

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR INDEPENDIENTE DE
CASPASAS POR *Mycobacterium bovis*

DOCTOR EN CIENCIAS

DELIA XOCHIL VEGA MANRIQUEZ

JOSÉ ANGEL GUTIÉRREZ PABELLO

YOLANDA LÓPEZ VIDAL

IRIS ESTRADA GARCÍA

MÉXICO, D. F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A DIOS CREADOR DEL UNIVERSO DEL LIBRE ALBEDRÍO

A MI MADRE

A MIS PADRES: ANTONIO

 JAIME

A MI FAMILIA ESPÍRITUAL

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL POR SER UNO DE LOS PILARES EN MI FORMACIÓN ACADÉMICA.

AL DR. JOSÉ ÁNGEL GUTIÉRREZ PABELLO POR SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ POR SER MI PADRE ACADÉMICO Y ENSEÑARME QUE, LA CIENCIA ES EL LENGUAJE MÁS EXQUISITO QUE EL CREADOR UTILIZA PARA HABLARNOS Y POR LO TANTO NO CABE EN ELLA LA SOBERBIA, EL EGOISMO Y LA CARENCIA DE ÉTICA.

A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS BOVINA: SILVIA, ELIHÚ, ALEJANDRO E IRASEMA, POR SU SOLIDARIDAD Y AMISTAD.

A LOS MIEMBROS DEL PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR MICROBIANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM, POR SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO.

A LOS MIEMBROS DEL LABORATORIO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNAM, PRINCIPALMENTE AL DR. JULIO MORÁN ANDRADE.

A LOS MIEMBROS DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGÍA E INFECTOLOGÍA DEL CMN LA RAZA IMSS. DE MANERA IMPORTANTE EXTIENDO EL AGRADECIMIENTO A LA DRA. SARA HUERTA YEPES POR EL APOYO QUE BRINDÓ AL PROYECTO.

Algunas ideas son mejores que otras. El mecanismo para distinguirlas
es una herramienta esencial para tratar con el mundo
y especialmente para tratar con el futuro.
Y es precisamente la mezcla de estas dos maneras
de pensar el motivo central del éxito de la ciencia.

Carl Sagan

INDICE

	Pagina
RESUMEN	II
SUMMARY	III
ABREVIACIONES	V
DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTOS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
<i>M. bovis</i> y su relación con la tuberculosis humana	1
Tuberculosis bovina	2
Transmisión de TB bovina	2
Epidemiología de la TB bovina	3
Características microscópicas	3
Factores de persistencia	4
Muerte celular programada	5
Muerte celular independiente de caspasas	7
Mitocondria y su participación en la MCIC	8
Factor de inducción de apoptosis	9
Antecedentes	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	36
REACTIVOS	37
BIBLIOGRAFÍA	39

ABREVIACIONES

AIF	Factor de inducción de apoptosis
AIPs	Inhibidores de la apoptosis
Apaf-1	Factor de activación de apoptosis
Caspasas	Cisteín-aspartato proteinasas
CRPMI	Complete-Roswell Park Memorial Institute 1690
DiOC6	Yoduro de dihexiloxacarbocianina
DD	Dominio de muerte
DTT	DL-ditrioteitol
EEA1	Antígeno endosomal temprano 1
ELB	Extracto libre de bacterias
EndoG	Endonucleasa G
Fc	Fracción constante de las inmunoglobulinas
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FS	Fosfatidil serina
HBSS	Solución de sales balanceadas de Hanks
HTRA2/OMI	Proteína A2 requerida en temperatura alta
MØ	Macrófago
MCIC	Muerte celular independiente de apoptosis
MCP	Muerte celular programada
MIF	Intensidad de fluorescencia
MM	Masa molecular
MOI	Multiplicidad de Infección
LAM	Lipoarabinomanana
PMEM	Permeabilidad de la membrana externa de mitocondria
RNI	Intermediários de nitrógeno reactivo
SDS-PAGE	Geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS
2D-PAGE	SDS-PAGE de dos dimensiones
TACO	Proteína de cubrimiento con aspartato y triptofano
TB	Tuberculosis

TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	Marcaje en el extreme 3' de fragmentos de DNA
UFC	Unidades formadoras de colonia
z-VAD.fmk	Inhibidor general de caspasas

REACTIVOS

Cultivo celular

PBS 10X

Cloruro de sodio	21.92 g
Fosfato de sodio monobásico	0.375 g
Fosfato de sodio dibásico	3.25 g
Agua destilada cbp	250 ml

PBS-Citrato

PBS 10X	50 ml
Ácido cítrico trisódico	1.86 g
Agua destilada cbp	500 ml

NaCl 0.15 M y NaH₂PO₄ 0.01M

Cloruro de sodio	8.77 g
Fosfato de sodio monobásico	1.2 g
Agua destilada cbp	100 ml

Percoll

Percoll	10 partes
NaCl 0.15 M y NaH ₂ PO ₄ 0.01M	1 parte

CRPMI

Medio RPMI	500 ml
L-glutamina	5.5 ml
MEM- aminoácidos no esenciales	5.5 ml
Piruvato de sodio	5.5 ml
Bicarbonato de sodio	5.5 ml

Bicarbonato de sodio al 7.5%

NaHCO ₃	7.5 gr
Agua destilada cbp	100ml

Cultivo de bacterias

Medio 7H11

Agar 7H11	21 g
Agua destilada	900 ml
Esterilizar 10 min a 110 C	
OADC	100 ml

Medio 7H9

Agar 7H9	4.7 g
Tween 80	2.5 ml
Agua destilada	900 ml
Esterilizar 10 min a 110 C	
OADC	100 ml

Soluciones para SDS-PAGE

Acrilamida/bis

Acrilamida	29.2 g
Bis-acrilamida	2.4 g
Agua destilada cbp	100 ml

Tris-HCl 1.5 M pH8.8

Tris base	18.15 g
Agua destilada cbp	100 ml

Resumen

Las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* sobreviven y se replican dentro del fagosoma del macrófago. En esta interacción, el proceso de muerte celular programada se ha señalado como uno de los posibles desenlaces que puede contribuir a las defensas del hospedero. Se ha demostrado en estudios anteriores que la apoptosis es el resultado de la infección de *Mycobacterium bovis*. En el presente trabajo se exploró la participación de elementos efectores de muerte celular programada, en macrófagos infectados o bien en respuesta a un extracto de *M. bovis* libre de bacterias. Se evaluaron los cambios estructurales compatibles con muerte celular programada como es la condensación de cromatina, la cuál se incremento 3 veces en las células tratadas con el extracto de *M. bovis* libre de bacterias. Por otra parte, los ensayos de TUNEL demostraron que tanto *M. bovis* como el extracto de *M. bovis* libre de bacterias fueron capaces de inducir fragmentación, en comparación con el control basal de células. El porcentaje de fragmentación no se afecto al tratar a los macrófagos con el inhibidor general de caspasas. Igualmente se observó que en los macrófagos incubados con 100 µg del extracto de *M. bovis* libre de bacterias durante 12 h se incrementó 5 veces la pérdida del potencial de la membrana externa de mitocondria en comparación con células no tratadas. Por otra parte, no se detectó la actividad de caspasa 3, 8 y 9 en la infección con *M. bovis* o en la incubación con el extracto de *M. bovis* libre de bacterias, pero si se observó la translocación del factor de inducción de apoptosis al núcleo en macrófagos infectados o tratados con el extracto de *M. bovis* libre de bacterias. La incubación de macrófagos con el inhibidor general de caspasa previó a la infección no afectó el porcentaje de células que presentaron translocación del factor de inducción de apoptosis. Los resultados sugieren que *M. bovis* induce muerte celular programada en macrófagos de bovino independiente de caspasas con la participación del factor de inducción de apoptosis.

Este proyecto fue financiado por Texas A&M-CONACyT 3-051002 y PAPIIT IN237002-3.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; así como en el Programa de Microbiología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina de la UNAM.

SUMMARY

Mycobacterium tuberculosis complex species survive and replicate inside macrophage's phagosome. The programmed cell death (PCD) process has been highlighted as one of the probable outcomes during the host pathogen interaction. Also, has been suggested that forms part of the innate immunity. Previous studies demonstrated apoptosis as a consequence of *Mycobacterium bovis* infection. In this study, the role of macrophage apoptotic effector elements during *M. bovis*-induced cell death or in response to a *M. bovis* cell-free extract was explored. Structural changes compatibles with PCD were evaluated; chromatin condensation was increased 3 times by cell-free extract. On the other hand, TUNEL assay demonstrated that both *M. bovis* and CFE induction were capable of inducing DNA fragmentation. Macrophage DNA fragmentation rates were not affected by the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK. Macrophages treated with 100 µg of cell-free extract during 12 h had a 5-fold decrease in mitochondrial outer membrane permeabilization as compare to non-treated cells. Neither *M. bovis* infection nor cell-free extract treatment induced activation of caspases 3, 8 or 9, but translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) into the nucleus. Incubation of macrophages with Z-VAD-FMK prior to infection did not affect cell percentage of AIF translocation into nucleus. These data suggest that bovine macrophage *M. bovis*-induced programmed cell death is caspase-independent and with AIF participation.

This project was supported by grants 3-051002-7 from the Texas A&M-CONACYT Collaborative Research Grant Program, and PAPIIT IN-237002 from the Universidad Nacional Autónoma de México.

This project was done in the Departamento de Microbiología e inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, and in the Programa de Microbiología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina de la UNAM.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una de las principales causas de muerte en el humano, existen datos que reportan que entre la mitad y la tercera parte de la población mundial puede estar infectada. Se calcula que cada año mueren 2 millones de personas en el mundo y se estima que en el 2004 hubo 8.9 millones de casos nuevos de tuberculosis pulmonar, de los cuales sólo el 10% van a desarrollar la enfermedad activa.^{29,104}

Los agentes causales de la tuberculosis en animales y en el hombre forman el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium caprae*.³ Las especies de este complejo comparten entre ellas 99.9% de similitud en la secuencia de DNA y en la subunidad 16s ribosomal.^{88, 13}

M. bovis Y SU RELACIÓN CON LA TUBERCULOSIS HUMANA

La especie responsable de los casos nuevos de tuberculosis en humanos es *M. tuberculosis*, aunque cabe mencionar que a nivel clínico, radiológico y patológico no se puede distinguir de *M. bovis*.¹⁰² Existen reportes donde se considera que *M. bovis* puede ocasionar la enfermedad en humanos aunque principalmente infecta a animales.⁶⁸ Unos de estos estudios es el realizado en el estado de California en Estados Unidos, donde se observó una relación en el aumento de la tuberculosis infantil con el aumento de la población de emigrantes; en ese mismo estudio se encontró que 87 niños fueron positivos al cultivo del complejo tuberculosis, de los cuales 16% fueron positivos a *M. bovis*.⁴⁷ Se estima que en Estados Unidos el 0.1% de los casos de tuberculosis en humanos son ocasionados por *M. bovis*, y el porcentaje aumenta al 10% en América Latina.²³ En México se calcula que por lo menos el 8% de los casos de tuberculosis humana pueden ser atribuidos a *M. bovis*.⁵

La presentación de la enfermedad en humanos se asocia a factores de riesgo como son coinfección con HIV (virus de inmunodeficiencia humana), fondo genético, grado de vacunación, nivel socioeconómico y exposición por profesión. Se considera que las vías de transmisión son: la oral al consumir productos contaminados, principalmente lácteos no pasteurizados, y la vía aérea en la cual la transmisión se da por el contacto estrecho entre el ganado y el personal que lo atiende, incluyendo al médico veterinario.⁹

TUBERCULOSIS BOVINA

La tuberculosis (TB) bovina es una enfermedad infecciosa, de curso crónico, que estimula la formación de una lesión característica llamada granuloma;⁷⁷ el agente etiológico es *M. bovis* y se considera a los rumiantes reservorio de este microorganismo junto con otras especies silvestres.⁹

La importancia de la TB bovina radica en las pérdidas económicas que origina y a la reducción de la eficiencia productiva de los animales. Además de ser considerada una zoonosis importante, causa pérdidas por el sacrificio de animales infectados y por ser una barrera para la exportación de ganado en pie y sus productos.⁹

TRANSMISIÓN DE TB BOVINA

La TB bovina se transmite a otras especies animales domésticas como son porcinos, ovinos, caprinos, equinos, canídeos, felinos y animales silvestres.⁹ Después de ser expulsado *M. bovis* en las descargas nasales y orales de animales infectados, los bacilos son capaces de sobrevivir en el medio ambiente por periodos de tiempo largos, por lo que la ruta respiratoria se considera la principal vía de transmisión al inhalar partículas contaminadas por el ganado, lo que genera lesiones limitadas a cavidad torácica, principalmente en tracto respiratorio alto y bajo, donde los linfonódulos van a estar involucrados.⁶⁵ También la transmisión puede ser por vía oral, cuando el animal ingiere pastura o agua

contaminados; esta ruta de infección generalmente produce lesiones mesentéricas.⁶⁵ La transmisión congénita y la vertical no son frecuentes en las regiones donde se llevan a cabo programas intensivos de erradicación.⁹

EPIDEMIOLOGÍA DE LA TB BOVINA

La prevalencia de la TB bovina en el mundo es muy variada y está relacionada con las campañas de control en cada país. Existen regiones en África y Asia donde un alto porcentaje del ganado vive donde no existe control de TB bovina, y se reportan casos de 85% y 94% de incidencia, respectivamente. En América Latina la prevalencia es de 24%.²³ En México se estima una prevalencia de TB bovina de 0.1% en el ganado de carne y de 2.1% en el ganado de leche, sin embargo, en las zonas centro y sur del país éstos valores aumentan, ya que se han encontrado establos lecheros con una prevalencia mayor a 25%; debido a la importancia de la enfermedad, en 1991 se implementó la Campaña Nacional para el Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en México.⁷²

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

M. bovis es una bacteria en forma de bacilo, ácido alcohol resistente, que mide 0.2 a 0.6 μm de ancho y 1 a 10 μm de largo. No forma esporas, ni cápsulas; es inmóvil y presenta un crecimiento en forma de filamento. Su pared celular se compone en un 50% a 60% de lípidos, entre los que están los ácidos micólicos, las ceras, los triglicéridos y los sulfolípidos; otro componente importante de la pared celular es el lipoarabinomanana (LAM);¹⁷ debido a esta composición, *M. bovis* puede resistir la desecación, las defensas del sistema inmune del hospedero, así como la acción de antifímicos, todos estos factores contribuyen de manera importante para la persistencia del microorganismo en el hospedero, ya que la pared celular se liga a la adaptación de la vida intracelular.⁸⁴

FACTORES DE PERSISTENCIA INTRACELULAR

Las micobacterias utilizan diferentes mecanismos para permanecer dentro del macrófago (Mø), su principal célula hospedera.³¹ En su superficie, la bacteria presenta múltiples moléculas que se van a unir a los receptores de manosa, complemento y a la fracción constante de las inmunoglobulinas (Fc), entre otros.³¹ Una vez dentro del Mø, la micobacteria utiliza diversos mecanismos para inhibir la fusión del fagosoma con el lisosoma, uno de ellos es cuando secuestra Rab5, el cual es un regulador de la fusión lisosomal, y a su vez se considera un marcador de fagosoma temprano y excluye a Rab7 que se asocia a fagosoma tardío, con lo cual modifica el camino endocítico e impide la maduración del fagosoma y de esta manera puede sobrevivir dentro del Mø.⁹⁷ Otro mecanismo que se asocia con las alteraciones en la maduración del fagosoma es la exclusión de la ATPasa vacuolar, lo que lleva a una ausencia de acidificación dentro del fagosoma;⁹⁰ así mismo la micobacteria puede inducir la retención de la proteína de cubrimiento que contiene aspartato y triptofano (TACO, por sus siglas en inglés), el cual confiere protección a las micobacterias virulentas contra la lisis de la vacuola, ya que no se observa su retención en vacuolas que contienen *M. bovis* BCG o perlas de látex, y estas vesículas llevan a término el camino endocítico, que culmina en la destrucción del contenido del fagosoma.³⁴ A estos mecanismos se asocia la acción del componente bacteriano LAM, ya que se conoce su participación en el arresto de la maduración de vacuolas fagosomales con micobacterias patógenas. Así mismo, el bloqueo en la maduración del fagosoma se relaciona con la disminución de la actividad de hVPS34 (fosfatidil-inositol 3(OH) cinasa (PI-3K)), lo que permite la inhibición del reclutamiento de antígeno 1 endosomal temprano (EEA1) en las vacuolas, impidiendo así la unión fagosoma-lisosoma en Mø.⁸⁷

Otro mecanismo empleado por estas bacterias para permanecer en el Mø es la resistencia a la acción de intermediarios de nitrógeno reactivo (RNI). Se sugiere que el bacilo posee mecanismos de inhibición de RNI, como son los productos de los genes *noxR1* y *noxR3*, aunque la vía por la cual se lleva a cabo esta acción no

está completamente descrita.^{30,83} Otro gene involucrado en la persistencia bacteriana en el modelo murino es *aceA*, el cual codifica para la enzima isocitrato liasa, que forma parte del ciclo del glioxilato utilizado por ciertos microorganismos para aprovechar los ácidos grasos que se encuentran en las células eucariotas, y de esta manera permanecer por periodos largos de latencia.⁶⁶

Las micobacterias patógenas son capaces de sobrevivir y replicarse dentro del Mø, por lo cual se postula que la modulación del mecanismo de apoptosis puede contribuir a la persistencia de la bacteria dentro de la célula. Lo anterior se observó en un estudio donde el porcentaje de apoptosis en Mø alveolares de humanos infectados con la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* fue menor al de los infectados con una cepa avirulenta.⁴⁵ Así mismo, se considera a la apoptosis como posible mecanismo involucrado en la inmunidad innata del hospedero, se ha reportado que *M. avium* serovariedad 4, induce apoptosis en Mø y dicho evento previene la diseminación de la enfermedad al secuestrar a la micobacteria en cuerpos apoptóticos, y al ser fagocitados contribuyen a la activación de Mø no infectados, los que van a destruir al patógeno.³⁵ Los resultados de estos primeros estudios, demostraron el papel relevante de las bacterias del género *Mycobacterium* en la inducción de apoptosis en las células del hospedero, y permiten vislumbrar la muerte celular programada como un posible mecanismo inespecífico de defensa cuyo objetivo es contrarrestar la infección.

MUERTE CELULAR PROGRAMADA

El proceso de muerte celular programada (MCP) es importante para el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares, ya que permite mantener el equilibrio entre la vida y la muerte.²⁰ El mecanismo de MCP cumple una función fisiológica básica durante el desarrollo embrionario, durante el crecimiento y para el mantenimiento de la homeostasis. Las células defectuosas, los linfocitos autorreactivos y las células con un potente mecanismo destructivo, como los

neutrófilos, son eliminados mediante este proceso.¹⁰³ Los desordenes en la MCP conducen a eventos patológicos primarios capaces de desencadenar padecimientos como el cáncer,⁴¹ enfermedades autoinmunes, degenerativas, infertilidad, inmunodeficiencias y problemas de embriogénesis.^{60,38}

La apoptosis es considerada un tipo de MCP, este proceso se lleva a cabo por la activación de cisteín-aspartato proteinasas (caspasas), proteínas que son dependientes de cisteína y cortan directamente sobre aspartato. Este proceso se puede inducir a través de dos vías principales, la extrínseca y la intrínseca. La vía extrínseca es dependiente de receptores como Fas o de la superfamilia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).⁶ Estos receptores presentan en su porción citoplasmática un dominio de muerte (DD), que permite la interacción con moléculas adaptadoras específicas como FADD o CRADD las cuáles forman un complejo receptor que interactúa con el predominio de las caspasas iniciadoras 2, 8 y 10 y así activan las cascadas de señales intracelulares.⁶⁰ La caspasa 8 a su vez activa a la caspasa 3, que finalmente induce la muerte celular (Figura 1).⁶² Las caspasas iniciadoras se activan por autocatálisis y este proceso continúa en cascada hasta activar a las caspasas efectoras. Las caspasa 3, 6 y 7 son responsables de la hidrólisis de importantes sustratos celulares involucrados en cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis.⁷⁴

La vía intrínseca involucra la participación de miembros de la familia Bcl-2 en la mitocondria. La familia de proteínas Bcl-2 participa en la regulación de la integridad de la membrana externa de la mitocondria y se les considera además reguladores de la apoptosis.^{70,93} Los miembros de esta familia se dividen en inhibidores de apoptosis: Bcl-x_L, Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, A-1, adenovirus E1B, 19X y virus Epstein-Barr BHRF; y en promotores de la apoptosis: Bax, Bak, Bid, Bad, Bcl-x_s, Bok/Mtd, Bik, Bim, Hrk y Blk. Estas proteínas forman homodímeros o heterodímeros entre ellas y de esta forma se activan o inactivan.⁴⁶

La participación de la familia Bcl-2 permite que se altere el potencial de la membrana externa de la mitocondria (PMEM) y que se lleve a cabo la liberación de diversas proteínas almacenadas en el espacio intermembranal, como el citocromo c, Ca^{2+} , el factor de activación de Apoptosis (Apaf-1) y el factor de inducción de apoptosis (AIF), entre otros. El citocromo c interactúa con Apaf-1 en presencia de dATP/ATP. Apaf-1 se une al Card de procaspasa 9 para formar un complejo proteico conocido como apoptosoma, cuya función es activar a caspasa 9, la cual finalmente promueve la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7 (Figura 1).^{57,75} Por otra parte, la proteína Smac/DIABLO, que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria se libera durante la pérdida PMEM, y se une a inhibidores de la apoptosis (AIPs), promoviendo de esta forma la liberación de las caspasas,^{28,96} la fragmentación de ADN y posteriormente la formación de los cuerpos apoptóticos, que son fragmentos celulares que contienen citoplasma y organelos rodeados de membranas funcionales.⁴⁹

Existe una intercomunicación entre estas vías que involucra receptores de muerte, y en la que participa la mitocondria; se da por caspasa 8,^{11,69} la cual a su vez activa a Bid, que junto con Bax se translocan a mitocondria.^{55,32} Una vez dentro de la mitocondria, Bid y Bax sufren un cambio en su estructura que permite la formación de canales tetraméricos lo cuál desencadena la salida de moléculas importantes para la inducción de la MCP.²⁶

MUERTE CELULAR INDEPENDIENTE DE CASPASAS

La muerte celular independiente de caspasas (MCIC) se considera un tipo de MCP con características morfológicas de apoptosis como la condensación de cromatina, fragmentación de ADN, así como la participación de manera importante de la mitocondria; como su nombre lo establece, no tiene una relación con la activación de caspasas (Figura 1).^{2,12,50}

Existen trabajos donde se ha demostrado que la célula puede presentar morfología de apoptosis sin que se dé la activación de las caspasas. En uno de los primeros reportes que ejemplifican este tipo de muerte se observó la inducción de MCP en células Jurkat por medio de BAX sin la intervención de caspasas, ya que el inhibidor de caspasas (z-VAD.fmk) no logró disminuir el efecto letal.⁹⁸ De igual forma, en fibroblastos de embrión de ratón Apaf-/- se detectó la translocación de fosfatidil serina (FS), una proteína considerada marcador de células apoptóticas; en este reporte dicha translocación es asociada a la actividad de proteínas con dominio BH3 como tBID, BIM y BAD sin la detección de caspasas y la muerte no se bloqueó al utilizar zVAD.fmk.¹⁸

Así mismo, se relaciona el desarrollo de la MCIC con la participación de microorganismos y sus componentes. Se reporta que las toxinas de *E. coli* activan la MCP vía señales ERK sin que se observe la participación de caspasas en células de túbulos proximales renales,¹⁹ de esta misma bacteria se reporta que la enterotoxina termolábil induce la vía independiente de caspasas para producir la MCP en células CD8+.⁸⁵ Otra toxina involucrada en MCIC es la listeriolisina O de *Listeria monocitogenes*, la cual induce la translocación de FS y la pérdida del PMEM sin la intervención de las caspasas, ya que al incubar las células T con z-VAD, se bloquea la fragmentación de DNA sin que se logre bloquear los efectos de MCP.¹⁴ La citotoxina H₂O₂ de *Streptococcus pneumoniae* también induce MCIC en células del endotelio microvascular con la translocación de AIF al núcleo, induciendo fragmentación de DNA y desencadenando MCP.⁸

MITOCONDRIA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MCIC

La mitocondria participa de manera importante en la MCIC al perder el PMEM, a este evento se le considera el punto de no retorno de la MCP.⁴⁸ En la pérdida de la PMEM participan las proteínas de la familia Bcl-2 con dominio BH3,²⁵ las cuales actúan como sensores celulares de diferentes eventos como son, estrés, infección, transformación celular, privación de citocinas, ataque por células T o

asesinas naturales, además estas proteínas pueden ser movilizadas por modificaciones post-traduccionales para translocar a mitocondria y participar en la pérdida del PMEM.²⁵ Se sugiere que las proteínas BH3 inician la pérdida del PMEM, porque inducen la oligomerización de Bax y Bak en la membrana externa de la mitocondria, donde estas dos proteínas forman canales a través de los cuales van a salir componentes que se encuentran en el espacio intermembranal de la mitocondria⁴⁹ (Figura 1), una vez en el citoplasma, estas moléculas se translocan al núcleo, ocasionando el daño nuclear que desencadena la MCIC.⁵⁰

A varias de las proteínas que son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria se les atribuye una participación en la MCIC. Una de ellas es la endonucleasa G (EndoG), la cual está involucrada en la regulación de la reparación y síntesis del ADN mitocondrial,²⁴ aún cuando no se observan alteraciones en el genoma mitocondrial en fibroblastos de embrión de ratón *EndoG*^{-/-}.¹⁰⁵ Una vez que la proteína sale de la mitocondria, se transloca al núcleo donde puede degradar el ADN nuclear,⁵⁶ sin embargo, este mecanismo está relacionado directamente con la activación de caspasas.⁴ Otra proteína liberada por la mitocondria es la proteína A2, requerida en temperatura alta (HTRA2/OMI); está reportado que la sobreexpresión de esta proteína induce MCP, la cual no se inhibe al tratar a las células con z-VAD.⁹² Estos reportes sugieren una participación en la MCP, pero cabe mencionar que en ratones *Htra2/Omi*^{-/-} desarrollan susceptibilidad a la muerte celular y desordenes neurodegenerativos letales,⁶³ por lo cual se considera que su función es mantener la fisiología mitocondrial.²⁰ También se induce la liberación al citoplasma del AIF el cual participa activamente en la MCIC⁴⁹ (Figura 1).

FACTOR DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS (AIF)

AIF es una proteína de 67 kDa, presenta un sitio de unión a flavin adenin dinucleótido (FAD) similar a la oxido reductasa bacteriana.⁹¹ En estudios recientes se demuestra la participación de AIF en la fosforilación oxidativa ya que su

disminución reduce la formación y actividad del complejo I de la cadena respiratoria.⁹⁵ Cuando se pierde la PMEM sale del espacio intermembranal de la mitocondria, una vez en el citoplasma va a translocar al núcleo,⁹¹ donde participa en la condensación de cromatina y en la fragmentación del ADN. Aunque no se conoce el mecanismo utilizado para llevar a cabo estos eventos, se sabe que se une al ADN y recluta a proteasas y nucleasas que inducen la condensación de cromatina.⁴³ Este punto se sustenta al observar condensación de cromatina y fragmentación de ADN en núcleos de células HeLa incubados con AIF recombinante;⁹¹ por otra parte, también se reporta la prevención de la translocación de esta proteína al núcleo, y las consecuentes condensación de cromatina y fragmentación de ADN al microinyectar anticuerpos neutralizantes contra AIF.⁹¹

En un inicio se consideró la participación de AIF en el evento de apoptosis, sin embargo existen estudios donde se reporta que después de la translocación de la proteína al núcleo se observan en la célula características apoptóticas como son translocación de FS, condensación de cromatina y condensación parcial del núcleo y en todos estos eventos se presenta una ausencia de la actividad de caspasas^{22,91,100} por lo tanto se considera a la proteína AIF como una molécula que puede tener un papel importante en la MCIC.

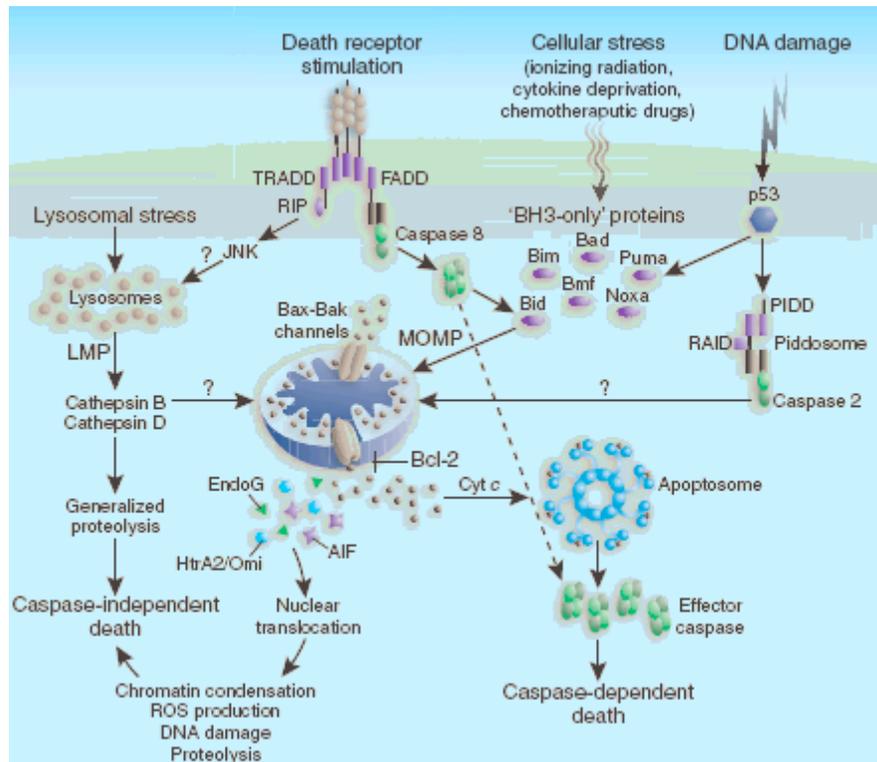


Figura 1. Vías de señalización utilizadas por la célula para llevar a cabo la muerte celular dependiente o independiente de caspasas. Imagen tomada de Kroemer G, Martin SJ. Nature Medicine 2005; 11:725–730.

ANTECEDENTES

Existen evidencias respecto a la inducción de la MCP en el modelo de Mø bovinos. Cuando las células se infectan con una cepa virulenta de *M. bovis*, presentan condensación de cromatina y fragmentación del ADN; dichos eventos son dependientes del tiempo y de la multiplicidad de la infección.³⁹ También se reporta la importancia del fenotipo de resistencia de los Mø de bovino y de la virulencia de *M. bovis* en la inducción de la MCP.³³ Así mismo, existen trabajos enfocados a identificar componentes particulares de la micobacteria que pudieran estar modulando el mecanismo de MCP en los Mø, uno de ellos es el de Hayashi,⁴² que demuestra que el sonicado de *M. avium* induce apoptosis en Mø y monocitos de humanos; de igual manera se ha identificado a la lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* H37Rv como un inductor de la MCP.¹⁶ Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de MCP contribuye al control de la infección por parte de la célula hospedera.

La interacción entre el hospedero y el patógeno es un mecanismo dinámico donde el microorganismo utiliza diferentes estrategias para sobrevivir y multiplicarse en el individuo, inhibiendo las defensas del hospedero. Como ya se ha mencionado, existen reportes donde se considera el mecanismo de MCP como parte de las defensas que la célula utiliza para tratar de destruir a la micobacteria, así mismo se ha observado que las micobacterias virulentas tienen la capacidad de inhibir la MCP.

HIPÓTESIS

Mycobacterium bovis es capaz de inducir muerte celular programada en macrófagos de bovino con la participación de la familia de las caspasas y la mitocondria.

OBJETIVO GENERAL

Identificar algunos elementos moleculares involucrados en el mecanismo de la muerte celular programada en los macrófagos de bovino infectados con *Mycobacterium bovis* o con el extracto libre de bacterias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Detectar la muerte celular programada de macrófagos infectados con *Mycobacterium bovis* mediante la fragmentación de ADN.
- ❖ Comprobar la participación del extracto libre de bacterias en la muerte celular programada en macrófagos infectados con *Mycobacterium bovis*.
- ❖ Identificar los elementos moleculares involucrados en la muerte celular programada en macrófagos de bovino infectados con *Mycobacterium bovis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

CULTIVO DE *Mycobacterium bovis*

Se utilizó la cepa de *M. bovis* 9926 aislada de lesiones de un bovino con TB, dicha cepa pertenece al departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El cultivo de la bacteria se realizó en medio 7H9 (Becton Dickinson, Cockeysville MD), se obtuvo un primocultivo de 8 días a 37°C, posteriormente se hizo un cultivo final, el cual se incubó 11 días a 37°C en agitación constante, se cosechó y se congeló a -70°C, para después descongelarlo y titularlo con una serie de diluciones para determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) que se utilizaron para infectar macrófagos (Mø).

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIBRE DE BACTERIAS

Después de la incubación el cultivo de *M. bovis* se inactivó por 90 min. a 60°C. Se verificó la eficiencia de la inactivación mediante cultivo de las bacterias incubadas, en cajas con medio 7H11 (Becton Dickinson Co. Sparks, MD), las cuales se incubaron por 30 días. Las bacterias inactivadas se suspendieron en 10 ml de PBS y se lisaron utilizando una prensa French (SLM Aminco Spectronic Instrument, Rochester, NY), posteriormente la solución obtenida se centrifugó por 20 min. a 500 X g, se colectó el sobrenadante que contenía el extracto libre de bacterias (ELB) y se guardó en congelación a -70°C. La obtención del ELB y el rompimiento bacteriano se realizaron según el protocolo descrito por Parish y Wheeler.⁷⁶ Las proteínas contenidas en el ELB se cuantificaron utilizando el paquete comercial BCA (Pierce, Rockford, IL) por el método de ácido bencinquinconinico, con una curva de concentración conocida de albúmina sérica bovina como control.

SEPARACIÓN DEL ELB POR MEDIO DE ELECTROFORESIS BAJO CONDICIONES DESNATURALIZANTES DE UNA Y DOS DIMENSIONES

El ELB se separó por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12%, y geles de dos dimensiones (2D-PAGE); en la composición de los geles y de las soluciones amortiguadoras se elaboraron de acuerdo a técnicas ya estandarizadas.^{52,73} Para el SDS-PAGE el ELB se trató previamente con amortiguador de muestra y posteriormente se colocó en los pozos del SDS-PAGE a una concentración de 6 y 12 μg . Para el cálculo de la masa molecular se utilizó un marcador con estándares de masa molecular (MM) (Bio-Rad; Hercules CA). Las proteínas separadas en los geles fueron visualizadas utilizando tinción de nitrato de plata.³⁷

Para la separación en geles de dos dimensiones, el ELB se trató con una solución que contenía 4% de [(3-(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanolsulfonato) (CHAPS) (Sigma-Aldrich CO, St. Louis MO), 9M de urea (Sigma-Aldrich CO, St. Louis MO) y 20mM de DL-ditrioteitol (DTT) (Sigma-Aldrich CO, St. Louis MO), posteriormente se ultracentrifugó la muestra 10 min a 100,000 X *g* a 4°C; se tomaron 200 μl de sobrenadante que contenía 100 μg del ELB y se les añadió un amortiguador con anfólinas pH 3-10 (Bio-Lyte, Bio-Rad; Hercules CA) a una concentración final de 0.2% y 5 μl de azul de bromofenol (Bio-Rad; Hercules CA) al 1%. Con esta solución se hidrataron tiras de gradiente de pH inmóvil de 11 cm de longitud (IPG ReadyStrip, Bio-Rad; Hercules CA) pH 4-7 por 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron las tiras en una cámara Multiphor-II (Amersham Biosciences; Uppsala Sweden), y se les aplicaron diferentes voltajes hasta completar 52,000 VH; todo se realizó a 17°C. Al término del isoelectroenfoco, las tiras se equilibraron y se colocaron en un SDS-PAGE al 12%, donde se realizó la separación de las proteínas a 100 V constantes. Se visualizaron las proteínas por tinción con nitrato de plata y posteriormente se realizó el análisis utilizando el *pI* y la MM de los diferentes puntos observados en

el gel. Se consultó la página electrónica <http://us.expasy.org/tools/tagident.html>, para conocer las posibles identidades de las proteínas seleccionadas.

OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS DE BOVINO

La purificación de monocitos se llevó a cabo a partir de sangre periférica de bovinos clínicamente sanos, provenientes de un hato libre de TB; la separación de las células se realizó por gradientes de Percoll utilizando la técnica descrita por Stich RW *et al.*⁸⁹ con modificaciones propias. Brevemente, la sangre se centrifugó 30 min a 1,000 g para separar la capa blanca, la cual se mezcló con una solución PBS-citrato y se agregó al tubo que contenía el Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden), la línea blanca se obtuvo por centrifugación 30 min. a 1,000 X g. Posteriormente se le realizó lavados a las células y por último se incubaron a 37 C con 5% de CO₂, se mantuvieron en medio RPMI 1640 adicionada con 2 mM de L-glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio y 20 mM de bicarbonato de sodio (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) (CRPMI). Los macrófagos (Mø) se maduraron por 12 días en medio CRPMI con 10 % de suero autólogo.

INFECCIÓN DE Mø

Para la infección se utilizaron 1×10^6 Mø por ensayo, y se trataron como se menciona a continuación: Mø infectados con *M. bovis* a una multiplicidad de infección (MOI) 1:10, Mø incubados con 20 µg/ml de camptotecina (Sigma-Aldrich CO, St. Louis MO) (control positivo CP), Mø incubados con 50 µM de inhibidores de caspasas (Sigma-Aldrich CO, St. Louis MO) (z-VAD), Mø tratados con z-VAD e infectados con Mb (zVAD-Mb) y Mø sin tratamiento (control negativo CN). El tratamiento con el inhibidor de caspasas se realizó según lo reportado por Santos *et al.*,⁸⁶ se agregó 50 µM de zVAD a los cultivos de células y se incubaron 1 h a 37°C y 5% de CO₂, posteriormente las células se infectaron, con *M. bovis*, a una multiplicidad de infección de 1:10, se incubaron por 4h a 37°C en condiciones de cultivo celular, posteriormente se les realizó tres lavados con PBS, se les agregó 7

ml de medio CRPMI (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) con 10% de suero autólogo y se incubaron 16 h. De igual manera fueron infectados Mø con *M. tuberculosis* utilizando diferentes MOI de 1:10, 1:20 y 1:25, posterior a la incubación de 4 h para permitir la fagocitosis, se lavaron y se incubaron utilizando los tiempos descritos para *M. bovis*. Finalmente, los Mø se cosecharon, se fijaron con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) al 1% por 30 min. en hielo y se centrifugaron a 300 X g durante 10 min. para después suspenderlos en etanol al 70 %, se almacenaron a -20°C , para después aplicarles la técnica de TUNEL.

DETECCIÓN DE CONDENSACIÓN DE CROMATINA EN Mø INCUBADOS CON ELB DE *M. bovis*.

Para determinar la concentración del ELB y el tiempo de incubación se incubaron los Mø de bovino 48 h con 50 y 25 μg de ELB y se tiñeron con yoduro de propidio para determinar el porcentaje de condensación de cromatina.

Una vez estandarizado el tiempo de incubación y la concentración del ELB, se colocaron 2×10^5 Mø de bovino en placas de 24 pozos (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) con cubreobjetos redondos, y recibieron los diferentes tratamientos CN, CP y 100 μg de ELB de *M. bovis*, se incubaron 24 h a 37°C y 10% de CO_2 . Posteriormente se fijaron con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) al 4% y se les aplicó yoduro de propidio a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ adicionado con 100 μg de RNasa (Sigma, St. Louis, MO), se incubaron 1 h en obscuridad, después se montaron los cubreobjetos y las células se observaron al microscopio de fluorescencia para determinar la condensación de cromatina. Se contaron 100 células en diferentes campos para calcular el porcentaje de condensación de cromatina en los diferentes tratamientos. Los resultados presentados son representativos de tres réplicas independientes.

TÉCNICA DE TUNEL

La detección de la fragmentación de ADN se realizó por medio de la técnica de TUNEL (del inglés Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling), la cual se llevó a cabo utilizando el paquete comercial APO-BRDU (Pharmigen, San Diego, CA). El protocolo que se utilizó fue el especificado por el fabricante. La suspensión de células contenidas en etanol 70% a -20°C , se lavaron y posteriormente se permeabilizaron con amortiguador de lavado para posteriormente permitir que entrara la solución de marcaje, se incubaron 1 h a 37°C , nuevamente se lavaron centrifugando la suspensión de células 10 min. a $300 \times g$, para después adicionar el anticuerpo marcado con fluoresceína, el cual se unió a los fragmentos de ADN contenidos en las células en proceso de MCP. Finalmente se agregó yoduro de propidio, se incubaron las células 30 min. en obscuridad. El marcaje de las células se detectó por medio de citometría de flujo, en un citómetro Altra Beckman (Beckman Coulter, Miami FL) donde se contaron como un mínimo 10,000 eventos. Los resultados presentados son representativos de tres réplicas independientes.

DETECCIÓN DE CALCIO CITOPLÁSMICO POR MEDIO DE Fluo-4

Se colocaron 2×10^5 Mø de bovino por pozo, se trataron con 50 μg de ELB y se incubaron 48h a 37°C a una atmósfera de 5% de CO_2 , también se incubaron CN y CP. Una vez concluida la incubación se les retiró el sobrenadante y se les realizaron 2 lavados con medio libre de Ca^{2+} (HBSS) (Sigma, St. Louis, MO), se agregó 1 ml de HBSS y 3 μl de fluo-4 (Molecular Probes, Eugene, OR) para tener una solución de 1 μM , posteriormente las células se incubaron 1 h a 37°C y 5% de CO_2 . Después de la incubación se lavaron 3 veces más y en el último lavado se les dejó con el medio HSB. Se observaron 5 diferentes campos por tratamiento en un microscopio confocal, se capturaron las imágenes para posteriormente ser analizadas y determinar la intensidad de fluorescencia. En todos los ensayos una vez que se tomaron las imágenes, se agregó 100 nM-10 μM de taspargina (A. G. Scientific INC, San Diego CA) para comprobar la funcionalidad de la célula.

Después de este paso también se capturaron las imágenes para restar la intensidad de fluorescencia de las primeras imágenes.

DETECCIÓN DE LA PÉRDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EXTERNA DE LA MITOCONDRIA

Después de la incubación de los Mø de bovino con 100 y 200 µg del ELB durante 12, 24 y 48 h, las células se centrifugaron a 500 X g, el botón de células se suspendió en PBS con DiOC₆ (Molecular Probes, Eugene, OR) a 0.1 µM y se incubaron, 30 min. en obscuridad, la determinación de la pérdida del potencial de membrana externa de la mitocondria (PMEM), se realizó por citometría de flujo en un citómetro Altra Beckman (Beckman Coulter, Miami FL) donde se contaron como un mínimo 10,000 eventos. Los resultados presentados son representativos de tres réplicas independientes.

ACTIVIDAD DE CASPASAS

Para determinar la actividad de las caspasas en los Mø infectados con *M. bovis* e incubados con ELB, se utilizaron sustratos marcados.⁹⁴ Las células incubadas 16 o 24 h bajo los diferentes tratamientos, se cosecharon y se suspendieron en amortiguador de raspado de caspasas (100 mM Hepes, 10% (w/v) sucrose, 0.1% (w/v) CHAPS, 10mMDTT, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, y 5 µg/ml leupeptin), posteriormente se detecto la actividad de caspasas utilizando 25 µM del sustrato marcado, que se agregó a 60-90 µg/ml del homogenizado de células contenido en el amortiguador de caspasas. Los sustratos utilizados fueron Ac-DEVD-AMC, Ac-YVAD-AMC, Ac-IETD-AMC y Ac-LEHD-AMC (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) para caspasas 1, 3, 8 y 9 respectivamente. La lectura de la actividad de caspasas se realizó por 20 min. después de agregar el sustrato en un espectrofluorofotometro RF-5301PC (Shimadzu Corp. Kioto, Japan) a 450 nm. Los resultados son representativos de tres réplicas independientes. También se determino la actividad de caspasa 3 en Mø infectados con *M. tuberculosis*, utilizando la metodología ya descrita.

DETECCIÓN DEL FACTOR DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la detección del factor de inducción de apoptosis (AIF) se utilizó un anticuerpo monoclonal D-20 Santa Cruz Cor, sc-9416 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) a una dilución 1:100. Las células infectadas o incubadas con *M. bovis* o ELB respectivamente, fueron fijadas con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) al 4 %. La recuperación del antígeno se realizó por incubación con citrato de sodio 0.01M, pH 6.0, a 90°C por 20 min. Los MØ de bovino se bloquearon con suero de cerdo al 2% disuelto en PBS, se incubaron 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se le agregó el anticuerpo a una concentración del 1% y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Se utilizó un control el cuál se incubó sin el anticuerpo. La detección se realizó con anticuerpo anti-ratón biotinilado producido en cabra (biotinylated link universal, Dako Cytomation, Carpintería, CA) las células se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con PBS y se expusieron a estreptavidina (Dako Cytomation, Carpintería, CA) por 30 min, el revelado se realizó con 0.05% diaminobenzidina (DAB) (Dako Cytomation, Carpintería, CA) en 50mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) con 0.1% vol/vol peróxido de hidrógeno (Golden bell, México) por 5 min. y se contratiñeron con hematoxilina. Se observaron las células al microscopio (100X) para determinar la translocación al núcleo de AIF. Los resultados son representativos de tres réplicas independientes.

RESULTADOS

CONDENSACIÓN DE CROMATINA Y FRAGMENTACIÓN DE DNA.

A las 48 h de incubación con 25 μg de ELB se observó condensación de cromatina en el 19 % de los M \emptyset y esta se incrementó al 33% al incubarlos con 50 μg de ELB, lo cual indica que la condensación de cromatina en M \emptyset de bovino es un evento dependientes de la dosis y tiempo de incubación con ELB, por lo que se decidió utilizar 100 μg de ELB y 24 h de incubación.

Al incubar los macrófagos de bovino (M \emptyset) con el ELB de *M. bovis* a una concentración de 100 μg por cada 2×10^5 M \emptyset y teñirlos con yoduro de propidio se observó una inducción de 3 veces más ($37 \pm 5\%$) condensación de cromatina comparado con el control negativo de M \emptyset sin tratamiento ($10 \pm 3\%$) (Figura 2A y B). Cuando se realizó la técnica de TUNEL para detectar células con fragmentación de ADN se observó un resultado parecido ya que el ELB fue capaz de inducir 3 veces más ($38.9 \pm 14\%$) fragmentación de ADN en los M \emptyset , en comparación con el control negativo ($8.9 \pm 4\%$) (Figura 3). La infección por *M. bovis* indujo la fragmentación del ADN en $53.7 \pm 24\%$ de M \emptyset , porcentaje que no se vio afectado por la presencia del inhibidor general de caspasas (z-VAD) (Figura 3).

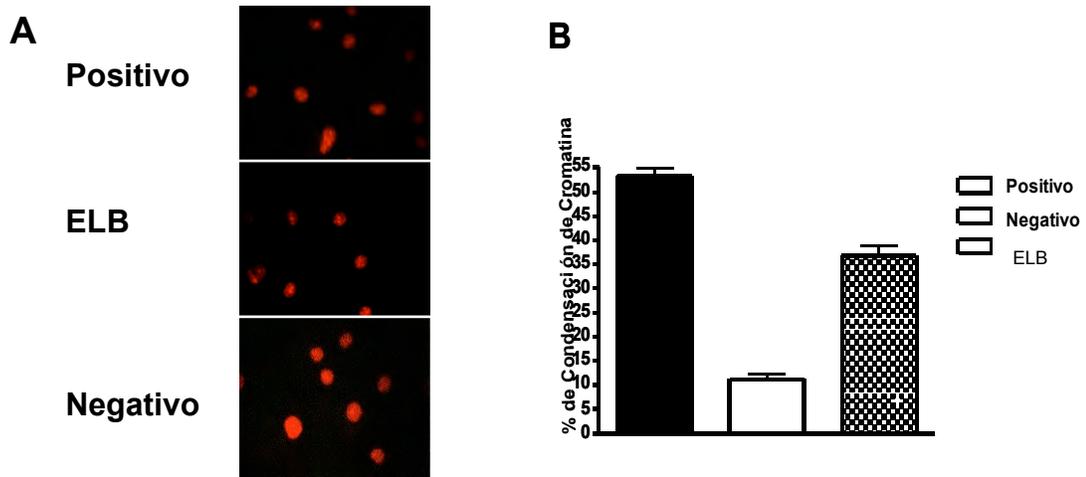


Figura 2. Condensación de cromatina en Mø incubados con ELB. Los Mø se incubaron 24 h con 100 μ g de ELB. A) Imágenes donde se observa condensación de cromatina en los núcleos de los Mø tenidos con yoduro de propidio. B) Gráfica con los porcentajes de células que mostraron condensación de cromatina.

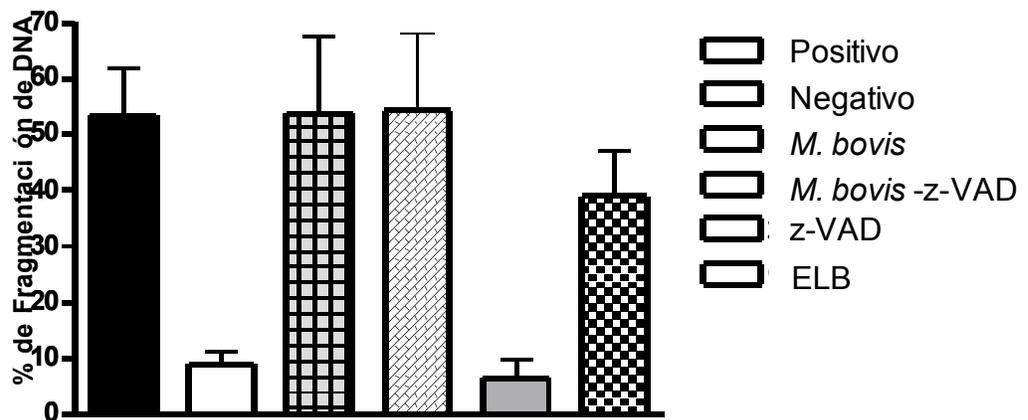


Figura 3. Fragmentación de ADN en Mø infectados con *M. bovis* e incubados con ELB. Se infectaron a los Mø con una MOI de 1:10 (barra cuadros), se incubaron 16 h, y los tratados con 100 μ g de ELB se incubaron 24 h (barra punteada). Se detectó la fragmentación de ADN por medio de la técnica de TUNEL y analizando las células por citometría de flujo.

GEL DE DOBLE DIMENSIÓN.

En el gel de doble dimensión del ELB, se observaron 61 puntos (Figura 4), los cuales podrían corresponder cada uno a una especie proteica distinta. Aproximadamente el 80% de los puntos se ubicó entre el pH 4.5 y 5.5, mientras que el menor número de puntos se ubicó entre el pH 6 y 7. En cambio la mayoría de los puntos se localizó entre los 25 y 60 kDa. Tomando como base el punto isoeléctrico (pI) y la masa molecular (MM), se consultó la base de datos ExPASy (<http://us.expasy.org/tools/tagident.html>), con la finalidad de determinar la posible identidad de las proteínas. Con ese análisis se observó que un mismo punto podría corresponder a más de 5 diferentes proteínas. Las proteínas reportadas en esta base de datos presentan diferentes localizaciones en la bacteria; pueden ser constitutivas, citoplásmicas o de pared. Cabe mencionar que el análisis por ExPASy no permite determinar la identidad precisa de cada proteína, por lo cuál estos resultados deben tomarse con reserva, y ser complementados con otros estudios encaminados a la identificación de cada proteína, por ejemplo degradación de Edman ó análisis basado en espectrometría de masas.

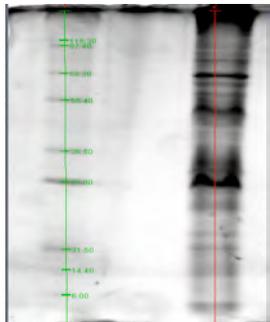
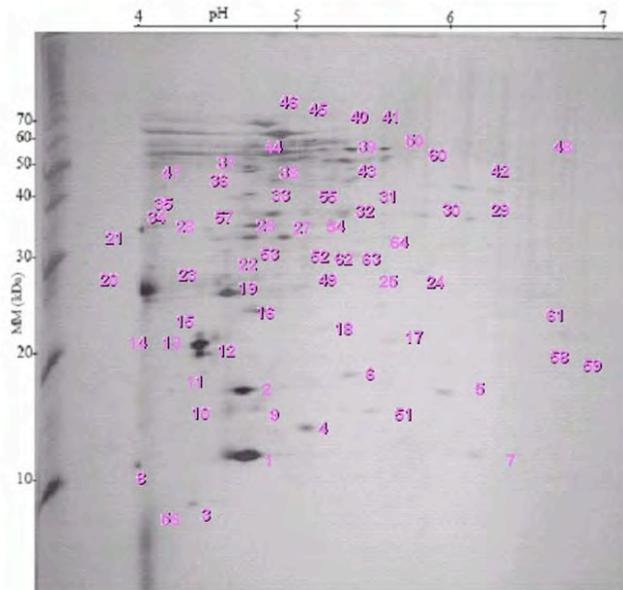
A**B**

Figura 4. Gel de doble dimensión del ELB de *M. bovis*. La muestra del ELB se le realizó A) electroforesis de una dimensión B) y en tiras de gradiente de pH inmóvil de 4 a 7.

DETECCIÓN DE CALCIO CITOPLÁSMICO. Después de incubar los Mø 48 h con 50 μg de ELB de *M. bovis*, se determinó la presencia de Ca^{2+} en el citoplasma de las células, por medio de la sonda Fluo-4. La intensidad de fluorescencia (MIF) en los Mø incubados con el ELB (IF 961), mostró un ligero aumento, en comparación con el CP (IF 1159) (Figura 5A y B).

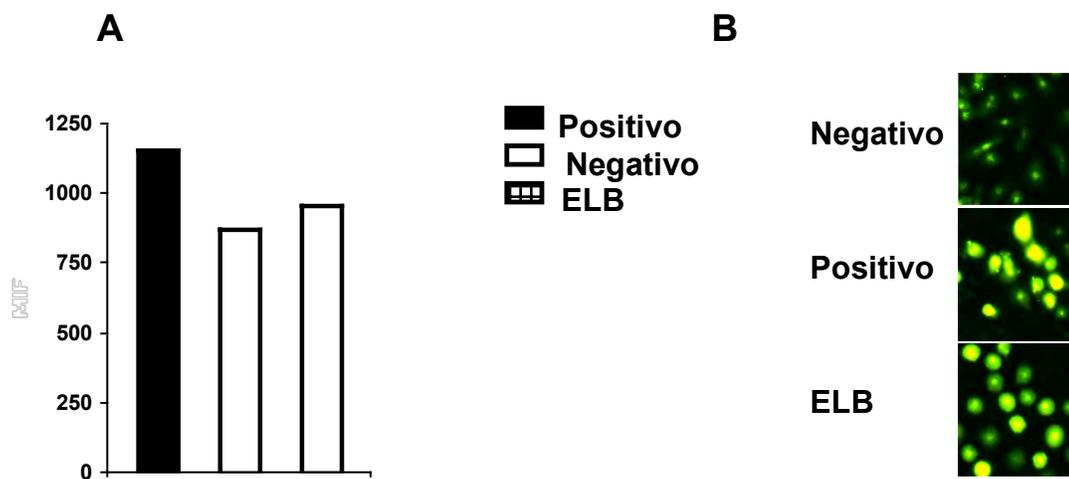


Figura 5. Calcio libre en el citoplasma en Mø de bovino incubados con ELB. Se trataron los Mø con 50 μg de ELB y se incubaron 48 h. A) Gráfica con los porcentajes de intensidad de fluorescencia en los Mø. B) Imágenes que muestran la fluorescencia en Mø incubados con diferentes tratamientos utilizando Fluo-4 para detectar la presencia de calcio en el citoplasma.

PÉRDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EXTERNA DE LA MITOCONDRIA (PMEM).

Para determinar si la mitocondria tenía participación en los eventos observados anteriormente, condensación de cromatina, fragmentación de DNA y presencia de Ca^{2+} en el citoplasma, se procedió a realizar la tinción de DiOC₆ en los Mø

incubados con el ELB, dicha tinción nos permite observar la pérdida del PMEM, el cuál es un evento temprano de apoptosis. Los Mø incubados 12 h con 100 μg del ELB mostraron una pérdida de 5 veces mas (5%) del PMEM en comparación con el control negativo, dicha pérdida se mantuvo a las 24 h y aumentó a 15 veces más a las 48 h (Figura 6). Al incubar con 200 μg de ELB se observó una pérdida mínima del PMEM a las 12 y 24 h, la cuál no se presentó a las 48 h de incubación.

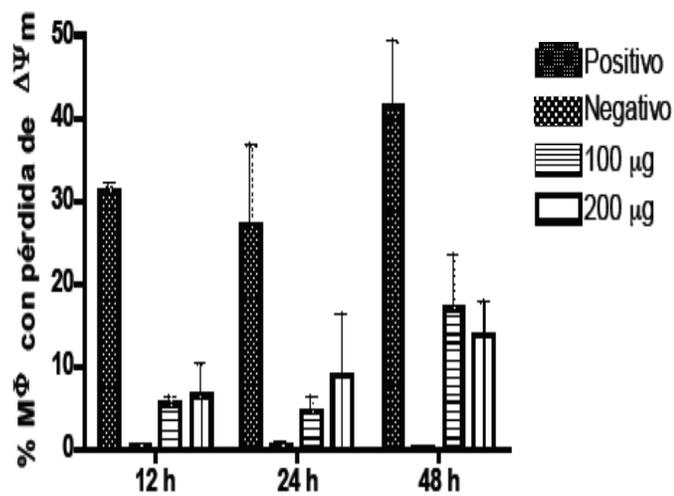


Figura 6. Porcentaje de Mø con pérdida del PMEM. Se incubaron las células a diferentes tiempos 12, 24 y 48 h y a diferentes concentraciones de ELB 100 y 200 μg . La pérdida del PMEM se detecto tiñendo las células con DiOC₆ y analizándolas por citometría de flujo.

ACTIVIDAD DE CASPASAS.

Se utilizó sustrato marcado para determinar la actividad de caspasa por medio de fluorimetría en los Mø incubados con ELB e infectados con *M. bovis* a las 24 y 16 horas de incubación respectivamente. El resultado evidencia la falta de actividad

de caspasa 3, 8 y 9 en la infección con *M. bovis* (Figura 7A), de igual forma no se observó actividad en la incubación con el ELB (Figura 7B). También se midió la actividad de caspasa 1 en Mø infectados con *M. bovis* y se obtuvo el mismo resultado de no actividad (Figura 8). Así mismo al determinar la actividad de caspasa 3 en Mø infectados con *M. tuberculosis* a diferentes MOI 1:10, 1:20 y 1:25 se observó la ausencia de actividad de está caspasa (Figura 9).

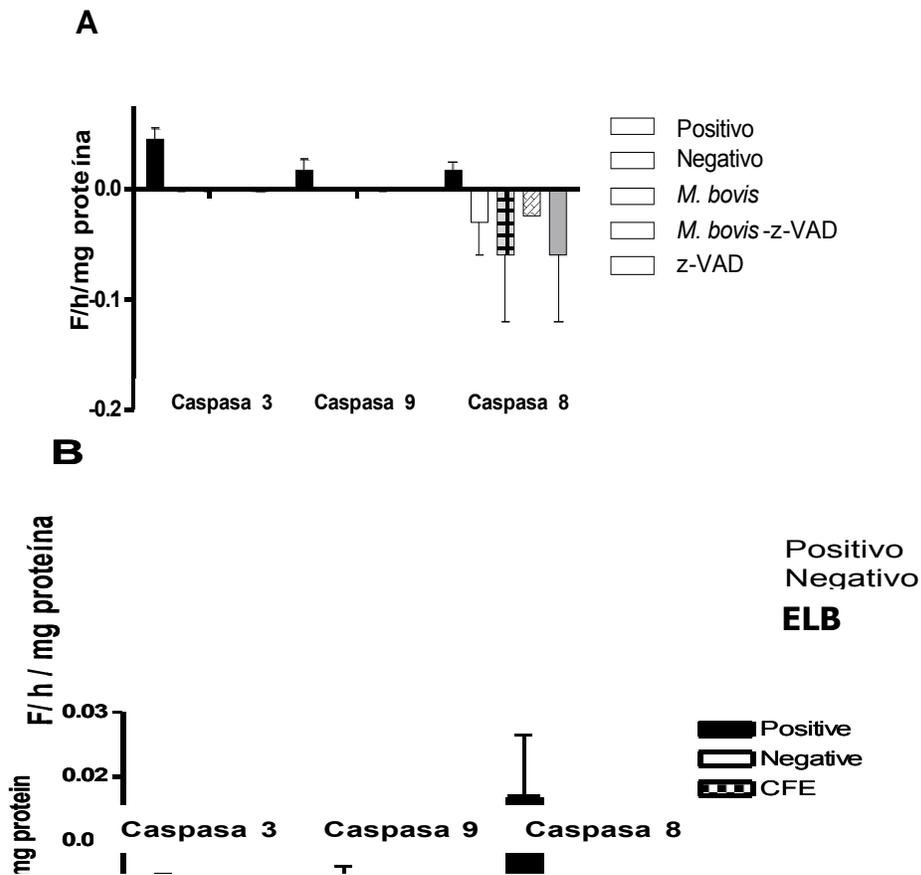


Figura 7. Efecto de *M. bovis* y ELB en la actividad de caspasas. A) Mø de bovino infectados con *M. bovis* 1:10, B) Mø incubados con ELB (B). Se les detectó la actividad de caspasa 3, 8 y 9 con sustratos marcados y la actividad de las caspasas fue detectada por fluorimetría.

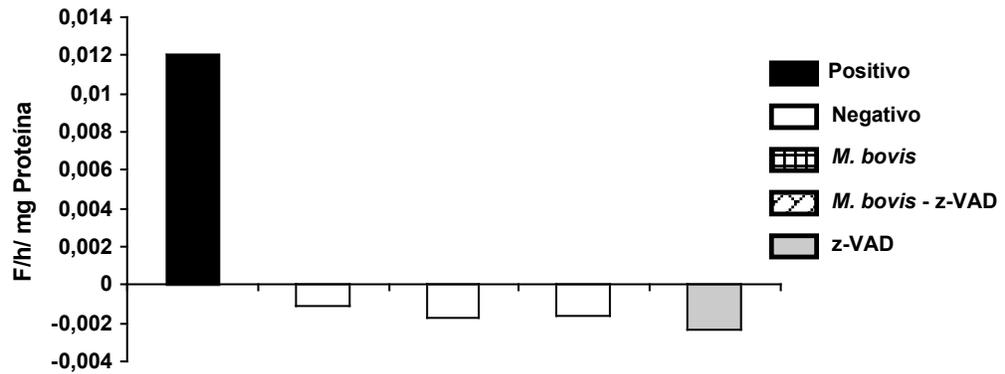


Figura 8. Efecto de *M. bovis* en la actividad de caspasa 1. Mø de bovino infectados *M. bovis* 1:10 e incubados 16 h, se les detecto la actividad de caspasa 1 utilizando sustrato marcado la actividad de la caspasa fue detectada por fluorometría.

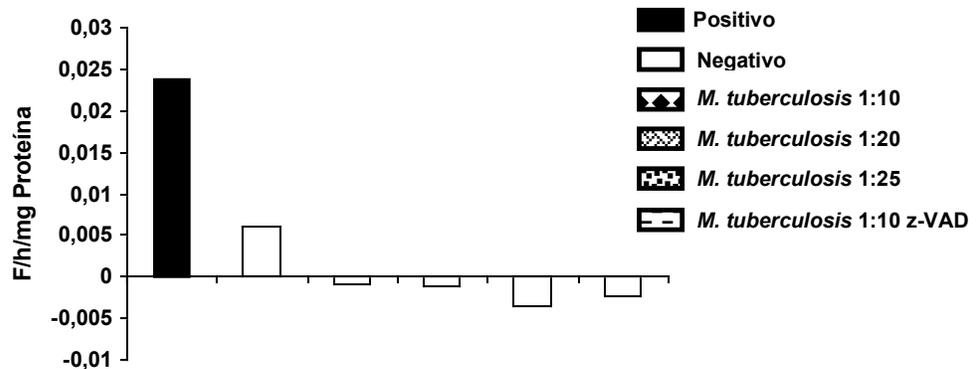


Figura 9. Efecto de *M. tuberculosis* en la actividad de caspasa 3. Los Mø de bovino infectados con *M. tuberculosis* 1:10, 1:20 y 1:25 incubados 16 h, se les detecto la actividad de caspasa 3 por medio de sustrato marcado y midiendo la actividad por una técnica fluorométrica.

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR AIF.

Al utilizar anticuerpos monoclonales contra AIF en los Mø infectado con *M. bovis* se observó por medio de la técnica de inmunohistoquímica $32 \pm 3.5\%$ de células con translocación de AIF al núcleo en los Mø infectados y $37 \pm 2.6\%$ en los que previamente se trataron con z-VAD y posteriormente se infectaron y en los Mø incubados con ELB presentaron $26 \pm 4.9\%$, en cambio los controles negativo e incubados únicamente con z-VAD presentaron solo 8% (Figura 10A). Las células se observaron al microscopio para realizar el conteo de aquellas que presentaban núcleos teñidos de color oscuro, los cuales se consideraron como positivos a la translocación de AIF al núcleo (Figura 10B).

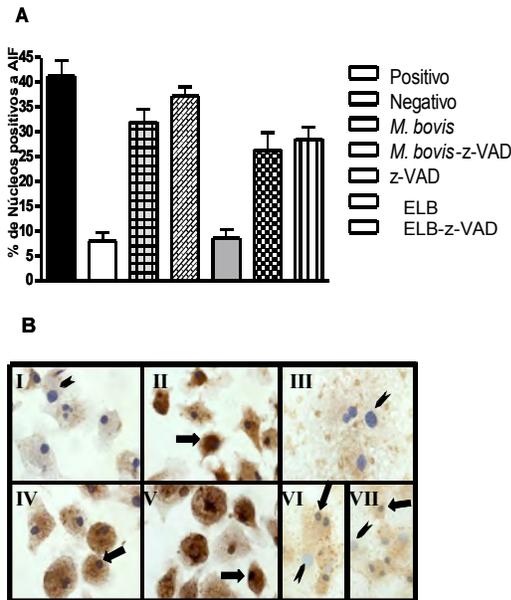


Figura 10. Translocación de AIF al núcleo. Porcentaje de Mø infectaron con *M. bovis* y e incubados con ELB que fueron positivos a la translocación de AIF al núcleo (A). Imágenes de Mø con diferentes tratamientos se observa la tonalidad oscura de los núcleos positivos a la translocación de AIF (Flechas) y la tonalidad morada en los núcleos negativos a la translocación (Cabezas de flecha) (B).

DISCUSIÓN

La primera evidencia de que la muerte celular programada (MCP) inducida por *M. bovis* se desarrolla en ausencia de la activación de las caspasas se obtuvo al incubar a los macrófagos (Mø) con el inhibidor general de caspasas previo a la infección. La fragmentación del ADN no se vio afectada por la presencia de z-VAD (Figura 3), en cambio las células incubadas con camptotecina (control positivo) sufrieron una disminución en el porcentaje de fragmentación del ADN como efecto del inhibidor. Con el objetivo de confirmar esta observación se procedió a evaluar la activación de diferentes caspasas en forma individual mediante una técnica de sustrato marcado. La activación de caspasa 3, 8 y 9 no se observó en los Mø infectados a diferencia de lo que ocurrió en las células tratadas con camptotecina donde se comprobó la participación de las tres proteínas (figura 7A). Como consecuencia de estos resultados se procedió a identificar la participación de las caspasas en células inducidas a sufrir MCP al ser incubadas con el ELB. En forma semejante a lo que ocurrió con los Mø infectados, la incubación con z-VAD no afectó la proporción de fragmentación de ADN en las células incubadas con el ELB. Al utilizar la técnica de sustrato marcado tampoco se identificó la actividad individual de ninguna de las caspasas investigadas (Figura 7B). De igual forma se determinó la participación de caspasa 1 por sustrato marcado; observándose la ausencia de la actividad de esta caspasa (Figura 8). Era importante comprobar la actividad de esta caspasa debido a que en diferentes trabajos, reportaron la activación de caspasa 1 y su relación con la MCP inducida por micobacterias.^{7,15,36,82} Todos estos resultados sugieren que la MCP inducida en macrófagos bovinos ya sea infectados con *M. bovis* o tratados con su ELB se genera en una modalidad independiente de caspasas.

Es conocido que *M. tuberculosis* es capaz de inducir MCP en células infectadas y este evento se asocia con la actividad de caspasas.^{10,15,28,79,80} Al detectar la actividad de caspasa 3 en Mø de bovino infectados con *M. tuberculosis* H37Rv se

observó la carencia de actividad de esta proteína (Figura 9) sugiriendo que el proceso biológico de MCP depende del origen de las células. En relación a este resultado, en una publicación reciente,⁵⁴ demostraron muerte celular independiente de caspasas (MCIC) en Mø de ratón infectados con *M. tuberculosis*, sin embargo el evento fue asociado a una multiplicidad de infección (MOI) alta de 1:25. Considerando este dato se infectaron Mø de bovino con diferentes MOI, de 10, 20 y 25, sin embargo, no se logró detectar la actividad de caspasa 3 (Figura 9). Con base en lo anterior se sugiere que los Mø de bovino no responden de igual forma que los Mø de ratón y humano a la infección por *M. tuberculosis*.

Una característica de las especies patógenas del género *Mycobacterium* es la inducción de MCP, la cual depende de la presencia de bacterias vivas,^{35,44,53,78} aunque también se ha descrito que algunos de sus componentes proteicos pueden inducirla.^{16,42,59} *M. bovis* induce MCP, sin embargo se desconoce que moléculas son las responsables de inducir este proceso, por lo cual se evaluó si el ELB de *M. bovis* era capaz de inducir MCP en Mø de bovino. Para lo cual se incubó a los Mø con el ELB. A las 24 h de incubación se observaron cambios morfológicos característicos de la MCP, como la condensación de la cromatina (Figura 2A y B) y fragmentación de ADN (Figura 3). Estos resultados son similares a los reportados por Hayashi⁴², quien observó que el sonicado de *M. avium* indujo la fragmentación del ADN en células THP-1. El ELB al ser una mezcla compleja de proteínas y lípidos provenientes del citoplasma y de la membrana celular bacteriana, no puede descartarse la presencia de LAM en el ELB, sin embargo, su participación en la inducción de MCP es limitada ya que diferentes modelos biológicos indican que LAM inhibe el proceso apoptótico al fosforilar la proteína proapoptótica Bad.^{61,71,81,82}

Para conocer si la mitocondria participaba en la MCP en los Mø de bovino, se decidió medir el potencial de la membrana externa de la mitocondria (PMEM) en los Mø incubados a diferentes tiempos con el ELB, para lo cual se utilizó la tinción

de DiOC₆. Lo que se observó fue una pérdida del PMEM de 5 veces más comparado con el control negativo a las 12 y 24 h y aumenta 15 veces más a las 48 h (Figura 6). Estos resultados son similares a trabajos donde se observa que la infección con *M. tuberculosis* se relaciona con la pérdida del PMEM y estos eventos contribuyen al desarrollo de MCP en diferentes modelos biológicos.^{1,36,81} Así mismo la detección de calcio (Ca²⁺) por Fluo-4 en Mø incubados con ELB (Figura 5), permite sugerir que esta molécula pudiera estar involucrada en las señales celulares que desencadenan MCP durante la infección con *M. bovis*. Lo anterior se relaciona con diferentes reportes que consideran la salida de Ca²⁺ de la mitocondria como una señal para que se desencadene la MCP en células infectadas con *M. tuberculosis*.^{27,36,81}

Los resultados obtenidos indicaban que *M. bovis* inducía cambios morfológicos característicos a MCP, los cuáles se presentaban con una pérdida considerable del PMEM sin embargo no se detectó la activación de caspasas. Se conoce que cuando se pierde el PMEM se presenta la salida de diferentes componentes inductores de MCP del espacio intermembranal del organelo hacia el citosol, una de estas moléculas es el factor de inducción de apoptosis (AIF), el cuál es una proteína que tiene la función de oxidoreductasa,⁶⁷ sin embargo, una vez que es liberada al citosol transloca a núcleo donde participa en la condensación de cromatina y fragmentación de ADN^{58,100} y todo este evento se puede dar sin la participación de las caspasas, por lo tanto AIF se considera importante en la MCIC.²¹ Por todo lo anterior se procedió a tratar de detectar con un anticuerpo monoclonal específico contra esta proteína, la presencia de AIF en el núcleo de Mø infectados con *M. bovis*. Los resultados mostraron un 32% de células infectadas que presentaban translocación de AIF al núcleo y dicho evento no se inhibió al realizar un tratamiento previo a la infección con z-VAD.

Considerando los resultados mostrados se propone que en el Mø de bovino una vez que es infectado por *M. bovis* se activan varias señales que desencadenan la

MCIC (Figura 11). Durante la infección del Mø por *M. bovis* se pierde el PMEM, que si bien es menor tomando como referencia el control positivo, permite la salida de AIF al citosol y su posterior translocación al núcleo donde participa en la condensación de cromatina y fragmentación del ADN y todo este evento se desarrolla sin que se involucren las caspasas, así mismo esa pérdida del PMEM permite la salida de Ca^{2+} al citoplasma, el cuál puede participar en la activación de vías propias de MCP. Las interrogantes que existen en este momento es qué señales se presentan antes de la pérdida de la PMEM y que permiten se desencadene la MCIC en el Mø infectado e incubado con ELB de *M. bovis*. Pueden estar ocurriendo varios sucesos, uno de ellos es la participación de la familia de proteínas Bcl-2, esto es debido a que existe reportes donde relacionan la liberación de AIF con la participación de Bax,^{4,22} que si bien en estos estudios se relaciona el evento con la actividad de caspasas cabe mencionar que existen trabajos donde mencionan la liberación de AIF sin que se involucren las caspasas.^{40,64} Otra explicación puede ser la variación en los niveles de Ca^{2+} citosólico proveniente del estrés del retículo endoplásmico, que permiten la activación de proteínas que interactúan con Bax y favorecen su translocación a la mitocondria .¹²

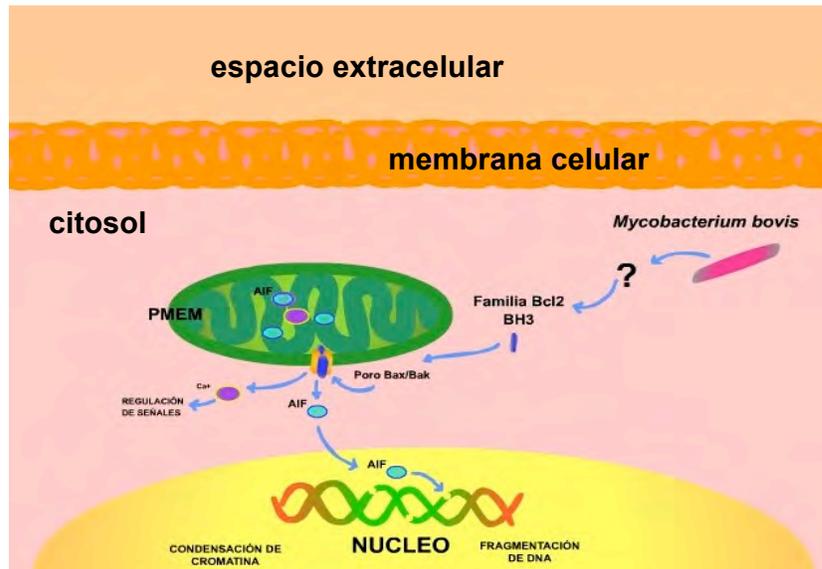


Figura 11. Señales celulares que se activan en el MØ de bovino por la infección con *M. bovis*. La bacteria puede interactuar con la familia de proteínas Bcl-2, una vez activadas formarían poros en la membrana mitocondrial, lo que permitiría la pérdida de la PMEM, por lo tanto la salida de Ca^{2+} y AIF y este último transloca a núcleo para participar en la MCP sin la activación de caspasas.

CONCLUSION

La infección de macrófagos de bovino con *Mycobacterium bovis* o su estimulación con extracto libre de bacterias inducen muerte celular programada sin la activación de la cascada de caspasas.

El factor de inducción de apoptosis participa en la muerte celular programada de los macrófagos de bovino durante la infección con *Mycobacterium bovis*.

REFERENCIAS

1. Abarca-Rojano E, Rosas-Medina P, Zamudio-Cortéz P, Mondragón-Flores R, Sánchez-García FJ. *Mycobacterium tuberculosis* virulence correlates with mitochondrial cytochrome c release in infected macrophages. *Scan J Immunol* 2003; 58: 419–427.
2. Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *TRENDS in Cell Biology* 2004; 4:184-193.
3. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Interna. J Sist Evolut Mycobiol* 2003; 53: 1785-1789.
4. Arnoult D, Parone P, Martinou JC, Antonsson B, Estaquier J, Ameisen JC. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol* 2002. 159: 923–929
5. Arriaga C, Banda V, Díaz F, Estrada C. Avances en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Memorias de la 8ª reunión anual CONASA* 1999.
6. Bhardwaj A, Aggarwal B. Receptor-Mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 2003; 23:317-331.
7. Bermudez LE, Parker A, Petrofsky M. Apoptosis of *Mycobacterium avium*-infected macrophages is mediated by both tumour necrosis factor (TNF) and Fas, and involves the activation of caspases. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:94–99.

8. Bempohl D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Braun JS, Bechmann I, *et al.* Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J Clin Invest* 2005; 115:1607–1615.
9. Biet F, Boschioli MA, Thoerl MA, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* 2005; 36:411-436.
10. Bhattacharyya A, Pathak S, Basak C, Law S, Kundu M, Basu J. Execution of macrophage apoptosis by *Mycobacterium avium* through apoptosis signal-regulating kinase 1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling and caspase 8 activation. *J Biol Chem* 2003; 278:26517–26525.
11. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor–induced cell death. *Cell* 1996; 85:803-815.
12. Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell ceath independent of caspases: A Review. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3155-3162.
13. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brondin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2002; 99:3684-3689.
14. Carrero JA, Calderon B, Emil R, Unanue ER. Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J Immunol* 2004; 172: 4866–4874.
15. Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB, Amicosante MA, Martino A, Auricchio G, Pucillo LP, Colizzi V, Fraziano M. Proinflammatory cytokines in the course of

- Mycobacterium tuberculosis*–induced apoptosis in monocytes/macrophages. J Infect Dis 2002; 186:1277–1282.
16. Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB, Garg SK, Sanarico N, Bocchino M, *et al.* Induction of apoptosis and release of interleukin-1b by cell wall–associated 19-kDa lipoprotein during the course of Mycobacterial infection. J Infect Dis 2004; 190:1167–1176.
 17. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. Curr Opin Chem Biol 1997; 1:579-588.
 18. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak, T.W., Lindsten, *et al.* BCL-2, BCL-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. Molecular Cell 2001; 8:705–711.
 19. Chen M, Jahnukainen T, Bao W, Daré E, Ceccatelli S, Celsi G. Uropathogenic *Escherichia coli* toxins Induce caspase-independent apoptosis in renal proximal tubular cells via ERK signalling. Am J Nephrol 2002; 23:140-151.
 20. Chipuk JE, Green DR. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?. Nature 2005; 273:268-275.
 21. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. Oncogene 2004; 23:2785–2796.
 22. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu S-W, *et al.* Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. J Cell Biol 2002; 158:507–517.

23. Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robins, R.A., Huchzermeyer, H.F., Kantor, I. and Meslin, F.X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 1:59-70.
24. Cote J, Ruiz-Carrillo A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 1993; 261:765-769.
25. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205–219.
26. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, *et al.* Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144:891-901.
27. Duan L, Gan H, Arm J, Remold HG. Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF- α in the induction of apoptosis of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra1. *J Immunol* 2001; 166:7469–7476.
28. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c–dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102:33-42.
29. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA* 1999; 282:677-86.
30. Ehrt S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M, Gunzburg S, Nathan C, *et al.* A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997; 186:1885–1896

31. Ernst JD. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998; 66:1277–1281.
32. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid Induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000; 29:929–935.
33. Esquivel-Solis H, Vellecillo AJ, Benítez-Guzmán A, Adams LG, López-Vidal, Gutiérrez-Pabello JA. Control of *Mycobacterium bovis* by bovine macrophages is related to the host resistant phenotype and apoptosis induction. Manuscript in process.
34. Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters JA. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 1999; 14:435-447.
35. Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Remold HG. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the Mycobacteria from spreading and induces Mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* 1997. 158: 4320-4327.
36. Gil D, Garcia LF, Rojas M. Modulation of macrophage apoptosis by antimycobacterial therapy: physiological role of apoptosis in the control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxic Applied Phar* 2003; 190:111–119.
37. Görg A. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. Technische Universitat Munchen, Germany. 2003.
38. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002; 1:19-30.

39. Gutiérrez-Pabello JA, McMurray DN, Adams LG. Upregulation of thymosin α 1 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infect Immun* 2002; 70:2121–2127.
40. Gwan BJ, Lobner D, Koh JY, Wie MB, Choi DW. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neuroscience* 1995; 68:615-619.
41. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57–70.
42. Hayashi T, Catanzaro A, Rao SP. Apoptosis of human monocytes and macrophages by *Mycobacterium avium* sonicate. *Infect Immun* 1997; 65:5262–5271.
43. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *TRENDS* 2004; 25:259-264.
44. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp G, Meek BB, Fenton MJ, *et al.* Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997. 65:298–304.
45. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 2000; 164:2016–2020.
46. Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *TRENDS Cell Biol* 1998; 8:324-330.

47. Keyton TA, Driver C, Haas E, Valway SA, Moser KS, Onorato IM. Immigration and tuberculosis among children on the United States-Mexico border, county of San Diego, California. *Pediatrics* 1999; 104:1-6.
48. Kroemer G, Reed J. Mitochondrial control of cell death. *Nature* 2000; 6: 513-519.
49. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nature Medicine* 2005; 11:725–730.
50. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele, *et al.* Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12:1463–1467.
51. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, *et al.* Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; 111:331–342.
52. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
53. Laochumroonvorapong P, Paul S, Keith B, Elkon KB, Kaplan G. H₂O₂ induces monocyte apoptosis and reduces viability of *Mycobacterium avium-M. intracellulare* within cultured human monocytes. *Infect Immun* 1996; 64: 452–459.
54. Lee J, Remold HG, Jeong MH, Kornfeld H. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *J Immunol* 2006; 176:4267–4274.

55. Li H, Bergeron L, Cryns V, Pasternack MS, Zhu H, Shi L, *et al.* Activation of caspase-2 in apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272:21010–21017.
56. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412:95-99.
57. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479–489.
58. Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Métivier D, Nieminen A-L; *et al.* Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J* 2001; 15:758-767.
59. López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, and Reiner NE. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-Like receptor-2. *J Immun* 2003; 170:2409–2416.
60. MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO* 2004; 5:674-678.
61. Maiti D, Bhattacharyya A, Basu J. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. *J. Biol Chem* 2001; 276: 329–333.
62. Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHa1) death signal. *J Biol Chem* 1998; 273:4345–4349.

63. Martins LM, Morrison A, Klupsch K, Fedele V, Moiso N, Peter Teismann P, *et al.* Neuroprotective role of the reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 2004; 24:9848–9862.
64. Mattson MP, Zhu H, Yu J, Kindy MS. Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia *in vivo* and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis. *J Neurosci* 2000; 20:1358–1364.
65. Menzies FD, Neil SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000; 160: 92-106.
66. McKinner JD, Höner zu Bentrup K, Muñoz-Elías EJ, Miczak A, Chen B, Chan W-T, *et al.* Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000; 406:735-738.
67. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, *et al.* NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* 2001; 276:16391–16398.
68. Moda G, Dabon CJ, Grange JM, Cosivi O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tub lung Dis* 1996; 77:103-108.
69. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, *et al.* FLICE, A novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996. 85:817–827.

78. Placido R, Mancino G, Amendola A, Mariani F, Vendetti S, Piacentini M, et al. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Pathology* 1997; 181: 31–38.
79. Perskvist N, Long M, Stendahl O, Zheng L. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of bax/bcl-xl via an oxygen-dependent pathway. *J Immun* 2002; 168: 6358–6365.
80. Riendeau CJ, Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to mycobacterial infection. *Infect Immun* 2003; 71:254–259.
81. Rojas M, García LF, Nigou J, Puzo G, Olivier M. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis by altering ca²⁺-dependent cell signaling. *J Infect Dis* 2000; 182:240–51.
82. Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, García LF. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immun* 1999; 162: 6122–6131.
83. Ruan J, ST. Jonhn G, Ehrt S, Riley L, Nathan C. *noxR3*, a novel gene from *Mycobacterium tuberculosis*, protects *Salmonella typhimurium* from nitrosative and oxidative stress. *Infect Immun* 1999; 67:3276-3283.
84. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev Microbiol* 2001; 2:10.

85. Salmond RJ, Williams R, Hirst TR, Williams NA. The B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin induces both caspase-dependent and -independent cell death pathways in CD8 T cells. *Infect Immun* 2004; 72:5850–5857.
86. Santos RI, Tsolis R, Bäumler AJ, Smith R, Adams G. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early *sipB*-dependent and delayed *sipB*-independent mechanisms. *Infect Immun* 2001; 69:2293–2301.
87. Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, et al. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 1998; 394:494-498.
88. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003. 16:463-496.
89. Stich RW, Lisl KM, Shoda LK, Dreewes M, Adler B, Thomas W, et al. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect Immun* 1998; 66:4130–4136.
90. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Hassix PL, Collins HL, Fox AK, et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994; 263:637-639.
91. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.

92. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Koji Takio K, Takahashi R, A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001; 8:613-621.
93. Tanaka S, Saito K, Reed JC. Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. *J Biol Chem* 1993. 268:10920-10926.
94. Thornberry NA. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol* 1994; 244:615-631.
95. Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Bénit P, Joza N, Larochette N, *et al.* AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 2004; 23:4679–4689.
96. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000. 102: 43–53.
97. Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huberi LA, Deretic V. Arrest of Mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* 1997. 272:13326–13331.
98. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14559–14563.
99. Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, *et al.* DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 2002, 9:680-684.

100. Yu S-W, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, *et al.* Mediation of Poly (ADP-Ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002; 297:259-263.
101. Watson VE, Hill L, Owen-Schaub LB, Darren W. Davis DW, McConkey DJ, *et al.* Apoptosis in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice exhibiting varied immunopathology. *J Pathol* 2000; 190: 211-220.
102. Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect* 2002; 4:471-480.
103. Winau F, Kaufmann SH, Schaible UE. Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. *Cell Microbiol* 2004; 6:599–607.
104. WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization, 2006:242.
105. Zhang J, Dong M, Li L, Fan Y, Pathre P, Dong J, *et al.* Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *PNAS* 2003; 100:15782-15787.