



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

**El tratamiento con fármacos inductores de autofagia  
favorece el control de la infección por *Mycobacterium  
tuberculosis* en macrófagos humanos y murinos.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**GONZÁLEZ ESTÉVEZ MITZI ROCIO**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Adriana Guadalupe Mejía Chávez**

**VOCAL: Patricia Elvira Berron Ruiz**

**SECRETARIO: Esmeralda Juárez Carvajal**

**1er. SUPLENTE: Maria Eva González Trujano**

**2° SUPLENTE: Jose Ignacio Páramo Ramírez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO  
VILLEGAS”**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Esmeralda Juárez Carvajal**

**SUSTENTANTE:**

**Mitzi Rocío González Estévez**

## RESUMEN

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecto-contagiosa producida por el agente etiológico *M. tuberculosis*, siendo la segunda causa mundial de mortalidad debido a un agente infeccioso. Ataca principalmente al sistema respiratorio y de no tratarse oportuna y eficientemente, puede causar la muerte de quien lo padece. Hoy en día la Tb es una enfermedad que se puede tratar y curar con un estricto régimen terapéutico que si no se cumple, la infección puede propagarse y convertirse en tuberculosis multi droga resistente (Tb-MDR), por lo que la OMS la declaró como una amenaza emergente. Se ha reportado el papel de la autofagia en el control de la infección de *M. tuberculosis*. La autofagia es un proceso catabólico, conservado en la evolución que utilizan las células eucariontes para eliminar proteínas de vida media larga, orgánulos dañados y es importante en la defensa contra infecciones por microorganismos en un proceso selectivo denominado “xenofagia”.

La autofagia se caracteriza por la formación de unas vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas que en su interior albergan el material citoplásmico a degradar y que al fusionarse con los lisosomas, éstos últimos vierten su contenido lítico dentro del autofagosoma para la degradación del contenido intra-autofagosomal. Diferentes fármacos se han usado para inducir autofagia en diferentes líneas celulares. En éste trabajo, usamos fármacos aprobados para consumo humano como loperamida un antidiarreico, ácido valproico un anticonvulsivo y verapamil un antihipertensivo, para inducir autofagia en macrófagos, que son las células que constituyen la primera línea de defensa encargadas de la fagocitosis de *M. tuberculosis*. Así mismo utilizamos un modelo *in vitro* de macrófagos derivados de monocitos humanos (MDMs) y macrófagos alveolares murinos (MAM), que fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y tratados con rapamicina, loperamida, ácido valproico y verapamil 24h post-infección. Examinamos la inducción de la autofagia y la colocalización de *M. tuberculosis* con los autofagosomas por microscopía de fluorescencia, la expresión génica de proteínas relacionadas con la autofagia (LC3, ATG16, IRGM) por PCR en tiempo real y la reducción de la carga intracelular de *M. tuberculosis* por el método de las unidades formadoras de colonias (UFC). Encontramos que en macrófagos humanos y macrófagos alveolares murinos rapamicina, loperamida, ácido valproico y verapamil inducen autofagia, además se observó sobre-expresión de genes autofágicos (LC3, ATG16L1 e IRGM) con ácido valproico. En macrófagos humanos rapamicina, loperamida, ácido valproico y verapamil permitieron el reclutamiento de *M. tuberculosis* a la vía de la autofagia 49.87 (rango 27.84-85.71)%, 71.43(rango 51.72-87.5)%, 62.5(rango 14.29-87.88)% y

71.43(rango 48-73.3)%, respectivamente, pero en macrófagos alveolares murinos sólo loperamida permitió la colocalización de la bacteria con los autofagosomas. Se observó que la estimulación *in vitro* con loperamida 40.9(rango 11.7-60)% y ácido valproico 39.85(rango 3.8-50)% no disminuyó el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos (MDMs) comparados con las células infectadas no tratadas farmacológicamente 35(rango 20-53)% con la dosis de infección más alta (MOI 1) pero en macrófagos alveolares murinos (MAm) si se observó una reducción significativa del porcentaje de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* con la dosis de infección más baja (MOI 1) con la administración *in vitro* de loperamida y verapamil 78.28(rango 55.5-78.7)% y 46.23(rango 18.18-77.78)%, respectivamente, tomando como referencia que la micobacteria virulenta sin tratamiento crece al 100%.

Para evaluar el efecto de éstos fármacos en activar la autofagia y pre activar los mecanismos bactericidas de los macrófagos alveolares murinos, utilizamos un modelo *in vivo*, en el cual se le administraron a 6 ratones vía intraperitoneal durante 3 días consecutivos una dosis diaria de cada uno de los fármacos mencionados y una vez obtenidos los macrófagos alveolares, se infectaron *ex vivo*. Encontramos que la administración sistémica de loperamida ( $59.57 \pm 1.83$ )% y ácido valproico ( $66.24 \pm 1.39$ )% indujeron autofagia en macrófagos alveolares recién obtenidos del pulmón de ratón, además de que loperamida ( $64.81 \pm 7.46$ )% permitió el reclutamiento de *M. tuberculosis* a la vía de la autofagia. Se observó también que ácido valproico aumentó la expresión de genes relacionados con la autofagia (LC3 y ATG16L1) 1.67(rango 0.51-3.27) veces el control y 1.92(rango 0.51-2.42) veces el control, respectivamente, así como una disminución significativa del índice de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* con el tratamiento con loperamida tanto en la dosis de infección más baja (MOI 1) como en la más alta (MOI 5), 1.1(rango 0.6-1.2) y 0.5(rango 0.3-0.9), respectivamente. Por lo que el tratamiento con fármacos inductores de autofagia, en nuestro caso, loperamida puede ser usado como fármaco adyuvante para el tratamiento contra la tuberculosis.

## INDICE

### RESUMEN

#### 1. INTRODUCCIÓN

1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	1
1.1.2 Características generales.....	1
1.1.3 Características estructurales .....	1
1.2 Patogenia de <i>M. tuberculosis</i> .....	3
1.2.1 Mecanismos de transmisión .....	3
1.2.2 Infección primaria .....	3
1.2.3 Infección secundaria .....	5
1.3 Tuberculosis.....	5
1.3.1 Epidemiología.....	6
1.4 Síntomas y diagnóstico de la Tb pulmonar.....	7
1.5 Tratamiento de la Tb.....	7
1.5.1 Tuberculosis resistente a fármacos y desafíos para el apego al tratamiento anti-Tb.....	8
1.6 Respuesta del sistema inmunológico ante la infección con <i>M. tuberculosis</i> .....	9
1.6.1 Los macrófagos como células del sistema inmune responsables de la fagocitosis de <i>M. tuberculosis</i> .....	9
1.6.2 Inmunidad innata .....	11
1.6.3 Inmunidad celular.....	12

1.7 Mecanismos de escape de <i>M. tuberculosis</i>	
a la respuesta inmune del hospedero.....	13
1.7.1 Factores de virulencia de <i>M. tuberculosis</i> .....	14
1.8 Autofagia.....	15
1.8.1 Tipos de autofagia.....	16
1.8.2 Maquinaria central de la autofagia.....	17
1.8.3 Etapas de la autofagia.....	22
1.8.4 Papel de la autofagia en la muerte	
intracelular de <i>M. tuberculosis</i> .....	23
1.8.5 Factores que inducen autofagia.....	24
1.8.5.1 Inducción de autofagia por patógenos.....	25
1.8.5.2 Inducción farmacológica de la autofagia.....	26
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>33</b>
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
<b>5. MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 Sujetos de estudio.....	34
5.2 Obtención de macrófagos derivados de monocitos	
a partir de células mononucleares de sangre periférica.....	34
5.3 Obtención de macrófagos alveolares de ratón.....	35

5.4 Fármacos utilizados para inducir autofagia.....	35
5.5 Preparación de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> para la infección <i>in vitro</i> .....	36
5.6 Infección <i>in vitro</i> con <i>M. tuberculosis</i> .....	36
5.7 Microscopía de fluorescencia.....	37
5.8 Purificación de RNA total.....	38
5.9 Síntesis de cDNA a partir del RNA purificado.....	39
5.10 Expresión génica.....	39
5.11 Cuantificación de la expresión génica.....	40
5.12 Cuantificación del crecimiento intracelular de <i>M. tuberculosis</i> .....	41
5.13 Administración sistémica de fármacos a ratones.....	41
5.14 Cuantificación del crecimiento intracelular de <i>M. tuberculosis</i> en macrófagos murinos tratados con fármacos <i>in vivo</i> .....	41
<b>6. RESULTADOS</b> .....	42
6.1 Autofagia por microscopía de fluorescencia.....	42
6.2 Análisis cuantitativo de autofagia en MDMs y MAM tratados <i>in vitro</i> y expresión génica de proteínas relacionadas con la autofagia.....	42
6.3 Efecto de la administración <i>in vitro</i> de loperamida, ácido valproico y verapamil en MDMs y MAM infectados con Mtb.....	48



6.4 Análisis cuantitativo de autofagia en MAm tratados sistémicamente y expresión génica de proteínas relacionadas con la autofagia.....	49
6.5 Efecto de la administración sistémica de loperamida, ácido valproico y verapamil sobre el control del crecimiento intracelular de Mtb en MAm.....	53
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>62</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Mycobacterium tuberculosis*.

### 1.1.2 Características generales

Son bacilos Gram positivos, ácido-alcohol resistentes, con tamaño entre 0.2-0.7 x 1-10 micras ( $\mu\text{m}$ ), ligeramente curvados, aerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas ni cápsulas (8) y de crecimiento lento (3-5 semanas se observa el desarrollo de colonias no pigmentadas y rugosas en medios sólidos como en Lowenstein-Jensen y Midelbrook), con una temperatura óptima para su crecimiento de 37°C con un rango entre 30 y 42°C y el crecimiento también es favorecido con una atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>. (9). Su pared celular es muy rica en lípidos lo cual determina sus características propias como: hidrofobia, que es la tendencia que muestran las células a adherirse unas con otras durante su crecimiento en medios acuosos, y por ello a flotar en la superficie; resistencia a la acción de ácidos y álcalis.

*M. tuberculosis* obtiene su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono (como glucosa y glicerol); crece en medios simples con glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio. También es resistente a la desecación, insensible a los detergentes catiónicos, pero no resiste el calor ni la radiación ultravioleta.

El genoma completo de una cepa de *M. tuberculosis* se ha secuenciado y contiene 4,4 millones de pares de bases, 4.000 genes que codifican proteínas y 50 que codifican RNA. (10)

### 1.1.3 Características estructurales

La envoltura de *M. tuberculosis* es compleja (**Figura 1**). Su pared celular contiene lípidos que constituyen el 20% del peso seco de la bacteria. Esta es compuesta de cuatro capas, la más interna de mureína o peptidoglicano; que como en otros

géneros da a la bacteria forma rígida. Por encima de esta capa están tres diferentes compuestas de complejos peptídicos polisacáridos lípidos que semejan filamentos arreglados en una matriz homogénea. La pared bacteriana rígida está constituida por una estructura covalente de dos polímeros unidos entre sí: peptidoglicano arabinogalactano contenidos aproximadamente en igual proporción.

La capa externa de la envoltura de las micobacterias sirve de protección contra múltiples factores externos entre sus principales componentes se encuentran el ácido micólico los glicolípidos que junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria por lo general estas moléculas son ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa (11).

La membrana celular tiene las características biológicas bioquímicas de cualquier membrana aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como el lipoarabinomano que tienen un papel fundamental en la patogenicidad de la tuberculosis (12).

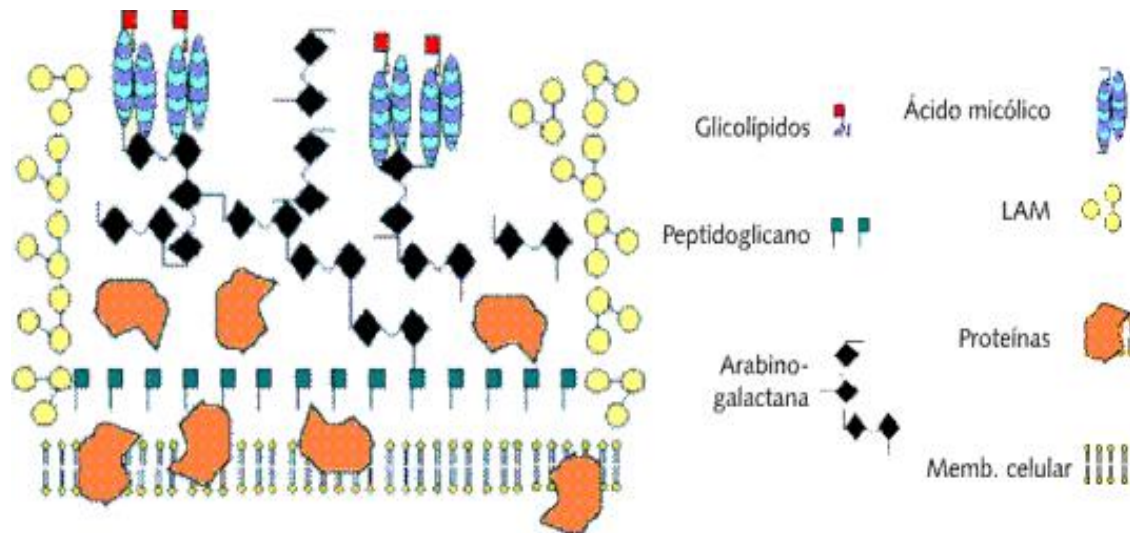
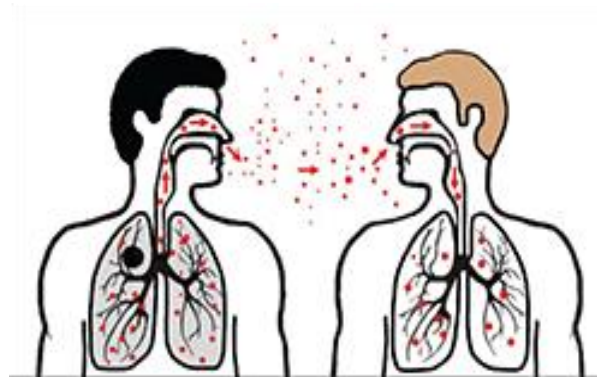


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está envuelta dentro  
**Figura 1.** Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está formada por una bicapa lipídica típica de membrana citoplasmática que permanece debajo del peptidoglicano rígido (PG). Cierta número de proteínas se encuentran en asociación con PG y entre la membrana, los PG y alguna de ellas pueden ser inmunogénicas. Patricia Gorocica y cols. 2005.

## 1.2 Patogenia de *M. tuberculosis*

### 1.2.1 Mecanismos de transmisión

Se adquiere por vía aérea, principalmente (por medio de aerosoles que son expulsados con la expectoración de las personas afectadas por Tb pulmonar) (**Figura 2**). Un caso no tratado puede infectar de 10 a 15 personas en un año (3).

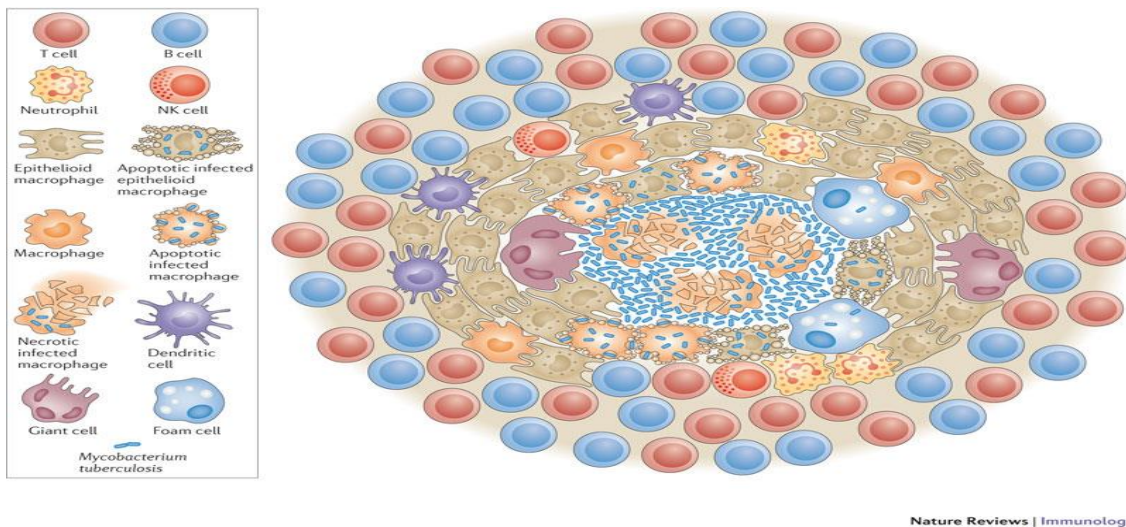


**Figura 2.** Vía de transmisión de *M. tuberculosis*. La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa que ataca con frecuencia a los pulmones pero puede comprometer cualquier otra parte del cuerpo. Adaptado de la referencia 56.

### 1.2.2 Infección primaria

Las partículas de tamaño superior a 10  $\mu\text{m}$  quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1 y 5  $\mu\text{m}$ ) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadenan la primo infección. En la mayoría de las ocasiones, los escasos bacilos que llegan hasta los alvéolos son fagocitados y destruidos por los macrófagos. Sólo un pequeño porcentaje de las personas infectadas (aproximadamente, el 10%) llegará a desarrollar la enfermedad; la mitad de ellos tempranamente, a los pocos meses de la infección, mientras que el otro 5% necesitará de un largo intervalo (a veces, de varias décadas) para que se produzca la reactivación endógena de lesiones aparentemente curadas que albergan en su interior micobacterias en condiciones metabólicas adversas pero potencialmente viables. (13)

En las 2-10 semanas posteriores a la infección se pone en marcha una respuesta inmunológica celular desencadenada por los antígenos de la membrana y del citoplasma de las micobacterias. Los macrófagos reconocen y procesan dichos antígenos y los muestran a los linfocitos T para que estimulen, mediante liberación de linfocinas, la transformación de un gran número de macrófagos en células que están altamente especializadas en la lucha contra las micobacterias (células epitelioides y gigantes de Langhans) (**Figura 3**). Los linfocitos activadores de los macrófagos, las células epitelioides y las gigantes se sitúan concéntricamente para rodear e intentar destruir a los bacilos intrusos dando lugar al característico granuloma tuberculoso que al cabo de un tiempo se reblandece en su centro y deja un núcleo de necrosis caseosa. En muchos casos, este sistema defensivo controla totalmente la infección y una vez cumplido su cometido se reabsorbe dejando tan sólo una pequeña cicatriz fibrosa que, para mayor seguridad, se calcifica. (14)



Nature Reviews | Immunology

**Figura 3.** Granuloma de la tuberculosis. Agregado organizado de células epitelioides- macrófagos que han sufrido una transformación especializada para tener membranas celulares fuertemente interdigitadas. Las células epitelioides pueden ser altamente fagocíticas. Los macrófagos también pueden fusionarse en células gigantes multinucleadas o diferenciarse en células espumosas, que se caracterizan por la acumulación de lípidos. Las células espumosas se han observado que se encuentra con más frecuencia en el borde del centro necrótico de un granuloma tuberculoso maduro. En general en las células espumosas y células gigantes multinucleadas se han reportado que contienen sólo unas pocas bacterias. Las bacterias son más comúnmente presentes en las áreas necróticas centrales. Muchos otros tipos de células también habitan el granuloma, tales como neutrófilos, células dendríticas, células B y células T, células NK, fibroblastos, etc. *Nature Reviews Immunology* 12, 352-366 (Mayo2012)

En estas circunstancias es posible que la primo-infección haya sido asintomática y que incluso no deje secuelas detectables en la radiografía de tórax; lo que sí queda es la memoria inmunológica que se pondrá de manifiesto con la prueba de la tuberculina y permitirá diferenciar los individuos infectados (tuberculina-positivos) de los no infectados (tuberculina-negativos). (15)

### **1.2.3 Infección secundaria**

La tuberculosis post-primaria, también denominada secundaria, es la forma clinicorradiográfica más frecuente, aunque en general el individuo no tiene constancia de la primo-infección previa por haber sido ésta asintomática o poco aparente. En algunos casos, sobre todo en los países con alta prevalencia de tuberculosis, la tuberculosis post-primaria se debe a una reinfección exógena pese al relativo grado de inmunidad del sujeto infectado. No obstante, lo más común es la reinfección endógena por micobacterias latentes capaces de resistir ocultas en el interior de algunas células, o en pequeños focos caseosos en condiciones metabólicas adversas en un continuo equilibrio con las defensas orgánicas, que se rompe tras muchos años por alteraciones, transitorias o persistentes, de la inmunidad. (15)

### **1.3 Tuberculosis**

Del latín tuberculum, que significa pequeña protuberancia, pequeño nódulo, la tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa crónica, causada por un grupo de bacterias del orden Actinomicetales de la familia Mycobacteriaceae. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* se compone por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*; *M. caprae* y *M. pinnipedii*; siendo *M. tuberculosis* el causante de la Tb pulmonar en el humano

La Tb es una enfermedad sistémica que afecta principalmente al sistema respiratorio. Ataca al estado general y de no tratarse oportuna y eficientemente,

puede causar la muerte a quien la padece, de ahí que requiere de atención urgente. (1)

### **1.3.1 Epidemiología**

En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la Tb como enfermedad reemergente, debido a una serie de factores que inciden directamente o de manera tangencial, como son las enfermedades inmunodepresoras (infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), diabetes, desnutrición, adicciones), la explosión demográfica, la pobreza y los constantes movimientos migratorios. (1)

La OMS, informa que un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*; cada año se estima una ocurrencia cercana a 9 millones de casos nuevos y 1.7 millones de defunciones por Tb. (1) La Tb es la segunda causa mundial de mortalidad, después del sida, causada por un agente infeccioso. En 2013, 9 millones de personas enfermaron de Tb y 1,5 millones murieron por esta enfermedad. Más del 95% de las muertes por Tb ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos, y esta enfermedad es una de las cinco causas principales de muerte en las mujeres entre los 15 y los 44 años. En 2013, se estima que 550 000 niños enfermaron de Tb y 80 000 niños seronegativos murieron de Tb. Se calcula que 480 000 personas desarrollaron tuberculosis multidrogo-resistente (Tb-MDR) a nivel mundial en 2013. (2)

En el 2013 en México se presentaron 20 708 casos nuevos de los cuales 670 fueron de Tb-MDR y 387 fueron casos de tuberculosis extremadamente resistente; 2000 personas murieron a causa de esta enfermedad. En México, los desafíos actuales en el control de la Tb son diferentes debido a la heterogeneidad de la población, amplia brecha socioeconómica, la inequidad en los servicios y una pobre cultura en cuanto a la salud. (2)

#### 1.4 Síntomas y diagnóstico de la Tb pulmonar.

Los síntomas comunes de la Tb pulmonar activa son tos productiva por más de 2 semanas (a veces con sangre en el esputo), dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna.

La baciloscopía es la técnica de elección para el diagnóstico rápido y el control del tratamiento de la Tb pulmonar del adulto. Es simple, económica y eficiente para detectar los casos infecciosos. (3) El cultivo complementa a la baciloscopía ya que permite poner en evidencia bacilos viables presentes en una muestra de lesión, caracterizarlos para certificar que sea el bacilo de la Tb y conocer si es sensible o resistente a las drogas antituberculosas. (4) El principal inconveniente de este método es el tiempo de incubación para la recuperación de este microorganismo, que puede demorar hasta 8 semanas. (5) La PCR es por tanto un método de diagnóstico que en unas cuantas horas permite detectar y amplificar una secuencia de ADN o ARN (gracias al uso de las reverso transcriptasas, enzimas que generan ADN complementario (ADNc) a partir de un templado de ARN). Bajo condiciones apropiadas, la cantidad de ADNc generado por reverso-transcripción es proporcional al número de moléculas de ARN presente en una muestra dada. Entonces este método puede ser el templado para una reacción de PCR en tiempo real utilizando su sensibilidad y precisión para determinar cambios en la expresión de genes. Esta técnica es conocida como RT-PCR en tiempo real y se ha convertido en el método más popular para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero (6).

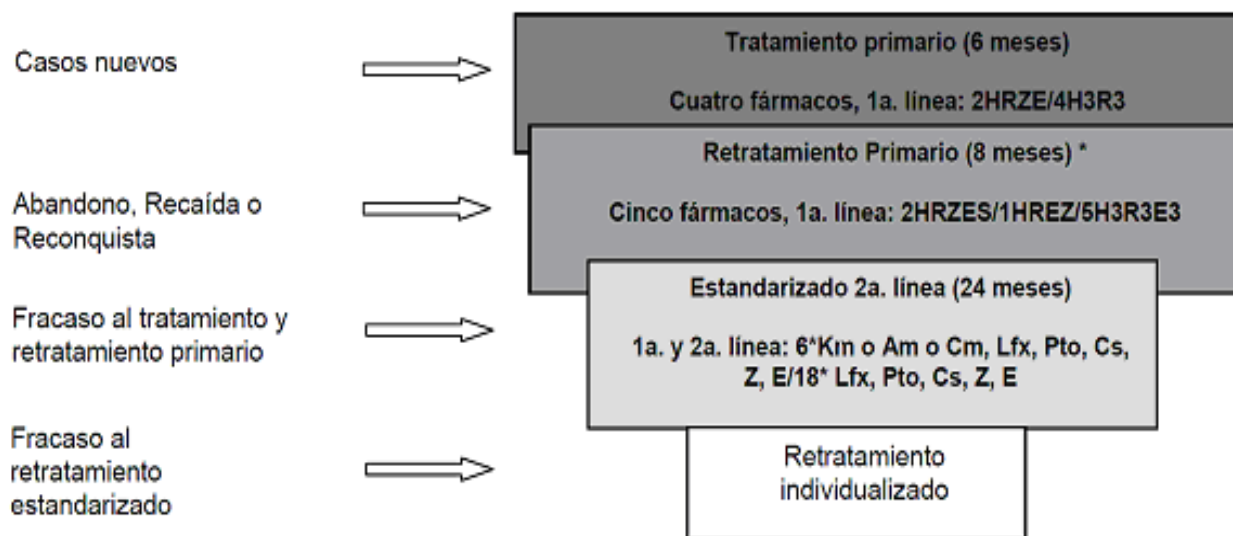
#### 1.5 Tratamiento de la Tb

La Tb es una enfermedad que se puede tratar y curar (**Figura 4**). La forma activa que es sensible a los antibióticos se trata con una combinación estándar de cuatro medicamentos administrada durante seis meses junto con información, supervisión y apoyo del paciente por un agente sanitario o un



voluntario capacitado. Si no se proporcionan supervisión y apoyo, el cumplimiento terapéutico puede ser difícil y, como consecuencia, la infección puede propagarse. La gran mayoría de los enfermos pueden curarse a condición de que los medicamentos se tomen correctamente. (1)

**Figura 4.** Pirámide de Éxito de Tratamiento.



1a. línea: isoniacida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E), estreptomina (S).

2a. línea: kanamicina (Km), amikacina (Am), capreomicina (Cm), etionamida (Eto), protionamida (Pto), ofloxacina (Ofx), levofloxacina (Lfx), moxifloxacina (Mfx) y ciclocerina (Cs).

\* Utilizar sólo en caso de recaída o reconquista, si el paciente cumple criterios de fracaso, presente el caso al COEFAR.

Nota: los números que preceden a la inicial del fármaco indican el tiempo en meses por el cual hay que administrarlo; las diagonales, el cambio de fase; los subíndices, el número de dosis del medicamento por semana. De no haber ningún número en forma de subíndice, el medicamento se administra diariamente de lunes a sábado. NOM-006-SSA2-2013.

### 1.5.1 Tuberculosis resistente a fármacos y desafíos para el apego al tratamiento anti-Tb

La Tb-MDR representa una amenaza emergente para el control mundial de la enfermedad. Las cepas de TB-MDR son aquellas que presentan resistencia a los medicamentos más potentes (isoniazida y rifampicina), lo que significa una mayor

dificultad para curar a este tipo de enfermos (7). Es multifactorial, y su origen se centra en tres grandes componentes como se muestra en la **Tabla 1**:

**Tabla1.** Causas probables de fármaco-resistencia.

Tratamientos inadecuados:	Causas asociadas a los medicamentos:	Inadecuada adherencia al tratamiento:
La existencia de una prescripción de dosis no suficiente para que sea efectiva.	Mala calidad de los medicamentos.	Poca adherencia al tratamiento.
Prescripción incompleta o inadecuada de quimioterapia.	Tratamientos incompletos.	Información incompleta sobre el tratamiento.
Adición de un fármaco suplementario en un caso de fracaso o recaída.	Falta de disponibilidad de medicamentos.	Efectos adversos.
Empleo de medicamentos o combinaciones de fármacos con eficacia no demostrada.	Malas condiciones de almacenamiento.	Falta de recursos económicos para transporte.
Fracaso organizacional del Programa de Tuberculosis.		Barreras sociales.
		Mala absorción.
		Presencia de toxicomanías.
		Factores socioculturales:
		• El paciente se siente avergonzado.
		• El paciente se siente culpable.
		• Falta de comunicación con el personal de salud.

Guía para la atención de personas con Tb resistente a fármacos. Adaptado de la referencia 7

## **1.6 Respuesta del sistema inmunológico ante la infección con *M. tuberculosis*.**

### **1.6.1 Los macrófagos como células del sistema inmune responsables de la fagocitosis de *M. tuberculosis***

El sistema fagocítico mononuclear comprende monocitos que circulan en la sangre y macrófagos diseminados en los tejidos. Durante la hematopoyesis en la médula ósea las células progenitoras de granulocitos y monocitos se diferencian en promonocitos, que salen de la médula ósea y pasan a la sangre, en donde se diferencian de modo adicional en monocitos maduros. Los monocitos circulan en el torrente sanguíneo donde crecen y migran hacia los tejidos y se diferencian en

macrófagos específicos de tejido. La diferenciación de un monocito en un macrófago tisular incluye varios cambios: la célula crece cinco a diez veces; sus orgánulos intracelulares aumentan en número y complejidad; adquiere mayor capacidad fagocítica, que produce concentraciones más altas de enzimas hidrolíticas, y comienza a secretar una diversidad de factores solubles. Los macrófagos se dispersan en la totalidad del cuerpo los cuales se nombran según su localización (macrófagos alveolares en pulmón, células de Langerhans en la piel, células de Kupffer en hígado etc.). (32)

La fagocitosis de antígenos particulares sirve como un estímulo activador de macrófagos. Sin embargo la activación del macrófago aumenta por citocinas que secretan las células T cooperadoras (Th) activadas, mediadores de la respuesta inflamatoria y componentes de la pared de células bacterianas. Además, los macrófagos activados secretan varias proteínas citotóxicas que los ayudan a eliminar una amplia variedad de patógenos, incluidas bacterias intracelulares y además poseen la capacidad de adherirse a sustratos de vidrio y plástico. Los macrófagos activados también expresan valores más altos de moléculas de MHC clase II, que les permiten funcionar con mayor efectividad como células presentadoras de antígeno.

Los macrófagos alveolares (MA) son células involucradas en la fagocitosis, presentación de antígeno y producción de moléculas antimicrobianas (37). El reconocimiento de microorganismos por los macrófagos alveolares ocurre a través de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), como el receptor 3 del complemento (C3R), receptor de quimiocinas, receptor de manosa, DC-SIGN, receptor de adenosina y receptores tipo toll (TLRs) que a través de la unión con sus ligandos, activan monocitos, macrófagos y células dendríticas, desencadenando una respuesta inmune antimicrobiana innata y adaptativa en el hospedero. TLRs reconocen múltiples componentes del microorganismo, desde ácidos nucleicos hasta proteínas complejas. TLR2, TLR4 y TLR9 son relevantes en el reconocimiento de antígenos micobacterianos. TLR4 desencadena una respuesta protectora tipo Th1 en pulmón durante la infección con *M. tuberculosis*.

TLR2 reconoce al lipoarabinomamano de la micobacteria, mientras que TLR9 potencia la respuesta inmune inducida por el DNA de *M. tuberculosis*. (32-34)

### **1.6.2 Inmunidad innata**

El espacio alveolar posee mecanismos celulares innatos de defensa que involucran a los MA, las células dendríticas, los neutrófilos, los linfocitos B, las células epiteliales, las células alveolares tipo I y tipo II y factores solubles como la mucina, lisosima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2 inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y la eliminación de partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio.

La llegada de *M. tuberculosis* hasta el espacio alveolar significa que ha superado la barrera mucociliar del tracto respiratorio; sin embargo, ahora se enfrenta a los MA que constituyen la primera línea de defensa en el alvéolo y este primer contacto es crucial ya que va definir el control de la infección o el desarrollo de la enfermedad. La fagocitosis de *M. tuberculosis* es principalmente llevada a cabo por los MA a través de diversos mecanismos y es favorecida por el surfactante A producido por las células epiteliales alveolares tipo II ya que aumentan la interacción entre la micobacteria y los MA. (16)

Algunos componentes de la micobacteria (arabinogalactanas, peptidoglicanos, LAM, proteínas) pueden interactuar con los Receptores Toll / TLR2/TLR4 de los MA e inducir la producción de IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

Durante la fagocitosis, la micobacteria es incluida en un fagosoma y destruida en el fagolisosoma por enzimas lisosomales y algunos de sus antígenos son procesados y presentados a linfocitos T CD4+ (MCH II) y CD8+ (MCH I), por lo que los MA además de ser células efectoras funcionan como células presentadoras de antígenos y pueden definir el curso de la respuesta de inmunidad adaptativa (Th1 o Th2). Este es el paso de transición entre la respuesta

de inmunidad innata a la respuesta de inmunidad adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico entre diferentes células y la secreción de factores solubles como las citocinas y quimiocinas. (29)

A pesar de que se ha pensado que el primer evento en el alveolo es la fagocitosis de *M. tuberculosis* por los MA, también se ha sugerido que inicialmente la micobacteria está en contacto e infecta a las células epiteliales alveolares, como una alternativa para evadir las agresiones del medio y escapar de los MA. Debido a que al inicio de la infección hay relativamente pocos MA para fagocitar a la micobacteria, son las células epiteliales las que pueden ser invadidas en las primeras horas; sin embargo, la infección juega un papel muy importante en la repuesta inmunitaria, ya que las células epiteliales empezarán a secretar quimiocinas para el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y monocitos al pulmón, además de producir péptidos antimicrobianos causando la lisis de la micobacteria. (19)

### **1.6.3 Inmunidad celular**

La respuesta de inmunidad adaptativa es específica y su desarrollo depende en gran medida de la eficiencia de la respuesta de inmunidad innata, ya que si los MA no son capaces de controlar la infección se favorece una respuesta inmunitaria humoral (Th2), que no es protectora para tuberculosis y que se caracteriza por la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$  los cuales antagonizan la respuesta de inmunidad celular tipo Th1, eficiente en infecciones causadas por microorganismos intracelulares y caracterizada por la producción de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18 y TNF- $\alpha$ . (16)

En la Tb pulmonar, *M. tuberculosis* ingresa al organismo por vía aérea y alcanza a los alvéolos pulmonares en el espacio pulmonar interactuando con células epiteliales tanto del alvéolo como del espacio peribronquial, las cuales pueden secretar quimiocinas y algunos péptidos antimicrobianos que eliminarán a algunas micobacterias. Posteriormente, la micobacteria es fagocitada por los MA residentes no activados que tratan de controlar la infección y al mismo tiempo

producen citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12 para el reclutamiento y activación de otras células del sistema inmunológico.

La inmunidad adquirida en la Tb es generada cuando los linfocitos T CD4+ reconocen antígenos de *M. tuberculosis* presentados por los MA en el contexto de moléculas MHC II. Estos antígenos provienen del fagosoma, el cual constituye el hábitat preferido de la micobacteria, al mismo tiempo que tienen fácil acceso a la vía de las moléculas MHC II, de manera que pueden ser acoplados y presentados a los linfocitos T CD4+. Como resultado de esto, los linfocitos TCD4+ son activados y empiezan a producir IFN- $\gamma$ , una citocina de gran importancia por su capacidad de incrementar la función microbicida de los macrófagos. Por otra parte, otra citocina, la IL-1 producida por MA, promueve la producción de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2 con la subsecuente expansión clonal de los linfocitos T CD4+, así como también la IL-12 producida por MA. (17)

En los gránulos citoplasmáticos de los linfocitos T se encuentran proteínas importantes como las perforinas, las cuales forman trímeros que se insertan en la membrana y facilitan la entrada de las granzimas y granulisin; a estas últimas se les ha asignado el rol de ser las responsables de la muerte de *M. tuberculosis* al actuar directamente sobre los lípidos en la pared de la micobacteria. (18)

Junto con el TNF-  $\alpha$  el IF -  $\gamma$  producido por las diferentes poblaciones de linfocitos T y las células NK interacciona con su receptor IFN-  $\gamma$  expresado en la membrana de los MA; y es el responsable de iniciar la señales intracelulares, lo cual dispara la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en la activación de mecanismos bactericidas. (16)

### **1.7 Mecanismos de escape de *M. tuberculosis* a la respuesta inmune del hospedero**

Luego de la exposición inicial, el bacilo puede penetrar y replicarse dentro de los macrófagos no activados. Subsecuente, la respuesta inmune del hospedero

mediada por los linfocitos Th1 con la liberación de IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  resulta en la formación del granuloma, tejido constituido por macrófagos y linfocitos que rodean un área central de necrosis (**Figura 3**).

El granuloma se caracteriza por poseer un ambiente hipóxico, situación responsable de mantener bajos los niveles de replicación bacteriana. Así mismo, en su interior pueden formarse lesiones necróticas que permiten la presencia de *M. tuberculosis* en el espacio extracelular, favoreciéndose la existencia de microambientes con áreas anaeróbicas. Aunque es posible que el desarrollo de la necrosis caseosa impida la transmisión y dispersión de la TB, la adaptación a los bajos niveles de oxígeno es un factor importante que incrementa la capacidad de *M. tuberculosis* para persistir en el hospedero. (20)

La mayor parte de los componentes estructurales de las micobacterias son de naturaleza sacarídica, estructuras reconocidas por diversos receptores en los macrófagos y otros tipos celulares (linfocitos T). Algunas de estas estructuras moleculares de las micobacterias son también responsables de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero, pues son capaces de inhibir o interferir con los mecanismos microbicidas del macrófago infectado. (21)

El medio intracelular confiere ventajas importantes a las micobacterias debido a que quedan protegidas de los mecanismos efectores de la respuesta inmune del hospedero, como la lisis por el complemento; además, las características estructurales de su envoltura le proporcionan resistencia a los agentes microbicidas, a los fármacos y a la destrucción por el calor. (22)

### **1.7.1 Factores de virulencia de *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* ha desarrollado estrategias para su propia supervivencia utilizando la autofagia del hospedero de modo que: a) previene la inducción de la autofagia b) previene la maduración del autofagosoma en autolisosoma c) inhibe el

reconocimiento de patógenos por la maquinaria autofágica d) utiliza componentes de la autofagia para su supervivencia intracelular. (47)

Un aspecto característico de *M. tuberculosis* que contribuye a su virulencia es su habilidad para crecer dentro de monocitos y macrófagos previniendo la acidificación del fagosoma. Habitualmente la ingestión de una bacteria por fagocitosis es seguida de la acidificación del fagosoma, mediada por ATPasas de la membrana fagosomal, la que bombea protones hacia el interior de esta estructura, reduciendo el pH en él. Dicha acidificación no sólo inhibe el desarrollo bacteriano sino que, además, es un paso importante en la fusión lisosoma-fagosoma, y en la activación de los factores bactericidas liberados durante la fusión. *M. tuberculosis* presumiblemente, contrarresta la acidificación produciendo amoníaco y de esta manera mantiene las condiciones óptimas para el crecimiento dentro de las vesículas. (9) Además *M. tuberculosis* secreta una fosfatasa-PI3, SapM (fosfatasa ácida secretada por *M. tuberculosis*), la cual inhibe la maduración del autofagosoma ya que su formación involucra la generación de un fosfolípido de membrana celular, fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P). (46)

Aunque *M. tuberculosis* puede sobrevivir dentro de los macrófagos no activados, la bacteria es destruida por las mismas células activadas. Se ha encontrado una proteína secretada por *M. tuberculosis*, el antígeno 85A, que se une a la fibronectina la cual impide la activación de macrófagos. (9)

## **1.8 Autofagia**

La autofagia es un proceso catabólico que realizan las células eucariontes, conservado en la evolución, que en general ayuda a las células a eliminar proteínas de vida media larga y organelos dañados, como la mitocondria. Es importante en la defensa contra infecciones por microorganismos, y cuando no funciona correctamente favorece el surgimiento de diversas patologías como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, desórdenes en el hígado y el músculo, infarto, etc. (27)



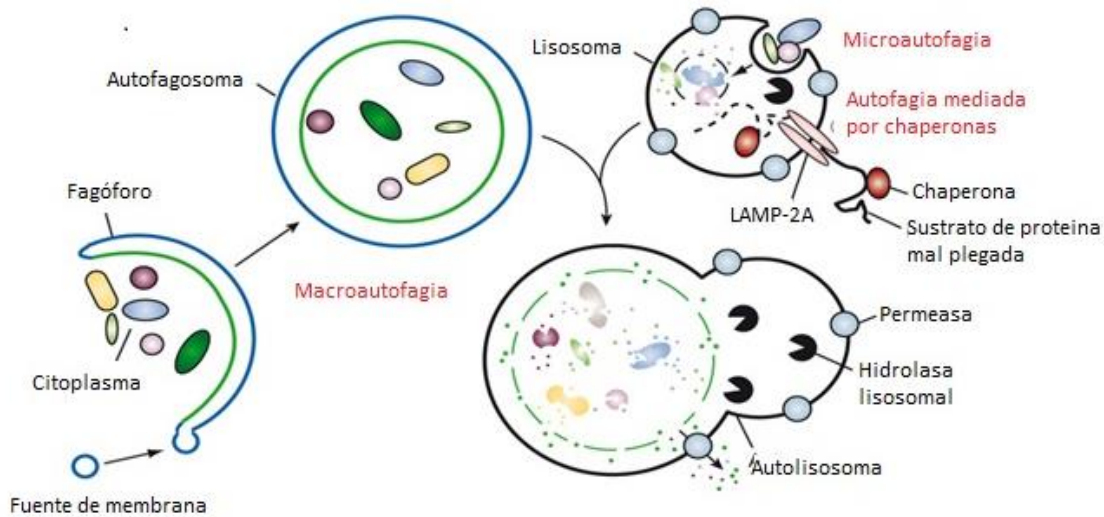
### 1.8.1 Tipos de autofagia

Existen tres tipos de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y macroautofagia. (**Figura 5**). En la **microautofagia**, el material citoplásmico a degradar es engullido directamente por el lisosoma, ya sea por invaginación o extensión de la membrana lisosomal que rodea el material a degradar, y eventualmente se fusiona formando un vesícula dentro del lisosoma.

En la **autofagia mediada por chaperonas** se degradan determinadas proteínas citoplásmicas que son introducidas a los lisosomas molécula por molécula. Las proteínas blanco se identifican por contener una secuencia semejante al motivo formado por los aminoácidos KFERQ, que es reconocida por un complejo citoplásmico formado por la chaperona hsc70 y las co-chaperonas hip, hop, bag-1, hsp40 y hsp90. Este complejo interactúa con un receptor en la membrana lisosomal llamado LAMP-2A. Este receptor está compuesto por varias subunidades que forman un poro, a través del cual pasa la proteína a degradar, que tuvo que haber sido previamente desdoblada. En el lumen de los lisosomas se encuentra una variante lisosomal de la hsc70 (ly-hsc70) que facilita la entrada de la proteína blanco a la matriz lisosomal, donde es finalmente degradada por enzimas hidrolíticas. El complejo de las chaperonas hsc70 se desprende de la membrana lisosomal para poder unirse a otra proteína citoplásmica que contenga el motivo tipo KFERQ.

La **macroautofagia** o autofagia se caracteriza por la presencia de unas vesículas especializadas que se forman a partir de unos sacos que se encuentran en el citoplasma llamados “fag foros” o “membranas de aislamiento” que se elongan rodeando el material citoplásmico a degradar. Los extremos de estos sacos eventualmente se fusionan, formando una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma, dentro de la cual queda secuestrado el material a degradar. Posteriormente el autofagosoma se fusiona a lisosomas, que aportan las enzimas hidrolíticas que degradarán tanto la membrana interna como el material citoplásmico atrapado. (23)

Tipos selectivos de autofagia son definidos de acuerdo a la carga secuestrada. Por ejemplo “xenofagia” secuestra bacterias y virus; “agrefagia” secuestra proteínas agregadas; “pexofagia” secuestra peroxisomas “mitofagia” secuestra mitocondrias, etc. (24)



**Figura 5. Tipos de autofagia.** La microautofagia se refiere al secuestro de componentes citosólicos directamente por los lisosomas a través de invaginaciones en su membrana limitante. La función de este proceso en eucariontes superiores no se conoce, mientras que en la microautofagia en hongos está involucrada la degradación selectiva de organelos. En el caso de macroautofagia, el material es secuestrado dentro de una vesícula citosólica de doble membrana, un autofagosoma. El secuestro puede ser no específico, que implica el engullimiento del citoplasma completo, o selectiva, dirigida a blancos específicos como orgánulos o microbios invasores. El autofagosoma se forma por la expansión de la fagóforo, pero el origen de su membrana es desconocido. La fusión del autofagosoma con un endosoma (no mostrado) o un lisosoma proporciona hidrolasas. La lisis de la membrana interna del autofagosoma y la descomposición de su contenido se produce en el autolisosoma y las macromoléculas resultantes se liberan de nuevo en el citosol a través de permeasas de membrana. CMA implica la translocación directa de proteínas desplegadas a través de la membrana del lisosoma mediante la acción de una chaperona citosólica y lisosomal hsc70, y el receptor de membrana LAMP-2A integral (proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A). Nature 451, 1069-1075 (28 Febrero 2008).

### 1.8.2 Maquinaria central de la autofagia

La autofagia en levaduras se describió por primera vez en 1992 desde entonces se han identificado 34 componentes moleculares que participan en este proceso: los llamados genes TG “AuTophagy-related genes”. Muchos ortólogos de los

genes ATG de *S. cerevisiae* han sido identificados y estudiados en algunos eucariotas superiores como en nemátodos insectos plantas mamíferos parecen tener funciones similares a las que desempeñan en la levadura (24).

**Tabla 2.** Proteínas ATG en mamíferos

Proteína	Posición en la vía autofágica	Nombre alternativo y función
ULK1 y ULK2	Complejo ULK	Atg1 ortólogo; Ser/Thr cinasas que median la señalización de mTOR y ATG9
ATG13	Complejo ULK	El sustrato ULK1 y ULK2 modulan la actividad del complejo ULK
FIP200	Complejo ULK	Atg17 ortólogo; ULK1 y ULK2 modulan la actividad del complejo ULK
ATG101	Complejo ULK	Interactúa con ULK1 y ATG13
Beclin 1	Complejo PI3K	Atg6 ortólogo; parte del complejo PI3K y tiene un papel durante la iniciación, formación y maduración de la autofagia.
VP S34	Complejo PI3K	Subunidad activa catalítica del complejo PI3K
p150	Complejo PI3K	Vps15 ortólogo; recluta al complejo PI3K a las membranas
ATG14L	Complejo PI3K	Atg14 ortólogo; dirige al complejo PI3K al omegasoma
WIPI1 y WIPI2	Proteína de unión a PtdIns(3)P	Atg18 ortólogo; une a PtdIns(3)P al autofagosoma
ATG3	Conjugación de LC3–fosfatidiletanolamina	Similar a la enzima de conjugación de ubiquitina E2, conjuga LC3-PE
ATG4	Conjugación de LC3–fosfatidiletanolamina	Cys proteasa que se adhiere a la glicina del carboxilo terminal de homólogos de LC3 y es requerida para el reciclaje de LC3 de la membrana externa del autofagosoma
ATG7	LC3–fosfatidiletanolamina y conjugación de ATG12	Similar a la enzima activadora E1; activa a ATG12 y homólogos de LC3.

**Tabla 2.** Proteínas ATG en mamíferos (continuación)

LC3-A, LC3-B, LC3-C, GATE 16, GABARAPL1, GABARAPL2 y GABARAPL3	Conjugación de fosfatidiletanolamina	LC3-	Atg8 homólogo; proteína tipo ubiquitina que recluta carga al autofagosoma y ayuda a la fusión de membrana
ATG5	Conjugación ATG12	ATG5-	Conjugado a ATG12
ATG10	Conjugación ATG12	ATG5-	Similar a la enzima de conjugación E2; une a ATG12 al residuo interno de lisina de ATG5
ATG12	Conjugación ATG12	ATG5-	Proteína tipo ubiquitina conjugada a ATG5
ATG16L1	Complejo ATG5-ATG12		Se une al conjugado ATG5-ATG12 y dirige la conjugación de LC3 a la membrana de aislamiento
ATG9A y ATG9B	Proteínas de membrana integral		Atg9 ortólogo; requerido para la formación del autofagosoma
ATG2A y ATG2B	Localiza al omegasoma		Atg2 ortólogo; requerido para el cierre de la membrana de aislamiento para formar el autofagosoma

Nombres alternativos en levaduras son dados. Atg, genes relacionados con la autofagia; FIP200, FAK proteína que interactúa con una cinasa de 200 kDa; mTOR, blanco de rapamicina en mamíferos; PtdIns(3)P, fosfatidilinositol 3 fosfato; ULK, cinasa tipo UNC51; VPS34, proteína vacuolar 34; WIPI, WD dominio de repetición interactuando con fosfoinositol; GABARAPL, receptor asociado al ácido- $\gamma$ -aminobutírico. A. Lamb et. al. Nature Reviews, Diciembre 2013.

Las proteínas “core” de TG están divididas en cinco subgrupos: el complejo de la proteína cinasa ULK1, el complejo de la cinasa PI3K clase III Vps34-Beclin 1, el complejo ATG 9-WIPI1 y los dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina ATG12-ATG5-ATG16L1 y LC3-PE. **(Figura 6).**

**Complejo de la proteína cinasa ULK1.** Está compuesto por ULK1 (una proteína cinasa), ATG13, FIP200 y ATG101. La cinasa mTOR fosforila directamente a ATG13 regulando negativamente la iniciación de la autofagia. ATG101 es importante para la fosforilación basal de ATG13 y ULK1. FIP200 estabiliza la fosforilación basal de ULK1, considerando que ATG13 es responsable del reclutamiento de ATG14 al pre autofagosoma es posible que el complejo cinasa

ULK1 interactúa con el complejo cinasa PI3K clase III Vps34-beclin1 en mamíferos.

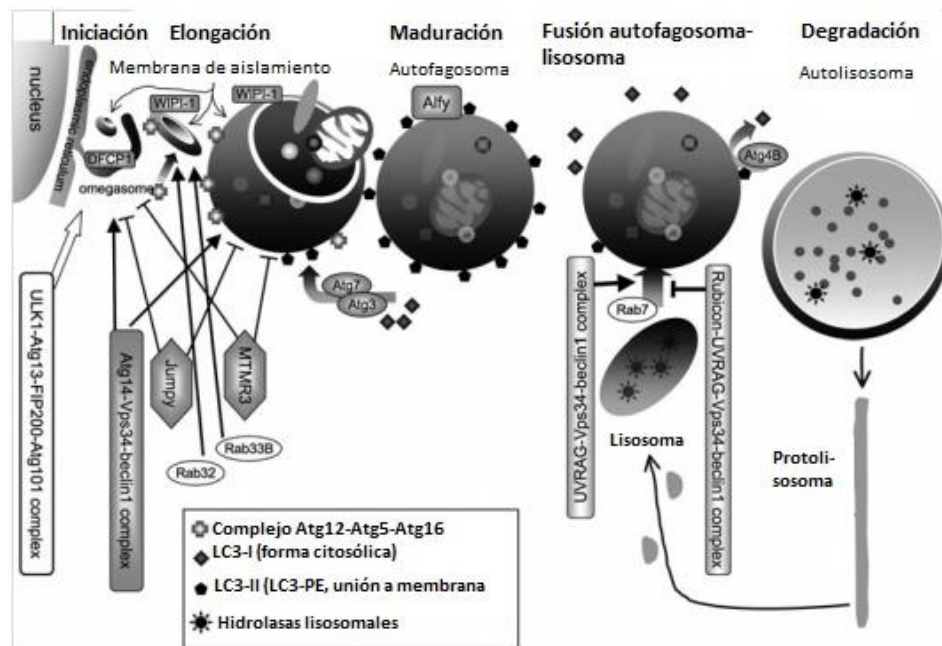
**Complejo Vps34-beclin1-PI3K clase III.** En mamíferos por lo menos tres tipos de complejo cinasa PI3 clase III contribuyen a la autofagia. El complejo ATG14-Vps34-Vps15-beclin1 es esencial para la formación del autofagosoma y el complejo UVRAG-Vps34-VPS15-beclin1 funciona positivamente en la maduración del autofagosoma y en el tráfico endocítico.

**Complejo ATG9-WIPI-1.** Atg9 es la única proteína integral de membrana en levaduras, sus ortólogos en mamíferos son ATG9/mAtg9/ATG9L1. Durante condiciones ricas en nutrientes ATG9 se ubica en la porción trans del aparato de Golgi mientras que bajo condiciones de inanición se localiza en el autofagosoma por medio de un proceso dependiente de ULK1 (24).

**Primer sistema de conjugación tipo ubiquitina de ATG12.** Es esencial para la formación y elongación de la membrana de aislamiento. En el sistema de conjugación ATG12, ATG12 es activada por ATG7, una enzima tipo E1, y transferida a ATG10, una enzima tipo E2, y conjugada a ATG5 para formar el conjugado ATG12-ATG5. El carboxilo terminal de la glicina de ATG12 es esencial para la formación de los puentes tioéster con el sitio activo de los residuos de Cys de ATG7 y ATG10; también es esencial para la formación de los puentes amida con el residuo de lisina 130 de ATG5. ATG16L1 interactúa con ATG5 formando un complejo multimérico.

**Segundo sistema de conjugación tipo ubiquitina LC3-PE.** El segundo sistema tiene como blanco un fosfolípido, la fosfatidiletanolamina (PE), por esta razón este sistema también es llamado lipidación de LC3. Se han encontrado cuatro homólogos en mamíferos de la proteína Atg 8, presente en levaduras, y han sido identificados como: LC3/MAP1-LC3/LC3B (proteína 1 de cadena ligera 3 asociada a microtúbulo), GABARAP, GATE-16 y ATG8L. LC3 es sintetizada como proLC3 el cual es escindido por Atg 4B para formar LC3-I dejando expuesto el carboxilo terminal de la glicina, este carboxilo expuesto de LC3 es esencial para la

formación de un puente tioéster con el sitio activo de cisteína de ATG7 y ATG3 y también es importante para la formación de un puente amida con la fosfatidiletanolamina; posteriormente LC3 I es activado por ATG7, transferido a ATG3, y finalmente conjugado a la fosfatidiletanolamina, el cual se denomina LC3-II. LC3-I se encuentra ubicado en el citosol mientras que LC3 II se ubica en la superficie citoplásmica del autofagosoma (por esta razón es utilizado como marcador de autofagia) y posteriormente es deslipidado por ATG4B reciclándolo a LC3-I para posterior formación de nuevos autofagosomas. (25)



**Figura 6.** Modelo esquemático de los complejos ATG durante la autofagia. El complejo ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 es activado por la vía de señalización de mTOR para inducir autofagia (Iniciación). Seguido de la inducción de la autofagia, el omegasoma es formado por el retículo endoplásmico (ER) por asociación con DFCP1. Dos fosfatasa PI(3)P, Juny y MTMR3, son reguladores negativos de éste proceso. Lo siguiente es la formación de la membrana de aislamiento, la cual se elonga para envolver componentes citoplásmicos, incluyendo la mitocondria y el RE (elongación). La asociación con el complejo Atg5-Atg12-Atg16L forma la membrana de aislamiento. LC3-II se localiza en la membrana de aislamiento en las etapas tardías de la formación del autofagosoma, mientras el complejo Atg5-Atg12-Atg16L se disocia del autofagosoma. Finalmente la membrana de aislamiento se cierra para formar el autofagosoma (maduración). Después de su formación, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma (fusión autofagosoma-lisosoma) para formar el autolisosoma. El contenido intra-autofagosomal es degradado por hidrolasas lisosomales. Después de la formación del autolisosoma, las hidrolasas lisosomales, degradan el contenido intra-autofagosomal, incluyendo a LC3-II. Todos éstos eventos ocurren dentro de 10 a 15 min. Después de la degradación, el protolisosoma es elongado del autolisosoma. Tanida Isei. Microbiol Inmunol 2011; 55: 1-11

### 1.8.3 Etapas de la autofagia

La autofagia se divide en seis pasos: formación del omegasoma, iniciación de la membrana de aislamiento, alargamiento de la membrana de aislamiento, formación autofagosoma, fusión autofagosoma-lisosoma y degradación (**Figura 6**).

**Iniciación.** El complejo de la proteína cinasa ULK1 activa la autofagia a través de la vía mTOR. El omegasoma, que tiene la forma de la letra griega omega, primero se forma desde el retículo endoplásmico. Una proteína de unión a PI(3)P, DFCP1, se localiza en el omegasoma en condiciones de inanición pero se localiza en el retículo endoplásmico y Golgi en condiciones ricas en nutrientes.

El complejo PI3K- ATG14-Vps34-beclin1 regula positivamente la formación del omegasoma DFCP1-positivo. Después de la formación del omegasoma, la membrana de aislamiento o fagóforo es formada en el interior del anillo del omegasoma (**Fig. 6 Iniciación**).

**Elongación.** El complejo ATG12-ATG5-ATG16 está localizado en la membrana de aislamiento, así como la proteína ATG9, WIPI1, el complejo proteína cinasa ULK1 y el complejo PI3K-ATG14-Vps34-beclin1. Dos PI3P-fosfatasa (Jumpy o MTMR14 y MTMR3) regulan negativamente la formación del omegasoma y la membrana de aislamiento. El complejo ATG12-ATG5-ATG16 localizado en la membrana de aislamiento, se elonga para engullir componentes citoplásmicos. En etapas tardías de la elongación de la membrana de aislamiento el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 es progresivamente disociado de la membrana de aislamiento mientras que LC3-II es localizado en ambos sitios de la membrana (52). Rab32 y Rab33b contribuyen también a la elongación de la membrana de aislamiento (**Figura 6 Elongación**).

**Formación del autofagosoma.** La membrana de aislamiento se cierra para formar el autofagosoma. Mientras LC3-II es localizado en autofagosomas, la mayoría del complejo ATG12-ATG5-ATG16 se disocia del autofagosoma (42). Durante éste proceso, LC3-II es incrementado. (**Figura 6 Maduración**).

**Fusión del autofagosoma con el lisosoma.** La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar un autolisosoma, proceso que requiere de Rab7. Seguido de la formación del autolisosoma, ATG4B deslipida a LC3-II en la superficie citosólica para convertirlo en LC3-I. Ésta fusión es regulada positivamente por el complejo PI3K-UVRAG-Vps34-beclin1 y regulado negativamente por el complejo PI3K-Rubicon-UVRAG-Vps34-beclin1 (**Figura 6 Fusión autofagosoma-lisosoma**).

**Degradación.** Seguido de la formación del autolisosoma, hidrolasas lisosomales, incluyendo catepsinas, enzimas glicolíticas lisosomales y lipasas, degradan el contenido intra-autofagosomal. En este paso, catepsinas degradan a LC3-II en el interior del autolisosoma. Después de la digestión del contenido del autolisosoma, una proteína positiva de membrana 1 asociada a lisosoma y una estructura tubular negativa asociada a LC3 (protolisosoma), es elongado del autolisosoma, el cual forma una vesícula y madura dentro del lisosoma por acumulación de hidrolasas lisosomales. (23-25)

#### **1.8.4 Papel de la autofagia en la muerte intracelular de *M. tuberculosis*.**

Los mecanismos moleculares por los cuales *M. tuberculosis* es el blanco de la autofagia han sido ampliamente investigados. IRGM, un miembro de los trifosfatasa guanosina relacionadas con la inmunidad innata (IRGs), se demostró que se requiere para la autofagia mediada por *M. tuberculosis* (41). IRGM se localiza en la mitocondria y mediante la interacción con la cardiolipina, induce la producción de ROS y la fisión mitocondrial, dos eventos requeridos en la autofagia para la muerte de *M. tuberculosis*. (27) Recientemente, los miembros de otra familia de IRGs, las proteínas de unión a guanilato inducida por interferón, GBP1 y Gbp7, se han relacionado con la actividad anti micobacterial de la autofagia. Se encontró que ambas proteínas que se asocia físicamente con los factores de la autofagia, es decir GBP1 interactúa con la proteína p62 y Gbp7 asociados con Atg4. (26)



La autofagia no solo permite la maduración de los fagosomas conteniendo *M. tuberculosis*, sino que también asegura la producción y entrega al lisosoma de péptidos con actividad antimicrobiana que se originan del procesamiento de proteínas citosólicas como la proteína ribosomal rpS30. (43)

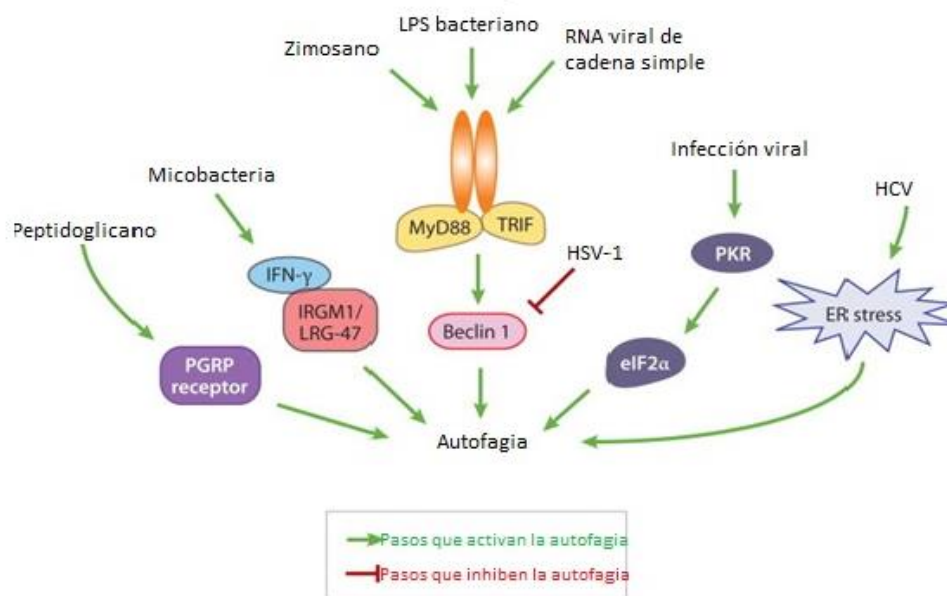
Se ha reportado que la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv es capaz de inhibir la autofagia basal en los macrófagos y células dendríticas. En particular, se describe una acumulación de autofagosomas en células infectadas con *M. tuberculosis* como resultado de su capacidad deteriorada para fusionarse con los lisosomas. Esta inhibición se establece entre 8 y 16 h post-infección y puede ser revertida mediante tratamiento rapamicina. En particular, mediante la comparación de H37Rv con la cepa no virulenta de *M. tuberculosis* H37Ra y el Bacillus Calmette y Guerin (BCG), se sabe que sólo H37Rv es capaz de poner en peligro la autofagia en la fusión del autofagosoma con el lisosoma. (27)

### **1.8.5 Factores que inducen autofagia**

La autofagia ocurre espontáneamente a niveles basales y se conoce como “autofagia basal”. Sin embargo, este proceso se regula rápidamente cuando las células necesitan producir nutrientes intracelulares y energía durante condiciones en las que hay una privación de nutrientes (ejemplo: baja concentración de aminoácidos, disminución de factores de crecimiento y cuando se produce una acumulación de componentes citoplasmáticos dañados en la célula (orgánulos dañados o formación de agregados de proteínas que se acumulan en la célula). En estos casos, el proceso se conoce como “autofagia inducida”. Además, tras una infección, las células también aumentan los niveles de autofagia. Por tanto, este proceso sirve como una respuesta común al estrés extracelular (hipoxia, altas temperaturas, falta de nutrientes) e intracelular (daño de orgánulos), permitiendo a los organismos eucariontes sobrevivir bajo estas condiciones mediante el reciclado. Además de la señalización de Insulina y aminoácidos, muchos otros factores están implicados en la regulación de la autofagia. (48)

### 1.8.5.1 Inducción de autofagia por patógenos

La autofagia tiene un papel importante en la eliminación de patógenos invasores y la autofagia inducida por patógenos también conocida como xenofagia parece ser independiente de la vía mTOR. **(Figura 7)**. Los miembros de la familia de la proteína de reconocimiento a peptidoglicano (PGRP), juegan un papel importante en la detección y monitoreo de patógenos. (26). La señalización de los receptores tipo Toll (TLRs) desencadenan la autofagia durante la inmunidad innata y adaptativa en mamíferos. TLRs son receptores de membrana localizados en la superficie celular de endosomas y su activación induce la transcripción de los genes responsables de la estimulación de células T y la inflamación. (33) Diferentes TLRs están implicados en la inducción autofagia tras la unión de sus ligandos específicos derivados de patógeno. Además (IFN)- $\gamma$  su efector Irgm1 el IFN-inducible relacionado con inmunidad GTPasa) es requerido para estimular la autofagia en macrófagos e inhibir la supervivencia de micobacterias intracelulares. (47)



**Figura 7.** Mecanismos que regulan la autofagia por invasión de patógenos intracelulares. El adaptador de proteínas del receptor de tipo Toll, MyD88 y TRIF, disocian a Beclin1 de su inhibidor Bcl-2 e inducen autofagia, mientras que la proteína de HSV-1 ICP34.5 bloquea la autofagia mediante la unión y secuestro de Beclin1. HSV-1, virus de herpes simplex tipo 1; VHC, virus de la hepatitis C. Annu Rev Genet. 2009; 43: 67–93.

### 1.8.5.2 Inducción farmacológica de la autofagia

Recientemente, varios fármacos han demostrado inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* a través de la inducción de la autofagia. La inducción de la autofagia celular para mejorar el tratamiento es atractivo porque puede favorecer la muerte intracelular de los bacilos; puede ser activa para *M. tuberculosis* farmacosensibles o farmaco-resistentes y en particular, puede ser crucial para eliminar la latencia a través de la muerte y la no replicación de *M. tuberculosis* dentro de los fagosomas. (35, 38)

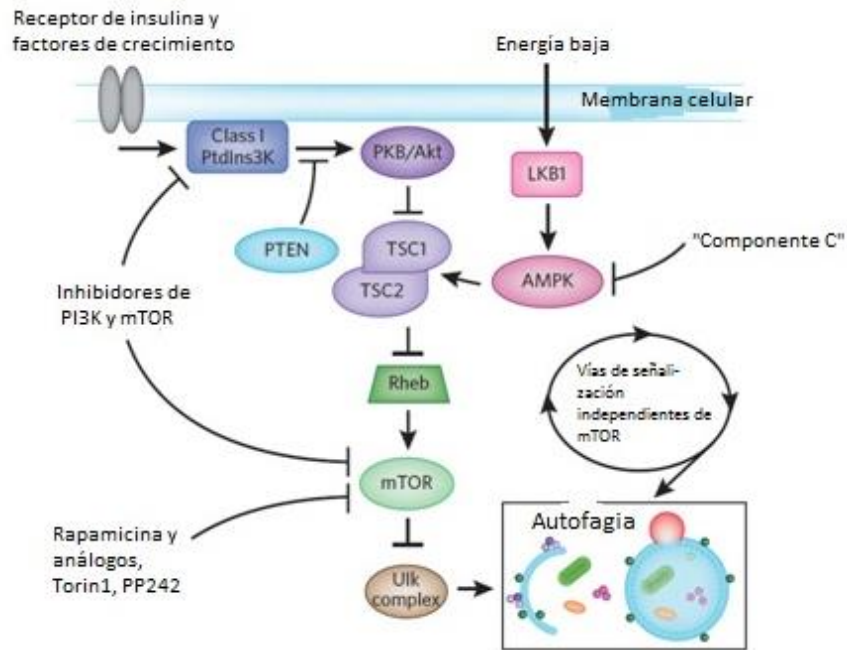
En general una variedad de fármacos han demostrado ser capaces de inducir autofagia de manera independiente a cualquier proceso infeccioso. Por ejemplo:

**a) Inductores de autofagia dependientes de mTOR. (Figura 8).** Existe un gran número de moléculas blanco de la vía de mTOR. Un ejemplo es la rapamicina y su análogo sirolimus, un agente inmunosupresor y anti fúngico que forma un complejo con FKBP-12 (proteína que interactúa con el receptor de PI3) (30) e inhibe la actividad de la cinasa de mTOR1, induciendo la autofagia. (mTOR2 es resistente a rapamicina). (28)

Algunos inhibidores nuevos de mTOR que compiten con ATP, como PP242, PP30 y WYE-125132, tienen una actividad inhibitoria de mTOR mayor que rapamicina, sin embargo su eficacia para inducir autofagia no está bien documentada. (29)

Las cascadas de señalización de PI3K juegan un papel importante en el control del complejo mTOR1. La familia de la proteína cinasa PI3 se divide en tres clases. PI3K clase I y III juegan un papel opuesto en la autofagia; inhibiendo su actividad o acelerando el proceso, respectivamente. La vía PI3K clase I es iniciada por la unión de factores de crecimiento o insulina a los receptores de superficie celular, activandola para convertir el lípido de membrana plasmática fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 juega un papel clave en el reclutamiento de proteínas, como la serina/treonina cinasa 1 dependiente de fosfoinositol (PKD1) y AKT (PKB) a la membrana plasmática. AKT está involucrada en la traducción de señales de la vía PI3K que modula la

actividad autofágica, vía mTOR1. La cinasa PI3 clase III regula la autofagia incrementando la concentración de PI3P. (31)

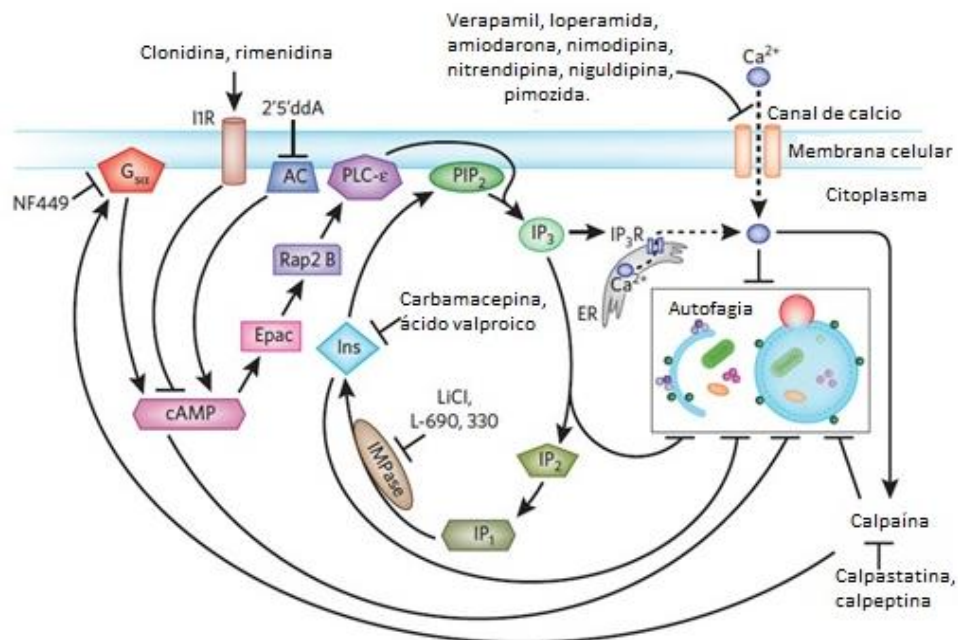


**Figura 8.** Representación esquemática de la vía de señalización de mTOR. La autofagia es regulada negativamente por mTOR, una cinasa serina/treonina, vía formación del complejo mTORC1. Este complejo es inhibido por inhibidores específicos incluyendo rapamicina (y sus análogos), Torin1 y PP242, que también inducen autofagia. Río arriba de mTOR, la vía puede manipularse farmacológicamente por la inhibición de AMPK. Además, inhibidores duales de PI3K y mTOR que específicamente blanquean a cinasas PI3 clase I, golpea esta vía en dos puntos, ejerciendo un efecto inductor más fuerte que los inhibidores de mTOR. . Fleming et. al Nature Chemical Biology 7, 9-17 (2011)

**b) Inductores de autofagia independientes de mTOR. (Figura 9).** Una de las vías independientes de mTOR está regulada por niveles de calcio intracelular e involucra canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L o implica a GPCP a la que el ligando de éste receptor se une. En condiciones de estrés, la autofagia independiente de mTOR, se promueve por disminución de los niveles de IP3 (inositol trifosfato) como es el caso de carbamacepina y ácido valproico que activan la vía IP3 lo cual puede servir como tratamiento adyuvante contra la Tb; o por bloqueo de la actividad de cisteín proteasas dependientes de calcio (calpains) como es el caso de verapamil y loperamida.

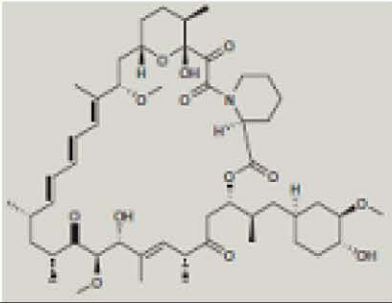
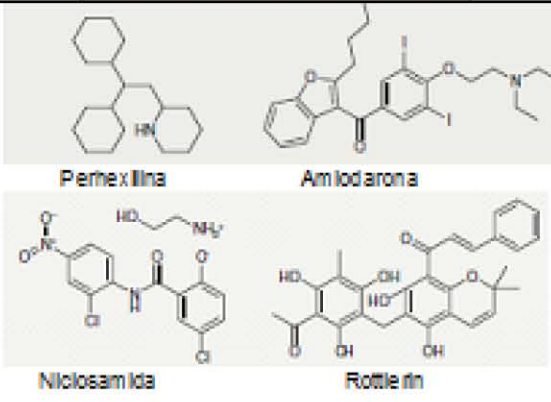
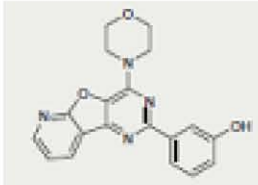

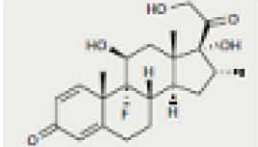
Ejemplos de inductores positivos de autofagia que actúan como antagonistas de los canales de calcio tipo L son verapamil, un agente anti-arrítmico, loperamida, un agente antidiarreico, nimodipina y nitrendipina, agentes antihipertensivos; éstos fármacos inducen autofagia previniendo la entrada de calcio y así disminuyen los niveles de calcio citosólico, que tiene como consecuencia la inhibición de calpain proteasas dependientes de calcio. Entre las moléculas que activan la autofagia independientes de mTOR, están los anticonvulsivantes ácido valproico y carbamazepina (inhibidores de la sintasa myo-inositol-1-fosfato) o litio y L690,330 (inhibidores de la monofosfatasa de inositol), los cuales inhiben la síntesis de inositol y disminuyen los niveles de IP3. (29)

as calpains inhiben la autofagia por escición de Gαs activando su actividad para producir mas AMPc, el cual es un inhibidor de autofagia. (31)

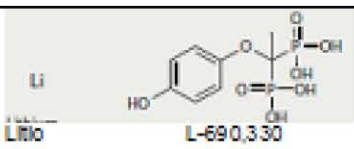

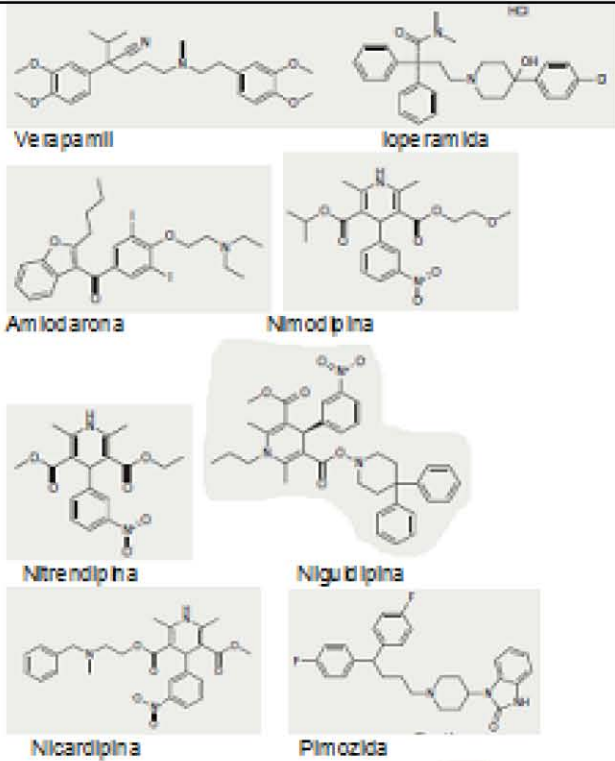
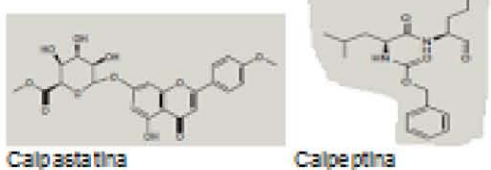
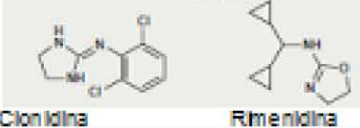
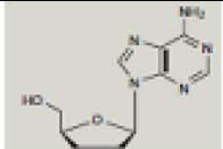


**Figura 9.** Vías de inducción de autofagia independiente de mTOR. Nuevos agentes inductores de la autofagia participan en las vía cíclica de Ca<sup>2+</sup> – calpaína–G<sub>s</sub> la vía c –Epac–PLC-ε–IP<sub>3</sub> que pueden ser inducidas farmacológicamente para modular la autofagia. Inhibición de varios componentes de estas vías resultan en la inducción de la autofagia. Sin embargo, el mecanismo exacto por los cuales los niveles de cAMP, Ca<sup>2+</sup>, calpaína, inositol o IP<sub>3</sub> controlan la autofagia todavía tienen que ser aclaradas. Fleming et. al Nature Chemical Biology 7, 9-17 (2011)

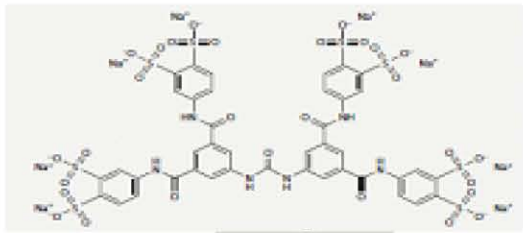
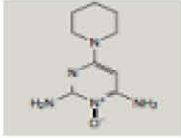
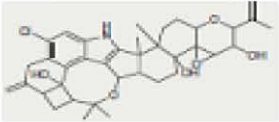
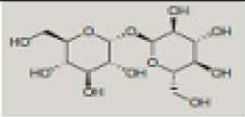

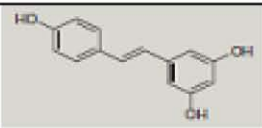
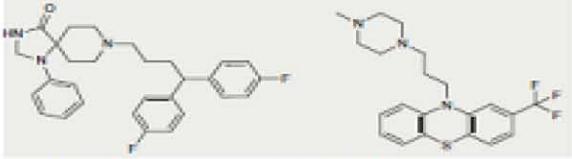
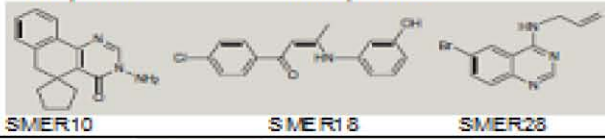
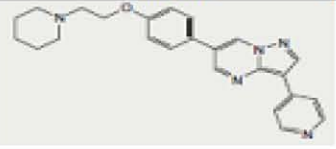
**Tabla 3.** Moléculas inductoras de autofagia

Compuesto	Estructura química	Clase farmacológica o modo de acción	Mecanismo
<b>Inductores de autofagia dependientes de mTOR</b>			
Rapamicina y análogos (CCI-779, RAD001, AP23573)		Inhibe al complejo 1 de mTOR	Induce autofagia por inhibición del complejo 1 mTOR
Perhexilina Amiodarona Niclosamida Rottlerin		Bloqueador de canales de calcio. Antiarrítmico clase III. Antiparasitario. Inhibidor de la cinasa de calmodulina III	Inhibe al complejo 1 mTOR o pasos arriba en la vía mTOR
Torin1	Sin estructura	ATP-inhibidor competitivo de mTOR	Se une directamente a mTOR1 y mTOR2
PI103 y compuestos relacionados estructuralmente		Inhibidor de PI3K y mTOR	Altamente selectivo al inhibidor PI3K clase I y al inhibidor mTOR competitivo de ATP
Fenitil isotiocianato (PEITC)		Desconocido	Suprime la fosforilación de AKT y mTOR
Dexametasona		Glucocorticoide	Sobregula la desfosforilación dependiente de AKT

**Tabla 3.** Moléculas inductoras de autofagia, (continuación)...

Inductores de autofagia independientes de mTOR			
Litio, L-690,330		Inhibidor de IMPasa	Reduce los niveles de inositol e IP <sub>3</sub>
Carbamacepina Ácido valproico		Antiepilépticos (inhibidor de IMP sintasa)	Reduce los niveles de inositol e IP <sub>3</sub>
Verapamil loperamida Amiodarona Nimodipina Nitrendipina Niguldipina Nicardipina Pimozida		Bloqueadores de canales de calcio	Reducen los niveles intracitosólicos de calcio
Calpastatina Calpeptina		Inhibidores de calpaína	Inhiben a la calpaína
Clonidina Rimenidina		Agonistas del receptor 1 de imidazol	Reduce niveles de AMPc
2',5'-Dideoxiadenosina		Inhibidor de la adenil ciclasa	Reduce los niveles de AMPc

**Tabla 3.** Moléculas inductoras de autofagia, (continuación)...

NF449		Inhibidor de Gαs	Reduce los niveles de AMPc
Minoxidil		Abre canales de K <sup>+</sup> dependientes de ATP	Desconocido
Penitrem A		Inhibe alta conductancia de los canales de K <sup>+</sup> dependientes de calcio	Desconocido
Trehalosa		Chaperona	Desconocido
Spermidina		Inhibe histonas acetil transferasas	Afecta la expresión de genes ATG
Resveratrol		Activa sirtuin-1 (histona deacetilasa), inhibe a la cinasa P70S6	
Fluspirileno, trifluoperazina		Antagonistas de dopamina	Desconocido
SMER10, SMER18, SMER28 y análogos		Desconocido	Desconocido
Compuesto C (dorsomorfinina)		Desconocido	Inhibe la actividad de la cinasa AMP

Las características farmacológicas y mecanismos de acción de los inductores de autofagia son presentados. Una variedad de ensayos han sido empleados para demostrar la inducción de autofagia. Fleming et. al Nature Chemical Biology. 2011



## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la tuberculosis es una enfermedad que de tratarse oportunamente es curable, sin embargo la poca adherencia al tratamiento por parte de los pacientes ocasiona cepas fármaco-resistentes que son aún más difíciles de controlar con medicamentos de primera línea, siendo los de segunda línea más tóxicos, además de que generan efectos secundarios graves. Es por ello que se necesita un tratamiento más corto y menos tóxico capaz de permitir la eficiente eliminación de *M. tuberculosis*.

Se ha reportado que la autofagia está involucrada en la eliminación de *M. tuberculosis* en un proceso selectivo denominado xenofagia y que puede ser inducida por fármacos aprobados para consumo humano como loperamida, ácido valproico y verapamil. Es por ello que el presente trabajo se enfoca en la inducción farmacológica de la autofagia para el control de la infección por *M. tuberculosis*.

### **3. HIPÓTESIS**

Los fármacos Loperamida, ácido valproico y verapamil inducen autofagia en macrófagos permitiendo controlar la infección por *M. tuberculosis*.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Investigar el potencial terapéutico de loperamida, ácido valproico y verapamil para favorecer la eliminación de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos y alveolares murinos con enfoque en la inducción de autofagia.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si loperamida, ácido valproico y verapamil inducen autofagia en macrófagos humanos (MDMs) y macrófagos alveolares murinos *in vitro*.
2. Analizar el efecto bactericida del tratamiento *in vitro* con loperamida, ácido valproico y verapamil sobre el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*.
3. Evaluar si la administración sistémica de loperamida, ácido valproico y verapamil preactiva a los macrófagos alveolares murinos para un mejor control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Sujetos de estudio**

**Humanos.** Se utilizaron paquetes leucocitarios de donadores sanos del banco de sangre del INER.

**Ratones.** Se emplearon ratones machos BALB/c de 8-10 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en condiciones convencionales de bioferio (aire filtrado,  $21\pm 1$  °C, con un 50-60% de humedad, en cama estéril) con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo de luz y oscuridad de 12-12 horas. El protocolo fue aprobado por los Comités de Bioética de la Ciencia del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas y todos los experimentos se llevaron a cabo bajo los principios en el cuidado de los animales aprobados por American Physiological Society.

### **5.2 Obtención de macrófagos derivados de monocitos (MDMs) a partir de células mononucleares de sangre periférica.**

Se colocaron 20mL de un paquete fresco leucocitario obtenido del banco de sangre del INER en tubos falcon de 50mL, junto con 25mL de medio RPMI (Lonza) suplementado con 50µg/ml de sulfato de gentamicina (Sigma) y 200 mM de L-glutamina (Lonza) (RPMI G+G) y 10mL de solución separadora de linfocitos (Lonza); los tubos se centrifugaron a 1200rpm a temperatura ambiente (TA) durante 45min; se recuperó el anillo leucocitario y se lavó tres veces con medio RPMI G+G. A partir de éstas células mononucleares de sangre periférica se purificaron los monocitos por selección positiva utilizando perlas CD14 de Miltenyi Biotec de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente se centrifugaron las células recuperadas a 1200rpm por 15min a 4°C; se descartó el sobrenadante y se agregó 5 mL de RPMI con 10% de suero humano descomplementado y se contaron las células utilizando la cámara de Neubauer. La viabilidad se determinó por exclusión de azul de tripano y fue superior al 98% en todos los casos. Se ajustaron las células a  $1 \times 10^6$  MN/mL.

### 5.3 Obtención de macrófagos alveolares de ratón

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron sus pulmones lavados con PBS pH=7.5 (Lonza), sin bronquios, vasos sanguíneos superiores, corazón, timo ni tejido conectivo. Las células de pulmón se digirieron con un kit de enzimas de disociación de pulmones de ratón (Miltenyi 130-095-927) y se homogenizaron en un gentle MACS Dissociator (Miltenyi). Las células se transfirieron a un tubo falcon con filtro de 40  $\mu$ L y se resuspendieron en buffer PEB (PBS, BSA al 0.5% y 2mM de EDTA) y se contaron con la cámara de Neubauer. La viabilidad fue observada por exclusión de azul de tripano (Gibco) y fue la misma que se obtuvo para los MDMs. Las células alveolares se centrifugaron 10min/290g/20°C para eliminar el PEB y se resuspendieron en RPMI G+G y 10% de suero fetal bovino para tener una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.

### 5.4 Fármacos utilizados para inducir autofagia

Sulfóxido de dimetilo, clorhidrato de loperamida (4- (p-clorofenil) -4-hidroxi-N, N-dimetil- $\alpha$   $\alpha$ -difetil-1-piperidinebutyramide hidrocioruro) # de catálogo: L4762-5G; sal de sodio ácido valproico (ácido 2-propil-pentanoico) # de catálogo: P4543-10G y clorhidrato de verapamilo (5- [N- (3,4-Dimetoxi-fenil-etil) metil-amino] -2- (3,4-dimetoxi-fenil) -2-clorhidrato isopropil-valeronitrilo) # de catálogo: V106-25MG fueron adquiridos de Sigma -Aldrich, St Louis, MO, EE.UU. y se resuspendieron en el diluyente recomendado por el fabricante.

Las concentraciones utilizadas *in-vitro* se establecieron de acuerdo a resultados de experimentos previos, los cuales mostraron mayor viabilidad celular y fueron: rapamicina 250 ng/ml; loperamida 3  $\mu$  ; cido valproico 1  $\mu$  verapamil 50 ng/ml.

### **5.5 Preparación de *M. tuberculosis* H37Rv para la infección *in vitro*.**

La cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC#25618) fue crecida en medio líquido 7H9 (Difco), suplementado con 10% de ADC (albúmina, dextrosa y catalasa, Becton Dickinson, BD) y 2 % de glicerol (Merck). Después de 21 días de incubación en agitación orbital a 37°C se cosechó por centrifugación a 3000 rpm, 30 minutos a 18°C. Las bacterias fueron resuspendidas en medio 7H9, se separaron en alícuotas y fueron congeladas a -80°C hasta su uso.

Se disgregaron las bacterias de una alícuota ( $1 \times 10^9$  bacterias/ml) con perlas de cristal de 3 mm de diámetro durante 5 minutos, se centrifugaron a 900 x g durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante y se resuspendió en medio RPMI con 30% de suero humano descomplementado para los MDMs o suero fetal bovino para los MAm.

### **5.6 Infección *in vitro* con *M. tuberculosis*.**

Los macrófagos (MDMs y MAm) de cada sujeto se colocaron por duplicado en placas de poliestireno de 8 pozos (Chamber slides) (Costar) a razón de  $5 \times 10^5$  células por pozo (Volumen por pozo: 500  $\mu$ l). Las células se infectaron con *M. tuberculosis* a razón de 5 bacterias por macrófago ( $2.5 \times 10^6$  bacterias/pozo) durante 1 hora, al término de este tiempo los pozos se lavaron tres veces con medio RPMI para eliminar las bacterias que no fueron fagocitadas y se incubaron 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente a las células que no se les administró el fármaco a nivel sistémico se estimularon *in vitro* con los fármacos loperamida, ácido valproico y verapamil y 24 h después se analizaron por microscopía de fluorescencia. Para biología molecular se colocaron las células de cada sujeto por duplicado en placas de 24 pozos de baja adherencia (Costar) a razón de  $5 \times 10^5$  células por pozo. Volumen por pozo: 500  $\mu$ l y se infectaron y se estimularon de igual manera que las anteriores. Se lisaron las células con 350  $\mu$ l de buffer de lisis RLT (Qiagen) y se recuperó el lisado para la obtención de RNA y análisis por técnicas de biología molecular y los lisados se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Para la determinación de las UFC, se colocaron las células de cada sujeto por duplicado o triplicado en placas de 96 pozos (Costar) a razón de  $2 \times 10^5$  células/pozo (Volumen por pozo: 200  $\mu$ l). Las células se infectaron con *M. tuberculosis* a razón de 1 bacteria por macrófago ( $2 \times 10^5$  bacterias/pozo) y 5 bacterias por macrófago ( $1 \times 10^6$  bacterias/pozo) durante 1 hora y enseguida las células que no recibieron tratamiento previo se estimularon *in vitro* con los fármacos o se dejaron con medio, posteriormente se incubó durante 1 y 72 horas (D0 y D3). Las dosis de infección utilizadas ya se tienen estandarizadas en el laboratorio, debido a que una dosis por macrófago (MOI 1) es un modelo de infección natural y más de 5 bacterias por macrófago ya no se puede controlar la infección con la micobacteria virulenta.

### **5.7 Microscopía de fluorescencia.**

Se eliminó el medio de cultivo de las placas y se lavaron dos veces las células con solución de lavado 1 (PBS-0.1% y BSA), posteriormente se fijaron con 400  $\mu$ l de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces con solución de lavado 1 y se bloquearon con 400  $\mu$ l de la solución de bloqueo (PBS-10%, SFB-1%, BSA-0.3% y Tritón X100) durante 45 minutos. Se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron 50  $\mu$ l de anticuerpo anti-LC3-FITC (Thermo Scientific, 1mg/mL) diluido 1:75 en solución de dilución (PBS, BSA-1%, SFB-1%, NaN3-0.01% y 0.3% Tritón X100) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, posteriormente se añadieron 50  $\mu$ l de Hoescht (Enzo) diluido 1:1000 en solución de dilución y se incubó durante 10 minutos en oscuridad; se lavaron las células dos veces por 5 minutos con solución de lavado 2 (PBS-1 % BSA-0.05 % y Tween 20); se desmontó la cámara y se añadieron 25  $\mu$ l de medio de montaje (ProLong Antifade Reagent), se dejaron curar las laminillas durante 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad a 4°C hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia AxioScope 1.A (Carl Zeiss). Se contaron las células por cada campo observado y se calculó el porcentaje de vesículas LC3+

Las células infectadas se procesaron igual a las que no se infectaron hasta la adición de la solución de bloqueo. Enseguida se añadieron 50 µl de anticuerpo primario anti-Mtb (suero hiperinmune de conejo preparado en el laboratorio por inmunización con Mtb H37Rv) diluido 1:1000 en solución de dilución y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, posteriormente se lavaron las células dos veces con solución de lavado 2 y se añadieron 50µl del anticuerpo secundario (Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG, life technologies A11037, 2mg/mL) y se dejó incubar por 1 hora en oscuridad. Después se lavaron las células dos veces con solución de lavado 2 y se añadieron 50µl del anticuerpo Anti-LC3-FITC diluido 1:75 en solución de dilución y se incubó por 1 hora en oscuridad. Sin lavar se añadieron 50µl de Hoescht diluido 1:1000 en solución de dilución y se dejó incubar por 10 minutos; se lavaron dos veces las células con solución de lavado 2; se desmontó la cámara y se añadieron 25µl de medio de montaje, se dejaron secar las laminillas durante 24 horas en oscuridad y a temperatura ambiente hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia. Se calculó el porcentaje de vesículas LC3+ y el porcentaje de bacterias que colocalizaban con LC3.

## **5.8 Purificación de RNA total.**

Se agregaron 350 µl de etanol al 70% al lisado celular y se mezcló por pipeteo. Se transfirió la muestra a una columna de microcentrifugación (Qiagen) y se centrifugó 30 segundos a 12000 rpm; se eliminó el eluido en el tubo procesado y se lavó la columna con 350 µl de buffer W1 Quiagen y se centrifugó 30 seg a 12000 rpm.

Para remover el etanol se agregaron 80 µl de la mezcla de sales 1 en la membrana de la columna y se dejó a T amb durante 15 min. Se lavó de nuevo la columna con 350 µl de W1 y se centrifugó 20 seg a 12000 rpm. Se eliminó el eluido y se agregaron 500 µl de tampón RNeasy Lysis Quiagen en la columna y se centrifugó 20 seg a 12000 rpm. Se volvió a lavar la columna con 500 µl de tampón y se centrifugó 2 min a 12000 rpm. Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 mL y se

agregaron 20  $\mu$ l de agua libre de sales (agua-DEPC) en la membrana y se centrifugó 1 min a 8000 rpm para eluir el RNA. Se almacenó el RNA purificado a -20°C en agua DEPC para evitar la degradación del RNA.

### 5.9 Síntesis de cDNA a partir del RNA purificado

Se colocaron 4  $\mu$ l de la mezcla de random hexámeros (random Hexámeros dT mix) a viales y se agregaron 16  $\mu$ l de agua estéril en el vial correspondiente; se incubó 5 min a 65°C en el termociclador Bio Rad y después se agregaron 18  $\mu$ l de la mezcla de reacción 10x RT buffer; 25  $\mu$ g Cl<sub>2</sub>; 0.1 U<sub>T</sub>; 1  $\mu$ l de la mezcla OUT a cada tubo se incubó a 25°C durante 2 min. y se agregaron 2  $\mu$ l de la enzima superscript II RT (50 u/ $\mu$ L) a cada vial y se volvió a incubarse a 10 min a 25°C; 50 min a 42°C; 15 min a 72°C; 4 min a 4°C. Para eliminar el RNA usado como template se agregaron 2  $\mu$ l de la mezcla H a cada tubo se incubó 20 min a 37°C. Los tubos se almacenaron a -20°C hasta su amplificación por PCR.

### 5.10 Expresión génica

La evaluación cuantitativa de los genes LC3, ATG16L1 e IRGM, se realizó por PCR en tiempo real utilizando los juegos de primers y sondas Taqman específicos comerciales prediseñados (Applied Biosystems). LC3: (Mm00782868\_sH) y (Hs00797944\_s1); ATG16L1: (Mm00513085\_ml) y (Hs00250530\_m1); IRGM: (Mm00492596\_m1) y (Hs01013699\_s1). La cinética de amplificación de los genes en estudio se midió en tiempo real; el ciclo en el cual la expresión del gen sobrepasó el umbral de detección se denomina Ct y es un indicador de la concentración inicial de mRNA del gen de estudio. La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó por el método de  $\Delta\Delta$ Ct previa validación del método utilizando como gen control endógeno el de 18S RNA (Mm03928990\_g1) y (4319413E-1204057).



### 5.11 Cuantificación de la expresión génica.

Se preparó una mezcla de cDNA diluido 1:2 en agua con DEPC, 1X de Universal Master Mix (AB), 900 nM de los cebadores y 250 nM de las sondas TaqMan (AB) correspondientes al gen de interés. Las muestras se colocaron por duplicado en una placa de reacción óptica de 96 pozos libre de RNAsas (AB). La amplificación se realizó en el equipo Step one Plus (AB), con una estrategia prediseñada por el fabricante para este fin, la cual consiste en: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C para activar la Taq polimerasa y 40 repeticiones de 10 segundos a 95°C para alinear el DNA y 1 minuto a 60°C para elongar el DNA. La expresión de cada gen se normalizó con la expresión del gen de RNA 18S y la cuantificación relativa de la expresión génica de LC3, ATG16L1 e I G se realizó utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$ .

Formulas utilizadas en el método  $\Delta\Delta Ct$ :

La expresión del gen X en la muestra A (tratamiento) relativa a la muestra B (células sin estimular), RQ, se calcula como sigue:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En donde,

RQ es la cuantificación relativa.

$\Delta\Delta Ct$  es la diferencia en la expresión normalizada del gen blanco entre las dos muestras comparadas:

$$\Delta\Delta Ct_{\text{gen x}} = \Delta Ct_{\text{gen x muestra A}} - \Delta Ct_{\text{gen x muestra B}}$$

$$\Delta Ct_{\text{gen x muestra A}} = Ct_{\text{gen muestra A}} - Ct_{18S \text{ muestra A}}$$

$$\Delta Ct_{\text{gen x muestra B}} = Ct_{\text{gen muestra B}} - Ct_{18S \text{ muestra B}}$$

### **5.12 Cuantificación del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos tratados farmacológicamente *in vitro*.**

Después de que los macrófagos se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv y se estimularon con los fármacos post-infección como se describió anteriormente, terminado el tiempo de incubación se hicieron diluciones seriadas (1:10) con medio 7H9 por duplicado para cada condición de infección (MOI 1 Y MOI 5) y se sembraron los macrófagos en placas de agar de 7H10 (Difco), se incubaron por 21 días a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y 85% de humedad relativa y posteriormente se procedió al conteo de las UFC.

### **5.13 Administración sistémica de fármacos a ratones**

Se emplearon 6 ratones para cada grupo de estudio bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Cada animal, incluyendo el grupo control (SSF 0,9%), recibió vía i.p durante 3 días consecutivos, 10 mg/kg de clorhidrato de loperamida, 30 mg/kg de valproato de sodio, o 10 mg / kg de clorhidrato de verapamilo, cada uno disuelto en SSF 0,9%. Veinticuatro horas después de la última administración los ratones se sacrificaron y se obtuvieron los homogenados pulmonares. La autofagia se evaluó también por microscopía de fluorescencia y por PCR en tiempo real como se describió anteriormente.

### **5.14 Cuantificación del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos murinos tratados con fármacos *in vivo*.**

Se hizo el conteo de las UFC de la misma forma que los macrófagos estimulados farmacológicamente *in vitro*. Aquí los fármacos ya se habían administrado sistémicamente (vía i.p) y por lo tanto nada fue añadido al cultivo post-infección.

## 6. RESULTADOS

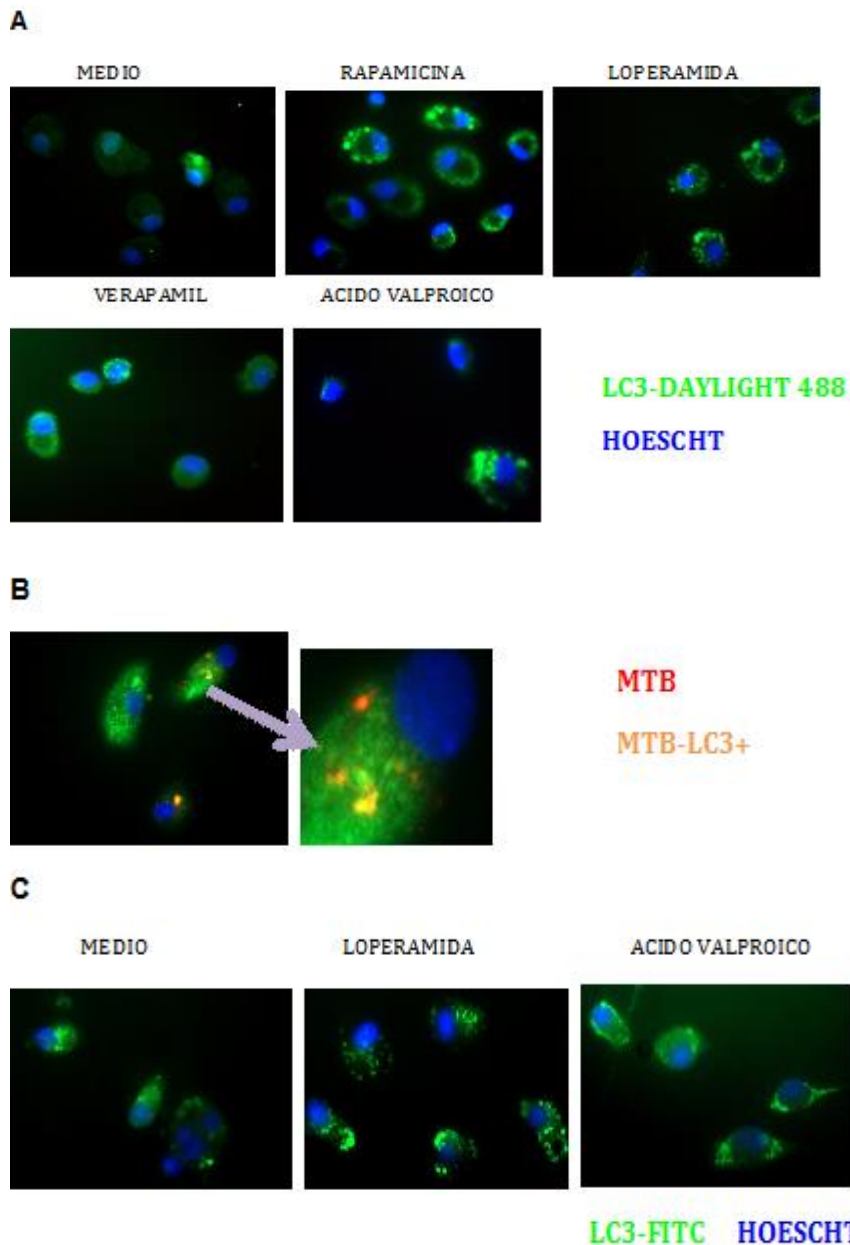
### 6.1 Autofagia por microscopía de fluorescencia.

Para saber si la administración *in vitro* de loperamida, ácido valproico y verapamil inducían autofagia en macrófagos humanos (MDMs) y macrófagos alveolares murinos (MAM) se tiñeron las células con un anticuerpo anti-LC3 el cual marca la proteína LC3 que está unida al autofagosoma y con un colorante para núcleos (Hoescht). Las células infectadas previamente a la administración *in vitro* de los fármacos fueron teñidas usando además un anticuerpo anti-Mtb (**Figura 10**).

Se observó en los MDMs (**Fig. 10A**) y los MAM (**Fig.10C**) la aparición de vesículas LC3 positivas que corresponden a autofagosomas y esto se observó con los tres fármacos (loperamida, ácido valproico y verapamil) y se utilizó a Rapamicina como control positivo de autofagia. En las células infectadas (**Fig. 10B**) se observó colocalización de la bacteria (roja) con los autofagosomas (verde) el cual se ve de color amarillo. Las células son MDMs estimulados con loperamida.

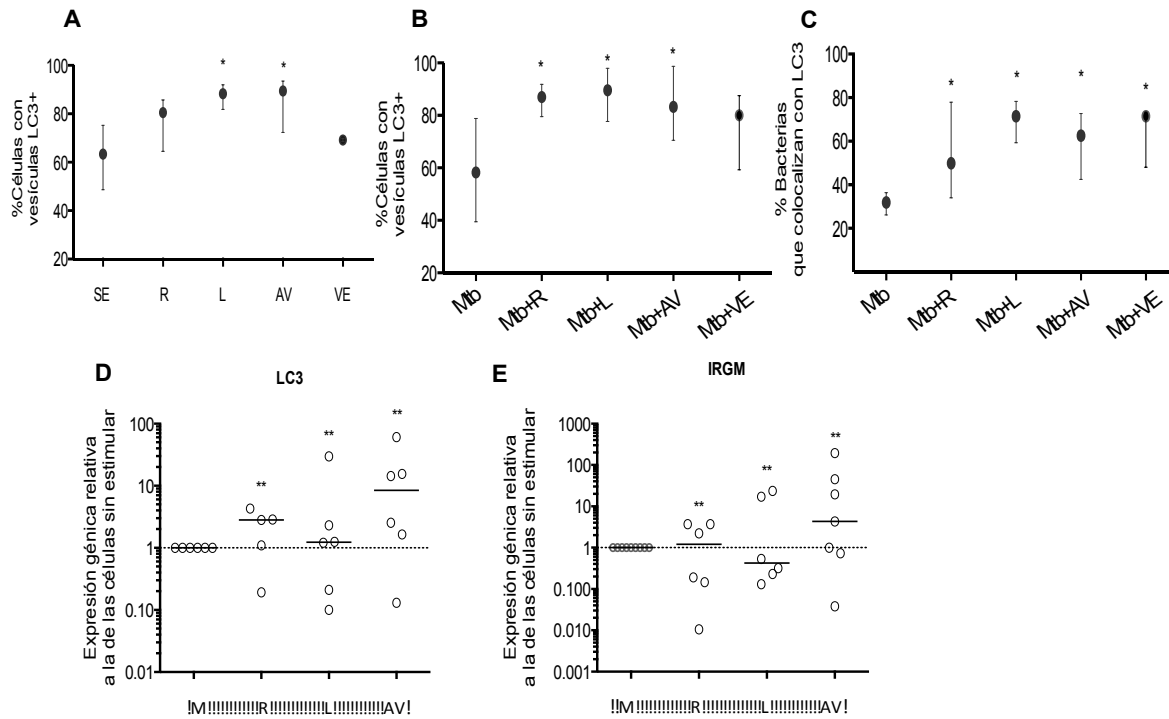
### 6.2 Análisis cuantitativo de autofagia en MDMs y MAM tratados *in vitro* y expresión génica de proteínas relacionadas con la autofagia.

En MDMs (**Fig. 11**) se observó un aumento significativo de células con vesículas autofágicas con loperamida 88.33 (rango 80-100)% y ácido valproico 88.9 (rango 55.56-93.94)%, comparadas con el control (SE) 63.39 (rango 25.45-77.97)% en el caso de las células no infectadas (**Fig.11A**) y comparadas con el control (Mtb) 31.91 (rango 23.53-59.26)% de las células infectadas (**Fig.11B**), las cuales contienen únicamente MDMs con o sin infección, respectivamente, sin la administración de ningún fármaco. n=5-8, \*p<0.05 vs SE



**Figura10. Loperamida, verapamil y ácido valproico inducen autofagia en MDMs y MAm.** MDMs (A) y MAm (C) fueron incubados 24h en presencia de medio, rapamicina, loperamida, ácido valproico y verapamil como se indica en los métodos. Las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-LC3 para marcar los autofagosomas y Hoescht para el núcleo y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. (B) Las células fueron infectadas con Mtb H37Rv con MOI 5 previa a la estimulación con los fármacos y las bacterias no fagocitadas fueron removidas y las células fueron incubadas 24h a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> como se indica en los métodos. Las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-LC3 para marcar autofagosomas, Hoescht para marcar núcleos y un anticuerpo anti rabbit IgG-Alexa 594 para marcar a la bacteria y las células fueron visualizadas por microscopía de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de 6 experimentos independientes.

Para saber qué efecto tiene la infección con Mtb sobre la autofagia de las células tratadas con los fármacos, se infectaron los MDMs con una multiplicidad de infección de cinco bacterias por célula (MOI 5) y se observó que las células infectadas estimuladas con rapamicina, loperamida y ácido valproico también mostraron significativamente mayor porcentaje de vesículas autofágicas en comparación con las células que solo están infectadas (Mtb); además loperamida tiene mayor porcentaje de células con vesículas autofágicas con respecto a rapamicina. Rapamicina 49.87 (rango 27.84-85.71)%, loperamida 71.43 (rango 51.72-87.5)%, ácido valproico 62.5 (rango 14.29-87.88)% y verapamil 71.43 (rango 48-73.3)% aumentaron significativamente el porcentaje de colocación de la bacteria con los autofagosomas con respecto a las células únicamente con Mtb 31.91 (rango 23.53-59.26)% (**Fig. 11C**). n=5-8, \*p<0.05 vs Mtb. También se midió la expresión de genes relacionados con la autofagia (LC3, IRGM) relativa al gen constitutivo del RNA ribosomal 18S en MDMs no infectados, únicamente tratados con rapamicina, loperamida y ácido valproico, tomando como control a las células en medio RPMI G+G donde (M=1) y se observó que tantas veces aumenta o disminuye el gen con respecto al control. Rapamicina aumenta 2.81 (rango 0.19-4.29) veces el control, loperamida 1.23 (rango 0.1-29.67) y ácido valproico 8.43 (rango 0.13-60.5) también sobre expresan significativamente los niveles de LC3 (**Fig. 11D**) mientras que rapamicina 1.20 (rango 0.01-3.68) y ácido valproico 4.29 (rango 0.04-194.2) sobre expresan significativamente al gen IRGM pero loperamida lo regula significativamente a la baja 0.42 (rango 0.13-23.54) veces el control (**Fig. 11E**). n=5-6, \*\*p<0.01 vs M.

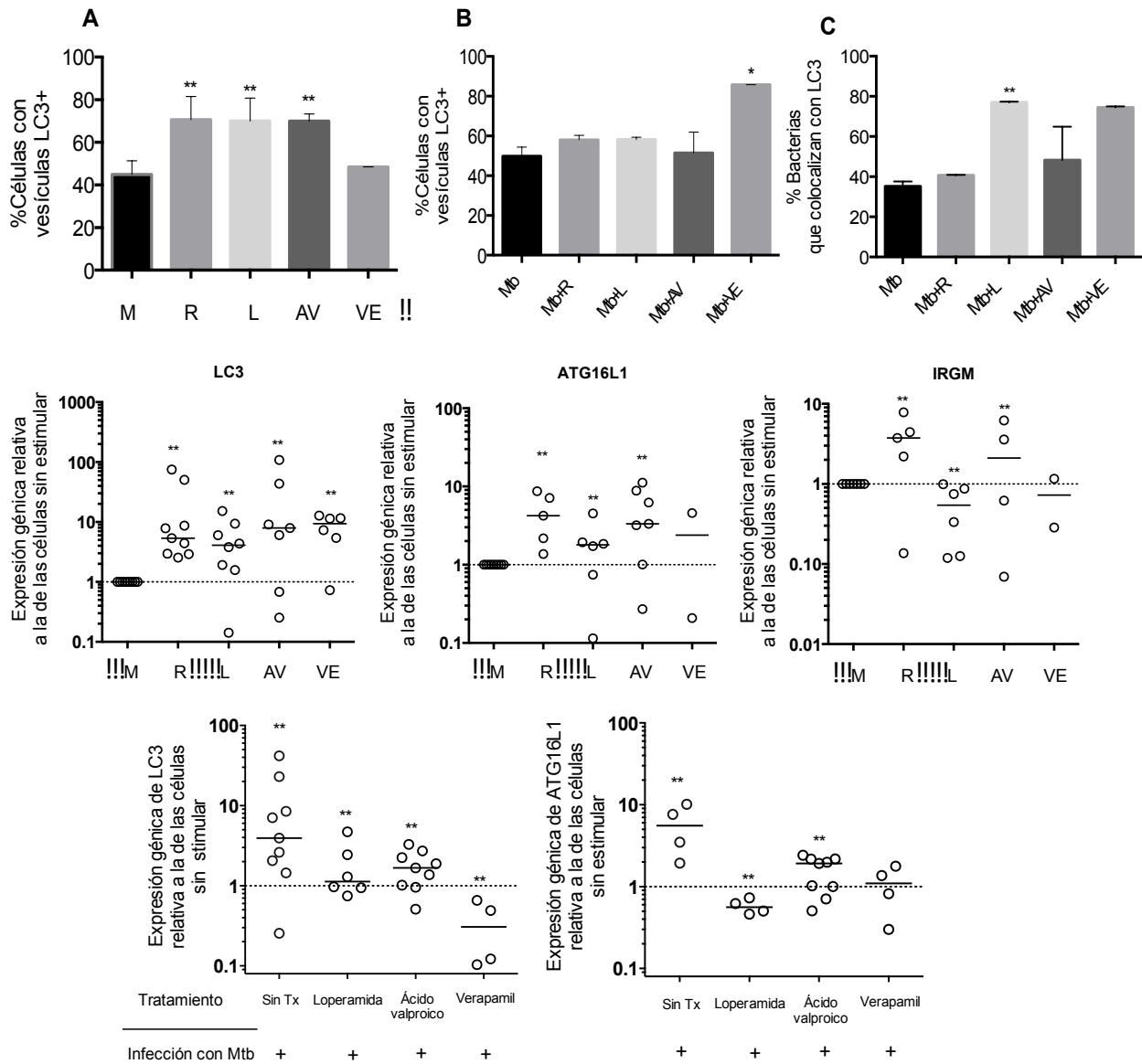


**Figura 11. En MDMs, loperamida y ácido valproico aumentan significativamente el porcentaje de vesículas autofágicas tanto en células no infectadas como infectadas.** Para analizar cuantitativamente la autofagia en las células, al menos 50 células fueron contadas y el porcentaje de vesículas LC3+ o autofagosomas se calculó en base al número de células contadas (A-B), así como también se calculó el porcentaje de colocalización de la bacteria con los autofagosomas en base al número de células y bacterias contadas (C). n=5-8 \*p<0.05. Se muestran las medianas con rango intercuartil. Una parte de las células fueron lisadas para la extracción de ácidos nucleicos como se indica en los métodos y la expresión génica de LC3 e IRGM en células no infectadas (D-E) relativa a las células sin estimular (medio) fue medido por PCR en tiempo real, usando el método comparativo Ct. Las líneas en cada resultado indican la mediana y la línea punteada indica que el medio (M=1). Se muestran datos individuales n=5-6, \*\*p<0.01. SE= sin estímulo; M= medio; Mtb= *Mycobacterium tuberculosis*; R= rapamicina; L= loperamida; AV= ácido valproico; VE= verapamil.

En MAm se observó un aumento significativo de células con vesículas autofágicas con rapamicina ( $70.62 \pm 10.89\%$ ), loperamida ( $70.07 \pm 10.69\%$ ) y ácido valproico ( $69.97 \pm 3.41\%$ ), mientras que con verapamil ( $48.49 \pm 0.007\%$ ) no hubo aumento significativo de vesículas LC3+, comparado con las células sin estímulo o con medio RPMI G+G (M) ( $44.98 \pm 6.42\%$ ) (**Fig.12A**) n=4-6 \*\*p<0.01 vs M. Los Mam infectados con Mtb y estimulados con verapamil  $85.76 \pm 0.04$  mostraron mayor porcentaje significativo de células con autofagosomas comparados con el control

(Mtb) ( $49.83 \pm 4.54$ )% y con rapamicina ( $58.07 \pm 2.24$ )%, loperamida ( $58.16 \pm 1.09$ )% y ácido valproico ( $51.47 \pm 10.45$ )%, no hubo un aumento significativo de células con autofagosomas formados (**Fig. 12B**)  $n=4-6$  \* $p < 0.05$  vs Mtb y solo loperamida aumentó significativamente el porcentaje de colocalización de la bacteria con los autofagosomas, comparados con las células infectadas (Mtb) (**Fig.12C**)  $n=4-6$ , \*\* $p < 0.01$  vs Mtb.

En cuanto a la expresión génica de los genes relacionados con la autofagia, se midió la expresión de LC3, ATG16L1 e IRGM para las células no infectadas (**Fig.12D-F**) y LC3 y ATG16L1 para las células infectadas con Mtb (**Fig.12G-H**) y se observó que en las células no infectadas, todos los fármacos inducen la sobre expresión de los genes LC3 y ATG16L1, comparados con el control M=1 (rapamicina 5.37 (rango 2.54-74.96) y 4.23 (rango 1.37-8.71); loperamida 4.09 (rango 0.14-15.27) y 1.79 (rango 0.11-4.53); ácido valproico 7.90 (rango 0.25-108.2) y 3.34 (rango 0.27-11.19); verapamil 9.35 (rango 0.729-12.78) y 2.39 (rango 0.21-4.57) veces el control, respectivamente, mientras que solo rapamicina 3.75 (rango 0.14-7.83) veces el control y ácido valproico 2.10 (rango 0.07-6.20) veces el control, sobre-expresan significativamente al gen IRGM y loperamida 0.54 (rango 0.20-0.99) veces el control y verapamil 0.72 (rango 0.28-1.16) veces el control lo regulan a la baja. Para saber el efecto que tiene la pura infección con Mtb en MAm sobre la expresión de los genes autofágicos, se comparó la expresión génica relativa de las células no infectadas con las infectadas y tratadas con los fármacos de interés y se observó que la pura infección sobre expresa a los genes LC3 y ATG16L1. Loperamida y ácido valproico sobre expresan significativamente a LC3, mientras que verapamil lo regula significativamente a la baja. En contraste, ácido valproico y verapamil sobre expresan significativamente al gen ATG16L1, mientras que loperamida lo regula a la baja.  $n=4$ ,

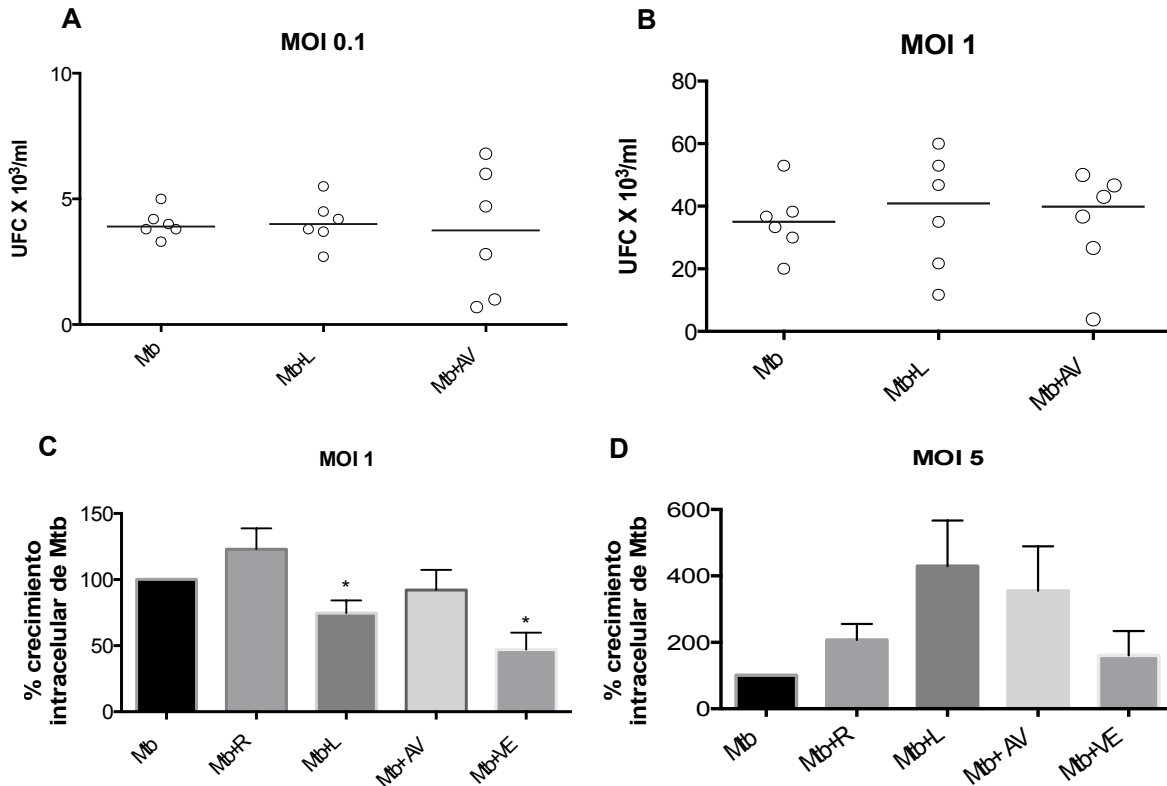


**Figura 12.** En MAm, el tratamiento *in vitro* con loperamida y ácido valproico aumentan significativamente el porcentaje de vesículas autofágicas en células no infectadas, además de que loperamida permite la colocalización de la bacteria con los autofagosomas. Se contaron al menos 50 células y se calculó el porcentaje de autofagosomas formados tanto para las células infectadas como no infectadas (A-C) n=4-6 \*p<0.05 \*\*p<0.01. Se muestran las medias con error estándar. Una parte de éstas células fueron lisadas para la extracción de ácidos nucleicos, así como para la expresión génica relativa de LC3, ATG16L1 e IRGM a la de las células sin estimular en caso de los MAm que no fueron infectados, donde M=1 (D-F) y para los MAm infectados con Mtb sólo se vió la expresión génica de LC3 y ATG16L1 relativa a la de las células no infectadas, donde las células sin estímulo y en medio son la referencia y equivalen a 1 (G-H). La expresión de las proteínas autofágicas fue medido por PCR en tiempo real, usando el método comparativo Ct. Las líneas de cada resultado indican la mediana y la línea punteada es el valor de referencia. También se muestran datos individuales n=4-6, \*\*p<0.01.



### 6.3 Efecto de la administración *in vitro* de loperamida, ácido valproico y verapamil en MDMs y MAm infectados con Mtb

En MDMs se analizó el efecto que tienen los fármacos loperamida y ácido valproico administrados *in vitro* en el control del crecimiento de *M. tuberculosis* con diferentes multiplicidades de infección y se observó que loperamida y ácido valproico no controlan la infección con ninguna dosis de infección, ya que las colonias crecen (MOI 1) Mtb 35(rango 20-53)UFC/ml; Mtb+L 40.9(rango 11.7-60)UFC/ml y Mtb+AV 39.85(rango 3.8-50)UFC/ml (**Fig.13B**) o no hay diferencias significativas en el crecimiento intracelular de Mtb con (MOI 0.1), Mtb 3.9(rango 3.3-5)UFC/ml; Mtb+L 4.95(rango 1.3-6.5)UFC/ml; Mtb+AV 3.75(rango 0.7-6.8)UFC/ml (**Fig.13A**) comparado con las células que sólo están infectadas (Mtb). Se muestran las medianas y sus respectivos valores mínimo y máximo. También se evaluó el efecto de la administración *in vitro* de los fármacos (R, L, AV y VE) en el porcentaje de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en MAm (**Fig.13C-D**) tomando como 100% las células que únicamente estaban infectadas y se observó que sólo en la dosis de infección mas baja (MOI 1) loperamida y verapamil disminuyen significativamente el crecimiento intracelular de la bacteria 78.28 (rango 55.5-78.7)% y 46.23 (rango 18.18-77.78)%, respectivamente, con lo que nos damos cuenta que verapamil disminuyó aproximadamente el 50% de la carga intracelular de Mtb; mientras que con rapamicina 122.7 (rango 79.37-166.7)% y ácido valproico 92.06 (rango 43.78-139.4)% no sólo no disminuye el porcentaje de crecimiento, sino que aumenta y en la dosis de infección mas alta (MOI 5) ya no hay control de la infección, porque ninguno de los fármacos disminuye el crecimiento de Mtb. Mtb+R (207±48)%; Mtb+L (429±137.9)%; Mtb+AV (355.5±133.6)% y Mtb+VE (160.7±73.23)%. Éstos datos representan el porcentaje de crecimiento de la micobacteria al día 3 tomando como crecimiento máximo el valor de las células únicamente infectadas con Mtb (100%). Se muestran medias con error estándar. n=6, \*p<0.05.



**Figura 13.** La administración *in vitro* de loperamida y ácido valproico no disminuye el crecimiento intracelular de Mtb en MDMs pero loperamida y verapamil favorecen el control del crecimiento intracelular de Mtb en MAM con la dosis de infección más baja (MOI 1). Los MDMs se infectaron con Mtb H37Rv con una dosis de infección de una bacteria por cada diez macrófagos (MOI 0.1) (A) y con una dosis de infección de una bacteria por macrófago (MOI 1) (B). Se muestran resultados individuales y las líneas indican la mediana. n=6, \*p<0.05. Los MAM se infectaron con una dosis de infección de una bacteria por macrófago (MOI 1) (C) y cinco bacterias por macrófago (MOI 5) (D) y se procedió al conteo de las colonias del día cero y del día tres, a los 21 días post-infección, por el método de las UFC, como se indica en los métodos. El porcentaje de crecimiento intracelular se calculó tomando en cuenta que las células infectadas sin estimular crecían al 100% y en base a ello se calcularon los porcentajes para cada condición. Se muestran medias con error estándar. n=4-6, \*p<0.05.

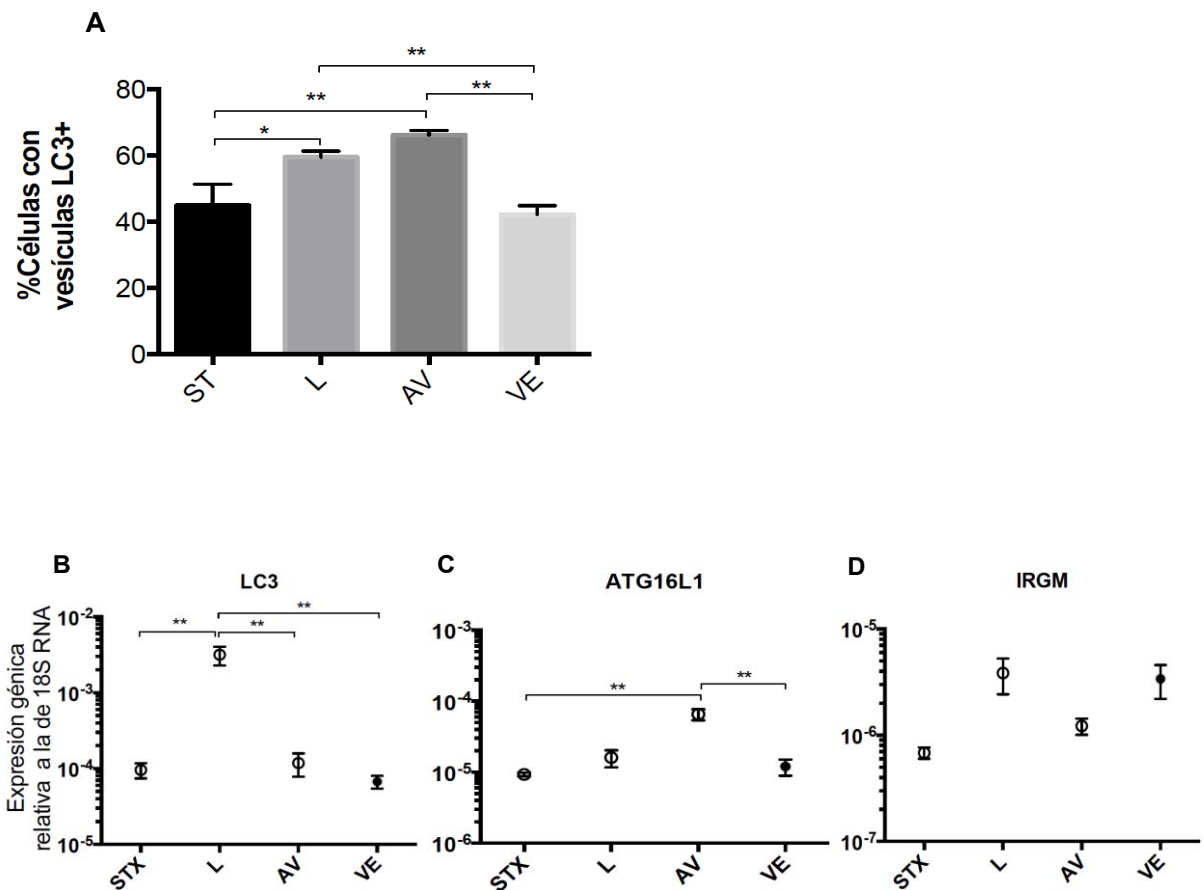
#### 6.4 Análisis cuantitativo de autofagia en MAM tratados sistémicamente y expresión génica de proteínas relacionadas con la autofagia.

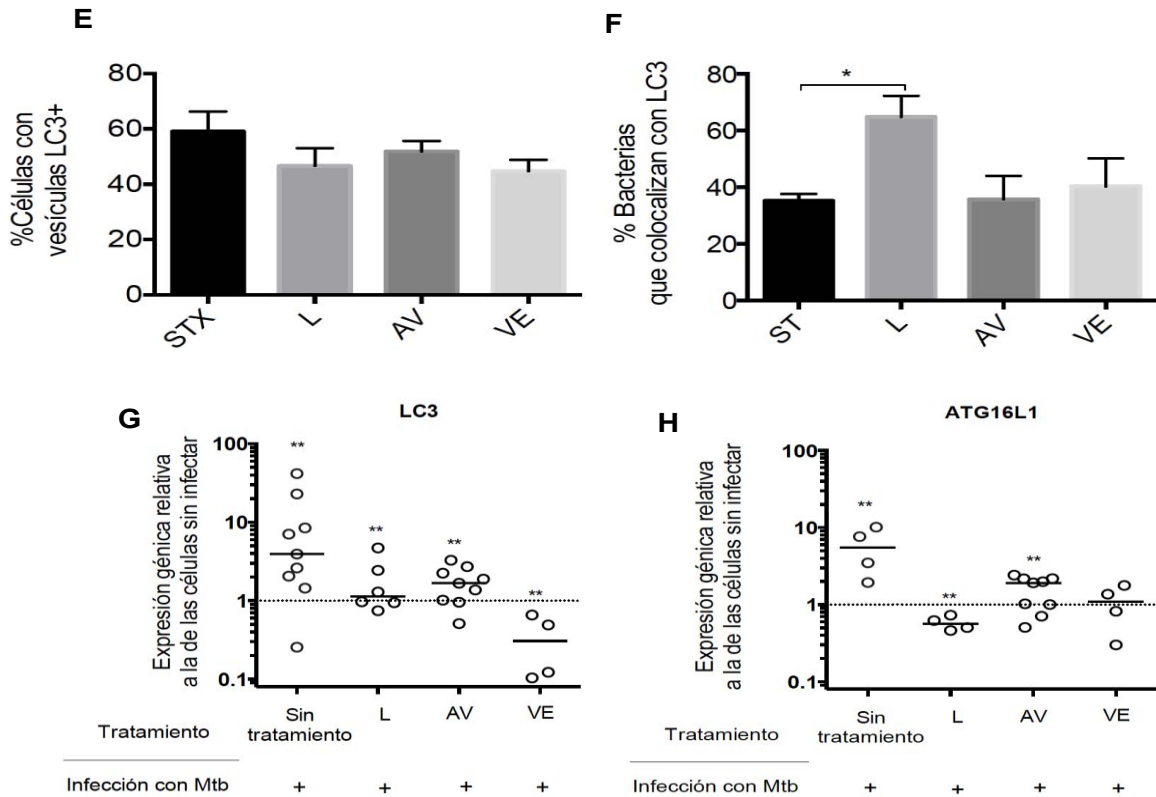
Se utilizaron células frescas o recién obtenidas del pulmón de ratón para ver si el fármaco administrado a nivel sistémico producía autofagia en MAM y para saber si

expresaba genes relacionados con la autofagia (LC3, ATG16L1, IRGM) (**Fig. 14**). Se observó que loperamida ( $59.57 \pm 1.83$ )% y ácido valproico ( $66.24 \pm 1.39$ )% aumentaron significativamente el porcentaje de células con vesículas autofágicas en MAm recién obtenidos con respecto a las células sin tratamiento (ST ó STX) ( $44.98 \pm 6.42$ )%, pero no fue así con verapamil ( $42.23 \pm 2.68$ )%. Se muestran las medias con su error estándar. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 4-5$  ratones por grupo (**Fig. 14A**). Solo loperamida  $0.0039$  (rango  $0.0006-0.0042$ ) y  $1.67 \times 10^{-5}$  (rango  $8.22 \times 10^{-6}-2.33 \times 10^{-5}$ ) veces el control y ácido valproico  $5.53 \times 10^{-5}$  (rango  $3.82 \times 10^{-5}-0.0004$ ) y  $6.64 \times 10^{-5}$  (rango  $2.30 \times 10^{-5}-0.0001$ ) veces el control, sobre-expresaron significativamente niveles del gen LC3 y ATG16L1, respectivamente. Verapamil sobre-expresó a la baja a los genes LC3  $4.81 \times 10^{-5}$  (rango  $4.81 \times 10^{-5}-4.81 \times 10^{-5}$ ) y ATG16L1  $1.03 \times 10^{-5}$  (rango  $5.62 \times 10^{-6}-2.17 \times 10^{-5}$ ) veces el control, con respecto a las células sin tratamiento (STX),  $0.000111$  (rango  $5.33 \times 10^{-5}-0.00012$ ) y  $8.82 \times 10^{-6}$  (rango  $8.75 \times 10^{-6}-1.04 \times 10^{-5}$ ) veces el control, respectivamente. Para el gen IRGM no se observó sobre-expresión significativa de ningún tratamiento, con respecto al control  $6.97 \times 10^{-7}$  (rango  $5.34 \times 10^{-7}-8.18 \times 10^{-7}$ ); L  $3.14 \times 10^{-6}$  (rango  $1.83 \times 10^{-6}-6.60 \times 10^{-6}$ ); AV  $8.50 \times 10^{-7}$  (rango  $4.92 \times 10^{-7}-2.21 \times 10^{-6}$ ); VE  $2.75 \times 10^{-6}$  (rango  $9.57 \times 10^{-7}-7.06 \times 10^{-6}$ ) veces el control. (**Fig. 14B-D**).

En cuanto a los MAm que fueron infectados con Mtb posterior a la administración de los fármacos, loperamida ( $46.66 \pm 6.35$ )%, ácido valproico ( $51.88 \pm 3.75$ )% y verapamil ( $44.67 \pm 4.17$ )% disminuyeron el porcentaje de células con vesículas autofágicas LC3+ comparado con el control (Stx) ( $59.1 \pm 7.22$ )% pero si se observó un mayor reclutamiento de Mtb hacia los autofagosomas con loperamida ( $64.81 \pm 7.46$ )% y no con ácido valproico ( $35.73 \pm 8.21$ )% ni con verapamil ( $40.33 \pm 9.83$ )% (**Fig. 14E-F**). Se muestran las medias con error estándar. \* $p < 0.05$ ,  $n = 4-5$  ratones por grupo. Además se evaluó el efecto de la infección sobre la expresión de genes autofágicos (LC3 y ATG16L1) con respecto a las células que no fueron infectadas. (**Fig. 14G-H**). La infección por sí sola mostró una sobre-expresión significativa de los genes LC3  $3.94$  (rango  $0.26-41.75$ ) y ATG16L1  $5.56$  (rango  $1.94-10-15$ ) veces el control, respectivamente. Loperamida  $1.13$  (rango  $0.75-4.7$ ) y ácido valproico  $1.67$  (rango  $0.51-3.27$ ) sobre-expresaron

significativamente al gen LC3, mientras que ácido valproico 1.92 (rango 0.51-2.42) veces el control, sobre-expresó significativamente al gen ATG16L1 y verapamil 1.10 (rango 0.30-1.78) veces el control, también lo sobre-expresó pero sin significancia. Con verapamil 0.31 (rango 0.10-0.66) y loperamida 0.56 (rango 0.46-0.73) veces el control, se observó una regulación a la baja de LC3 y ATG16L1, respectivamente. Las líneas gruesas en cada resultado muestran las medianas de 3-5 ratones por grupo  $**p < 0.01$ .

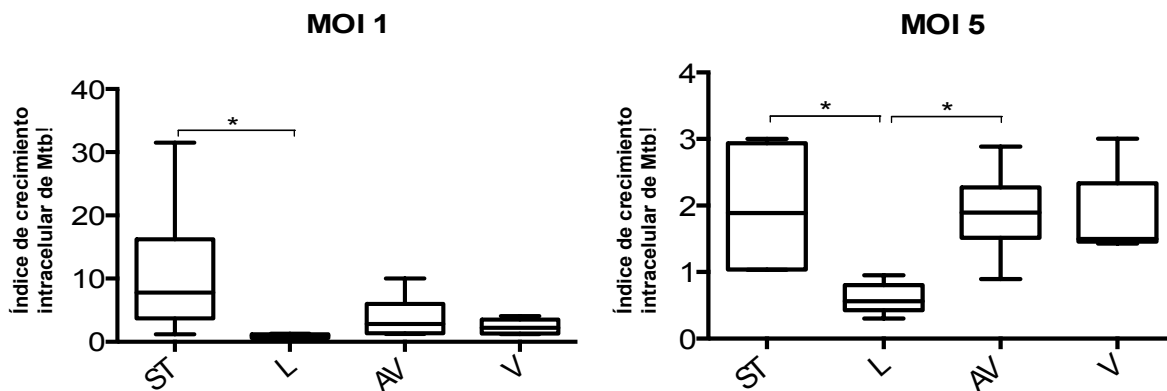




**Figura 14. La administración sistémica de loperamida y ácido valproico induce autofagia así como la sobre-expresión de genes autofágicos en MAm recién obtenidos pero en las células infectadas, sólo loperamida permite la colocalización de la bacteria con los autofagosomas.** Las células recién obtenidas del pulmón de ratón se obtuvieron de igual forma que los MAm estimulados *in vitro* como se describe en los métodos, con la diferencia de que después de su obtención, ya no se les estimulo farmacológicamente debido a que éstas células ya venían activadas con los fármacos de interés. Al menos 50 células se contaron y el porcentaje de vesículas LC3+ se calculó en base al número de células contadas (A y E), así como también se calculó el porcentaje de colocalización de la bacteria con los autofagosomas en base al número de células y bacterias contadas (F). Se muestran las medias con error estándar. n=5-6 ratones por grupo, \*p<0.05 \*\*p<0.01. Una parte de las células fueron lisadas para la extracción de ácidos nucleicos como se indica en los métodos y la expresión génica de LC3, ATG16L1 e IRGM en células no infectadas (B-D) relativa al gen endógeno 18S fue medido por PCR en tiempo real, usando el método comparativo Ct. Para las células infectadas se observó sólo la expresión de LC3 y ATG16L1 relativa a las células no infectadas, usando el mismo método (G-H). Las líneas en cada resultado individual indican la mediana y la línea punteada indica el valor de referencia, donde M=1. n=3-5 ratones por grupo \*\*p<0.01.

## 6.5 Efecto de la administración sistémica de loperamida, ácido valproico y verapamil sobre el control del crecimiento intracelular de Mtb en MAm.

Se observó que sólo loperamida disminuye significativamente el índice de crecimiento intracelular de Mtb, tanto en la dosis de infección más baja (MOI 1) (**Fig. 15A**) 1.1(rango 0.6-1.2) como en la más alta (MOI 5) (**Fig. 15B**) 0.5(rango 0.3-0.9), comparado con las células que no recibieron tratamiento (ST). Con la MOI 1 los demás fármacos no aumentan el índice de crecimiento intracelular de Mtb pero tampoco hay una disminución significativa del crecimiento: Mtb+AV 3.6(rango 1.8-10); Mtb+VE 1.2(rango 1.4-4), comparados con ST 4.5 (rango 4.5-31.5). Con la MOI 5, no hay diferencias significativas entre el control ST 1.8(rango 1-3) y los demás fármacos Mtb+AV 1.8(rango 0.8-2.8); Mtb+VE 1.5(rango 1.4-3). Se muestran las medianas así como sus valores mínimos y máximos de cada condición.



**Figura 15. La administración sistémica de loperamida en MAm favorece el control del crecimiento intracelular de Mtb.** Se infectaron los MAm con la cepa Mtb H37Rv con una dosis de infección de una bacteria por macrófago (MOI1) (A) y cinco bacterias por macrófago (MOI5) (B) durante 1h, como se indica en los métodos. El conteo de las colonias del día cero y del día tres, se realizó a los 21 días post-infección, por el método del las UFC y se hicieron por triplicado, como se indica en los métodos. El índice de crecimiento intracelular se calculó como el índice del crecimiento de Mtb del día cero al tercer día, tomando como referencia las células que no fueron estimuladas farmacológicamente. Se muestran las medianas y los valores mínimos y máximos de cada resultado. n=5 ratones por grupo, \*p<0.05.

## 7. DISCUSIÓN

Estudios de *M. tuberculosis* han revelado que la muerte del bacilo mediado por macrófagos, involucra a la autofagia y que la activación de las vías de señalización de la autofagia en células fagocíticas promueve un proceso de muerte lisosomal. (36). En este trabajo se observó la formación de autofagosomas con loperamida, ácido valproico y verapamil, tanto en MDMs como en MAm. En MDMs se observó mayor porcentaje de autofagosomas con loperamida y ácido valproico, respecto a las células no estimuladas. Con la infección de *M. tuberculosis* en MDMs, se observó un aumento significativo de autofagosomas con rapamicina, loperamida y ácido valproico; además el tratamiento con rapamicina, loperamida, ácido valproico y verapamil en MDMs infectados, permitieron la colocalización de Mtb con los autofagosomas, indicando que la autofagia no sólo se lleva a cabo, sino que también la administración *in vitro* de éstos fármacos en MDMs asegura el reclutamiento bacteria-autofagosoma.

Los datos obtenidos de biología molecular para los MDMs no infectados muestran un sobre-expresión significativa del gen LC3, con rapamicina, loperamida y ácido valproico, lo que puede estar relacionado con un aumento en el número de autofagosomas como se indica en la literatura. Una de de las proteínas que es requerida en la autofagia, es la proteína citosólica LC3/ATG8 que al conjugarse con fosfatidiletanolamida, se convierte en LC3-II que se asocia a la membrana del autofagosoma. Debido a que la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas, se ha constituido como un marcador bioquímico confiable para predecir la actividad autofágica en células animales (39). IRGM es un gen codificante de proteínas reguladoras de la autofagia que ayuda a eliminar los patógenos intracelulares y se encuentra sobre-expresado significativamente con rapamicina y ácido valproico pero se observa una reducción significativa de su expresión con loperamida. La expresión constitutiva de IRGM medía la autofagia en macrófagos humanos, además ciertos polimorfismos del gen IRGM se han relacionado simultáneamente con la reducción de la expresión de este gen (40,44). Por otra parte, analizando el efecto que tienen los fármacos respecto

al crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*, no se observó con ningún tratamiento una disminución de la carga intracelular de Mtb en MDMs ni a dosis muy bajas de infección (MOI 0.1), lo que indica que el tratamiento con loperamida y ácido valproico con esas multiplicidades de infección no es eficiente para controlar la infección por *M. tuberculosis* en MDMs. Estudios recientes sugieren la importancia de las células T CD4 en la respuesta inmune a la tuberculosis. Los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* parecen tener disminuida su capacidad para presentar antígenos a las células T CD4+, lo cual podría contribuir a la incapacidad del huésped para eliminar una infección persistente. *M. tuberculosis* interfiere en la modulación de presentación de antígenos para evitar la eliminación por las células T. (45)

Los resultados obtenidos de autofagia para MAm muestran que la administración *in vitro* de rapamicina, loperamida y ácido valproico aumentan significativamente el número de vesículas autofágicas con respecto a las células sin tratamiento en MAm no infectados, y en las células infectadas con *M. tuberculosis* solo con verapamil hay un aumento significativo del número de autofagosomas respecto a las células infectadas sin tratamiento. *M. tuberculosis* usa elementos del hospedero para defenderse contra la autofagia. La activación de mTOR reprime la autofagia, por más micobacterias virulentas, además la proteína del hospedero de unión a actina (coronina) es reclutada a los fagosomas de *M. tuberculosis* y se ha reportado que inhibe la formación de autofagosomas. (43). En las células que sólo contenían medio, también se observó un porcentaje de vesículas autofágicas que prácticamente no se vió modificado comparado con las células infectadas que no recibieron tratamiento alguno; lo que indica que la autofagia se produce de forma basal. Se ha reportado que la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv inhibe la autofagia basal en macrófagos y células dendríticas, acumulándose autofagosomas en las células infectadas con *M. tuberculosis* como resultado de el impedimento de fusionarse con los lisosomas (autofagia no efectiva) (27). En cuanto a el porcentaje de colocalización de la bacteria con los autofagosomas, sólo loperamida induce significativamente el reclutamiento de la micobacteria con los autofagosomas, lo que podría llevar a un flujo autofágico efectivo tras la fusión



con los lisosomas. El término “flujo autofágico” denota un proceso dinámico de síntesis de autofagosomas, entrega de los sustratos autofágicos al lisosoma y la degradación de sustratos autofágicos dentro del lisosoma (44).

Por otro lado en MAm no infectados, rapamicina, loperamida, ácido valproico y verapamil sobre-expresan significativamente al gen LC3 y ATG16L1, proteínas involucradas en la formación del autofosoma, mientras que rapamicina y ácido valproico sobre-expresan significativamente al gen IRGM pero loperamida y verapamil lo regulan a la baja. En MAm infectados con *M. tuberculosis*, se observa que ácido valproico sobre-expresa significativamente a los genes LC3 y ATG16L1 pero lo expresa de menor manera que las células que están únicamente infectadas con *M. tuberculosis* y de igual manera, loperamida y verapamil sobre-expresan a los genes LC3 y ATG16L1, respectivamente. Verapamil y loperamida disminuyen la expresión de LC3 y ATG16L1, respectivamente.

Loperamida y verapamil disminuyeron significativamente el porcentaje de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* con las dosis de infección más baja (MOI 1) porque en la más alta (MOI 5) ningún fármaco ayuda a los MAm a disminuir el porcentaje de crecimiento de *M. tuberculosis*. Éstos datos indican que la administración *in vitro* de loperamida y verapamil en MAm es eficiente para controlar la infección por *M. tuberculosis* H37Rv sólo a dosis bajas de infección. Loperamida y verapamil son fármacos que usan el mismo mecanismo para inducir autofagia, bloqueando los canales de calcio tipo L y con ello disminuyen los niveles de calcio intracelular, desactivando a la calpaína y así permiten que se induzca la autofagia (31), por ello es posible pensar que puedan tener resultados similares *in vitro*.

Finalmente con la administración sistémica de los fármacos se evaluó si llegaban al pulmón de ratón, inducían autofagia y pre-activaban a los macrófagos alveolares murinos para eliminar a *M. tuberculosis* y se observó en las células frescas o recién obtenidas del pulmón de ratón, que loperamida y ácido valproico aumentaron significativamente el porcentaje de autofagosomas en MAm, sin embargo, verapamil disminuyó el número de autofagosomas formados con

respecto a las células sin tratamiento, pero con ello se demostró que efectivamente todos los fármacos administrados llegaron a pulmón y se llevó a cabo la autofagia. La expresión de los genes autofágicos para éstas células fue muy variada entre genes ya que sólo loperamida sobre-expresa significativamente al gen LC3, mientras que ácido valproico y verapamil lo regulan a la baja. Ácido valproico sobre-expresa significativamente al gen ATG16L1 pero loperamida y verapamil lo regulan a la baja y en cuanto al gen IRGM aparentemente todos los fármacos lo sobre-expresan pero no hay diferencia significativa con respecto al sin tratamiento, debido al número de muestras utilizadas (n=3). La autofagia es un proceso muy regulado en el que participan multitud de quinasas factores de transcripción y otras proteínas siendo las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula las que van a determinar de forma mayoritaria la inducción o la represión de la autofagia (49). En las células infectadas no se observó ningún aumento significativo del porcentaje de autofagosomas con respecto a las células infectadas sin tratamiento, pero si se observó un mayor reclutamiento de la micobacteria a la vía de la autofagia con loperamida. Así mismo, las células que estaban infectadas y no recibieron tratamiento alguno, mostraron sobre-expresión de los genes LC3 y ATG16L1 con relación a las células no infectadas, indicándonos que la sola infección sobre-expresa significativamente genes autofágicos pero no necesariamente se lleva a cabo una autofagia productiva porque puede ser que haya una sobre-expresión debido a una falta de degradación de ambos genes. LC3 es degradado y/o disociado después de la fusión del autofagosoma con el lisosoma (maduración del autofagosoma), dejando menos LC3 en el autolisosoma (53). También se observó que el tratamiento con ácido valproico sobre-expresó significativamente ambos genes, el tratamiento con loperamida sólo sobre-expresó a LC3 pero reguló a la baja a ATG16L1 y con verapamil no hay sobre-expresión de ATG16L1 pero si una regulación significativa a la baja para LC3, todo lo contrario que con loperamida. Se ha encontrado que la vía c-Jun NH2-terminal cinasa (JNK) puede modular la autofagia en múltiples niveles de regulación. Aparte de la fosforilación de proteínas, la autofagia está también probablemente regulada por otros mecanismos, tales como la expresión

de genes ATG. Como resultado de ello, es razonable creer que el aumento de los nivel de los genes ATG inducidos por la expresión de JNK podría iniciar y / o mantener la autofagia de los órganos en estrés. La inhibición de la vía de JNK bloquea la autofagia y la sobre-regulación de la expresión de LC3. JNK contiene un gran número de genes blancos citoplásmicos y nucleares, la mayoría de ellos son factores de transcripción, incluyendo a FoxO, el cual es indispensable para la inducción de la autofagia por lo que es posible que la influencia de JNK en la autofagia module la transcripción de genes ATG vía dependiente de FoxO en mamíferos (51). La acción de JNK es importante para la activación del regulador clave de la autofagia Beclin-1 (43).

La administración sistémica de loperamida con la dosis de infección mas baja (MOI 1) redujo significativamente el índice de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*. Con ácido valproico y verapamil, se observó un control porque las bacterias no crecieron más comparadas con las células infectadas que no recibieron tratamiento. Con la dosis de infección más alta (MOI 5), se observó también que loperamida redujo significativamente el crecimiento de *M. tuberculosis* y ácido valproico y verapamil a esa dosis de infección ya no controlan el crecimiento intracelular de la micobacteria; por lo que podemos decir que el tratamiento con loperamida es el que mejor ayuda a los macrófagos alveolares de ratón para eliminar a *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* es uno de los principales microorganismos reconocidos como sujetos a eliminación por autofagia por los macrófagos murinos y humanos en sistemas *ex vivo* (50). Además también se ha reportado la muerte celular autofágica *in vivo* de *M. tuberculosis*-MDR independiente de mTOR estimulando la inmunidad innata y adaptativa. La muerte intracelular de *M. tuberculosis* se puede llevar a cabo a través de la estimulación de la autofagia dependiente de mTOR, sin embargo, su inhibición lleva a una inmunosupresión. Es por ello que existen fármacos capaces de estimular la muerte celular autofágica de *M. tuberculosis* independiente de m-TOR, lo cual podrían ser utilizados como nuevos tratamientos para TB-MDR (57).

Comparando los tratamientos *in vitro* y *ex vivo* de las células de ratón, nos damos cuenta que no hay una gran diferencia entre ambos tratamientos. La respuesta de autofagia de MAm no infectados tratados *in vitro* es similar a la autofagia que se observó en células frescas o recién obtenidas del pulmón de ratón con loperamida, ácido valproico y verapamil. En ambos modelos, loperamida aumentó el porcentaje de colocación de *M. tuberculosis* con los autofagosomas. En la expresión de genes relacionados con la autofagia sólo loperamida y ácido valproico, sobre-expresaron a los genes LC3 y ATG16L1 en las células no infectadas y en las células frescas. En MAm infectados los resultados de expresión génica fueron iguales tanto para el tratamiento *in vitro* como para el tratamiento *ex vivo*. Asimismo se observó en ambos casos que loperamida y verapamil fueron los que mejor controlaron y disminuyeron el crecimiento intracelular de la micobacteria en MAm con la dosis de infección más baja. Por tanto, ambos fármacos ayudan a controlar la infección con la cepa virulenta H37Rv

Comparando los datos de MDMs humanos con los MA murinos, se observaron resultados un poco diferentes por lo que era de esperarse ya que primero los macrófagos alveolares son células que se encuentran en el pulmón estratégicamente localizadas para el contacto inicial con las partículas inhaladas (54), mientras que la diferenciación de monocitos, *in vitro*, da como resultados cambios en la morfología y en la expresión de moléculas de membrana características de macrófagos residentes (55). Sin embargo, los datos de biología molecular son parecidos, ya que el tratamiento *in vitro* en MDMs y MAm con loperamida y ácido valproico sobre-expresa significativamente al gen LC3 y con loperamida a la baja la expresión de IRGM pero a la alza con ácido valproico en ambos casos; aunque si hubo una gran diferencia en el resultado final debido a que los MDMs no controlan la infección con la micobacteria virulenta y los MAm tratados *in vitro* si la controlan con loperamida y verapamil con la dosis más baja de infección.

## 8. CONCLUSIONES

1. Loperamida, ácido valproico y verapamil inducen autofagia en macrófagos humanos y murinos.
2. Loperamida, ácido valproico y verapamil permiten la colocalización de *M. tuberculosis* con los autofagosomas en macrófagos humanos y sólo loperamida recluta a *M. tuberculosis* a la vía de la autofagia en macrófagos alveolares murinos.
3. Ácido valproico sobre-expresa genes relacionados con la autofagia (LC3, ATG16L1 e IRGM) y loperamida sólo sobre-expresa al gen LC3 en macrófagos humanos y murinos.
4. La estimulación *in vitro* con loperamida y ácido valproico no disminuye el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos pero si loperamida y verapamil disminuyen significativamente el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* con la dosis de infección mas baja en macrófagos alveolares murinos.
5. La administración sistémica de loperamida y ácido valproico induce autofagia en mácrofagos alveolares murinos recién obtenidos pero sólo loperamida recluta a *M. tuberculosis* a la vía de la autofagia.
6. La administración sistémica de loperamida en macrófagos alveolares murinos favorece el control del crecimiento de *M. tuberculosis*, indicandonos que puede ser utilizado como posible fármaco adyuvante en el control de la tuberculosis.

## 9. PERSPECTIVAS

En éste trabajo, sólo se investigó el potencial terapéutico de tres fármacos para un posible uso adyuvante en el tratamiento contra la tuberculosis, sin embargo existen muchos otros fármacos que activan a la autofagia independiente de mTOR y que pueden ser investigados como posibles candidatos para la eliminación de *M. tuberculosis*. Por otro lado, es necesario seguir con estudios que demuestren que la administración de loperamida en conjunto con los fármacos anti-Tb de primera y segunda línea sea seguro, además de crear un nuevo esquema de trabajo que permita monitorear al fármaco en modelos experimentales infectados en condiciones adecuadas de seguridad.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. NOM-006-SSA2-2013. PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
3. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud. 2008. Parte1 Baciloscopía.
4. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud. 2008. Parte2 Cultivo.
5. <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v67n1/a03v67n1>
6. [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime\\_pcr.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf)
7. [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/guia\\_tb\\_mfr\\_ok.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/guia_tb_mfr_ok.pdf)
8. <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Mycobacterium%20tuberculosis.pdf>
9. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf>
10. Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KC, Wallace RJ. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification. En: Murray P.R., editor. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC: 560-583.
11. <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21767/Antecedentes.pdf>
12. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-75852005000200010](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852005000200010)
13. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/10.pdf>
14. Bernadette M. Saunders and Warwick J Britton. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. Immunology and Cell Biology (2007) 85, 103-111

15. [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=13035870&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=4v21n08a13035870pdf001.pdf&ty=27&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13035870&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v21n08a13035870pdf001.pdf&ty=27&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es)
16. [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s053551332005000400009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s053551332005000400009&script=sci_arttext)
17. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018775852005000400012](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018775852005000400012)
18. <http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/inmunitaria.pdf>
19. [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S007552222006000100008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S007552222006000100008&script=sci_arttext)
20. Palomo G. Iván; Ferreira V. Arturo; Sepúlveda C. Cecilia; Roseblatt S. Mario; Vergara C. Ulises. Fundamentos de inmunología básica y clínica . Edit. Universidad de Talca, 2009.
21. <http://www.farmafir.onored.com/bks/Microbiologia%20Medica%20MURRAY%205%AA%20edicion%202005.pdf>
22. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2009000300004&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2009000300004&script=sci_arttext)
23. Castro Obregón Susana. La autofagia en el proceso del envejecimiento. Instituto de Biotecnología. UNAM.
24. [http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/108987/1/DMG\\_Lisa\\_Santamaria\\_P\\_IdentificacionDeNuevos.pdf](http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/108987/1/DMG_Lisa_Santamaria_P_IdentificacionDeNuevos.pdf)
25. Tanida Isei. Autophagy basics. Microbiology and Immunology 2011; 55: 1-11
26. Congcong He, Daniel J. Klionsky. Regulation and Signaling Pathways of Autophagy. Annu Rev Genet, 2009; 43:67-93
27. Delia Goletti, Elisa Petriccioli, Alessandra Romagnoli, Mauro Piacentini, Gian Maria Fimia. Autophagy in Mycobacterium tuberculosis infection: A passepertout to flush the intruder out?. Cytokine and Growth Factor Reviews (2013).



28. Frédéric Gros and Sylviane Muller. Pharmacological regulators of autophagy and their link with modulators of lupus disease. *British Journal of Pharmacology* (2014) 171 4337-4359
29. Yan Cheng, Xingcong Ren, William N. Hait, and Jin-Ming Yang. Therapeutic Targeting of Autophagy in Disease: Biology and Pharmacology. *Pharmacological reviews* 65:1162–1197, October 2013
30. [http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-criollo\\_ag/pdfAmont/qf-criollo\\_ag.pdf](http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-criollo_ag/pdfAmont/qf-criollo_ag.pdf)
31. Angeleen Fleming, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, David Rubinsztein. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nature Chemical Biology*. Vol 7. January 2011.
32. R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, J. Kuby. *Inmunología*. 5ª edición. Editorial Mc Graw Hill.
33. E. Juárez, C. Nuñez, E. Sada, J.J Ellner, S. Schwander, M. Torres. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respiratory Research* 2010, 11:2.
34. M.A Duque Correa, M. Rojas López. Activación alternativa del macrofago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología* 2007; 73-86.
35. S Sarkar, B Ravikumar, RA Floto, DC Rubinsztein. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death and Differentiation* (2009) 16, 46-56.
36. Xu-Guang Guo, Tian-Xing Ji, Yong Xia, Yue-Yun Ma. Autophagy protects type II alveolar cells from Mycobacterium tuberculosis infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432 (2013) 308-313
37. E. Juárez, C. Carranza, F Sánchez, E. Loyola, D. Escobedo, C. Contreras, R. Pando, M. Torres, E. Sada. Nucleotide-oligomerizing domain-1 (NOD1) receptor activation induces pro-inflammatory responses and autophagy in human alveolar macrophages. *BMC Pulmonary Medicine* 2014, 14:152

38. Lihong Zhang, Jia Yu, Heling Pan, Yan Hao, Wenqing Cai, Hong Zhu, Albert D. Yu, Xin Xie, Dawei Ma and Yunying Yua. Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. PNAS November 2007 vol. 104 no.48 19023-19028
39. Pablo Aránguiz, Ariel Contreras, Diego Rojas, Rodrigo Troncoso, Paola Marambio, Bárbara Toro, Carlos Sanhueza, Christian Penannen, Jessica DiazElizondo, Valentina Parra, Mario Chiong, Guillermo Díaz Araya , Sergio Lavandero. Autofagia del cardiomiocito: ¿Un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular? Rev Chil Cardiol 2006; 25 (3): 331-338
40. Marisa Iborra, Belén Beltrán, Pilar Nos. Marisa Iborra <sup>ab</sup>, Belén Beltrán <sup>ab</sup>, Pilar Nos. Marisa Iborra <sup>ab</sup>, Belén Beltrán <sup>ab</sup>, Pilar Nos. New knowledge in genetics and inflammatory bowel disease. Are there any practical applications? Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), España. Noviembre 2011. Vol 34
41. Singh SB, AS Davis, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. Science. 2006 Sep 8;313(5792):1438-41.
42. Noburu Mizushima. Autophagy: process and function. Genes and development 2007 21:2861-2873
43. B. Bradfute, F. Castillo, Arko-Mensah, S. Chauhan, S. Jiang, M. Mandell V. Deretic. Autophagy as an immune effector against tuberculosis. Curr Opin Microbiol. 2013 June; 16(3): 355-365
44. Noburu Mizushima, Tamotsu Yoshimori and Beth Levine. Methods in Mammalian Autophagy Research. Cell 140, February 5, 2010.
45. Ma. Cecilia Eugenia García-Sancho Figueroa. Respuesta inmune a la infección por Mycobacterium tuberculosis. Una revisión de la literatura. Rev Inst Nal Enf Resp Mex Volumen 14 - número 2 Abril - junio 2001 Págs. 114-128
46. N. Takeshi and V. Tamotsu. Molecular basics of canonical and bactericidal autophagy. International immunology Vol.21 No. 11 pp. 1194-1204

47. V. Deretic and B. Levine. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. Cell Host and Microbe 5, June 18, 2009.
48. <http://hera.ugr.es/tesisugr/17664706.pdf>
49. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/34775/MORUNO%20-%20REGULACIÓN%20DE%20LA%20DEGRADACIÓN%20INTRACELULAR%20DE%20PROTEÍNAS%20POR%20GLUCOSA..pdf?sequence=1>
50. <http://www.pnas.org/content/109/46/E3168.full.pdf>
51. <http://www.biosciencerep.org/content/ppbiosciencerep/35/3/e00199.full.pdf>
52. Matthew T. Sorbara, Lisa K. Ellison, Mahendrasingh Ramjeet, Leonardo H. Travassos, Nicola L. Jones Stephen E. Girardin and Dana J. Philpott. The protein ATG16L1 supresses Inflammatory Cytokines Induced by the Intracellular Sensors Nod1 and Nod2 in an Autophagy- Independent Manner. Immunity 39, 858-873, November 14, 2013.
53. Noburu Mizushima. Methods for Monitoring Autophagy using GFP-LC3 transgenic Mice. Methods in Enzymology, Volumen 452, 2009.
54. <http://www.inmunologia.org/Upload/Articles/6/65.pdf>
55. R. López M. Teresa, P. Grajales J. Pablo, G. Montoja C. Julio. Inmunología Una Ciencia activa. Segunda edición. Editorial Universidad de Antioquia. 2009
56. <http://www.info-farmacia.com>
57. M. Schiebler, K. Brown, K. Hegyi, S. M Newton, M. Renna, L. Hepburn, C. Klapholz, S. Coulter, A. Obregón-Henao, M. H Tamayo, R. Basaraba, B. Kapmann, K. M. Henry, J. Burgon, S. A Renshaw, A Fleming, R. R Kay, K. E Anderson, P. T Hawkins, D. J Ordway, D. C Rubinsztein and R. A Floto. Functional drug screening reveals anticonvulsants as enhancers of mTOR-independent autophagic killing of *Mycobacterium tuberculosis* through inositol depletion. EMBO Molecular Medicine Vol 7. No. 2, 2015.