



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Fagocitosis de macrófagos muertos en apoptosis inducida  
por la glicolipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis*”**

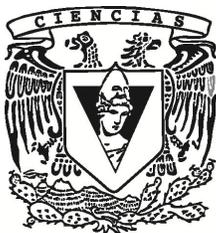
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**TERESA CONCEPCIÓN GARCÍA AGUILAR**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ  
2012**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Raúl Mancilla Jiménez, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Agradezco a mi asesor por brindarme los medios necesarios para realizar este trabajo, su valiosa asesoría y enseñanza en la elaboración de esta tesis. También agradezco a Patricia Espinosa Cueto por el apoyo técnico necesario para la realización de esta tesis.

A mis padres, Luz María y Fernando por enseñarme las cosas valiosas de la vida.

A mis hermanos, amigos y Rubén por su cariño, ayuda y comprensión, muchas gracias.

A mis profesores y compañeros a lo largo de la carrera con quienes entendí lo que es la ciencia.

A todos mis compañeros del laboratorio con los que tuve la oportunidad de convivir y disfrutar la ciencia, Fernanda, Toño, Jimena Lupita, Erika, Alejandro y Miguel.

## ÍNDICE

<b>I. ABREVIATURAS</b>	<b>6</b>
<b>II. RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>III. ANTECEDENTES</b>	<b>9</b>
III.1. Introducción	9
III.2. Epidemiología de la tuberculosis	10
III.3. El agente etiológico de la tuberculosis	11
III.3.A. Filogenia de <i>M. tuberculosis</i>	12
III.3.B. Resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a fármacos	13
III.4. Etiopatogenia de la tuberculosis	13
III.4.A. Fagocitosis de <i>M. tuberculosis</i>	14
III.5. Respuesta inmune a <i>M. tuberculosis</i>	15
III.6. Apoptosis	16
III.7. Apoptosis en la tuberculosis	19
III.8. Fagocitosis de células y cuerpos apoptóticos	21
<b>IV. FUNDAMENTACIÓN</b>	<b>24</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>VI. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
VII.1. Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratones de la cepa Balb/c-J y cultivo de macrófagos de la línea monocítica J-774	27
VII.2. Cultivo de <i>M. smegmatis</i> nativa y <i>M. smegmatis</i> transformada que expresa la glicolipoproteína de 19 kilodalton de <i>M. tuberculosis</i>	27

VII.3. Obtención de paredes micobacterianas	28
VII.4. Ensayos de apoptosis o inducción de apoptosis	28
VII.5. Purificación de cuerpos apoptóticos con microesferas magnéticas recubiertas con Anexina V	29
VII.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio e Immunoblot	29
VII.7. Ensayos de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos	30
VII.8. Ensayos de inhibición de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos con azúcares competidores del receptor de manosa y un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del receptor de manosa	30
VII.9. Ensayo de inhibición de la de la expresión del receptor de manosa y de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por medio de un ácido ribonucleico de interferencia para el receptor de manosa	31
VII.10. Análisis de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos	31
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
VIII.1. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio e Immunoblot de <i>M. smegmatis</i> transformada que expresa la glicolipoproteína de 19 kilodalton de <i>M. tuberculosis</i>	33
VIII.2. Análisis de la inducción de apoptosis	34
VIII.3. Caracterización de los cuerpos apoptóticos con electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio e Immunoblot	36
VIII.4. Análisis de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por citometría de flujo	38

VIII.5. Análisis de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por microscopia de epifluorescencia	39
VIII.6. Análisis de inhibición de la fagocitosis con N-acetilglucosamina, manana y un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del receptor de manosa	42
VIII.7.- Análisis de inhibición de la fagocitosis con un ácido ribonucleico de interferencia específico para el receptor de manosa	48
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>X. CONCLUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>58</b>

## I. ABREVIATURAS.

<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MØs</b>	Macrófagos
<b>M. smeg-LpqH</b>	<i>Mycobacterium smegmatis</i> transformada con el plásmido que codifica la glicolipoproteína LpqH de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MR</b>	Receptor de manosa
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PSR</b>	Receptor de fosfatidilserina
<b>LpqH</b>	Glicolipoproteína de 19 kDa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>CAs</b>	Cuerpos apoptóticos
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor transformante de crecimiento- $\beta$
<b>Nag</b>	N-acetilglucosamina
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>CFSE</b>	Carboxyfluoresceína diacetato succinimidil
<b>TLR-2</b>	Receptor de tipo toll 2
<b>ManLAM</b>	Lipoarabinomanana
<b>Bcl-2</b>	Familia de moléculas que intervienen en la apoptosis
<b>PIMs</b>	Manosidos fosfatidilmioinositol de bajo o alto orden
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio
<b>siRNA</b>	Ácido ribonucleico de interferencia

## II. RESUMEN.

La fagocitosis de cuerpos apoptóticos en condiciones fisiológicas es un proceso altamente eficiente en el cual participan una gran variedad de receptores en células fagocíticas lo que evita que los cuerpos apoptóticos generen una respuesta inflamatoria y fenómenos de autoinmunidad. *M. tuberculosis* induce apoptosis a su célula hospedera el macrófago, desconociéndose los mecanismos de remoción de las células muertas. Por lo anterior y en vista de que la eliminación o no de células muertas podría ser importante en la patogenia de la infección llevamos a cabo este estudio. Para inducir apoptosis se obtuvieron macrófagos derivados de médula ósea de ratones de la cepa Balb/c-J los cuales se incubaron con paredes de la cepa saprofita *M. smegmatis* transformada con un plásmido que codifica para la glicolipoproteína apoptogénica de 19 kilodalton de *M. tuberculosis*. Lo anterior resultó en 90% de apoptosis de las células, determinado mediante citometría de flujo con Anexina V e inmunofluorescencia. Los cuerpos apoptóticos se purificaron por la interacción de la fosfatidilserina translocada presente en la superficie de las células apoptóticas y microesferas magnéticas recubiertas con Anexina V. Por medio de Western blot se demostró la presencia de la glicolipoproteína de 19 kilodalton de *M. tuberculosis* en los cuerpos apoptóticos.

Se realizaron ensayos de fagocitosis con macrófagos de la línea J-774 marcados con el colorante vital PKH-26, los macrófagos se incubaron con diferentes gradientes de cuerpos apoptóticos obtenidos a 1500, 5000 y 32500 rpm marcados con carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE). Ya que los cuerpos apoptóticos contenían la glicolipoproteína de 19 kilodalton de *M. tuberculosis* que contiene manosa se consideró posible que el receptor de manosa participara en su fagocitosis. Por lo tanto, se

hicieron ensayos de inhibición con azúcares competidores del receptor de manosa como la manana y la N-acetilglucosamina. Además se hicieron ensayos de inhibición utilizando un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del receptor de manosa. El análisis se realizó por citometría de flujo y epifluorescencia. Por citometría de flujo se demostró fagocitosis a las 4 hr de los cuerpos apoptóticos obtenidos a 1500 rpm en 29 % de las células, un 45% de los cuerpos apoptóticos obtenidos a 5000 rpm y 20 % obtenidos a 32,500rpm. En ensayos de inhibición de la fagocitosis con N-acetilglucosamina de cuerpos apoptóticos obtenidos a 1500 rpm hubo un 52% de inhibición; con manana la inhibición fue del 43%. Con 5µg del anticuerpo monoclonal anti-receptor de manosa fue del 49% y con 10 µg fue del 76%. Estos estudios demuestran la participación del receptor de manosa en la fagocitosis de macrófagos muertos en apoptosis por tratamiento con la glicolipoproteína apoptogénica de 19 kilodalton de *M. tuberculosis*.

### III. ANTECEDENTES.

#### III.1. Introducción.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), la cual se adquiere principalmente por aerosoles y es transmitida por vía aérea, a través de gotitas que contienen de 1 a 3 bacilos los cuales son inhalados y entran en el pulmón [1]. La Organización Mundial de la salud (OMS) reporta alrededor de 8 millones de casos nuevos y 3 millones de muertes por esta enfermedad al año, con un estimado de 3 decesos cada minuto [2]. La TB en la actualidad constituye una enfermedad reemergente como consecuencia de la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos tradicionalmente empleados para el tratamiento de la TB y representa la primera causa de muerte en pacientes con VIH/SIDA. [3].

Aunque esta enfermedad fue reconocida hace muchos siglos, el entendimiento moderno de su naturaleza se logró por el trabajo de Robert Koch, quien desarrollo las técnicas de tinción, cultivo e identificó al agente causal de la TB [4].

El ser humano ha convivido con el bacilo de la TB por mucho tiempo [5]. Se ha considerado que el bacilo de la TB apareció hace 35,000 años mutando por transferencia horizontal desde un tipo de bacteria saprófita que pudo haber existido 2, 500,000 años antes. Los vestigios humanos más antiguos con TB se presentan en momias de hace 9,000 años encontradas en las costas del este del Mar Mediterráneo [5]. En América se ha documentado la existencia de TB en momias peruanas y chilenas en las sociedades prehispánicas por medio de estudios de patología e identificación de DNA micobacteriano en momias [6,7].

### III.2. Epidemiología de la tuberculosis.

Aproximadamente una tercera parte de la población mundial está infectada de manera latente por Mtb y una de cada diez de estas personas desarrollarán la TB activa [8]. De acuerdo a los informes del 2010 de la OMS en el control mundial de la TB en 2009 se presentaron: 9.4 millones de casos nuevos (equivalente a 137 casos por 100, 000 personas), 14 millones de casos extendidos, 1.3 millones de muertes en personas VIH-negativas y 0.38 millones de muertes en personas VIH-positivas. La mayoría de los casos fueron en el sureste de Asia, África y regiones del Oeste del Pacífico (35%, 30%, 20% respectivamente) [9].

En México, la TB sigue siendo endémica [10]; aproximadamente 3, 000 personas mueren por esta enfermedad cada año. En el 2007 [11] se registraron 16,964 casos de TB en todas sus formas clínicas, con una tasa de 16.03 por cada 100 mil habitantes, disminuyendo un 12.4% respecto a la tasa registrada en el 2000, cuando se identificaron 18,434 casos con una tasa de 18.3 por cada 100 mil personas. Del total de los casos clínicos en 2007, 14,281 correspondieron a TB pulmonar (13.5 por 100 mil habitantes), lo que representó una disminución de 15.1% respecto a los 15,649 casos del 2000. Se presentan patrones de concentración con tasas de incidencia elevadas, principalmente en occidente y Golfo de México y con menor incidencia en los estados del centro. Tamaulipas, Baja California, Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Sonora, Oaxaca y Chihuahua concentran 70% de los casos identificados en el país. La tasa entre los estados varía de 2.3 en Tlaxcala a 35.3 en Baja California, lo que refleja el riesgo a enfermar.

Se han realizado esfuerzos para controlar y erradicar la TB [12]. Por ejemplo, la vacunación contra la TB con la cepa atenuada de *M. bovis* (especie del complejo Mtb) denominada bacilo Calmette-Guérin (BCG) en honor a los científicos que aislaron al bacilo [13]. La vacunación con BCG ha disminuido de manera importante la TB de diseminación hematogena, sobre todo la TB meníngea. Sin embargo, en contra de la TB pulmonar en adultos no han dado los resultados esperados sobretodo en regiones pobres del mundo [14, 15].

### III.3. El agente etiológico de la tuberculosis.

Mtb, el agente causal de la TB, es un bacilo en forma de bastoncillo y es un patógeno intracelular facultativo [16, 17]. De acuerdo a estudios genéticos [18, 19] se sugiere la clasificación de las micobacterias en dos grupos: el complejo Mtb, que incluye Mtb, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. caprae*, que es la causa primaria de la TB tanto en humanos como en animales (silvestres y domésticos), y el complejo micobacteriano no tuberculoso (patógenos oportunistas como *M. avium*, *M. marinum* y *M. kansasii*), no causan TB, pero pueden causar la enfermedad en individuos inmunosuprimidos.

La clasificación taxonómica de *Mycobacterium tuberculosis* es:

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

- GÉNERO: *Mycobacterium*

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

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

Mtb presenta características de bacteria Gram positiva, de acuerdo a filogenia bacteriana basada en la secuencia 16S del ARN ribosomal, debido a su contenido alto de G+C, formando un grupo monofilético con la bacteria *Bacillus subtilis* de bajo contenido de G+C; y también tiene características de bacteria Gram negativa, porque en árboles genéticos basados en la conservación de genes, muestra mayor número de genes ortólogos para la producción de energía y conservación con bacterias Gram-negativas, en particular, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, algunos análisis indican que Mtb no está relacionada con ninguno de los dos grupos [20].

### III.3.A. Filogenia de *M. tuberculosis*

En un estudio reciente se determinó la filogenia del complejo Mtb de acuerdo con la distribución de 20 regiones variables, resultado de los eventos de inserción y delección de los genomas del bacilo de la TB en la evaluación de 100 cepas de Mtb, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti* y *M. bovis* [21]. La mayoría de los polimorfismos no ocurrieron de forma independiente en las diferentes cepas del complejo Mtb, sino más bien, es resultado de eventos genéticos irreversibles de la cepa progenitora. En base a la presencia o ausencia de una delección específica en Mtb (TbD1), se identifican una cepa ancestral y una moderna. Además, pérdidas sucesivas de ADN, como cambio en la región 9 y otras delecciones subsecuentes, se evaluaron para representar un linaje

evolutivo de *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis* que divergieron del progenitor de la cepa Mtb actual antes de que ocurriera la delección TbD1. Estas observaciones contradicen la hipótesis que Mtb, el agente causal de la TB humana, evolucionó a partir de *M. bovis*, el agente causal de la TB bovina. *M. canettii* y cepas ancestrales de Mtb carecen de estas delecciones, por lo tanto parece ser que son descendientes directos del bacilo antes de que existiera el linaje *M. africanum* y *M. bovis* separados del linaje de Mtb. Estas observaciones sugieren que el ancestro común del bacilo de la TB se asemeja a Mtb o *M. canetti* y podría haber sido un patógeno humano desde entonces.

#### III.3.B. Resistencia de *M. tuberculosis* a fármacos.

El término “*multidrogo-resistencia*” (MDR) define a una variedad de Mtb [22] recuperada del paciente que presenta resistencia por lo menos a isoniazida (H) y rifampina (R). Parecido a MDR el término “*drogo-resistencia*” (DR) se usa para definir la resistencia a dos o más medicamentos de primera-línea anti-TB utilizados en México como H, R, etambutol (E), pirazinamida (Z) y estreptomina (S). Estudios sobre la resistencia de TB en México han incluido algunas regiones geográficas alrededor del país como Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Veracruz, Sinaloa, Jalisco, Estado de México, Distrito Federal, Oaxaca y Chiapas [10].

#### III.4. Etiopatogenia de la tuberculosis.

La relación entre el agente infeccioso y el hospedero así como el ambiente, influyen en el curso de la infección [23]. Generalmente en las personas infectadas, se establece un equilibrio de coexistencia entre el hospedero y el agente. En la mayoría de las personas, la infección primaria, independientemente de la edad en la que ocurre, pasa desapercibida sin progresión a la enfermedad activa. Esto sucede si la carga bacilar y la

virulencia son bajas y la resistencia del individuo es alta [23]. En situaciones contrarias a las anteriores, si la multiplicidad del bacilo es alta, la infección progresa a la enfermedad, como por ejemplo, en presencia de la malnutrición y co-infecciones con VIH [24]. Cuando la población se expone al bacilo de Mtb, entre el 70-90% no presentan infección; mientras que el 10-30% presentan la infección. De estos el 90% manifiesta una infección latente sin desarrollo de la TB, pero el 10% restante muestra una infección activa en algún momento de su vida. De este 10% que presenta la enfermedad activa sólo el 5% desarrollará TB dentro de 2 años siguientes y el otro 5% desarrolla o no la TB muchos años después, si se trata la enfermedad a tiempo podrían curarse pero sin tratamiento, el 50% morirá dentro de los 2 años siguientes.

#### III.4. A. Fagocitosis de *M. tuberculosis*

La membrana de Mtb tiene biomoléculas con un alto contenido de manosa, incluyendo lipoarabinomanana fosfomioinositol cubierto o no cubierto (PILAM y AraLAM), manosidos fosfatidilmioinositol de bajo o alto orden (PIM1, PIM2 y PIM6), lipomanana, arabinomana, manana y glicoproteínas manosiladas como LpqH [25].

El MR participa en la homeostasis de glicoproteínas de alto contenido de manosa o fucosa [25]. En la infección por Mtb el MR regula negativamente la respuesta inflamatoria facilitando la infección, ya que impide la fusión fagolisosomal. La bacteria interacciona con el MR debido a sus componentes manosilados en la superficie celular, por medio de las vías fagocíticas ManLAM/MR y PIMs/MR permitiendo el arresto de la maduración del fagosoma [26]. Además, el reconocimiento de residuos de manosa en la bacteria por el MR reduce la actividad microbicida del macrófago inhibiendo la producción de óxido nítrico, radicales de oxígeno y citocinas proinflamatorias;

reduciendo la actividad de Mtb en la inducción de apoptosis donde se modifica la vía de señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  [25].

### III.5. Respuesta inmune a *M. tuberculosis*

Mtb se introduce por la vía aérea en pequeñas gotitas (conteniendo de 1 a 3 bacilos) hasta llegar a los sacos alveolares del pulmón donde es ingerido por MØs alveolares, células del sistema inmune innato que actúan como la primera barrera contra la infección [27]. El bacilo evade por diferentes vías las propiedades antibacterianas del macrófago permitiendo que resida y se replique en el nicho intracelular protegido. El macrófago infectado libera quimiocinas, atrayendo monocitos y otras células inflamatorias al pulmón. El reconocimiento inmune de Mtb por células fagocíticas permite la activación celular y una rápida producción de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas y quimiocinas reclutan células de la inflamación (células T, neutrófilos, monocitos y células natural killer NK) en las zonas de la infección, activando la migración celular, y coordinando la inflamación y la respuesta inmune adaptativa a Mtb. Los monocitos se diferencian a MØs e ingieren las micobacterias las cuales pueden bloquear la fusión fagolisosomal impidiendo su destrucción. En este estado la micobacteria crece logarítmicamente y se acumulan dentro de los MØs derivados de monocitos de la sangre produciendo daño tisular. Dos o tres semanas después de la infección las células T son activadas por las células presentadoras de antígeno que han fagocitado bacterias activándose así la respuesta inmune adquirida, liberándose citocinas proinflamatorias como  $\text{INF-}\gamma$  el cual activa a los MØs para matar a las micobacterias intracelulares. En estas condiciones se presentan diferentes escenarios: la infección se vuelve latente o

puede ser progresiva en el pulmón y algunas veces puede haber diseminación hematogénea [27].

El éxito de la infección por la micobacteria depende de la red de citocinas establecida y mantenida por los MØs [28]. Los MØs participan en la fagocitosis y muerte del bacilo, así como en la activación de la respuesta inmune adaptativa de las células T [27]. En la fagocitosis de las micobacterias participan los receptores de complemento, el MR, el receptor de la proteína surfactante A (Sp-A), el receptor scavenger de la clase A, manosa con unión a lectina (MBL) y posiblemente también dectina-1. En MØs humanos, los receptores primarios para Mtb son el MR y el receptor de complemento 3 (CR3). Las células dendríticas humanas usan DC-SIGN y no se ha encontrado la participación significativa de CR3 o MR [28].

### III.6. Apoptosis.

El término apoptosis fue por primera vez utilizado por Kerr, Wylie y Currie en 1972 para distinguir morfológicamente una forma distinta de muerte celular, aunque ciertos componentes del concepto apoptosis ya se habían descrito previamente [29, 30, 31].

La apoptosis es una forma de muerte celular programada en la cual actúan mecanismos genéticos de eliminación celular. También se ha descubierto que la necrosis puede ser una forma programada de muerte celular [32, 33, 34]. Se estima que para mantener la homeostasis en el cuerpo humano, alrededor de 10 mil millones de células mueren por apoptosis cada día [35]. La apoptosis es importante en la conformación del repertorio inmunológico; 95% de las células inmaduras que llegan al timo procedentes de la médula ósea mueren en apoptosis. Un proceso de selección semejante se lleva cabo con las neuronas en el sistema nervioso central [36, 37].

La apoptosis se caracteriza morfológicamente por condensación de la cromatina con picnosis nuclear, disminución del volumen celular y formación de microvesículas [38]. Hay diferentes modificaciones bioquímicas como son la activación de proteasas como las caspasas y enzimas que degradan proteínas y el ADN. La apoptosis es un proceso altamente regulado de destrucción celular que confina los contenidos citoplásmicos de las células muertas dentro de vesículas membranales (cuerpos apoptóticos) que expresan señales en su superficie que promueven la fagocitosis [39]. Una de las señales de los CAs es la exposición de la fosfatidilserina (PS), como una señal temprana de la apoptosis [40].

Los mecanismos de la apoptosis son altamente complejos dependientes de energía y de cascadas moleculares. La apoptosis puede iniciarse por dos vías dependientes de caspasas: una es la forma extrínseca donde participan receptores y ligandos de muerte y otra la intrínseca o mitocondrial; estas vías pueden interactuar [42].

La vía extrínseca implica la unión de ligandos a receptores de muerte en la membrana celular. Entre estos receptores se encuentran la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF); que poseen dominios extracelulares ricos en cisteína y generalmente están compuestos de 80 a.a. Los ligandos y sus correspondientes receptores de muerte incluyen FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 [43, 44, 31, 37, 45]. La unión de Fas ligando a su receptor Fas da como resultado la unión de la proteína adaptadora FADD, y la unión del ligando TNF al receptor de TNF permite la unión de la proteína adaptadora TRADD, la cual recluta a FADD y RIP [46, 47]. FADD se une a la procaspasa 8 dimerizando el dominio efector de muerte; posteriormente se forma un complejo inductor de muerte (DISC),

permitiendo la activación autocatalítica de la vía de la caspasa 8 [48]. Una vez activada la caspasa 8 inicia la cascada de caspasas de la apoptosis. Los dominios de muerte de la apoptosis son regulados mediante proteínas inhibidoras como c-FLIP la cual se une a FADD y caspasa 8 [49, 50].

La vía intrínseca (vía mitocondrial) es activada por daño al ADN y drogas citotóxicas. Este estímulo causa cambios a nivel de la membrana mitocondrial interna y se altera la permeabilidad de la transición mitocondrial (MTP) formando poros y pérdida del potencial de membrana mitocondrial, permitiendo la liberación de dos grupos de proteínas proapoptóticas desde el espacio intermembranal al citosol [51]. El primer grupo está constituido por el citocromo *c*, Smac/DIABLO (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria), y proteasas de serina HtrA2/Omi, estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasas. El citocromo *c* se une y activa Apaf-1 y a la procaspasa 9 formando el apoptosoma, la caspasa 9 activa a las caspasas efectoras iniciándose la cascada de caspasas [52, 53]. El segundo grupo de proteínas proapoptóticas está formado por el grupo AIF, endonucleasa G y CAD, las cuales son liberadas desde la mitocondria en la apoptosis, pero son eventos tardíos después que se ha iniciado la muerte celular [54]. Las proteínas que regulan la vía mitocondrial de la apoptosis son la familia Bcl-2 anti-apoptóticas y pro-apoptóticas [55, 53]. Alrededor de 25 genes han sido identificados en la familia Bcl-2 incluyendo proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG y algunas proteínas proapoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Estas proteínas son importantes porque pueden promover la apoptosis o la pueden suprimir [56].

Las tres vías convergen en la misma terminal o en el comienzo de otra vía, la cascada de caspasas [57, 58]. Esta vía comienza con la activación de la caspasa 3, la cual activa CAD, una enzima que degrada el DNA; además la caspasa 3 actúa sobre otros sustratos como son proteínas nucleares y del citoesqueleto. Las caspasas tienen una actividad proteolítica y pueden romper proteínas en sus residuos de ácido aspártico, aunque también son específicas en el reconocimiento de amino ácidos cercanos. Las caspasas se dividen en iniciadoras entre ellas se ubican las caspasas 2, 8, 9, 10; otro grupo son las efectoras formadas por las caspasas 3, 6, 7 y las caspasas involucradas en la inflamación como 1, 4, 5 [57, 58].

### III.7. Apoptosis en la tuberculosis.

Cuando la célula huésped se confronta con un patógeno que usa los recursos del huésped para sobrevivir y replicarse, una estrategia de la célula huésped para defenderse es activar la apoptosis [39]. Muchos patógenos que sobreviven satisfactoriamente codifican genes cuyos productos suprimen la apoptosis de la célula del huésped, así conservan el nicho para replicarse, como la infección a MØs por Mtb.

En 1997 Keane et al. [59] fue el primero en reportar que la infección de MØs alveolares por Mtb en una multiplicidad de infección (MOI) es aproximadamente de 5 bacilos por célula. Este número es suficiente para inducir apoptosis por la vía extrínseca, mediada por TNF- $\alpha$  de manera autocrina y paracrina. La mayoría de los estudios que se han hecho muestran que las micobacterias inducen apoptosis a MØs a través de la vía extrínseca [39]. Mtb activa la expresión de TNF- $\alpha$  y de Fas, así como de sus receptores celulares TNF [60]. Este fenómeno parece relacionarse con la activación río arriba de TLR-2 por componentes micobacterianos. Mtb como patógeno intracelular induce

apoptosis por medio de LpqH, un posible ligando del TLR2 así como en la preopsonización del bacilo; también en esta vía se activan la caspasa 8 y caspasa 3 independientemente de la vía mitocondrial de la apoptosis [50]. Otras moléculas que inducen apoptosis que han sido identificadas en Mtb son ESAT-6 y PE-PGRS [50, 61, 62, 63].

En cuanto al significado de la apoptosis, se ha observado que la cepa atenuada de Mtb (H37Ra), induce mucho más apoptosis que la cepa virulenta (H37Rv) a pesar de su comparable producción de TNF- $\alpha$  [65]. De acuerdo con lo anterior es consistente la hipótesis de que Mtb previene la apoptosis como un mecanismo cuyo fin aparente es la preservación de su nicho celular. Mtb virulenta suprime la apoptosis interfiriendo la señal de TNF- $\alpha$  y FasL [64]. Así mismo las cepas virulentas inducen la expresión de Mcl-1, una proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2 [39]. Recientemente se ha demostrado que las cepas virulentas de Mtb expresan genes que inhiben la apoptosis del macrófago infectado [65].

En respuesta a la infección con Mtb se ha observado que los MØs expresan genes que promueven la apoptosis, mientras que las cepas virulentas inducen genes que inhiben dicha expresión [66]. Es de interés que la viabilidad de la micobacteria disminuye cuando el macrófago entra en apoptosis. Otro mecanismo que demuestra que la apoptosis inducida por Mtb funciona como mecanismo de inmunidad innata es la presentación de antígeno micobacteriano por células dendríticas para la activación de linfocitos T, siendo mayor cuando se activan las células con bacilos incorporados en CAs [Mancilla R y col.; observaciones no publicadas].

### III.8. Fagocitosis de células y cuerpos apoptóticos.

La apoptosis de las células y su fagocitosis es clave en el desarrollo embrionario, mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y en la eliminación de patógenos [23]. Las células apoptóticas son fagocitadas y eliminadas por MØs lo que evita la respuesta inflamatoria y fenómenos de autoinmunidad [67, 68].

En el proceso biológico de fagocitosis [41], las células especializadas son capaces de distinguir entre los patógenos y sus propias células, gracias a la expresión en su superficie de moléculas de reconocimiento que interactúan con moléculas presentes en la superficie del patógeno. Las células fagocíticas profesionales del sistema inmune innato utilizan un amplio rango de receptores y opsoninas para discriminar células viables de patógenos y células muertas, y es esencial en la eliminación de lo no propio y alterado por medio de la fagocitosis. Para esto los MØs utilizan receptores “scavenger”, como SR-A, LOX-1, CD68, CD36, CD14; moléculas solubles de unión a lectinas como C1q, la lectina de unión a manosa, SP-A, SP-D, los receptores de integrinas como el receptor de complemento 4  $\alpha\chi\beta 2$ , receptor de complemento 3  $\alpha m\beta 2$ , receptor de vitronectina  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ , moléculas de unión al receptor de fosfatidilserina como Mer, receptor de  $\beta 2$ -GPI, receptor de vitronectina  $\alpha\nu\beta 3$ , entre otros [69]. Así mismo las células fagocíticas reconocen células apoptóticas por la exposición de patrones moleculares asociados a las células apoptóticas [41]. De acuerdo a estudios de inhibición de la fagocitosis de células apoptóticas con azúcares se ha demostrado un 50% de inhibición con Nag; esto sugiere que los carbohidratos en la superficie de las células apoptóticas tienen alteraciones específicas como glicosilaciones incompletas, esto permite que sean fagocitados a través de receptores tipo lectina de los MØs [70].

Los MØs y las células dendríticas, ya sea en un contexto pro o anti inflamatorio asociado, son las principales presentadoras de antígenos de las células fagocitadas por apoptosis [41]. La fagocitosis de células apoptóticas tempranas es dependiente de la cantidad y cualidad de señales fagocíticas positivas (señales “eat-me”) y negativas (señales “don’t- eat-me) [41]. Las señales “eat-me” como PS no están totalmente ausentes en células viables, pero es necesario un nivel suficiente de PS para iniciar la fagocitosis. La activación de la apoptosis produce una modificación o desaparición de las señales “don’t-eat-me” como CD47, CD31 y CD46, esto favorece la fagocitosis de las células apoptóticas. También es importante la presencia o ausencia de opsoninas del suero indicando señales fagocíticas positivas o negativas que tal vez dominen sobre otras señales fagocíticas. Los CAs son reconocidos y ávidamente ingeridos por medio de receptores de superficie de los fagocitos profesionales debido a la pérdida de la simetría membranal exponiendo señales “eat-me” como la PS [39], el proceso es llamado eferocitosis. La unión de CAs a MØs estimula la expresión de citocinas anti inflamatorias incluyendo el factor de necrosis tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) e interleucina-10 (IL-10). Para suprimir la inflamación se piensa que estas citocinas ayudan a limitar el daño al tejido si es que el contenido intracelular, particularmente enzimas degradativas, fueron liberadas al espacio extracelular [39]. En las células apoptóticas la exposición de fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (PS) en la membrana celular puede ser reconocida por receptores de células fagocíticas y opsoninas como la célula T inmunoglobulina mucina (Tim-1) y Tim-4, Estabilina-2, inhibidor 1 de la angiogenesis del cerebro y receptores scavenger, así como la proteína MFGE-8, la glicoproteína b2gp1 y la proteína S; además de la producción de TGF- $\beta$ , necesaria para la regulación

autocrina y paracrina del receptor de PS como un mecanismo de eliminación de las células apoptóticas [41,71]. Se sabe que Anexina 1 colocaliza con PS en las células apoptóticas y la interacción está asociada a la internalización de estas células [37]. Anexina 1 es reclutada desde el citosol a la superficie celular por mecanismos dependientes en la liberación de calcio y activación de caspasas. Un receptor específico para PS (PSR) fue identificado en las células fagocíticas [72] y se reportó su participación en el reconocimiento de células apoptóticas vía Anexina 1 [37, 73].

#### **IV. FUNDAMENTACIÓN.**

En la homeostasis de las poblaciones celulares existe un proceso constante de muerte y renovación celular en el cual las células que mueren por apoptosis son fagocitadas por células vecinas o fagocitos profesionales. En estas circunstancias las células muertas son rápidamente eliminadas evitando así una posible reacción inflamatoria. No hay información acerca de cómo son eliminadas las células apoptóticas inducidas por microbios como el bacilo de la TB. Ya que la remoción o no de CAs en las lesiones granulomatosas pudiera tener un efecto en la respuesta inflamatoria, hemos diseñado este estudio encaminado a conocer los mecanismos de remoción de células apoptóticas inducidas por LpqH, una glicolipoproteína apoptogénica de Mtb.

## **V. HIPÓTESIS.**

En vista de que la glicolipoproteína apoptogénica LpqH de Mtb, que contiene residuos de manosa, se incorpora en los CAs que induce, en la fagocitosis de los CAs inducidos por dicha proteína se presume que participe el MR.

## VI. OBJETIVOS.

### *Objetivo general*

- Entender el mecanismo de fagocitosis de los MØs apoptóticos inducidos por la glicolipoproteína LpqH 19kDa de Mtb.

### *Objetivos particulares*

- Caracterizar la apoptosis de MØs derivados de la médula ósea de ratones Balb/c-J, utilizando paredes de *M. smegmatis* transformada, la cual expresa la glicolipoproteína apoptogénica de Mtb *LpqH*.
- Caracterizar la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos e investigar la participación del receptor de manosa.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

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

Los MØs se obtuvieron a partir de la epífisis del fémur de ratones de la cepa Balb/c-J, en medio RPMI-1640 (Gibco BAL Products, USA) con 2 gr de bicarbonato de sodio por litro de RPMI-1640 suplementado al 20% con suero fetal bovino inactivado por calor a 50 °C, 1% aminoácidos no esenciales, 1% piruvato de sodio y 1% de un antimicótico (Gibco BRL Products, Rockville, MD). Las células se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y los MØs derivados de monocitos de médula ósea se cultivaron durante 10 días y se purificaron por adherencia al plástico en cajas Petri (Costar, Corning Incorporated, NY). La viabilidad celular se estimó por exclusión del azul tripano.

Los MØs de la línea monocítica J-774 se cultivan en RPMI-1640 (Gibco BAL Products, USA) con 2gr de bicarbonato de sodio por litro de RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino inactivado por calor a 50°C, 1% aminoácidos no esenciales, 1% piruvato de sodio y 1% de un antimicótico (Gibco BRL Products, Rockville, MD). Las células se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, los MØs se aislaron por la adherencia al plástico en cajas de 12 pozos (Costar, Corning Incorporated, NY) 0.5x10<sup>6</sup> MØs por pozo. La viabilidad celular se estimó por exclusión del azul tripano.

VII.2. Cultivo de *M. smegmatis* nativa y *M. smegmatis* transformada que expresa la glicolipoproteína de 19 kilodalton de *M. tuberculosis*.

Se cultivaron *M. smegmatis* (mc2155), nativa y *M. smeg-LpqH*; esta última es una cepa transformada con el plásmido p16R1 que contiene un fragmento SmaI de 1.8-kb codificador para el gen estructural de la glicolipoproteína LpqH de *Mtb* (donadas por Y.

Zhang, MCR TB and Related Infections Unit, Hammersmith Hospital, London, UK).

Por estudios previos realizados en el laboratorio se sabe que esta glicolipoproteína induce un alto grado de apoptosis [60]. Las bacterias se cultivaron en Middlebrook 7H9 (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD), suplementado con 2% de glucosa e higromicina B (50mg/ml). La presencia de LpqH en la cepa transformada y su ausencia en la cepa nativa se corroboraron por Western blot con el anticuerpo monoclonal para LpqH IT-19 (donado por Colorado State University). Las bacterias se cultivaron de 5 a 6 días.

### VII.3. Obtención de paredes micobacterianas.

Ya que LpqH es una lipoproteína de pared se obtuvieron las paredes de las 2 cepas *M. smegmatis* de la siguiente manera: las bacterias se trataron con ázida de sodio al 2%, se lavaron con PBS y se sometieron a ultrasonicación en hielo (20 ciclos de 5 min a 60 Hz con intervalos de 1 min). La fracción de pared se recobró por centrifugación a 20, 000 rpm por 20 min. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Pierce Endogen, Rockford, IL).

### VII.4. Ensayos de apoptosis o inducción de apoptosis.

Antes de inducir la apoptosis los MØs derivados de médula ósea de la cepa Balb/c-J se marcaron con CFSE (carboxifluorosceína succinimidil ester); (Molecular Probes-Invitrogen, TM, USA) un fluoróforo intracelular que marca proteínas por su interacción con grupos amino, diluido 1:1000 en PBS del stock 20µl/ml, durante 10 min a 37 °C.

Para inducir apoptosis se incubaron  $0.5 \times 10^6$  células con 50 µg de sonicado de *M. smegmatis* LpqH y *M. smegmatis* nativa como control. El período de incubación fue de 24 hr. Para corroborar la apoptosis se realizó el método TUNEL (Terminal dUTP Nick END-

Labeling; Roche Diagnostics, Germany). Además se incubaron las células apoptóticas con Anexina V (BioLegend, USA) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para su análisis por citofluorometría de flujo (FACScan).

VII.5. Purificación de cuerpos apoptóticos con microesferas magnéticas recubiertas con Anexina V.

Se obtuvieron tres tipos de Cas centrifugando las células tratadas con *M. smeg-LpqH* a 1500 (5 min), 5000 (5 min) y 32,500 rpm (30 min). Posteriormente se purificaron con microesferas magnéticas recubiertas con Anexina V, con el kit de purificación celular MACS (Miltenyi Biotec, Germany); este método se basa en la interacción entre la fosfatidilserina translocada en la superficie de los Cas y la Anexina V en las microesferas magnéticas.

VII.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio e Immunoblot.

La concentración de proteína de las paredes micobacterianas y los CAs se determinó por el método de Lowry (Pierce Endogen, Rockford, IL) y se separaron en geles de poliacrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE), desnaturizante, al 15%, por medio del sistema discontinuo de Laemmli y se corrieron a 120 mV durante 1:30 hr. Para observar el perfil de proteínas de las paredes micobacterianas y de los CAs, algunos geles se tiñeron con azul de coomasie durante 1 hr y se lavaron con solución desteñidora por 2 hr. Otros geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (350 mA por 40 min) y se bloquearon con leche Svelti al 3% en PBS por 1hr. Para observar la presencia de LpqH en las paredes micobacterianas y en los CAs se incubaron las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo monoclonal para LpqH IT-19 en dilución 1:1000 en PBS incubando toda la noche (donado por Colorado State University). Después de lavar con

PBS-Tween (2 veces por 5 min) y PBS 1x (1 vez por 5 min) se utilizó como segundo anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa en dilución 1:1000 por 1 hr. Para revelar las membranas de nitrocelulosa se utilizó un kit de quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), y después se agregó solución reveladora (10ml de PBS-Tween, 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 3 $\mu$ g de 3' 3 tetracloruro de diaminobenzidina, DAB) durante 10 min.

#### VII.7. Ensayos de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.

Se realizaron ensayos de fagocitosis de los diferentes tipos de CAs, con MØs de la línea monocítica J-774 marcados con el kit PKH-26 (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO) un fluoróforo lipofílico que marca fosfolípidos de las membranas celulares. Se incubaron 0.5x10<sup>6</sup>MØs de la línea J-774 con 50 $\mu$ g de CAs durante 4 y 24hr; posteriormente se fijaron con 1% paraformaldehído y después se lavaron dos veces con PBS.

VII.8. Ensayos de inhibición de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos con carbohidratos competidores del receptor de manosa y con un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del receptor de manosa.

Para identificar los receptores macrofágicos e indirectamente los ligandos micobacterianos involucrados en el proceso de fagocitosis, se hicieron ensayos de inhibición preincubando las células (0.5x10<sup>6</sup>) con Nag (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO) 50 $\mu$ M y manana (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO) 5 mg a 0.5x10<sup>6</sup> durante 30 min. Para el mismo fin se preincubaron las células con un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del MR (CD206 anti-human, BioLegend, USA) 5 y 10  $\mu$ g por 0.5x10<sup>6</sup> MØs durante 30min. Después se incubaron las células con CAs (50 $\mu$ g proteína) durante 4hr, se fijaron con 1% paraformaldehído y se lavaron dos veces con PBS.

VII.9. Ensayo de inhibición de la de la expresión del receptor de manosa y de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por medio de un ácido ribonucleico de interferencia para el receptor de manosa.

Para identificar la participación del MR en la remoción de células apoptóticas por la glicolipoproteína apoptogénica de Mtb LpqH, se utilizó un siRNA para el MR, con la secuencia GAACAAAGAUCCACUGACU, el cual se obtuvo de Thermo Scientific Dharmacon (USA). Para transfectar a los MØs de la línea monocítica J-774 con el siRNA se trataron con oligofetamina (Molecular Probes-Invitrogen, TM, USA) (7.35 µl en 490 µl de medio, sin suero) por 10 minutos. En seguida se incubaron las células ( $0.2 \times 10^6$  con siRNA a dosis de 15, 30, 60 y 90 pmol durante 64 hr). Después, se incubaron las células con los CAs (50ug proteína) durante 4h, se fijaron con 1% paraformaldehído y se lavaron dos veces con PBS. En estos ensayos las células programadas para fagocitar se marcaron con PKH-67 (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO) y las células apoptóticas con PKH-26. Para medir la expresión del MR se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-MR (CD206 anti-human, BioLegend, USA) el cual fue reconocido por un segundo anticuerpo IgG marcado con Cy5 (Molecular Probes-Invitrogen, TM, USA).

Posteriormente las células se analizaron por citometría de flujo para evaluar en algunas la expresión del MR y en otras la fagocitosis de los CAs.

VII.10. Análisis de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.

El porcentaje de células fagocitadas se analizó por citofluorometría de flujo y microscopia de epifluorescencia. Los datos fueron analizados con los programas FlowJo 7.6 e Image J y se realizó una prueba de Student't simple de una cola. La significancia

estadística fue asumida con el valor de  $P \leq 0.05$ . Las barras representan el error estándar de las medias (SEM).

## VIII. RESULTADOS.

VIII.1.- Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio e Immunoblot de *M. smegmatis* transformada que expresa la glicolipoproteína de 19 kilodalton de *M. tuberculosis*.

Para inducir apoptosis a los MØs de médula ósea se utilizó la pared de *M. smeg-LpqH* porque LpqH es una proteína altamente apoptogénica de Mtb [62, 73], en la pared de *M. smeg-LpqH* se encuentran diferentes proteínas de Mtb reconocidas por el suero hiperinmune del filtrado de cultivo de Mtb H37Rv y una de ellas es LpqH la cual es reconocida por el anticuerpo monoclonal IT-19 (Fig.1).

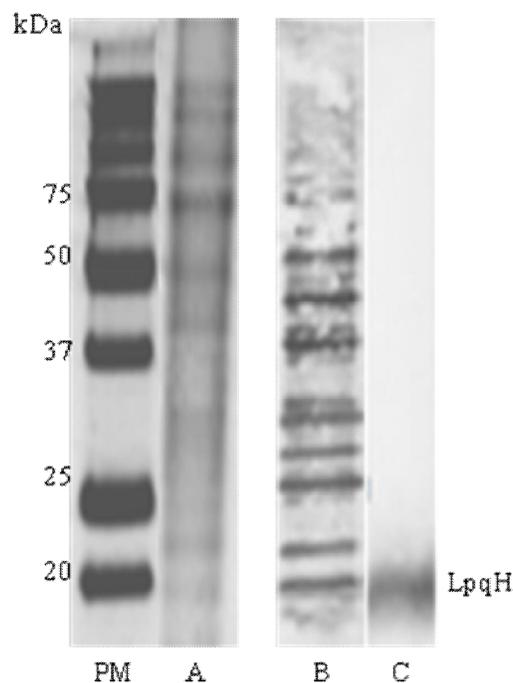
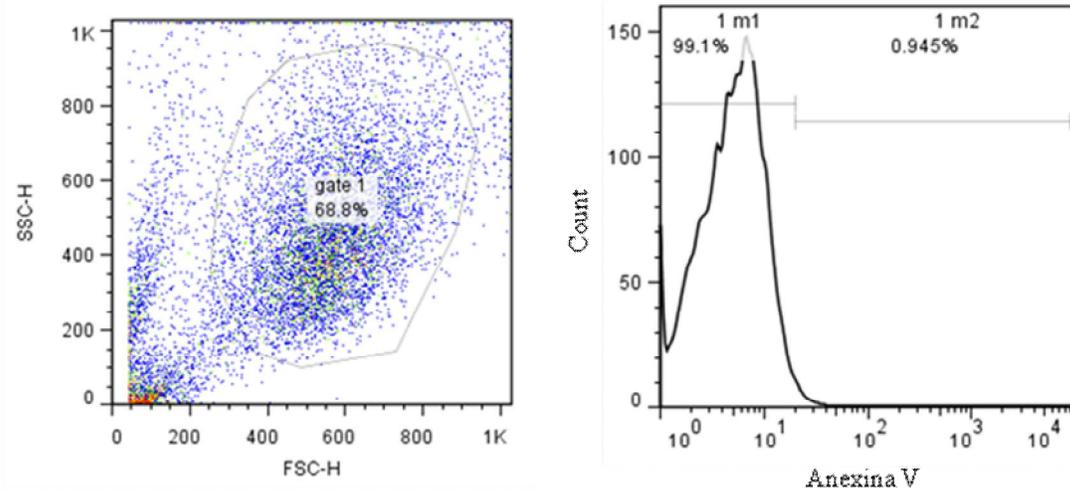


Fig.1. SDS-PAGE (A) y Western blot de la pared de *M. smeg-LpqH*. Se observan las proteínas reconocidas por el suero hiperinmune (B) y LpqH de 19kDa reconocida por el anticuerpo monoclonal IT-19 (C).

## VIII.2.-Análisis de la inducción de apoptosis.

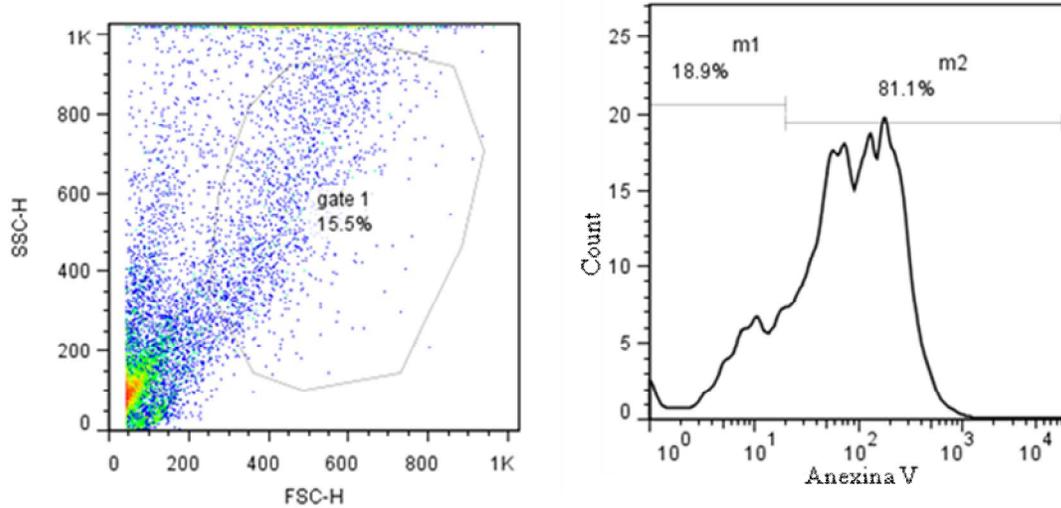
En los ensayos incubando MØs derivados de médula ósea de ratones de la cepa Balb-c/J con la pared de *M. smeg-LpqH*, se analizó la inducción de apoptosis por citofluorometría de flujo utilizando Anexina V-FITC, la cual interacciona con la fosfatidilserina que durante el proceso de apoptosis temprana se traslada del citosol a la superficie celular [39]. La inducción de apoptosis fue altamente eficiente; en múltiples ensayos la apoptosis varió del 80 al 90% (Fig. 2). La apoptosis se analizó por microscopia de epifluorescencia marcando los núcleos con Dapi, un marcador de DNA e incubando las células con Anexina V marcada con FITC (Fig. 3); en varios experimentos se observó apoptosis en 70-92% de las células con núcleos Dapi positivos. Lo anterior indica que la pared de *M. smeg-LpqH* induce apoptosis la cual, probablemente, se debe en parte a la glicolipoproteína apoptogénica LpqH.

A



No tratado

B



Células apoptóticas

Fig. 2. Análisis de la inducción de apoptosis por citofluorometría. Imágenes representativas de 3 diferentes experimentos. (A) Células sin inducción de apoptosis. (B) Se observó que 81% de células eran AnnexinaV-FITC positivas.

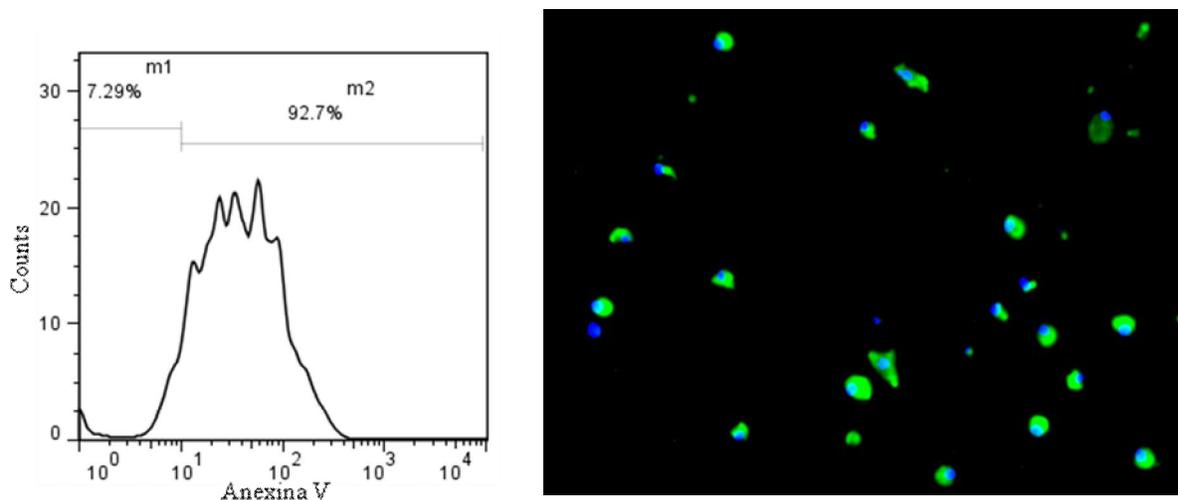


Fig. 3. Citometría de flujo e imagen de epifluorescencia de células a las que se les indujo apoptosis. Las células se purificaron en una columna de Miltenyi usando microesferas recubiertas con Anexina V. Las células se marcaron con Anexina V-FITC y Dapi 40x. Las dos imágenes son del mismo ensayo.

### VIII.3.- Caracterización de los cuerpos apoptóticos con electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio e Immunoblot.

Los CAs purificados, se analizaron por geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomasie y después de su transferencia a nitrocelulosa, por Western blot para determinar la presencia de proteínas micobacterianas, especialmente LpqH, la cual se identificó con el anticuerpo monoclonal IT-19. En los geles teñidos con azul de Coomasie, junto con otras bandas, se observó una de aproximadamente 19-kDa en la pared de *M. smeg-LpqH* y los CAs obtenidos a 1500 rpm (Fig. 4). Se analizó el perfil de proteínas de los CAs purificados con Anexina V, y después se transfirió a membranas de nitrocelulosa y con el anticuerpo IT-19 se identificó LpqH en los CAs purificados, así como en la pared de *M. smeg-LpqH* (Fig. 5).

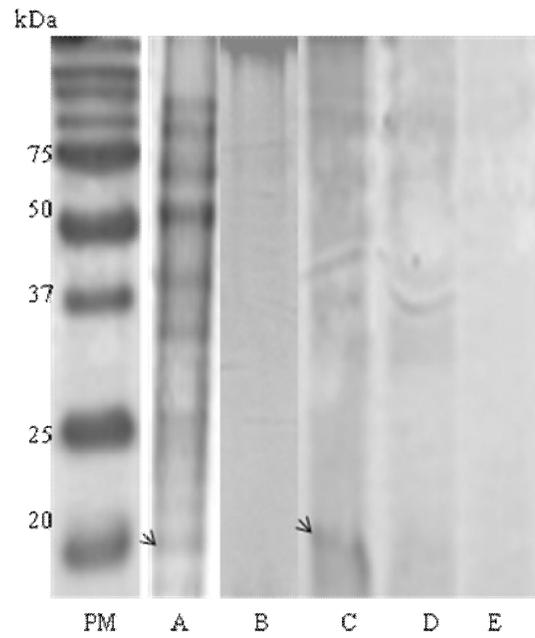


Fig. 4. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de los CAs inducidos con *M. smeg-LpqH*. (A). CAs inducidos con LpqH y purificados, obtenidos por centrifugación a 1500 (C), 5000 (D) y 32,500 rpm (E). Las flechas señalan una proteína 19kDa. B, CAs inducidos con luz ultravioleta.

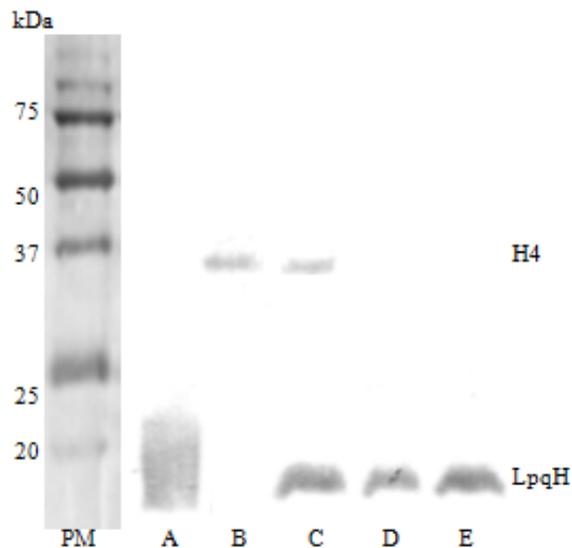


Fig. 5. Western blot de la Figura # 4 de CAs inducidos con *M. smeg-LpqH* purificados con perlas magnéticas recubiertas con Anexina V y obtenidos por centrifugación a 1500 (C), 5000 (D) y 32,500 rpm (E). Se utilizó el anticuerpo monoclonal IT-19 que reconoce LpqH de 19kDa. A, pared de *M. smeg-LpqH*; B, CAs inducidos con luz UV. Con un anticuerpo monoclonal se demostró la presencia de la histona H4 de 35kDa (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA).

#### VIII.4.-Análisis de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por citometría de flujo.

Los MØs derivados de la médula ósea de ratones de la cepa Balb/c-J se marcaron con CFSE antes de inducirles apoptosis y se purificaron con perlas magnéticas forradas con Anexina V. Los CAs marcados con CFSE se incubaron con MØs J-774 previamente marcados con PKH-26, durante 4 y 24 horas. La fagocitosis se analizó por citofluorometría de flujo observándose que a las 4 hr de incubación la fagocitosis de

CAs obtenidos a 1500 rpm era de  $29.73\% \pm 12.7$  y a las 24 hr de  $44.46\% \pm 7.85$ . La fagocitosis de los CAs obtenidos a 5000 rpm fue a las 4 hr de 45.1% y a las 24 hr de 34.52 %. Con CAs obtenidos a 32,500 rpm las fagocitosis a las 4 hr fue de 20.5% y a las 24 hr el promedio de 2 ensayos fue de 61.04 % (Fig. 6).

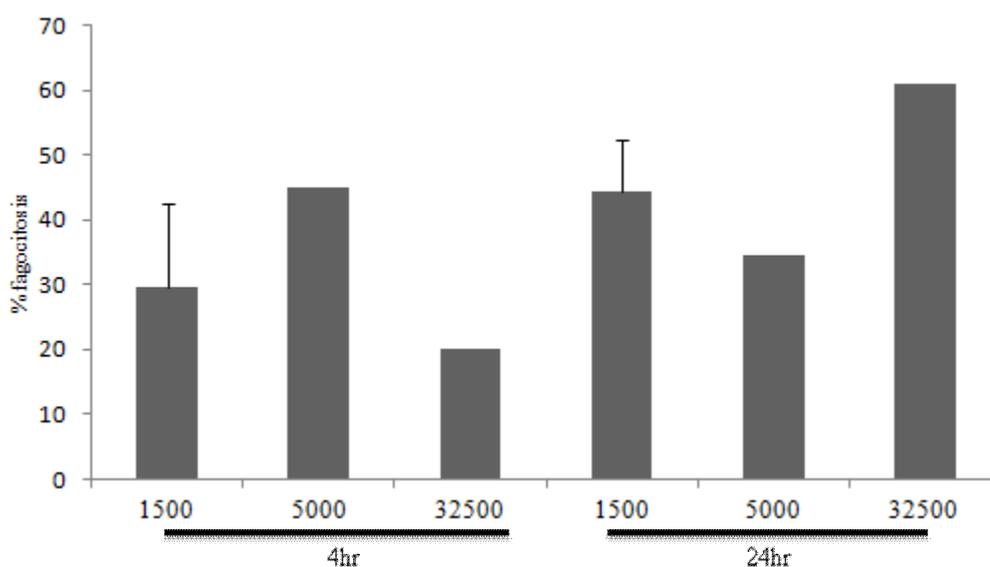


Fig. 6. Análisis por citometría de flujo de la fagocitosis de los CAs purificados con Anexina V por MØs J-774. Se realizaron 7 ensayos incubando por 4 hr  $0.5 \times 10^6$  células con  $50 \mu\text{g}$  de CAs obtenidos por centrifugación a 1500rpm y 4 ensayos a 24 hr; a 4 hr  $SD \pm 12,5$ , a 24 hr  $SD \pm 7,8$ . Significativamente no diferentes.

#### VIII.5.-Análisis de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por microscopia de epifluorescencia.

Utilizando CAs purificados con Anexina V, por microscopia de epifluorescencia se demostró fagocitosis al detectar la colocación de los CAs (fluorescencia verde) y las células fagocíticas (fluorescencia roja), lo que dio lugar a una fluorescencia amarilla en

los CAs fagocitados. En la Figura # 7 se muestran observaciones representativas hechas a 4 hr con CAs obtenidos a 1500 rpm (Fig. 7). En cuanto a la magnitud de la fagocitosis demostrada por microscopia de epifluorescencia este ilustra en la Figura # 8 la mayor fagocitosis se observo a las 4 hr con CAs obtenidos a 32,500 rpm (74.95 %) y a las 24hr de 32.40%. Con CAs obtenidos a 1500 rpm la fagocitosis a 4 hr fue de  $43.78\% \pm 15.67$  y a las 24 hr de  $38.8\% \pm 15.2$ . La fagocitosis de los CAs obtenidos a 5000 rpm a las 4 hr fue de 61.7% (Fig. 8).

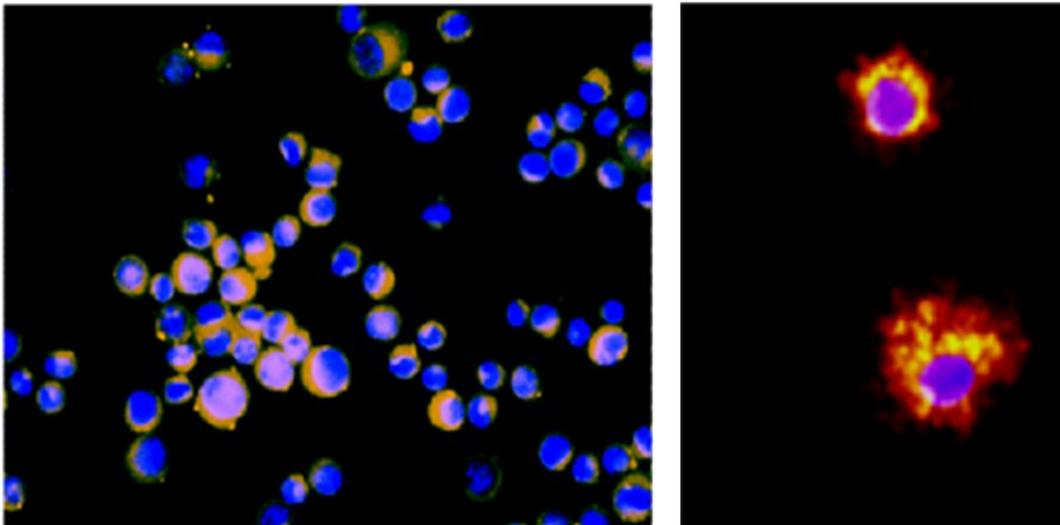


Fig. 7. Análisis de la fagocitosis de CAs por microscopia de epifluorescencia. Se observó la colocalización (fluorescencia amarilla) de los CAs (CFSE, fluorescencia verde) en el citoplasma de los MØs fagocíticos (PKH-26, fluorescencia roja); los núcleos se marcaron con Dapi. Imagen 40x.

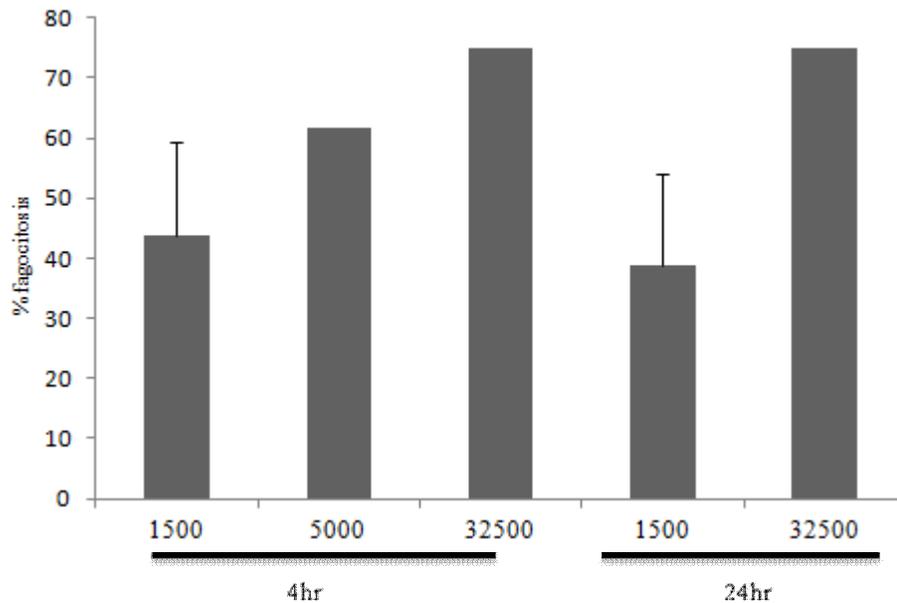


Fig. 8. Análisis por microscopia de epifluorescencia de la fagocitosis de los CAs purificados con Anexina V por MØs J-774. Se realizaron 7 ensayos incubando por 4 hr  $0.5 \times 10^6$  células con 50  $\mu\text{g}$  de CAs obtenidos por centrifugación a 1500 rpm y 3 ensayos a 24 hr; a 4 hr  $\text{SD} \pm 15,67$  a 24 hr  $\text{SD} \pm 15,2$ . Significativamente no diferentes.

#### VIII.6.-Análisis de inhibición de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos con N-acetilglucosamina, manana y un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del receptor de manosa.

Se sabe que el MR reconoce glicoproteínas como Lp<sub>q</sub>H en la fagocitosis de Mtb [75]. Para estudiar la participación del MR en la fagocitosis, se realizaron ensayos de inhibición con azúcares competidores del MR como son la Nag y la manana, así como con un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del MR en ensayos utilizando CAs obtenidos a 1500 rpm. Por citometría de flujo (Fig. 9) se observó mayor inhibición de la

fagocitosis con Nag (52.95%) que con manana (43.08%) a 4 hr de incubación de los CAs purificados con Anexina V. En los ensayos de inhibición de la fagocitosis a 4 hr con el anticuerpo monoclonal en contra del MR, se observó mayor inhibición de la fagocitosis con 10 $\mu$ g (76.7% $\pm$ 3.71%) que con 5 $\mu$ g (49.62% $\pm$ 9.26) (Fig. 10).

Por microscopia de epifluorescencia se observó que la preincubación con manana inhibió la fagocitosis en un 72.3% y con Nag en un 96.35% de CAs purificados con Anexina V y obtenidos a 1500 rpm e incubando con MØs J-774 por 4 hr (Fig. 11). Los ensayos de inhibición analizados por epifluorescencia mostraron a las 4 hr una inhibición de la fagocitosis de 74.14% con 5  $\mu$ g del anticuerpo monoclonal anti-MR; con 10  $\mu$ g la inhibición de la fagocitosis fue de 73.65 % (Fig. 12).

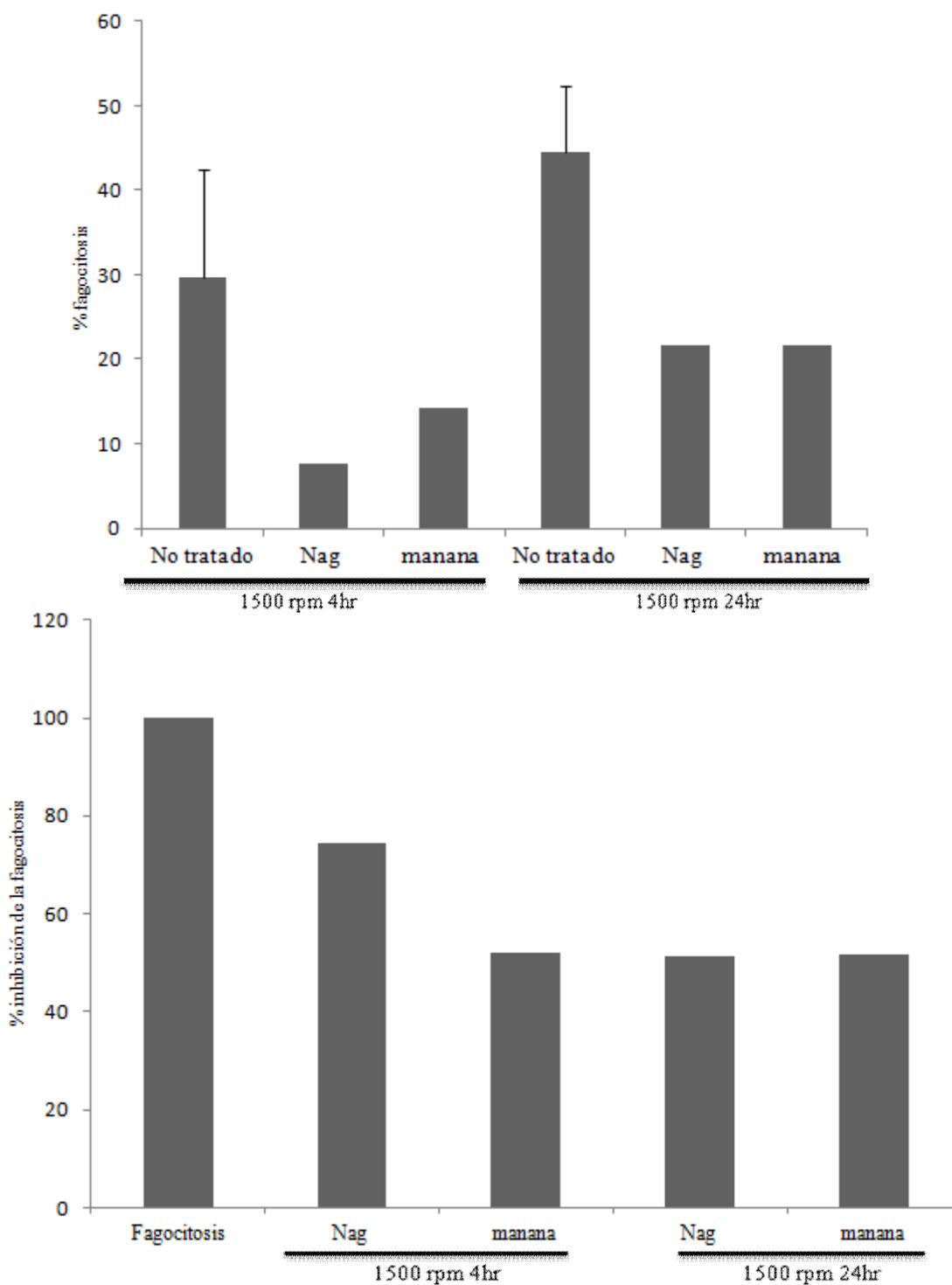


Fig. 9. Análisis por citometría de flujo de la inhibición de la fagocitosis de CAs obtenidos a 1500 rpm por Nag y manana. Se preincubaron  $0.5 \times 10^6$  células con  $50 \mu\text{g}$  de CAs y con los azúcares señalados.

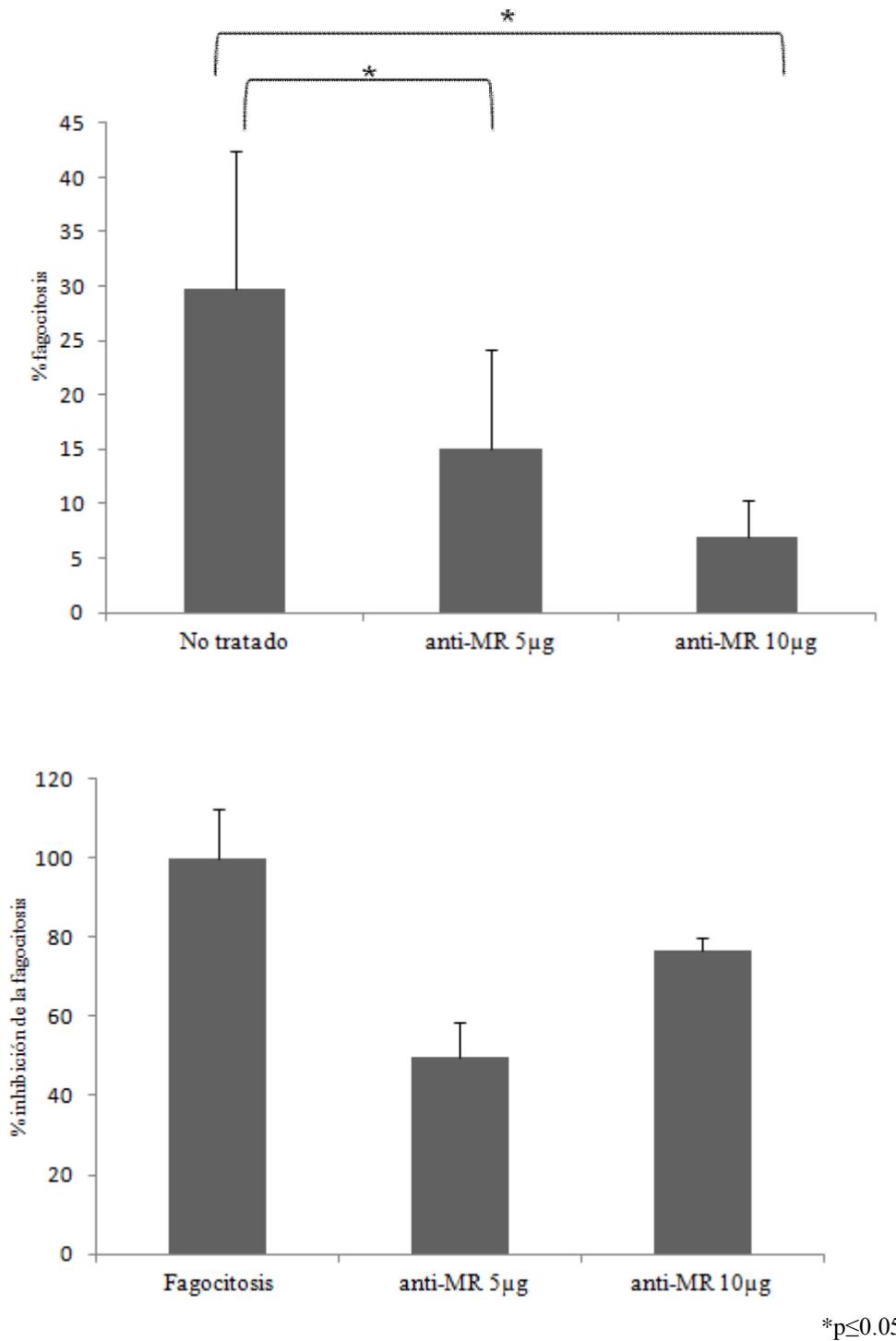
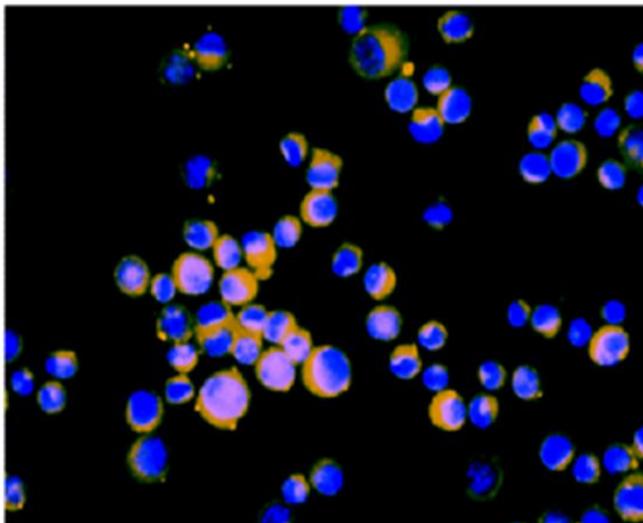


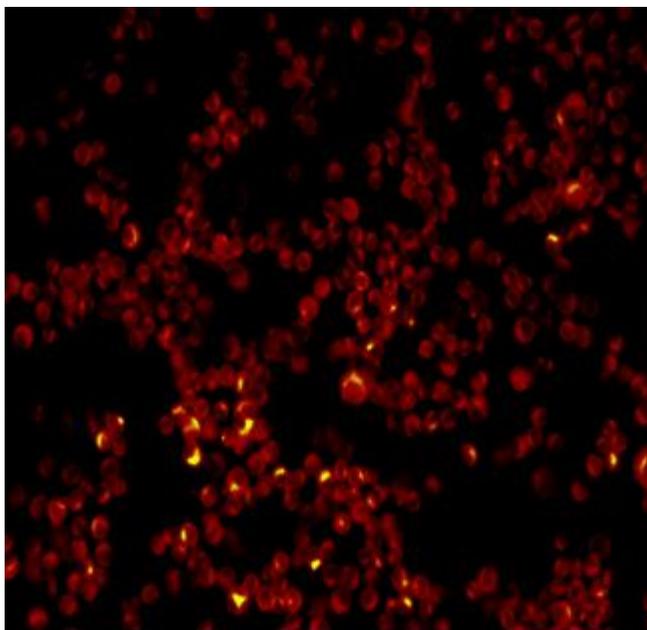
Fig. 10. Análisis de la inhibición de la fagocitosis de CAs purificados con Anexina V y obtenidos a 1500 rpm, con un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del MR. Se incubaron  $0.5 \times 10^6$  células con 50 µg de CAs y con el anticuerpo monoclonal. Los datos presentados se obtuvieron en 5 ensayos independientes. Se observó de  $6\% \pm 3.41$  a  $14\% \pm 9.26$  de fagocitosis a 4hr. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $*p \leq 0.05$ .

A



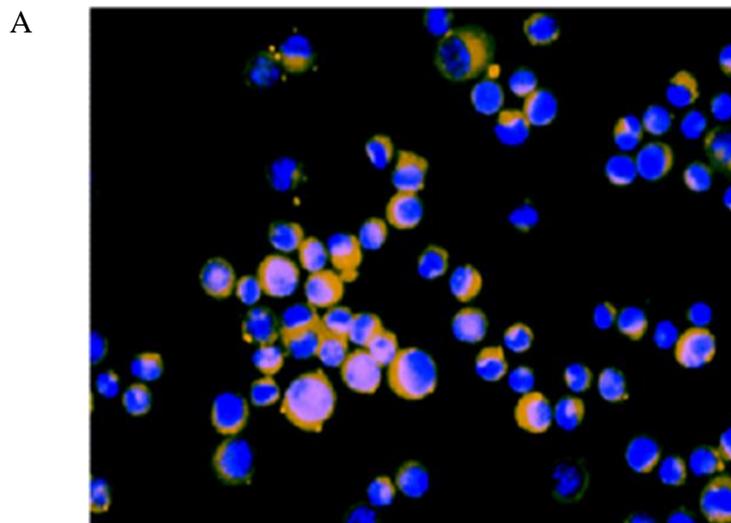
No tratado

B

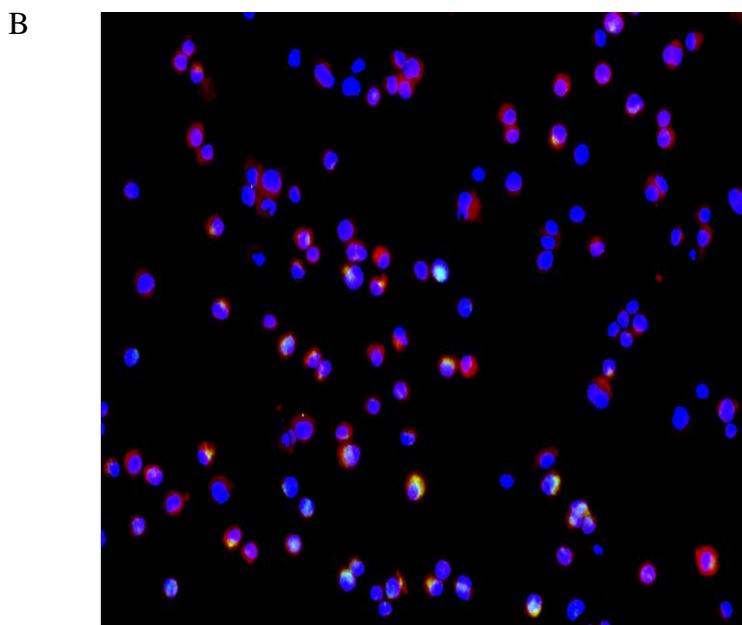


Inhibición con manana

Fig. 11. Análisis de inhibición de la fagocitosis de CAs purificados y obtenidos a 1500 rpm, con 5mg de manana por microscopia de epifluorescencia. En 7 ensayos independientes se observó la colocalización (fluorescencia amarilla) de los CAs (CFSE, fluorescencia verde) en el citoplasma de los MØs fagocíticos (PKH-26, fluorescencia roja); los núcleos se marcaron con Dapi. En este ensayo se observó 55.6% de fagocitosis (A). En 4 ensayos independientes se observó la colocalización (fluorescencia amarilla) de los CAs (CFSE, fluorescencia verde) dentro de los MØs fagocíticos (PKH-26, fluorescencia roja). En este ensayo se observó 4.2% de fagocitosis a 4hr (B). Imágenes 40x.



No tratado



Inhibición con anti-MR

Fig. 12. Análisis de inhibición de la fagocitosis de CAs purificados y obtenidos a 1500 rpm, con 5 $\mu$ g de un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del MR. En 7 en sayos independientes se observó la colocalización (fluorescencia amarilla) de los CAs (CFSE, fluorescencia verde) en el citoplasma de los MØs fagocíticos (PKH-26, fluorescencia roja); los núcleos se marcaron con Dapi. En este ensayo se observó 55.6% de fagocitosis (A). En 4 ensayos independientes se observó la colocalización (fluorescencia amarilla) de los CAs (CFSE, fluorescencia verde) dentro de los MØs fagocíticos (PKH-26, fluorescencia roja); los núcleos se marcaron con Dapi. En este ensayo se observó 15% de fagocitosis a 4 hr. (B). Imágenes 40x.

#### VIII.7.- Análisis de la inhibición de la fagocitosis con un ácido ribonucleico de interferencia específico para el receptor de manosa.

Para estudiar la participación del MR en la fagocitosis de CAs obtenidos a 1500 rpm, se realizó un ensayo de siRNA para el MR. Por citometría de flujo se observó inhibición de la expresión del MR que era dosis dependiente (con 30 pmol del siRNA 67.3%; con 15 pmol 45.45%) (Fig.13). Así mismo se observó que el tratamiento con el siRNA resultó en una disminución paralela, dosis dependiente de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (15 pmol 9.84% de fagocitosis; 30 pmol 6.05%) de manera paralela que la inhibición de la fagocitosis fue mayor con 30 pmol (67.82%) que con 15 pmol (47.64%) del siRNA en contra del MR (Fig. 14).

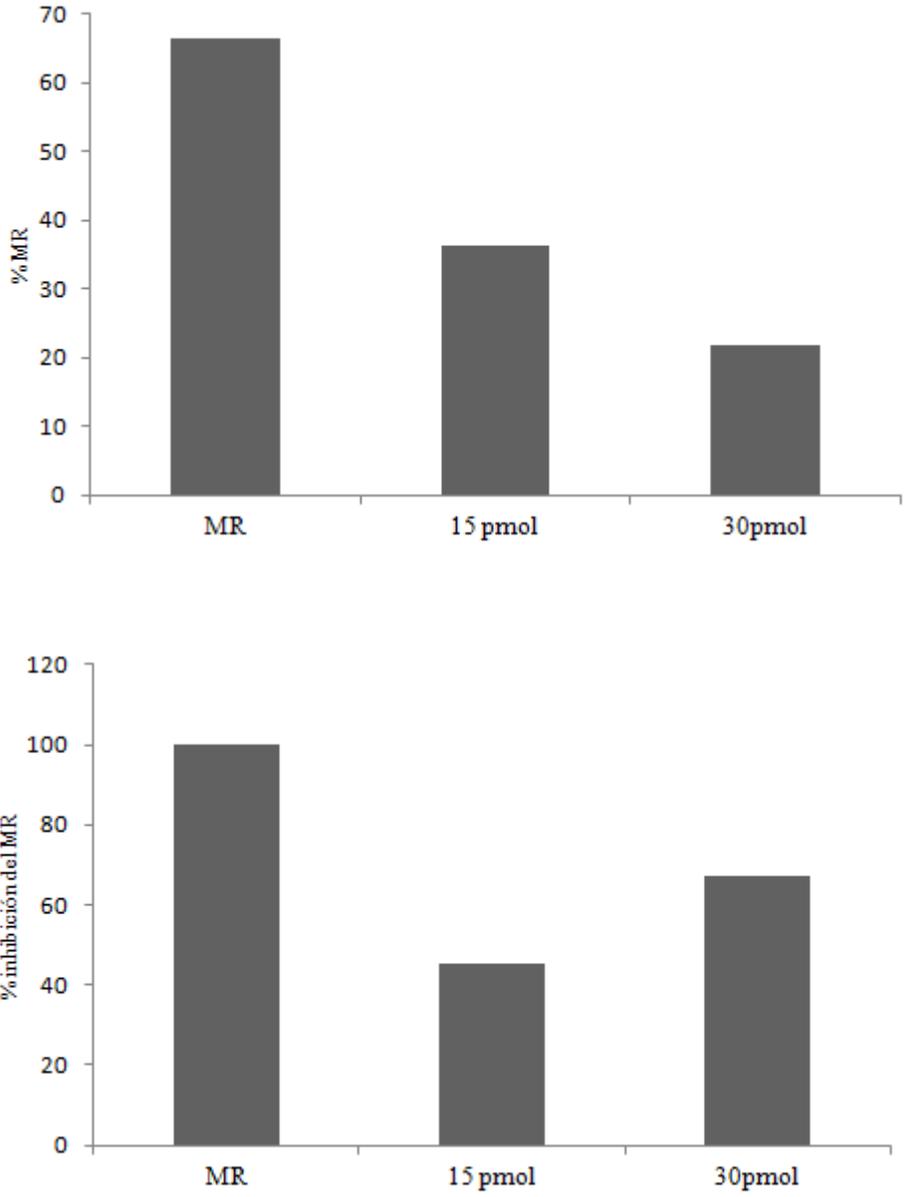


Fig.13. Análisis de la inhibición del MR con un siRNA para MR. Se incubaron  $0.2 \times 10^6$  células con 15 y 30 pmol del siRNA en contra del MR durante 64 hr. El porcentaje de la expresión del MR se midió por citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal anti-MR el cual fue reconocido por un segundo anticuerpo IgG marcado con Cy5.

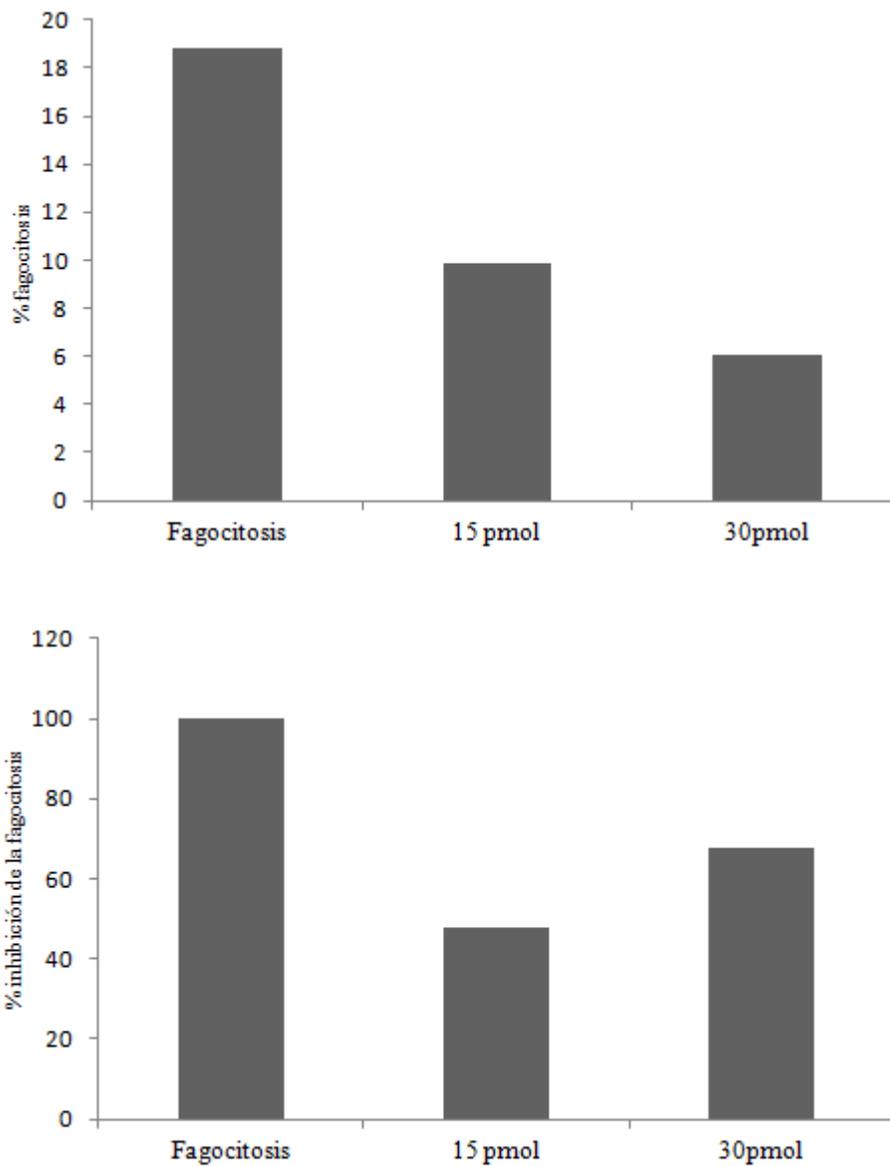


Fig. 14. Análisis de la inhibición de la fagocitosis de CAs purificados con Anexina V y obtenidos a 1500 rpm, con un siRNA en contra del MR (MRC1). Se incubaron  $0.2 \times 10^6$  células con 15 y 30 pmol del siRNA en contra del MR durante 64 hr y después con 50  $\mu$ g de CAs durante 4 hr.

## IX. DISCUSIÓN.

En condiciones fisiológicas, la apoptosis es un fenómeno de homeostasis presente en todos los sistemas biológicos cuyo propósito aparente es mantener el equilibrio de las poblaciones celulares, eliminando células muertas para dar paso a nuevas poblaciones celulares. La apoptosis o muerte celular programada se da a través de un proceso que requiere gasto de energía y se lleva a cabo por cascadas de señalización [35].

Se ha estimado que al día mueren en apoptosis aproximadamente  $1 \times 10^9$  células. La eliminación de las células apoptóticas es primordial para el mantenimiento de la homeostasis en mamíferos [76, 77, 78, 79, 80]. En las fases iniciales las células apoptóticas preservan la integridad de la membrana y previenen la liberación de contenido intracelular potencialmente inflamatorio e inmunogénico.

La fagocitosis de las células apoptóticas se lleva a cabo por fagocitos profesionales, tanto MØs como células dentríticas, y fagocitos no profesionales que pueden ser células epiteliales, endoteliales y fibroblastos. Siendo los fagocitos profesionales los que exhiben una mayor eficiencia y capacidad fagocítica por sus características biológicas [81].

En la primera fase de la apoptosis la fagocitosis se lleva a cabo por moléculas que funcionando como opsoninas se unen a la fosfatidilserina translocada en la membrana plasmática durante el proceso de apoptosis; dichas moléculas incluyen la proteína MFGE-8, la glicoproteína b2gp1 y la proteína Gas-6, ligandos que son reconocidos por integrinas, Mer cinasas y receptores de tipo “scavenger” [82]. En fases más tardías las células apoptóticas pueden unir proteínas como C1q, proteína c reactiva, pentraxinas y proteínas surfactantes que juegan también el papel de opsoninas en la fagocitosis por

MØs a través de los receptores correspondientes [82]. Además, en las etapas tempranas de la apoptosis, las células liberan señales que ayudan a la atracción de fagocitos, por ejemplo los nucleótidos trifosfatados, lisofosfatidilcolina y la quimiocina CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> [80, 83, 84, 85]. Otros receptores involucrados en la remoción de células muertas son el receptor de la partícula LDL oxidada (LOX-1), la macrosialina CD68, los receptores del complemento 3 y 4, el receptor de la fosfatidilserina [86, 87, 88, 89]; se ha sugerido que ICAM3 alterada presente en la superficie de las células apoptóticas facilita la unión al receptor para lipopolisacárido CD14 [90]. Las células apoptóticas ingeridas son procesadas en el fagolisosoma [91, 92, 93, 94,95]. La fagocitosis de CAs por MØs estimula la producción de citocinas anti-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral-β (TNF-β) e interleucina-10 (IL-10), que suprimen la inflamación evitando daño tisular [39].

Cuando la eliminación de las células apoptóticas no es eficiente, la membrana celular pierde su integridad y las células apoptóticas pueden progresar a la necrosis secundaria. En estas condiciones la liberación del contenido intracelular incluso ADN, induce una respuesta inflamatoria. Así mismo hay observaciones que muestran que la remoción deficiente de células muertas da lugar a fenómenos autoinmunes como la artritis reumatoide y en el lupus eritematoso sistémico [96, 97, 98, 99].

Esta investigación fue motivada en parte por la falta de información en la literatura sobre los mecanismos de fagocitosis de MØs que han muerto en apoptosis inducida por Mtb o sus moléculas apoptogénicas. Por otra parte consideramos la posibilidad de que la fagocitosis de células que mueren en apoptosis en las lesiones granulomatosas de la TB podría tener importancia en la patogénesis de esta infección. Extrapolando con lo que se

sabe acerca de la remoción de células apoptóticas que mueren en condiciones de homeostasis, consideramos que una eliminación deficiente podría dar lugar a necrosis y así aumentar la respuesta inflamatoria.

En este trabajo se utilizó la glicolipoproteína LpqH de Mtb incorporada en la pared de *M. smeg-LpqH* para inducir apoptosis. Se han publicado ya estudios que documentan la capacidad apoptogénica para MØs de esta proteína, [50, 60, 62, 73]. LpqH es una molécula de gran actividad biológica que además de su capacidad apoptogénica inhibe la producción de óxido nítrico y la expresión de iNOS por MØs y disminuye la presentación de antígeno [100, 101]. En vista de la presencia de grupos acyl, LpqH es un ligando de TLR2 [50, 101, 102]. Por otra parte es una proteína O-glicosilada que contiene residuos de manosa [103]. LpqH induce apoptosis dependiente de caspasas 8 y 3 con la participación mitocondrial ya que activa caspasa 9 y se ha demostrado la translocación nuclear del factor inductor de apoptosis (AIF) [Mancilla R. y col; observaciones no publicadas].

En este estudio, para evitar riesgos biológicos, en lugar de bacilos para inducir apoptosis utilizamos paredes de una cepa saprofita, *M. smegmatis*, la cual fue transformada con plásmidos que codifican LpqH de Mtb. Se purificaron los CAs con microesferas magnéticas recubiertas de Anexina V, porque se sabe que la fosfatidilserina translocada en la superficie celular de las células apoptóticas interacciona con la Anexina V. La purificación de CAs se considero necesaria para eliminar la pared de *M. smeg-LpqH* que podría inducir apoptosis de la célula fagocítica, así como para eliminar células viables.

Un hallazgo de interés fue que por Western blot se logró demostrar que la glicolipoproteína LpqH estaba incorporada en los CAs, lo que concuerda con observaciones previas por microscopía confocal que muestran que LpqH se localiza en los CAs y en la membrana de las células apoptóticas en fase temprana [Mancilla R. y col; observaciones no publicadas]. Esta fue una de las observaciones que motivo nuestra investigación ya que sugirió la posibilidad de que las células apoptóticas pudieran ser fagocitadas a través del reconocimiento de la glicolipoproteína micobacteriana, específicamente de sus residuos de manosa, los que podrían interactuar con el MR del macrófago. Aquí conviene señalar que la fagocitosis de la micobacteria a través del MR es permisiva para la subsistencia del bacilo al interior del macrófago, pues se observa bloqueo de la fusión del fagosoma con el lisosoma [26]. Además el reconocimiento de residuos de manosa por el MR reduce la producción de óxido nítrico, radicales de oxígeno y citocinas proinflamatorias [103].

Las observaciones anteriores son de interés en lo que concierne al posible papel de carbohidratos en la fagocitosis de CAs. Sin embargo, el papel de los receptores macrofágicos de tipo lectina como los receptores de manosa y DC-SIGN en la fagocitosis de células apoptóticas no ha sido estudiado pero existen observaciones que lo sugieren. Las células que mueren en apoptosis cambian su patrón de glicosilación y exponen en la superficie celular carbohidratos de moléculas del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico [104]. Los carbohidratos que se exponen incluyen fucosa, galactosa, Nag, N-Acetilgalactosamina y manosa. Este fenómeno es más evidente en fases tardías de la apoptosis [104]. Por otra parte se sabe que lectinas de origen vegetal, carbohidratos en la superficie de las células apoptóticas como *Narcissus*

*pseudonarcissus* que interacciona con manosa y *Griffonia simplicifolia* y *Ulex europaeus* que reconocen Nag y fucosa respectivamente; estos azúcares son residuos terminales de glicoproteínas inmaduras durante su proceso en RE y Golgi. En células no apoptóticas estos azúcares son intracelulares y en estadios tardíos de la apoptosis los azúcares son expuestos en la membrana plasmática [105, 106].

En esta investigación inicialmente se estudio la fagocitosis de CAs purificados con perlas magnéticas recubiertas con Anexina V y obtenidos a 1500, 5000 y 32,500 rpm; lo anterior porque hay en la literatura datos que sugieren que la actividad biológica de los CAs varía de acuerdo a su tamaño y método de purificación [67]. Sin embargo, posteriormente se decidió utilizar únicamente los CAs obtenidos a 1500 rpm ya que con los tres tipos de CAs la microscopia de epifluorescencia mostró que los CAs fagocitados eran muy pequeños, rara vez del tamaño de una célula apoptótica; esto nos sugirió que durante la fagocitosis y aun antes, los CAs se degradan de tal manera que independientemente de la velocidad de la centrifugación usada los CAs terminan siendo de tamaño semejante.

En los primeros ensayos dirigidos a identificar el receptor involucrado en la fagocitosis de CAs, se hicieron ensayos de inhibición utilizando azúcares competidores del MR como son Nag y manana obteniéndose una inhibición parcial (43% a 52% de inhibición respectivamente), indicando la participación de otros receptores que no se investigaron en este estudio. Además estos resultados, aun cuando sugestivos, requerían de otros más específicos. Por lo anterior se hicieron ensayos de inhibición de la fagocitosis con un anticuerpo monoclonal anti-MR, descrito en la literatura como bloqueador de la fagocitosis. Estos estudios confirmaron la suposición inicial de este

estudio de que el MR esta involucrado en la fagocitosis de CAs, ya que con 5  $\mu$ g la inhibición fue de 49 % y con 10  $\mu$ g del 76 %. Para tener un grado de certeza aun mayor se realizó un estudio categórico de inhibición de la expresión del MR con una secuencia de ácido ribonucleico diseñada de tal manera que interfiera con la transcripción del mensaje para la síntesis del MR (siRNA). En un solo estudio se obtuvieron resultados muy alentadores ya que la expresión del MR se vio disminuida (hasta un 67 % con 30 pmol de siRNA). Igualmente hubo una disminución marcada de la fagocitosis de CAs de hasta un 67 % con 30 pmol. Estos estudios deben de repetirse para obtener datos estadísticamente válidos y que descarte satisfactoriamente la posibilidad de citotoxicidad del procedimiento del siRNA.

En nuestras condiciones experimentales mostramos que el MR participa en la fagocitosis de CAs por medio de la unión a residuos de carbohidratos, posiblemente que podrían ser manosa o Nag expuestos en la superficie de los CAs. Estos residuos podrían estar presentes en lectinas que se han expuesto o intercambiado a la superficie celular durante el proceso de apoptosis. También es posible que el MR esté reconociendo residuos de manosa presentes en la glicoproteína LpqH inductora de la apoptosis, ya que como se ha demostrado dicha proteína se localiza en la superficie de las células que mueren en apoptosis inducida por la glicolipoproteína LpqH de Mtb. Hay que señalar que seguramente en la fagocitosis de CAs participan múltiples receptores entre ellos el MR. Este es un hallazgo original de este estudio hasta donde nos ha sido posible investigar y no ha sido previamente reportado.

## X. CONCLUSIONES.

- La pared de *M. smegmatis* transformada que expresa la glicolipoproteína LpqH de Mtb induce apoptosis a MØs derivados de médula ósea de la cepa Balb/c-J.
- Los CAs inducidos por la pared de *M. smegmatis* transformada contienen la glicolipoproteína apoptogénica LpqH.
- Los MØs J-774 fagocitan CAs con gran avidez.
- Los azúcares Nag y manana y un anticuerpo monoclonal bloqueador en contra del MR inhiben significativamente la fagocitosis de CAs.
- El siRNA para el MR es capaz de inhibir de manera dosis dependiente la fagocitosis de CAs y la expresión del MR en el tratamiento con el siRNA.
- La conclusión final es que el MR participa en la fagocitosis de CAs inducidos por la glicolipoproteína LpqH de Mtb.

## XI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Smith N. H., Hewinson R.G., Kristin Kremer K., Brosch R., Gordon S.V. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature Reviews Microbiology. 2009. 7: 537-544.
2. WHO. Global TB control report 2006. [www.who.int/tb/publications/global\\_report/2006](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006) 2006.
3. Dormans J., Burger M., Aguilar D., Hernandez-Pando R., Kremer K., Roholl P., Arend S.M., Van Soolingen D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. Clin Exp Immunol. 2004. 137:460-468.
4. Schluger, N.W. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2005. 32: 251-256.
5. Iwai K., Maeda S., Murase Y. Archaeology of tubercle bacilli and tuberculosis. Kekkaku. 2010. 85 (5):465-475.
6. García J.E. La tuberculosis en los antiguos peruanos. Actualidad Médica Peruana 1940. 5: 274-91.
7. Sotomayor H., Burgos J., Arango M. Demostración de tuberculosis en una momia prehispánica colombiana por la ribotipificación del ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. Colombia.Biomédica. 2004. 24 (1): 18-26.
8. Lucke K. Microbiological diagnosis of tuberculosis. Ther Umsch. 2011. 68 (7): 376-3780.

9. Kurasawa T. Epidemiology of tuberculosis in the world and Japan. *Nihon Rinsho*. 2011. 69 (8): 1351-1355.
10. Zazueta-Beltran J., León-Sicairos C., Canizalez-Roman A. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J Infect Developing Countries*. 2009. 3 (3): 162-168.
11. CENA VECE. Secretaria de Salud. Dirección General Adjunta de Epidemiología. Plataforma Única de Información, módulo tuberculosis. México. 2007.
12. Atun R., Weil D.E.C., Eang M. T., Mwakyusa D. Health-system strengthening and tuberculosis control. *Tuberculosis* 7. 2010. 375: 2169-2178.
13. Brodin P., Majlessi L., Brosch R., Smith D., Bancroft G., Clark S., Williams A., Leclerc C., Cole S. T. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant *Mycobacterium microti* vaccine that induces T cell immunity against region of difference 1 antigens. *The Journal of Infectious Diseases* 2004. 190:115–22.
14. Roche P. W., James A., Triccas J. A., Winter N. BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes. Elsevier Science. 1995. 3 (10): 397-400.
15. Xing Z., Charters T.J. Heterologous boost vaccines for bacillus Calmette-Guérin prime immunization against tuberculosis. *Expert Rev Vaccines*. 2007. 6 (4): 539-46.
16. Cox G.L. Sanatorium treatment contrasted with home treatment. After-histories of 4067 cases. *Br.J. Tuberc*. 1923. 17:27-30.

17. Vrba A., Kwiatkowska S. *Mycobacterium tuberculosis*--intracellular pathogen. Relationship between mycobacteria and the host. *Pol Merkur Lekarski*. 2009. 27 (162): 508-513.
18. Veyrier F. J., Dufort A., Behr M. A. The rise and fall of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Trends in Microbiology*. 2011. 19: 156-161.
19. Sierra R. F., Cerros S., Herrera P. Ventajas del cultivo en un equipo automatizado y la prueba de PCR para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista mexicana de Patología Clínica*. 2004. 51 (2): 70-74.
20. Fu L.M., Fu-Liu C.S. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens?. *Tuberculosis (Edinb)*. 2002; 82 (2-3):85-90.
21. Brosch R., Gordon S. V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L.M., Pym A.S., Samper S., Soolingen D., Cole S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS*. 2002. 9 (6): 3684-3689.
22. Secretaría de Salud. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993. Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. *Diario Oficial de la Federación*, 2000. Octubre: 9-33.
23. Gothi, G.D. Natural history of tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis*. 1997. 25 (2): 1-13.
24. Krishnan N., Malaga W., Constant P., Caws M., Hoang-Chau T.T., Salmons J., Ngoc-Lan N. T., Duc-Bang N., Daffe M., Young D.B., Robertson B. D., Guilhot C., EThwaites G. E. *Mycobacterium tuberculosis* lineage influences innate

- immune response and virulence and is associated with distinct cell envelope lipid profiles. PLoS One. 2011. 6 (9): 1-16.
25. Sasindran S. J., Torrelles J. B. *Mycobacterium tuberculosis* infection and inflammation: what is beneficial for the host and for the bacterium?. Front Microbiol. 2011. 2: 1-16.
26. Kang P.B., Azad A.K., Torrelles J.B., Kaufman T.M., Beharka A., Tibesar E., DesJardin L.E., Schlesinger L.S. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. J Exp Med. 2005. 202(7):987-99.
27. Kleinnijenhuis J., Marije Oosting M., Leo A. B. Joosten L. A. B. , Netea M. G., Crevel R. V. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and Developmental Immunology. 2011. 2011: 1-12.
28. Berrington W. R., Hawn T. R. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? Immunol Rev. 2007. 219:167-186.
29. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972. 26:239–257.
30. Kerr J.F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. Toxicology.2002. 181–182:471–474.

31. Paweletz N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2001. 2:72–5.
32. Debnath J., Baehrecke E.H., Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy.*2005. 1:66–74.
33. Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G.E., Capaccioli S., Orlandini S.Z. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol.* 2000. 182:41–49.
34. Sperandio S., Belle I., Bredesen D.E. An alternative, non- apoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. 97:14376–14381.
35. Igney F.H., Krammer P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002. 2:277–288.
36. Nijhawan D., Honarpour N., Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 23:73–87.
37. Renehan A.G., Booth C., Potten C.S. What is apoptosis, and why is it important?. *Bmj.*2001. 322:1536–1538.
38. Winau F., Weber S., Subash S., Juana de Diego, Locatelli H. S., Breiden B., Sandhoff K., Volker B., Kaufmann H.E.S., Schaible U.E. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* January 2006. 24:105–117.

39. Lee J., Hartman M., Kornfeld H. Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei Med Journal*. 2009. 50(1):1-11.
40. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407:770–776.
41. Poon I.K.H., Hulett M. D., Parish C.R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death and Differentiation*. 2010. 17:381–397.
42. Opferman J.T., Korsmeyer S.J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*. 2003. 4:410–415.
43. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998. 281:1305–1308.
44. Chicheportiche Y., Bourdon P.R., Xu H., Hsu Y.M., Scott H., Hession C., Garcia I., Browning J.L. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997. 272:32401–32410.
45. Sperandio S., Belle I., Bredesen D.E. An alternative, non- apoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. 97:14376–14381.
46. Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995. 81:495–504.
47. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002. 296:1635–1636.

48. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Kramer P.H., Peter M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 1995. 14:5579–5588.
49. Kataoka T., Schroter M., Hahne M., Schneider P., Irmeler M., Thome M., Froelich C.J., Tschopp J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol.* 1998. 161:3936–3942.
50. Lopez M., Sly M. L., Luu Y., Young D., Cooper H., Reiner N.E. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J. Immunol* 2003. 170:2409-2416.
51. Saelens X., Festjens N., Walle L. V., van Gurp M., van Loo G., Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004. 23:2861–2874.
52. Chinnaiyan A.M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.*1999. 1:5–15.
53. Hill M.M., Adrain C., Duriez P.J., Creagh E.M., Martin S.J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J.* 2004. 23:2134–2145.
54. Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y., Ravagnan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham A.,

- Hakem R., Yoshida H., Kong Y.Y., Mak T.W., Zuniga- Pflucker J.C., Kroemer G., Penninger J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001. 410:549–554.
55. Cory S., Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002. 2:647–656.
56. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007. 35 (4): 495–516.
57. Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997. 326 (1):1–16.
58. Rai N.K., Tripathi K., Sharma D., Shukla V.K. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2005. 4:138–144.
59. Keane J., Balcewicz-Sablinska M.K., Remold H.G., Chupp G.L., Meek B.B., Fenton M.J., et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997. 65:298-304.
60. Sanchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scand J Immunol*. 2009. 69(1):20-8.
61. Basu S., Pathak S.K., Banerjee A. Execution of macrophage apoptosis by PE-PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*. 2007. 282:1039–1050.

62. Ciaramella A., Martino A., Cicconi R., Colizzi V., Fraziano M. Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates *Mycobacterium tuberculosis* induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection. *Cell Death Differ.* 2000. 7: 1270–1272.
63. Derrick S.C., Morris S.L. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol.* 2007. 9:1547–1555.
64. Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1998. 160(11):5448-54.
65. Miller JL, Velmurugan K, Cowan MJ, Briken V. The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF-alpha-mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathog.* 2010. 6(4): 1-14.
66. Klinger K., Kam-Meng Tchou-Wong, Brändli O., Aston C., Kim R., Chuanxiang C., Rom W. N. Effects of Mycobacteria on Regulation of Apoptosis in Mononuclear Phagocytes. *Infection and Immunity.* 1997. 65 (12): 5272–5278.
67. Schiller M., Bekerredjian-Ding I., Heyder P., Blank N., Ho A.D., Lorenz H.M. Autoantigens is translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death and Differentiation.* 2008. 15:183–191.

68. Hart S. P., Dransfield I., Rossi A.G. Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods*. 2008. 44: 280-285.
69. Erwig L.P., Henson P.M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*. 2008. 15: 243–250
70. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *British Medical Bulletin*. 1997. 53 (3): 491-508.
71. Fadok V.A., Laszlo D.J., Noble P.W., Weinstein L., Riches D.W., Henson P.M. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J Immunol*. 1993. 151(8):4274-4285.
72. Rubio-Moscardo F., Blesa D., Mestre C., Siebert R., Balasas T., Benito A., Rosenwald A., Climent J., Martinez J.I., Schilhabel M., Karran E.L., Gesk S., Esteller M., deLeeuw R., Staudt L.M., Fernandez-Luna J.L., Pinkel D., Dyer M.J., Martinez-Climent J.A. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005. 106:3214–3222.
73. Wieland, C. W., Koppel, E. A., den Dunnen, J., Florquin, S., McKenzie, A. N., van Kooyk, Y., Van Der, P. T., and Geijtenbeek, T. B. Mice lacking SIGIRR have stronger T helper 1 responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2007. 9. 134–141.

74. Ciaramella A., Cavone A., Santucci M. B., Garg S. K., Sanarico N., Bocchino M., Galati D., Martino A., Auricchio G., D’Orazio M., Stewart G. R., Neyrolles O., Young D. B., Colizzi V., Fraziano M. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 $\beta$  by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of Mycobacterial infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004. 190:1167–76.
75. Díaz-Silvestre H., Espinosa-Cueto P., Sanchez-Gonzalez A., Esparza-Ceron M.A., Pereira-Suarez A.L., Bernal-Fernandez G., Espitia C., Mancilla R. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb Pathog*. 2005. 39 (3): 97-107.
76. Mochizuki H., Goto K., Mori H., Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson’s disease. *J. Neurol. Sci*. 1996.137:120–123.
77. Scott R.S., McMahon E.J., Pop S.M., Reap E.A., Caricchio R., Cohen P.L., Earp H.S., Matsushima G.K. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*. 2001.411:207–211.
78. Shimazaki A., Kawamura Y., Kanazawa A., Sekine A., Saito S., Tsunoda T., Koya D., Babazono T., Tanaka Y., Matsuda M.. Genetic variations in the gene encoding ELMO1 are associated with susceptibility to diabetic nephropathy. *Diabetes*.2005. 54:1171-1178.
79. Yang S.K., Attipoe S., Klausner A.P., Tian R., Pan D., Rich T.A., Turner T.T., Steers W.D., Lysiak J.J. In vivo detection of apoptotic cells in the testis using

- fluorescence labeled annexin V in a mouse model of testicular torsion. *J. Urol.*2006. 176:830–835.
80. Elliott M.R., Chekeni F.B., Trampont P.C., Lazarowski E.R., Kadl A., Walk S.F., Park D., Woodson R.I., Ostankovich M., Sharma P. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.*2009. 461:282–286.
81. Parnaik, R., M.C. Raff, and J. Scholes. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr. Biol.* 2000.10:857–860.
82. Gardai S.J., Bratton D. L., Ogden C.A., Henson P.M. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *Journal of Leukocyte Biology.* 2006. 79: 896-903.
83. Lauber K., Bohn E., Kröber S.M., Xiao Y.J., Blumenthal S.G., Lindemann R.K., Marini P., Wiedig C., Zobywalski A., Baksh S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3- mediated release of a lipid attraction signal. *Cell.*2003. 113:717–730.
84. Truman L.A., Ford C.A., Pasikowska M., Pound J.D., Wilkinson S.J., Dumitriu I.E., Melville L., Melrose L.A., Ogden C.A., Nibbs R. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood.*2008. 112:5026–5036.
85. Muñoz L.E., Peter C., Herrmann M., Wesselborg S., Lauber K. Scent of dying cells: the role of attraction signals in the clearance of apoptotic cells and its immunological consequences. *Autoimmun. Rev.*2010. 9:425–430.

86. Platt N., Suzuki H., Kurihara Y., Kodama T., Gordon S. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* .1996. 93: 12456–12460.
87. Oka K., Sawamura T., Kikuta K., Itokawa S., Kume N., Kita T. Lectin-like oxidized lowdensity lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* .1998. 95: 9535–9540.
88. Erdosova B., Hlavkova L., Prochazkova J., Lichnovsky V. Part of CD68+ macrophages in the clearance of apoptotic bodies in human metanephros. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2002. 146: 41–45.
89. Mevorach D., Mascarenhas J.O., Gershov D., Elkon K.B. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med*. 1998. 188: 2313–2320.
90. Devitt A., Parker K.G., Ogden C.A., Oldreive C., Clay M.F., Melville L.A. Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14<sup>-/-</sup> mice. *J Cell Biol* .2004.167: 1161–1170.
91. Erwig, L.P., McPhillips K.A., Wynes M.W., Ivetic A., Ridley A.J., Henson P.M. Differential regulation of phagosome maturation in macrophages and dendritic cells mediated by Rho GTPases and ezrinradixin-moesin (ERM) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006.103:12825–12830.
92. Kinchen J.M., Doukometzidis K., Almendinger J., Stergiou L., Tosello-Tramont A., Sifri C.D., Hengartner M.O., Ravichandran K.S. A pathway for

- phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. *Nat. Cell Biol.* 2008. 10:556–566.
93. Yu X., Lu N., Zhou Z. Phagocytic receptor CED-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells. *PLoS Biol.* 2008.6 (3):e61.
94. Kinchen, J.M., Ravichandran K.S. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature.* 2010.464:778–782.
95. Bohdanowicz, M., Grinstein S. Vesicular traffic: a Rab SANDwich. *Curr. Biol.* 2010.20:R311–R314.
96. Savill, J., Dransfield I., Gregory C., Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. 2:965–975.
97. Gaipf, U.S., Franz S., Voll R.E., Sheriff A., Kalden J.R., Herrmann M. Defects in the disposal of dying cells lead to autoimmunity. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2004. 6:401–407.
98. Erwig, L.P., Henson P.M. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am. J. Pathol.* 2007. 171:2–8.
99. Nagata, S., R. Hanayama, and K. Kawane. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell.* 2010.140:619–630.
100. Escalera Zamudio Marina. Di-*O*-acil-trealosa, Tri-*O*-acil-trealosa (DAT, TAT) y la glicolipoproteína de 19 kDa (LpqH) de *Mycobacterium tuberculosis* inhiben la producción de óxido nítrico por macrófagos. 2009. México. UNAM. 65-66 p.

101. Drage M.G., Pecora N.D., Hise A.G., Febbraio M., Silverstein R. L., Golenbock T.D., Boom H. W., Harding C.V. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol.* 2009. 258(1): 29–37.
102. Herrmann JL., O'Gaora P., Gallagher A., Thole JE, Young DB. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.* 1996. 15(14):3547-3554.
103. Almeida C. J. G., Linden R. Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2005. 62: 1532–1546.
104. Sarter K., Mierke C., Beer A., Frey B., Führrohr B. G., Schulze C., Franz S. Sweet clearance: Involvement of cell surface glycans in the recognition of apoptotic cells. *Autoimmunity.* 2007; 40(4): 345–348.
105. Franz S, Frey B, Sheriff A, Gaipf US, Beer A, Voll RE et al. Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *Cytometry A.* 2006. 23: 23.
106. Franz S., Herrmann K., Führrohr B., Sheriff A., Frey B., Gaipf U.S., Voll R.E., Kalden J.R., Jäck H.M., Herrmann M. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death and Differentiation.* 2007. 14: 733–742.