-Chavarría et al., 2023). Lo anterior nos sugiere que la inducción de piroptosis caracterizado por la escisión de gasdermina D es inducida por *M. bovis* y EFC en modelos *in vitro* e *in vivo*.

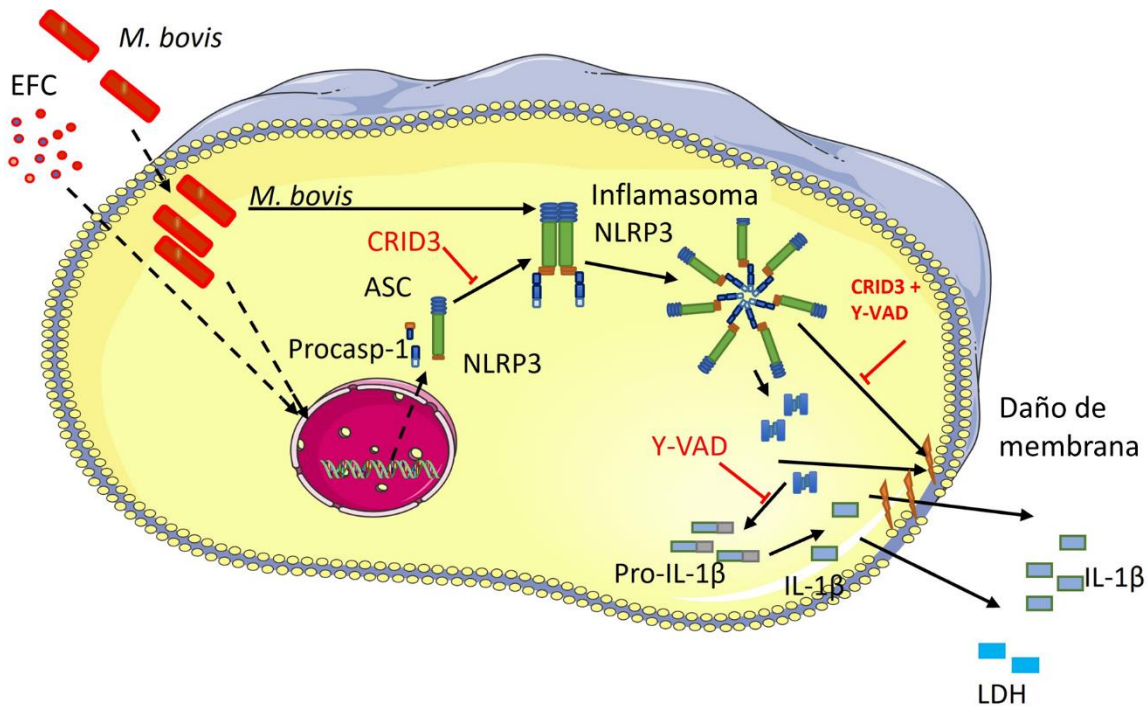
Existen algunos estudios que asocian la activación del inflammasoma con los procesos de muerte directos (Bergsbaken et al., 2009; Motani et al., 2011). Para

conocer si existía una relación entre los componentes del inflamasoma y la inducción de muerte, además de verificar que otros tipos de muerte celular no estuvieran participando utilizamos inhibidores moléculas clave en distintos tipos de muerte celular usamos Z-VAD como un inhibidor general de caspasas, necro-1 para inhibir necroptosis, CRID3 y Y-VAD para inhibir la capacidad del inflamasoma, donde se logró observar que la inhibición de apoptosis como de necroptosis no modificó el porcentaje de muerte de células infectadas, sin embargo, la inhibición de la oligomerización de NLRP3 y Caspasa-1 en conjunto llevo a una disminución significativa en mortalidad de las células infectadas con *M. bovis* o estimuladas con el EFC. Estos resultados confirman la importancia de la activación canónica del inflamasoma NLRP3 en el reconocimiento de *M. bovis* y sus componentes de secreción en bovinos, además de que pueden desencadenar muerte celular necrótica y esta puede ser disminuida al inhibir los componentes del inflamasoma, mientras otros tipos de muerte como apoptosis mediada por caspasas y necroptosis relacionada con la activación de RIPK-1 no juegan un papel importante en la necrosis presente en macrófagos de bovinos.

Finalmente, se probó el efecto que tiene la piroptosis sobre la sobrevivencia intracelular de *M. bovis* en macrófagos de bovino. Las células infectadas con *M. bovis* y tratadas con LPS más nigerina controlaron el crecimiento intracelular de manera eficiente, esto se puede relacionar con la activación del inflamasoma que induce muerte celular necrótica que daña a las células, pero puede contribuir al control de las micobacterias. Se sabe que la actividad del inflamasoma puede controlar el crecimiento de algunas bacterias intracelulares por medio de la formación de poros de membrana por la proteína gasdermina D, mientras que células con deficiencias en algún componente del inflamasoma permiten el crecimiento de las micobacterias (Lerner et al., 2017; Qu et al., 2020; Welin et al., 2011). Además, las citocinas inflamatorias inducidas por la actividad del inflamasoma (IL-1 $\beta$  e IL-18) juegan un papel importante en el control de la micobacteria. Por otra parte los ligandos inductores del inflamasoma también inducen la producción de diversas moléculas microbicidas en el macrófago como las especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico que juegan un papel fundamental

en el control del crecimiento intracelular de bacterias (Esquivel-Solís et al., 2013; Krishnan et al., 2013; Macedo et al., 2013; Mahamed et al., 2017)

En este estudio se cumplió la hipótesis planteada, al evidenciar la capacidad de *M. bovis* y del EFC para inducir muerte celular necrótica de tipo piroptosis inducida por el inflammasoma en macrófagos de bovino. El inflammasoma involucrado fue el NLRP3, el cual se activó por la vía canónica, en la que participa el receptor NLRP3, la proteína ASC y la caspasa-1y donde la liberación de IL-1 $\beta$  y la escisión de gasdermina D, son claves para inducir muerte celular conocido como piroptosis como podemos visualizar en la imagen 3, adaptada del artículo publicado con los datos obtenidos en este trabajo. En este modelo, la inducción de piroptosis generó daño en los macrófagos de bovino lo que puede estar relacionado con el daño que puede generar sobre el tejido y estar relacionado con la patogenia, por otra parte, se observó que el crecimiento intracelular de las micobacterias disminuyó al inducir piroptosis, la relación que existe entre los macrófagos de bovino y las micobacterias es un proceso conservado en el que las micobacterias buscas proliferar y los macrófagos buscan controlar las micobacteria. La piroptosis no es el único mecanismo que se genera por efecto de la respuesta inmune contra las micobacterias en bovinos, ya que existen otros mecanismos descritos como la apoptosis independiente de caspasas y posiblemente otros tipos de necrosis estén participando de control de micobacterias y daño al hospedero de manera simultánea como se ha observado en infecciones ocasionadas por patógenos como SARS COV-2, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* que pueden causar cuadros de inflamación exacerbada donde se observa la coparticipación de diversos tipos de muerte celular como piroptosis, apoptosis y necroptosis que se desencadenan al mismo tiempo en un fenómeno conocido como Panoptosis (Christgen et al., 2020; Karki et al., 2021).



**Imagen 3. Efecto de *M. bovis* y CFE en la inducción de muerte celular relacionada con la muerte celular de macrófagos bovinos.** (modificada de Escobar-Chavarría et al., 2023)

## 8. Perspectivas

En este trabajo se evidenció la capacidad de *M. bovis* y el EFC para inducir piroptosis en macrófagos de bovino, además pudimos evidenciar que la inducción de este tipo de muerte celular controló eficientemente el crecimiento intracelular de las micobacterias, ambos hallazgos son alentadores ya que describen la capacidad de *M. bovis* para inducir piroptosis en células de bovino y el papel que tiene este tipo de muerte al controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis*. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo no permiten evaluar si existe algún otro mecanismo de muerte que genere lesiones de tipo necróticas y que permita el crecimiento intracelular y diseminación de las micobacterias en bovinos, por lo que es importante identificar qué tipo de muerte celular se presenta de manera primordial en las lesiones encontradas en bovinos con tuberculosis. Por otra parte, sería útil estudiar el mecanismo por el cual la piroptosis disminuye tan eficientemente la replicación intracelular de *M. bovis* ya que podría ofrecer una variedad de moléculas candidatas para generar moléculas eficaces para el tratamiento de la tuberculosis.

## 9. Referencias

- Alfonseca-Silva, E., Hernández-Pando, R., Gutiérrez-Pabello, J.A., 2016. *Mycobacterium bovis*-infected macrophages from resistant and susceptible cattle exhibited a differential pro-inflammatory gene expression profile depending on strain virulence. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 176, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.015>
- Beckwith, K.S., Beckwith, M.S., Ullmann, S., Sætra, R.S., Kim, H., Marstad, A., Åsberg, S.E., Strand, T.A., Haug, M., Niederweis, M., Stenmark, H.A., Flo, T.H., 2020. Plasma membrane damage causes NLRP3 activation and pyroptosis during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nat. Commun.* 11, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16143-6>
- Behar, S.M., Divangahi, M., Remold, H.G., 2010. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 668–674. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2387>
- Behar, S.M., Martin, C.J., Booty, M.G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H.-X., Divangahi, M., Remold, H.G., 2011. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* 4, 279–87. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.3>
- Benítez-Guzmán, A., Arriaga-Pizano, L., Morán, J., Gutiérrez-Pabello, J.A., 2018. Endonuclease G takes part in AIF-mediated caspase-independent apoptosis in *Mycobacterium bovis*-infected bovine macrophages. *Vet Res* 49, 69. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0567-1>
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., Cookson, B.T., 2009. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
- Bobadilla-del Valle, M., Torres-González, P., Cervera-Hernández, M.E., Martínez-Gamboa, A., Crabtree-Ramirez, B., Chávez-Mazari, B., Ortiz-Conchi, N., Rodríguez-Cruz, L., Cervantes-Sánchez, A., Gudiño-Enríquez, T., Cinta-Severo, C., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de León, A., 2015. Trends of *Mycobacterium bovis* Isolation and First-Line Anti-tuberculosis Drug Susceptibility Profile: A Fifteen-Year Laboratory-Based Surveillance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0004124. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004124>
- Bourigault, M.-L., Segueni, N., ephanie Rose, S., Court, N., Vacher, R., Vasseur, V., Erard, F., Le Bert, M., Garcia, I., Iwakura, Y., Jacobs, M., Ryffel, B., J Quesniaux, V.F., Valerie J Quesniaux, C.F., 2013. Relative contribution of IL-1a, IL-1b and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG. *Immunity, Inflamm. Dis.* 1, 47–62. <https://doi.org/10.1002/iid3.9>



- Briken, V., Ahlbrand, S.E., Shah, S., 2013. *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell inflammasome: a complex relationship. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00062>
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., 2001. Signaling Signaling Molecules in Toll-Like Receptor 2 Toll-Interacting Protein and IL-1 Receptor of Outer Surface Protein A Lipoprotein: Role *Borrelia burgdorferi* Tuberculosis Factor and for Cellular Activation by Soluble Cooperation of Toll-Like Receptor. *J. Immunol.* 987–994. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.987>
- Butler, R.E., Brodin, P., Jang, J., Jang, M.-S., Robertson, B.D., Gicquel, B., Stewart, G.R., 2012. The Balance of apoptotic and necrotic cell death in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages is not dependent on bacterial virulence. *PLoS One* 7, e47573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047573>
- Butler, R.E., Krishnan, N., Garcia-Jimenez, W., Francis, R., Martyn, A., Mendum, T., Felemban, S., Locker, N., Salguero, F.J., Robertson, B., Stewart, G.R., 2017. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*-infected host cells to phospho-MLKL driven necroptosis is dependent on cell type and presence of TNF $\alpha$ . *Virulence* 8. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1377881>
- Campbell, G.A., Adams, L., 1992. The long-term culture of bovine monocytederived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 34, 291–305.
- Carrisoza-Urbina, J., Morales-Salinas, E., Bedolla-Alva, M.A., Hernández-Pando, R., Gutiérrez-Pabello, J.A., 2019. Atypical granuloma formation in *Mycobacterium bovis*-infected calves. *PLoS One* 14, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218547>
- Chen, M., Gan, H., Remold, H.G., 2006. A Mechanism of virulence: Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J. Immunol.* 176, 3707–3716. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3707>
- Christgen, S., Zheng, M., Kesavardhana, S., Karki, R., Malireddi, R.K.S., Banoth, B., Place, D.E., Briard, B., Sharma, B.R., Tuladhar, S., Samir, P., Burton, A., Kanneganti, T.D., 2020. Identification of the PANoptosome: A Molecular Platform Triggering Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 237. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00237/BIBTEX>
- Compan, V., Baroja-Mazo, A., López-Castejón, G., Gomez, A.I., Martínez, C.M., Angosto, D., Montero, M.T., Herranz, A.S., Bazán, E., Reimers, D., Mulero, V., Pelegrín, P., 2012. Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* 37, 487–500. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2012.06.013>

- Dallenga, T., Repnik, U., Corleis, B., Eich, J., Reimer, R., Griffiths, G.W., Schaible, U.E., 2017. *M. tuberculosis*-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. *Cell Host Microbe* 22, 519-530.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2017.09.003>
- Danelishvili, L., Everman, J., Luiz, and, Bermudez, E., Bermudez, L.E., 2016. *Mycobacterium tuberculosis* PPE68 and Rv2626c genes contribute to the host cell necrosis and bacterial escape from macrophages. *Virulence*. 7(1): 23–32. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1102832>
- Danilchanka, O., Sun, J., Pavlenok, M., Maueröder, C., Speer, A., Siroy, A., Marrero, J., Trujillo, C., Mayhew, D.L., Doornbos, K.S., Muñoz, L.E., Herrmann, M., Ehrt, S., Berens, C., Niederweis, M., 2014. An outer membrane channel protein of *Mycobacterium tuberculosis* with exotoxin activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6750. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1400136111>
- Dinarello, C.A., 1988. Biology of interleukin 1. *FASEB J.* 2, 108–15.
- Dorhoi, A., Nouailles, G., Jörg, S., Hagens, K., Heinemann, E., Pradl, L., Oberbeck-Müller, D., Duque-Correa, M.A., Reece, S.T., Ruland, J., Brosch, R., Tschopp, J., Gross, O., Kaufmann, S.H.E., 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* 42, 374–384. <https://doi.org/10.1002/eji.201141548>
- Ehlers, S., and Schaible, U.E., 2012. The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host–Pathogen Collusion. *Front. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00411>
- Escobar-Chavarría, O., Benitez-Guzman, A., Jiménez-Vázquez, I., Carrisoza-Urbina, J., Arriaga-Pizano, L., Huerta-Yépez, S., Baay-Guzmán, G., Gutiérrez-Pabello, J.A., 2023. Necrotic Cell Death and Inflammasome NLRP3 Activity in *Mycobacterium bovis*-Infected Bovine Macrophages. *Cells* 2023, Vol. 12, Page 2079 12, 2079. <https://doi.org/10.3390/CELLS12162079>
- Esquivel-Solís, H., Vallecillo, A.J., Benítez-Guzmán, A., Adams, L.G., López-Vidal, Y., Gutiérrez-Pabello, J.A., 2013. Nitric Oxide Not Apoptosis Mediates Differential Killing of *Mycobacterium bovis* in Bovine Macrophages. *PLoS One* 8, e63464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063464>
- Feng, S., Hong, Z., Zhang, G., Li, J., Tian, G.-B., Zhou, H., Huang, X., 2021. *Mycobacterium* PPE31 Contributes to Host Cell Death. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 0, 290. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.629836>
- Fratazzi, C., Arbeit, R.D., Carini, C., Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H., Remold, H.G., 1999. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J. Leukoc. Biol.* 66, 763–764. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.763>

- Gormley, E., Corner, L.A.L., 2018. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* Infection: The Badger model as a paradigm for understanding tuberculosis in animals. *Front. Vet. Sci.* <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00247>
- Guirado, E., Schlesinger, L.S., 2013. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* Granuloma – the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00098>
- Guo, H., Callaway, J.B., P-Y Ting, J., 2016. Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nat. Med.* 21, 677–687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>
- Gutiérrez-Pabello, J.A., McMurray, D.N., Adams, L.G., 2002. Upregulation of Thymosin-10 by *Mycobacterium bovis* Infection of Bovine Macrophages Is Associated with Apoptosis. *Infect. Immun.* 70, 2121–2127. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.2121-2127.2002>
- Jimenez Vazquez, I.N., Espitia Pinzon, C., Negrete Abascal, E., Benítez Guzmán, A., Morán, J., Gutierrez Pabello, J.Á., 2023. Proteínas del filtrado del cultivo de *Mycobacterium bovis* promueven apoptosis independientemente de la activación de las caspasas en macrófagos bovinos. *Vet. México OA* 10. <https://doi.org/10.22201/FMVZ.24486760E.2023.1195>
- Karki, R., Sharma, B.R., Tuladhar, S., Williams, E.P., Zalduondo, L., Samir, P., Zheng, M., Sundaram, B., Banoth, B., Malireddi, R.K.S., Schreiner, P., Neale, G., Vogel, P., Webby, R., Jonsson, C.B., Kanneganti, T.D., 2021. Synergism of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in sars-cov-2 infection and cytokine shock syndromes. *cell* 184, 149-168.e17. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.11.025>
- Keane, J., Remold, H.G., Kornfeld, H., 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol Ref.* 164, 2016–2020. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2016>
- Kleinnijenhuis, J., Joosten, L.A.B., Van De Veerdonk, F.L., Savage, N., Van Crevel, R., Kullberg, B.J., Van Der Ven, A., Ottenhoff, T.H.M., Dinarello, C.A., Van Der Meer, J.W.M., Netea, M.G., 2009. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 $\beta$  production by *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 39, 1914–1922. <https://doi.org/10.1002/eji.200839115>
- Krishnan, N., Robertson, B.D., Thwaites, G., 2013. Pathways of IL-1 $\beta$  secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Tuberculosis* 93, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.05.002>
- Latz, E., Xiao, T.S., Stutz, A., 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 397–411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>
- Lerner, T.R., Borel, S., Greenwood, D.J., Repnik, U., Russell, M.R.G., Herbst, S.,

- Jones, M.L., Collinson, L.M., Griffiths, G., Gutierrez, M.G., 2017. *Mycobacterium tuberculosis* replicates within necrotic human macrophages. *J. Cell Biol.* 216, 583–594. <https://doi.org/10.1083/JCB.201603040/VIDEO-2>
- Macedo, A.A., Costa, E.A., Silva, A.P.C., Paixão, T.A., Santos, R.L., 2013. Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle (*Bos taurus taurus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.001>
- Maciel Rivera, A., Flores Villalva, S., Jiménez Vázquez, I., Catalan Bárcenas, O., Espitia Pinzón, C., Moran, J., Arriaga-Pizano, L., Benítez Guzmán, A., Alfonseca Silva, E., Ángel Gutiérrez-Pabello, J., 2019. *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* derived proteins induce caspase-independent apoptosis in bovine macrophages. *Vet. Mex.* 6. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2019.1.560>
- Mahamed, D., Boulle, M., Ganga, Y., Mc Arthur, C., Skroch, S., Oom, L., Catinas, O., Pillay, K., Naicker, M., Rampersad, S., Mathonsi, C., Hunter, J., Wong, E.B., Suleman, M., Sreejit, G., Pym, A.S., Lustig, G., Sigal, A., 2017. Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *Elife* 6, e22028. <https://doi.org/10.7554/eLife.22028.001>
- Martin, C.J., Booty, M.G., Rosebrock, T.R., Udio Nunes-Alves, C., Desjardins, D.M., Keren, I., Fortune, S.M., Remold, H.G., Behar, S.M., 2012. Efferocytosis Is an Innate Antibacterial Mechanism. *Cell Host Microbe* 12, 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.010>
- Master, S.S., Davis, A.S., Rampini, S.K., Keller, C., Ehlers, S., Springer, B., Sander, P., Deretic, V., 2008. *Mycobacterium tuberculosis* Prevents Inflammasome Activation. *Cell Host Microbe* 17, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.003>
- Menzies, F.D., Neill, S.D., 2000. Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. *Vet. J.* 160, 92–106. <https://doi.org/10.1053/TVJL.2000.0482>
- Miao, E.A., Rajan, J. V., Aderem, A., 2011. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* 243, 206–214. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x>
- Molloy, A., Laochumroonvorapong, P., Kaplan, G., 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guérin. *J. Exp. Med.* 180, 1499–509. <https://doi.org/10.1084/JEM.180.4.1499>
- Motani, K., Kushiyama, H., Imamura, R., Kinoshita, T., Nishiuchi, T., Suda, T., 2011. Caspase-1 Protein Induces Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing

- a Caspase Recruitment Domain (ASC)- mediated Necrosis Independently of Its Catalytic Activity. *J. Biol. Chem.* 286, 33963–33972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286823>
- Pan, H., Yan, B.-S., Rojas, M., Shebzukhov, Y. V., Zhou, H., Kobzik, L., Higgins, D.E., Daly, M.J., Bloom, B.R., Kramnik, I., 2005. *lpr1* gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature* 434, 767–772. <https://doi.org/10.1038/nature03419>
- Pérez-Morote, R., Pontones-Rosa, C., Gortázar-Schmidt, C., Muñoz-Cardona, Á.I., 2020. Quantifying the Economic Impact of Bovine Tuberculosis on Livestock Farms in South-Western Spain. *Anim. an Open Access J. from MDPI* 10, 1–25. <https://doi.org/10.3390/ANI10122433>
- Petr Broz, Vishva M. Dixit, 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev.* 16, 406–420.
- Pollock, J.M., Rodgers, J.D., Welsh, M.D., McNair, J., 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection, in: *Veterinary Microbiology*. Elsevier, pp. 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.032>
- Qu, Z., Zhou, J., Zhou, Y., Xie, Y., Jiang, Y., Wu, J., Luo, Z., Liu, G., Yin, L., Zhang, X.L., 2020. Mycobacterial EST12 activates a RACK1–NLRP3–gasdermin D pyroptosis–IL-1 $\beta$  immune pathway. *Sci. Adv.* 6, 4733–4756. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABA4733>
- SAGARPA/SENASICA, 2015. Guía para el seguimiento epidemiológico de la tuberculosis bovina 4ª versión revisión: enero de 2016 publicación: julio de 2015.
- Salguero, F.J., 2018. Bovine Tuberculosis, in: Chambers, M., Gordon, S., Olea-Popelka, F., Barrow, P. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. London, UK., p. 959. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4586.959-c>
- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C.J., Müller, D.J., Broz, P., Hiller, S., 2016. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* 35, 1766–1778. <https://doi.org/10.15252/emj.201694696>
- Torres-González, P., Cervera-Hernandez, M.E., Martinez-Gamboa, A., Garcia-Garcia, L., Cruz-Hervert, L.P., Bobadilla-Del Valle, M., Ponce-De Leon, A., Sifuentes-Osornio, J., 2016. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: a retrospective comparison with *Mycobacterium tuberculosis* in a Mexican tertiary care centre, 2000-2015. *BMC Infect. Dis.* 16:657. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2001-5>
- Tundup, S., Mohareer, K., Hasnain, S.E., 2014. *Mycobacterium tuberculosis*

- PE25/PPE41 protein complex induces necrosis in macrophages: Role in virulence and disease reactivation? *FEBS Open Bio* 4, 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.09.001>
- Unter, G., Ulrich, W., Schaible, E., Unter Weiss, G., Schaible, U.E., Weiss, G., 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 264, 182–203.
- Vega-Manriquez, X., López-Vidal, Y., Moran, J., Adams, L.G., Gutiérrez-Pabello, J.A., 2007. Apoptosis-Inducing factor participation in bovine macrophage *Mycobacterium bovis*-Induced caspase-independent cell death. *Infect. Immun.* 75, 1223–1228. <https://doi.org/10.1128/IAI.01047-06>
- Volkman, H.E., Pozos, T.C., Zheng, J., Davis, J.M., Rawls, J.F., Ramakrishnan, L., 2010. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science.* 327, 466–469. <https://doi.org/10.1126/science.1179663>
- Wangoo, A., Johnson, L., Gough, J., Ackbar, R., Inglut, S., Hicks, D., Spencer, Y., Hewinson, G., Vordermeier, M., 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen,  $\gamma\delta$  (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *J. Comp. Pathol.* 133, 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.001>
- Waters, W.R., Palmer, M. V, Buddle, B.M., Martin Vordermeier, H., 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* 30, 2611–2622. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.018>
- Wawrocki, S., Druszczynska, M., 2017. Review Article Inflammasomes in *Mycobacterium tuberculosis*-Driven Immunity. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2017, 9. <https://doi.org/10.1155/2017/2309478>
- Welin, A., Eklund, D., Stendahl, O., Lerm, M., 2011. Human Macrophages Infected with a High Burden of ESAT-6-Expressing *M. tuberculosis* Undergo Caspase-1- and Cathepsin B-Independent Necrosis. *PLoS One* 6, e20302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020302>
- Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., Tang, D., 2016. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ.* 23, 369–379. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>
- Yang, Y., Zhou, X., Kouadir, M., Shi, F., Ding, T., Liu, C., Liu, J., Wang, M., Yang, L., Yin, X., Zhao, D., 2013. The AIM2 Inflammasome Is Involved in Macrophage Activation During Infection With Virulent *Mycobacterium bovis* Strain. *J. Infect. Dis.* 208, 1849–1858. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit347>
- Zheng, D., Liwinski, T., Elinav, E., 2020. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* 2020 61 6,

1–22. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x>

Zhou, Y., Zahid, S., Shah, A., Yang, L., Zhang, Z., Zhou, X., Zhao, D., 2016. Virulent *Mycobacterium bovis* Beijing Strain Activates the NLRP7 Inflammasome in THP-1 Macrophages. *PLoS One* 114, e0152853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152853>

Zhou, Y., Zhao, D., Yue, R., Khan, S.H., Shah, S.Z.A., Yin, X., Yang, L., Zhang, Z., Zhou, X., 2015. Inflammasomes-dependent regulation of IL-1 $\beta$  secretion induced by the virulent *Mycobacterium bovis* Beijing strain in THP-1 macrophages. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 108, 163–171. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0475-6>

Zinsstag, J., Schelling, E., Roth, F., Kazwala, R., 2006. Economics of Bovine Tuberculosis, in: *Mycobacterium Bovis Infection in Animals and Humans*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 68–83. <https://doi.org/10.1002/9780470344538.ch9>