



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
FACULTAD DE MEDICINA**

**IMPLICACIÓN DE PHT1 Y PHT2 EN EL TRANSPORTE DE MDP
DE *Mycobacterium bovis* BCG DESDE FAGOSOMA A CITOSOL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:
KENIA ELIZABETH RAMOS MEXICANO

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. María Soledad Funes Argüello
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Julio César Carrero Sánchez
Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM.

Ciudad de México. Noviembre, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal, bajo la asesoría técnica de la Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal en el programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. María Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Durante el desarrollo del proyecto se recibió una beca otorgada por el CONACyT (714587). Este trabajo fue financiado por DGAPA-PAPIIT IV200315, Presupuesto operativo 2017 (Dra. Yolanda López Vidal y Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal).

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Luis Puente García	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto Nacional de Nutrición
Vocal	Dr. Abraham Landa Piedra	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Rodolfo García Contreras	Facultad de Medicina, UNAM
Secretaria	Dra. Susana Castro Obregón	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Yolanda López Vidal** por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en su laboratorio, por su asesoría, sus consejos, sus críticas y su tiempo. Gracias por enseñarme que la única manera de alcanzar los sueños es con fortaleza y venciendo el miedo a trabajar duro. Siempre la recordaré como una mujer fuerte, con carácter y capaz de alcanzar sus objetivos sin importar que tan difícil sea. Mis más sinceros agradecimiento a una mujer admirable.

A la **Dra. María Antonia Castillo Rodal** por su apoyo incondicional, por su asesoría técnica y su tiempo. Muchas gracias por su guía, sus enseñanzas y consejos, siempre los voy a tener presentes y nunca los olvidaré. Mi gratitud y cariño por su infinita paciencia y profesionalidad. Ha sido muy importante su presencia en mi vida. Tiene todo mi respeto.

A la Maestra en ciencias **Gabriela Olvera Molina**, por contagiarme de tu pasión por la inmunología, por tus consejos y tu asesoría técnica. Definitivamente saber y saberlo demostrar es valer dos veces. Eres brillante. Fue un placer haberte conocido.

A los Maestros en ciencias: **Eduardo Mucito Varela y Stephanie Morales Guerrero**, por su asesoría y consejos en la parte bioinformática. Gracias por su amistad a lo largo de mi estadía en el laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial: **Dra. Soledad Funes Argüello y Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez**, por sus comentarios, consejos y críticas en el desarrollo de mi proyecto. Les agradezco mucho sus atenciones brindadas.

Finalmente agradezco a los miembros de mi jurado: **Dr. José Luis Puente García, Dr. Rogelio Hernández Pando, Dr. Abraham Landa Piedra, Dr. Rodolfo García Contreras y Dra. Susana Castro Obregón**, por su tiempo y atenciones destinados en la lectura de esta tesis, y cuyos consejos me permitieron tener una mejor versión de ella.

DEDICATORIAS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi alma máter que me ha brindado la oportunidad de seguir aprendiendo y me ha impulsado a mejorar académicamente.

A mis padres: Por ser todo mi mundo. Por apoyarme y darme su amor.

Papá. Gracias por tu sabiduría, por saber que decir en el momento justo. Por tu esfuerzo y sacrificio. Eres el hombre más valiente y justo que conozco. Gracias por confiar en mí aun cuando yo misma desconocía de lo que era capaz de hacer. Dios no podría haberme dado mejor ejemplo que tú.

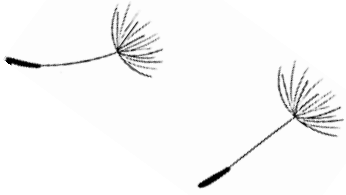
Mamá. Gracias por tu amor. Gracias por apoyarme en mis decisiones aun cuando no estabas de acuerdo. Gracias por tus abrazos y tus consuelos. Tu talento siempre ha sido la ternura, gracias por ser tan maravillosa. Gracias por demostrarme que sin amor no hay magia.

A mi hermano Juan Luis: Por ser mi ejemplo a seguir. Gracias por hacerme reír aun cuando no tenía ganas de hacerlo. Gracias por tu grata compañía y por tu apoyo. Parte de lo que he logrado hasta ahora es gracias a ti. Te quiero mucho hermanito.

A mi abuela **Julia Mendoza**: Por toda tu ternura y por ser mi motivación a lo largo de mi formación académica. A pesar de que decidiste emprender un largo viaje y dejarnos, siempre estuviste conmigo en los momentos difíciles. Cuando nos volvamos a encontrar te compartiré todo lo que en vida he aprendido. Gracias por tu legado.

A mis compañeros de laboratorio **Viridiana, Eduardo, Stephy, Mirna, Braulio y Karen**: Por ser mi “Ohana Científica” a lo largo de este tiempo y por hacer del laboratorio un lugar amigable y divertido.

A **Rubén Cantú**: Por tu amor, tus cuidados y tu apoyo. Por acompañarme en mis triunfos y en mis fracasos. Por tu paciencia y tus consejos. Por mirarme con esos ojitos preciosos y alentarme a dar siempre lo mejor de mí. Gracias por ser parte de mi vida. Simplemente te amo ♥.



«Ningún pesimista ha descubierto nunca los secretos de las estrellas, ni navegado a tierras inexploradas, ni ha abierto una nueva esperanza al espíritu humano»

HELEN KELLER



«El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino»

NIKOLA TESLA



RESUMEN

NOD2 es un receptor intracelular presente en células inmunes de la línea monocítica. Este receptor es capaz de reconocer muramil dipeptido (MDP), el cual se encuentra formando parte del peptidoglicano presente en la pared bacteriana. En la última década se ha demostrado la importancia del receptor NOD2 en la respuesta inmune innata frente a *Mycobacterium tuberculosis*, y se ha sugerido que la membrana fagosomal podría proporcionar la translocación de MDP desde el interior del fagosoma hacia el citoplasma para que se lleve a cabo el reconocimiento por parte del receptor NOD2. Sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo dicho transporte. Estudios recientes en macrófagos humanos han demostrado la presencia de los transportadores de oligopéptidos PHT1 y PHT2 a los cuales se les podría atribuir el transporte de MDP micobacteriano desde el fagosoma al citosol y, de esta manera, desempeñar un papel importante en su reconocimiento por parte del receptor NOD2. En este trabajo planteamos la hipótesis de que los transportadores PHT1 y PHT2 contribuyen al transporte de MDP de *Mycobacterium bovis* BCG desde el fagosoma al citosol. Los resultados obtenidos demuestran que los transportadores PHT1 y PHT2 se expresan principalmente en membrana fagosomal y que de éstos, solo la expresión de PHT2 es inducida por BCG. También se observó que BCG induce la expresión de NOD2 y promueve su reclutamiento desde citoplasma a membrana fagosomal. Y finalmente, que BCG es capaz de inducir la sobre-expresión de genes como RIPK2, NFKB1, CASP-1, IL1B, BIRC3 y NLRP3, que en conjunto demuestran la activación de la vía de señalización de NOD2. Con los resultados obtenidos se puede sugerir que los transportadores PHT1 y PHT2 se encuentran involucrados en el transporte de MDP micobacteriano desde el fagosoma al citosol, sin embargo para demostrar de manera concluyente esta afirmación se realizará, en estudios posteriores, silenciamiento génico para disminuir la expresión de los transportadores en macrófagos THP-1 y se evaluará el impacto del silenciamiento en la activación de NOD2.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
Índice de tablas.....	III
Índice de figuras.....	IV
Introducción	
1. Tuberculosis.....	1
2. Tuberculosis en México.....	1
3. Vacuna BCG.....	2
4. Características estructurales de las micobacterias.....	3
4.1. Membrana celular.....	3
4.2. Peptidoglicano.....	4
4.3. Arabinogalactana.....	4
4.4. Ácidos micólicos.....	4
4.5. Material tipo cápsula.....	5
5. Respuesta inmune innata a la tuberculosis.....	6
5.1. Fagocitosis.....	6
5.2. Receptores involucrados en el reconocimiento de <i>M. tuberculosis</i> ...	8
6. Receptor NOD2.....	8
6.1. Muramil dipéptido micobacteriano.....	9
6.2. Activación del receptor NOD2.....	10
6.3. Importancia del receptor NOD2 en tuberculosis.....	12
7. Transportadores PHT1 y PHT2.....	13
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivo	17
Objetivos particulares.....	17
Metodología	
Diseño experimental.....	18
Materiales y métodos.....	20

Resultados

1. Los transportadores PHT1 y PHT2 interactúan físicamente con MDP..	24
2. La expresión de PHT2 y NOD2 en macrófagos THP-1 infectados con BCG es máxima a los 45 minutos.....	26
3. Localización celular de PHT1, PHT2 y NOD2 en macrófagos THP-1.....	28
4. BCG induce la expresión de genes involucrados en la vía de señalización de NOD2 como RIPK2, NFKB1, CASP1, IL1B, BIRC3 y NLRP3 en macrófagos THP-1.....	34
Discusión	38
Conclusiones	43
Perspectivas	44
Anexos I.....	45
Anexos II.....	49
Anexos III.....	50
Referencias.....	51

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADC	Albumina-Dextrosa-Catalasa
ADP	Adenosina difosfato
AP-1	Proteína activadora 1
APS	Persulfato de amonio
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CD	Conjunto de diferenciación
CO ₂	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilendiamonotetraacético
H ⁺	Protones
HEPES	Acido 2-[4-(2-hidroxietil)-1- piperacilil]- etanosulfónico
IgG	Inmunoglobulina G
IKK	Complejo inhibidor de cinasas de NFκB
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IRF	Factor regulador de interferon
JNK	Cinasa C-Jun N-terminal
Kd	Constante de disociación
kDa	Kilodaltons
LAMP	Proteína membranal asociada a lisosomas
LPS	Lipopolisacarido
LRR	Región rica en leucinas
MAPK	Cinasa mitogeno activada
MDP	Muramil dipéptido
mg	miligramos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
NamH	N-acetilmurámico hidroxilasa
NF κ B	Factor de transcripción nuclear κ B
NLR	Receptor tipo Nod
nM	nanomolar
nm	nanómetros
NOD	Dominio de oligomerización de nucleotidos
OADC	Ácido oléico-Dextrosa-Catalasa
Native-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Amortiguador de fosfato salino
pH	Potencial de hidrógeno
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RD1	Región de diferenciación 1
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
SLC15A	Solute Carrier Family 15 Member 3
TB	Tuberculosis
TBS	Amortiguador Tris-salino
TEMED	Tetrametiletildiamina
THP-1	Células monocíticas humanas
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
μ g	microgramos
μ l	microlitros
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
xg	Gravedades

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1: Vías enriquecida obtenidas a partir de genes sobre-expresados en macrófagos infectados con BCG.

35

Tabla 2: Genes y sus correspondientes proteínas codificadas relacionadas con la vía de NOD2 que se sobre-expresan en macrófagos infectados con BCG

36

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1: Mapa de la tasa de incidencia de la tuberculosis a nivel mundial en el año 2015

2

Figura 2: Representación esquemática de la pared de micobcaterias

5

Figura 3: Etapas del proceso fagocítico de Mycobacterium tuberculosis

7

Figura 4: Representación esquemática de la estructura de NOD2

9

Figura 5: Estructura del peptidoglicano en donde se señala el fragmento correspondiente a MDP

9

Figura 6: Reacción de glicosilación del MDP

10

Figura 7: Señalización mediada por NOD2

11

Figura 8: Mecanismo de transporte de dipéptidos y tripéptidos mediado por PHT1 y PHT2

14

Figura 9: Diagrama general de trabajo

19

Figura 10: PHT1 y PHT2 son capaces de interaccionar con MDP

25

Figura 11: La expresión de PHT2 y NOD2 en macrófagos infectados con BCG es mayor a los 45 minutos

27

Figura 12: PHT1 se localiza en membrana fagosomal en macrófagos THP-1

29

Figura 13: PHT2 se localiza en membrana fagosomal en macrófagos THP-1

31

Figura 14: BCG induce la localización celular de NOD2 en membrana fagosomal en Macrófagos THP-1

33

Figura 15: Vías de señalización relacionadas con NOD2 que se encuentran enriquecidas durante la infección con BCG

37

INTRODUCCIÓN

1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que afecta principalmente al pulmón, aunque también existen la tuberculosis meníngea y la tuberculosis miliar, ambas formas graves de la enfermedad. La tuberculosis pulmonar es la forma más contagiosa y constituye más del 80% de los casos [WHO, 2015].

El agente causal de la enfermedad en humanos es *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno intracelular que infecta a los macrófagos, células que forman parte de la respuesta inmune innata. La transmisión se da por vía aérea a través de gotas de saliva expulsadas por la tos o estornudos de individuos enfermos. Se calcula que en el 2015 a nivel mundial contrajeron la enfermedad 10.4 millones de personas (Figura 1) y que 1.8 millones fallecieron por esta causa, de los cuales 400,000 murieron co-infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Alrededor de una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo de manera latente y de ésta el 10% presentará la enfermedad activa a lo largo de su vida. La tuberculosis es catalogada como la segunda causa de muerte a nivel mundial ocasionada por un agente infeccioso, motivo por el cual es considerada un problema de salud pública [Abbas, 2011; WHO, 2015].

2. Tuberculosis en México

De acuerdo con el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) de la Secretaría de Salud, la incidencia en México de Tuberculosis en el 2015 fue de 20,561 casos y más de 2,000 defunciones ocasionadas por esta enfermedad, lo que representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y, por consiguiente, un reto para el sector salud, ya que se presenta una mayor mortalidad en los extremos de la vida [Secretaría de salud: CENAPRECE, 2015].

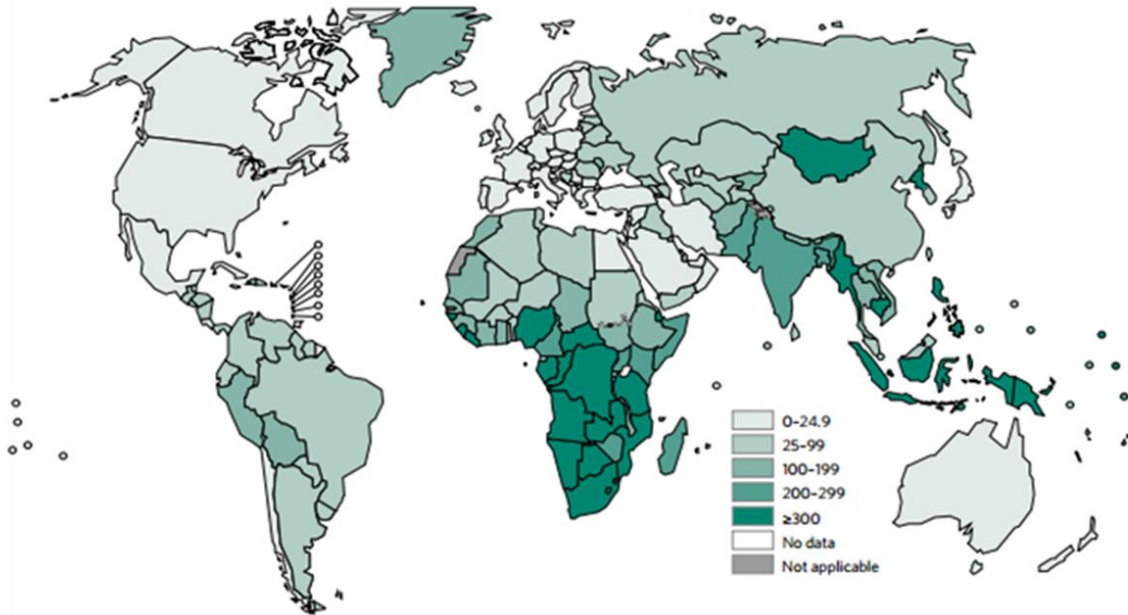


FIGURA 1: Mapa de la tasa de incidencia de la tuberculosis a nivel mundial en el año 2015. En la imagen se representan en colores los nuevos casos de tuberculosis en todas sus formas por cada 100,000 habitantes por año [WHO, 2015].

Actualmente el único tratamiento profiláctico contra la Tuberculosis es la aplicación de la vacuna obtenida a partir del bacilo de *Mycobacterium bovis* de Calmette y Guerin (BCG), la cual a partir de 1979 fue incorporada por la organización mundial de la salud al programa de inmunización en 64 países, incluyendo México. A pesar de que en los últimos años las aportaciones para proponer una nueva vacuna contra la tuberculosis han sido considerables, los nuevos prototipos de vacunas en la fase tres no han resultado significativamente mejores a la BCG [WHO, 2015].

3. Vacuna BCG

La vacuna BCG fue desarrollada en el Instituto Pasteur en Lille Francia por Albert Calmette y Camille Guerin a partir de una cepa de *M. bovis* aislada de la leche de una vaca con mastitis tuberculosa, la cual fue atenuada mediante 230 siembras secuenciales periódicas de cada 3 semanas en medio de papa, glicerol y sales biliares de buey [Liu, 2009]. Durante esta atenuación, la bacteria perdió la región de diferenciación 1 (RD1), un locus de 9.5 kilobases de longitud que comprende

nueve genes que codifican una serie de proteínas que se han relacionado con la virulencia y patogenicidad de la bacteria [Kurenuma, 2009].

En 1921 se aplicó por primera vez como vacuna a un infante cuya madre murió por tuberculosis, el cual no desarrolló la enfermedad. Durante los siguientes tres años se vacunaron en Europa a más de 300 niños, con lo que la eficacia y seguridad de la vacuna quedaron establecidos [Liu, 2009; Brewer, 1995]. Actualmente la vacuna es fabricada por distintos proveedores como vacuna BCG, y se aplica mundialmente a alrededor de 100 millones de recién nacidos cada año [Liu, et. al, 2009].

4. Características estructurales de las micobacterias

Todas las micobacterias presentan una estructura compleja, constituida por una membrana plasmática, seguida de la pared celular (formada por el complejo peptidoglicano-arabinogalactano-ácidos micólicos) y finalmente por una envoltura denominada material tipo cápsula. Estos componentes le confieren características como impermeabilidad a diferentes componentes, resistencia a medicamentos y la ácido-alcohol resistencia. Además, varios componentes de la pared intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del bacilo en el interior de los macrófagos.

A continuación, se describen brevemente los diferentes componentes de la pared celular de las micobacterias (**Figura 2**).

4.1 Membrana celular

La capa más interna corresponde a la membrana celular, la cual es una bicapa lipídica donde se encuentran proteínas que están involucradas en el metabolismo y procesos de biosíntesis. También presenta derivados de fosfolípidos altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomanana, que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis [Kumar, 2014].

La membrana celular se une por enlaces fosfodiéster a la pared micobacteriana, la cual está formada por peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos.

4.2 Peptidoglicano

El peptidoglicano es un polímero que forma una capa rígida fuera de la membrana que proporciona la forma celular y la fuerza para soportar la presión osmótica, también es considerado un andamio para las estructuras que conforman la pared celular. Estructuralmente el peptidoglicano está formado por una secuencia alternante de N-acetilglucosamina y ácido-N-acetilmurámico sustituidos con cadenas laterales de péptidos que están fuertemente ligados para proporcionar integridad estructural. El peptidoglicano se une a una capa de arabinogalactana y finalmente se encuentra una capa formada por ácidos micólicos [Mishra, 2011; Kumar, 2014].

4.3 Arabinogalactana

La función de la galactana aún es desconocida, aunque se sugiere que participa en el anclaje de los ácidos micólicos al peptidoglicano. El modelo más reciente de esta estructura indica que contiene 125 residuos glicosilados distribuidos en un dominio de galactana, 3 dominios arabinasa y una región específica que asegura la unión covalente al peptidoglicano [Kumar, 2014].

4.4 Ácidos micólicos

Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de 70 a 80 carbonos de gran importancia taxonómica para las micobacterias ya que les confiere resistencia contra fármacos hidrofóbicos, deshidratación y ayudan a que la micobacteria evada el sistema inmune del hospedero. Los ácidos micólicos presentan diferentes grupos funcionales; los ácidos α -micólicos, ceto-micólicos y metóxi-micólicos son capaces de atraer neutrófilos y macrófagos e inducir y/o adoptar una estructura antigénica para el reconocimiento de anticuerpos [de Souza, 2008; Verschoor, 2012].

4.5 Material tipo cápsula

El material tipo cápsula es la capa más externa en las micobacterias, contiene proteínas, glicolípidos, polisacáridos y proteasas y tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune. Muchas de estas moléculas, principalmente lipoarabinomanana y lipomanana, son importantes en la patogenicidad, penetración de los bacilos a las células del hospedero y su reconocimiento por parte de receptores de la inmunidad innata, los cuales activan diferentes vías de señalización e inducen un gran número de funciones que activan o inhiben mecanismos efectores para controlar o perpetuar la infección. [Riedel, 2000; Killick, 2013].

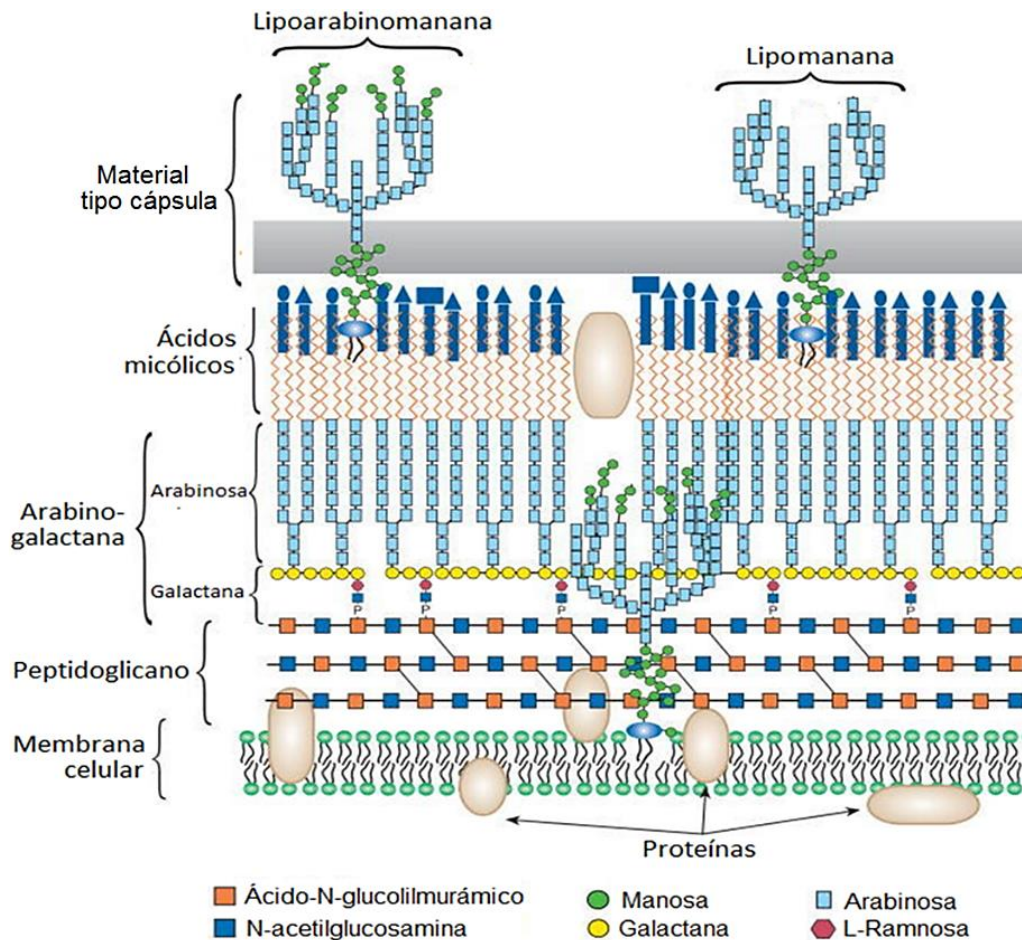


FIGURA 2: Representación esquemática de la pared celular de micobacterias [Modificado de Esko J, et al., 2009. Essentials of Glycobiology. 2ª ed.]

5. Respuesta inmune innata frente a la tuberculosis

La respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis* inicia una vez que el bacilo ingresa al organismo. Una de las primeras células que actúan frente a la infección son los fagocitos mononucleares, principalmente neutrófilos y macrófagos, los cuales desempeñan un papel fundamental en la defensa del hospedero eliminando a las bacterias mediante diferentes mecanismos mediados por el proceso de fagocitosis y lisis [Abbas, 2011].

5.1 Fagocitosis

La fagocitosis es el proceso en el que la membrana de células especializadas rodea a la bacteria dirigiéndola a su interior [Bardoel, 2011]. Este proceso requiere de la participación de receptores fagocíticos, principalmente receptores de manosa en el caso particular de *M. tuberculosis* (Figura 3A), que activan una serie de señales que culminan con el rearrreglo de la actina del citoesqueleto y la formación de un compartimento membranoso intracelular denominado fagosoma (Figura 3B) [Aderem, 1999; Haas, 2007]. Una vez formado el fagosoma con *M. tuberculosis* en su interior, se lleva a cabo una serie de fusiones complejas con elementos vesiculares de la red endosómica, como endosomas tempranos, endosomas tardíos y finalmente, con lisosomas [Underhill, 2002].

En una primera etapa se forman los fagosomas tempranos tras la fusión de un fagosoma con un endosoma temprano y se caracterizan por un bajo contenido de enzimas hidrolíticas y proteolíticas, un pH de 6.2 y la expresión de marcadores endosomales como las GTPasas Rab5 y Rab22a (Figura 3C). En una segunda etapa se forman los fagosomas tardíos resultado de la fusión de un fagosoma temprano con un endosoma tardío, estos presentan un pH de 4.5 a 5.0 y presentan marcadores endosomales como las GTPasas Rab6, Rab7 y Rab9 (Figura 3D). Finalmente, en la tercera etapa se forman los fagolisosomas resultado de la fusión final de los fagosomas tardíos con lisosomas, los cuales alcanzan un pH de 4.5 y presentan proteínas de membrana asociadas a lisosomas como LAMP-1, LAMP-2 y LAMP-3 (Figura 3E) [Castaño, 2010; Bobadilla, 2009; Gordon, 2016].

Los fagosomas tardíos y los fagolisosomas presentan una alta concentración de enzimas hidrolíticas y proteolíticas, péptidos antimicrobianos y la capacidad de generar compuestos tóxicos de oxidación que tienen como finalidad la muerte de *M. tuberculosis* y su degradación [Underhill, 2002].

Como productos de la degradación enzimática del bacilo en el fagosoma se obtienen fragmentos de ácidos nucleicos, péptidos bacterianos y fragmentos de pared. De estos, los péptidos microbianos son presentados a linfocitos T CD4 a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase dos, iniciando así el montaje de la respuesta inmune adaptativa (Figura 3G) [Abbas, 2011].

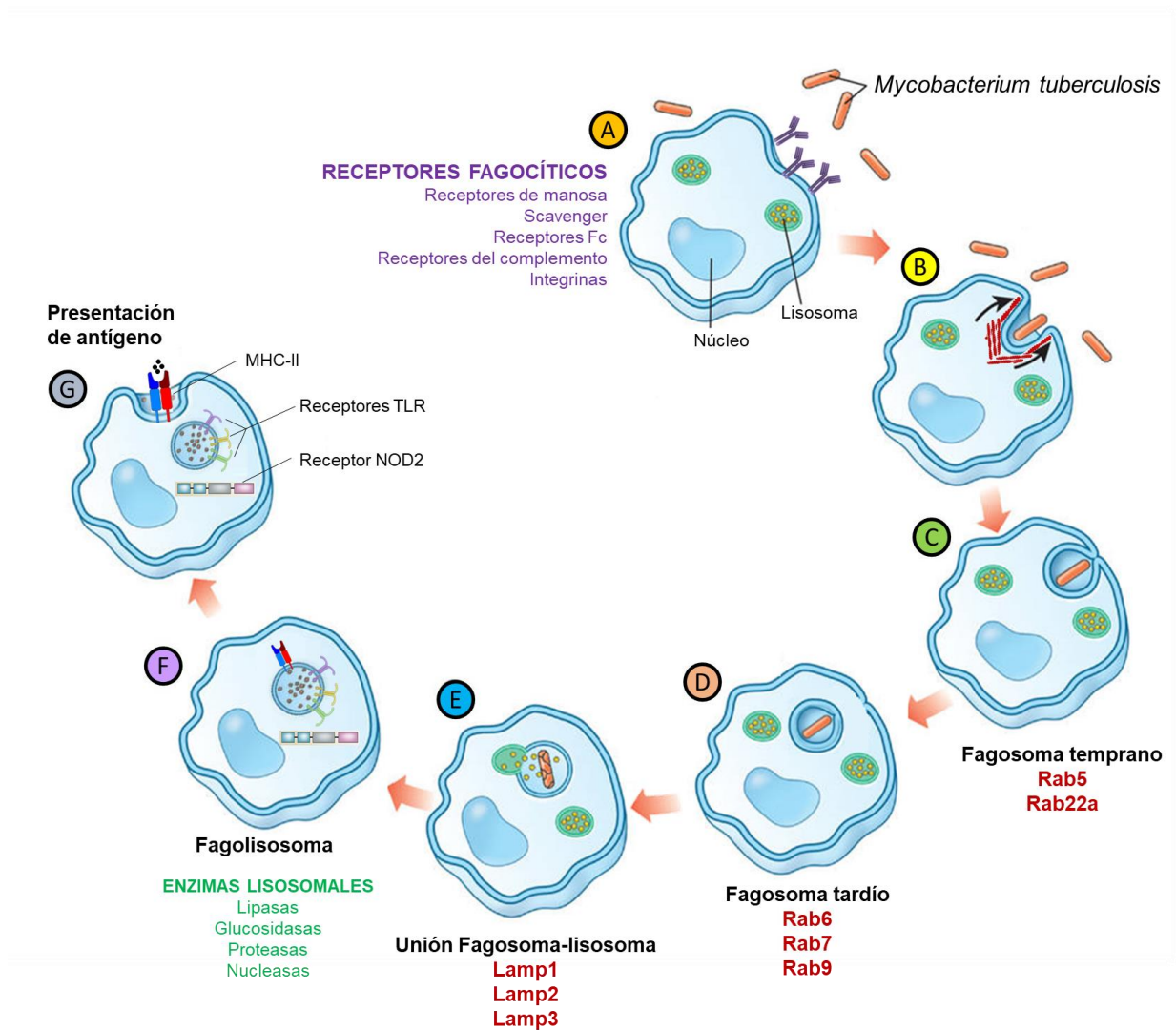


FIGURA 3: Etapas del proceso fagocítico de *Mycobacterium tuberculosis*. [Modificado de Medical Dictionary. 2009. Farlex and Partners. Recuperado el 10 de enero de 2017 de <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/phagocytosis>]

5.2 Receptores involucrados en el reconocimiento de *M. tuberculosis*

Además de los receptores fagocíticos, existen receptores capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) presentes en *M. tuberculosis* [Killick, 2013], entre los que destacan los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores tipo Nod (NLR) que inducen la respuesta inflamatoria innata y permiten la participación de la inmunidad adaptativa por medio de la producción de citocinas [Nakamura, 2014].

Los TLR son receptores de membrana que detectan el medio extracelular y el compartimiento fagosomal en las infecciones microbianas, mientras que los NLR son receptores citosólicos que detectan productos microbianos en el citosol. Los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen fragmentos de ácidos nucleicos micobacterianos presentes en compartimientos fagosomales y NOD2, miembro de la familia de los NLR, reconoce fragmentos de peptidoglicano micobacteriano presentes en el citosol (Figura 3F) [Elinav, 2011; Killick, 2013]. El receptor NOD2 es muy sensible en el reconocimiento de *M. tuberculosis*, esto se ha asociado principalmente a la mayor activación del receptor NOD2 por parte del peptidoglicano presente exclusivamente en los miembros del género *Mycobacterium*, lo que hace del receptor NOD2 un receptor importante para el reconocimiento de *M. tuberculosis* [Ferwada, 2005; Coulombe, 2009; Pandey, 2009; Brooks, 2011; Hansen, 2014].

6. Receptor NOD2

El receptor NOD2 se encuentran en el citosol de células inmunes de la línea monocítica, granulocitos, linfocitos y en células del tracto gastrointestinal [Gutierrez, 2002; Berrebi, 2003]. La estructura del receptor NOD2 incluye un dominio de reconocimiento el cual consiste en repeticiones ricas en leucinas (LRR) que participan en la detección microbiana; un dominio de oligomerización de nucleotidos (NOD) y un dominio efector que actúa como moderador de la señalización una vez que el receptor es activado, el cual consta de dos dominios CARD. (Figura 4) [Inohara, 2003].

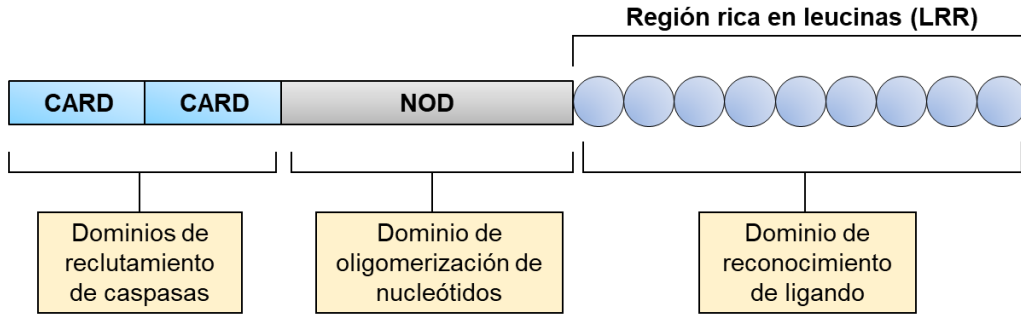


FIGURA 4: Representación esquemática de la estructura de NOD2 [Modificado de Philpott DJ, 2014]

El ligando del receptor NOD2 es el Muramil dipeptido (MDP), el cual se encuentra formando parte del peptidoglicano presente en la pared de las bacterias Gram positivas y Gram negativas [Stobe, 2006].

6.1 Muramil dipéptido micobacteriano

El MDP corresponde al fragmento de peptidoglicano formado por la fracción correspondiente al N-acetil murámico unido exclusivamente con L-alanina y D-ácido glutámico (Figura 5) [Ramírez-Rivera, 2002; Inohara, 2003].

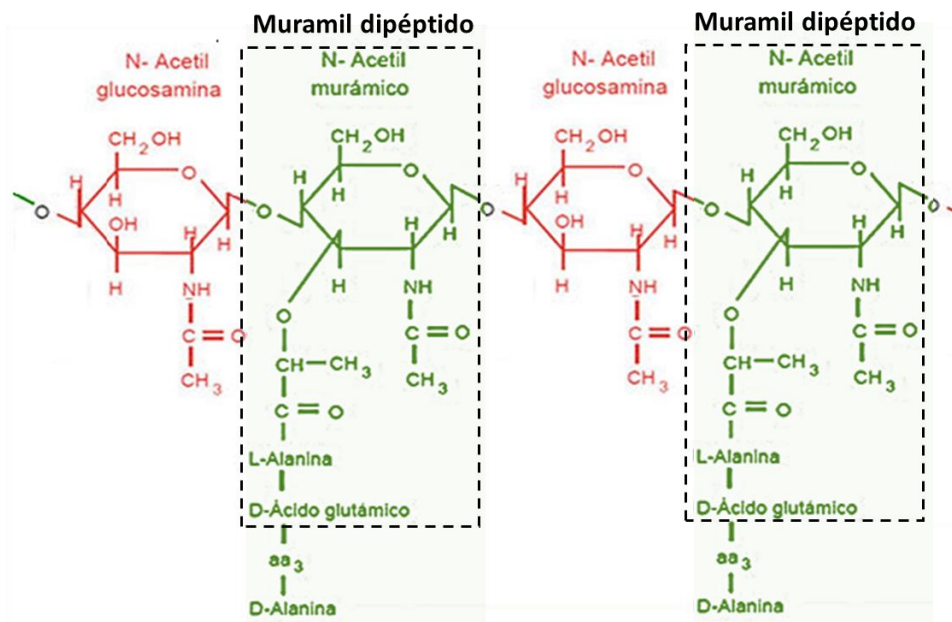


FIGURA 5: Estructura del peptidoglicano en donde se señala el fragmento correspondiente al MDP. [Modificada, Imagen sin autor (2006). "Peptidoglikano" recuperado el 10 de enero de 2017 de: <https://eu.wikipedia.org/wiki/Peptidoglikano#/media/File:Peptidoglicano.jpg>]

En el género *Mycobacterium* se encuentra presente la enzima N-acetil murámico hidroxilasa (NamH) que actúa sobre el grupo N-acetil del ácido murámico que adiciona un grupo hidroxilo para producir la forma glicosilada de muramil dipeptido (**Figura 6**). Se ha demostrado que el MDP glicosilado induce una activación de NOD2 mayor en comparación con el MDP acetilado, y que la interrupción de la enzima NamH conduce a la alteración del reconocimiento de micobacterias mediado por NOD2 [Coulombe, 2009; Hansen, 2014; Behr, 2015].

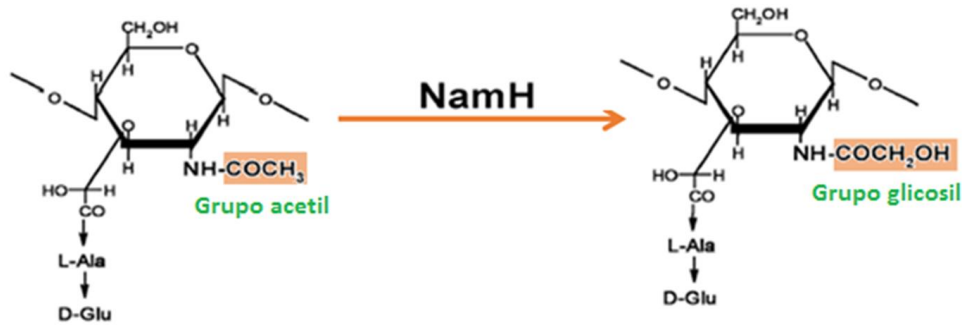


FIGURA 6: Reacción de glicosilación del muramil dipéptido mediada por la enzima N-acetil murámico hidroxilasa (NamH). [Modificado de Coulombe, 2009]

6.2 Activación del receptor NOD2

La unión de MDP al dominio de reconocimiento de ligando de NOD2 induce un cambio conformacional en el receptor promoviendo el reclutamiento y posterior activación de la cinasa RIP2, esto induce la fosforilación del complejo I κ B cinasa (IKK) favoreciendo su activación. Posteriormente el complejo IKK activado fosforila a I κ B el cual es un inhibidor que mantiene secuestrado al factor nuclear NF- κ B en el citoplasma. Esta fosforilación promueve la poliubiquitinación y posterior degradación del inhibidor I κ B, liberando así a NF- κ B que posteriormente se transloca al núcleo para regular la expresión de los genes diana implicados en inflamación, inmunidad y supervivencia celular. A su vez RIP2 también activa la vía de las MAP cinasas como ERK JNK y P38, lo que conduce a la activación del factor nuclear AP-1 (**Figura 7**) [Kanneganti, 2007; Franchi, 2008].

Los factores nucleares NF- κ B y AP-1 activados por la vía de señalización de NOD2 inducen la transcripción de genes que codifican a citocinas pro-inflamatorias, entre ellas los precursores inactivos pro-interleucina 1 β (pro-IL-1 β) y pro-interleucina-18 (pro-IL-18) que posteriormente, por acción de la caspasa 1, sufren una ensición teniendo como resultado final a la IL-1 β y a la IL-18 maduras (**Figura 7**) [Denes, 2012; Owen, 2013].

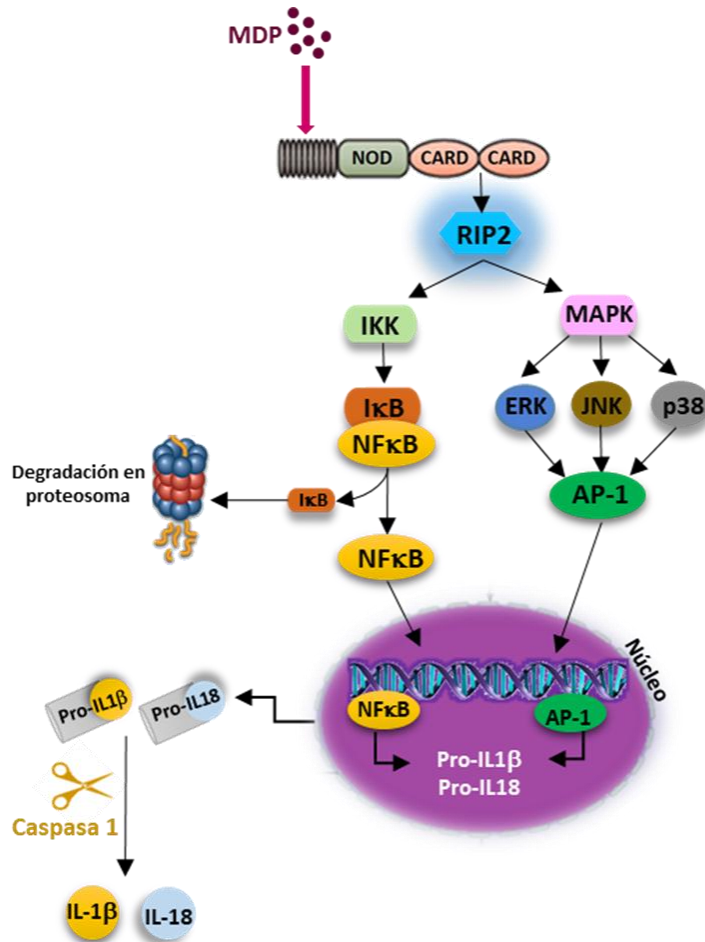


FIGURA 7: Señalización mediada por NOD2. Ver detalles en el texto [Modificado de Kanneganti, 2007]

6.3 Importancia del receptor NOD2 en la tuberculosis

En la última década se ha considerado a NOD2 como un receptor muy importante para el reconocimiento de patógenos intracelulares como es el caso de *M. tuberculosis*, esto se le atribuye principalmente a su localización intracelular y a la activación del receptor frente a MDP glicosilado micobacteriano [Ferwerda, 2005; Coulombe, 2009; Brooks, 2011; Juarez, 2012]. Estudios funcionales demostraron que NOD2 es un importante mediador en la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a *M. tuberculosis*, favoreciendo su eliminación [Landes, 2013].

M. tuberculosis induce una respuesta de Interferones del tipo I a través de una vía dependiente de NOD2 con un papel importante para la molécula de señalización RIP2 y el factor nuclear IRF5. Esto es notablemente diferente a la inducción de interferones de tipo I por otras bacterias que presentan MDP acetilado, como *Listeria monocytogenes*. El interferón de tipo I es conocido por participar y regular la inmunidad contra patógenos intracelulares que induce un aumento en la capacidad microbicida [Pandey, 2009]. La importancia del receptor NOD2 fue confirmada por una asociación significativa entre la presencia de tres polimorfismos no-sinónimos presentes en el gen *nod2* (Pro268Ser, Arg702Trp y Ala725Gly) con una mayor susceptibilidad a la tuberculosis en humanos [Azad, 2012; Austin, 2008]. También en ratones *knock-out* para NOD2 se comprobó la disminución en la producción de TNF- α en respuesta a *M. tuberculosis* y un mayor crecimiento bacteriano intracelular [Killick, 2013]. Estos estudios en conjunto demuestran la importancia del receptor NOD2 en la respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis*, y se sugiere que la membrana fagosomal podría proporcionar la translocación de MDP desde el interior del fagosoma hacia el citoplasma para que se lleve a cabo el reconocimiento por parte del receptor NOD2, sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo el transporte.

Estudios recientes en macrófagos humanos han demostrado la presencia de los transportadores de oligopéptidos PHT1 y PHT2 a los cuales se les podría atribuir

el transporte de MDP micobacteriano [Wang, 2014; Sun, 2013; Marina-García, 2009; Rubio-Aliaga, 2002].

7. Transportadores PHT1 y PHT2

Los transportadores PHT1 y PHT2 son transportadores membranales miembros de la familia SLC15A presentes en fagosoma que median la captación celular de dipéptidos y tripéptidos por medio de un transporte simporte activo utilizando un potencial de membrana negativo y un gradiente de protones dirigido desde el interior del fagosoma al citoplasma. El transporte simporte se define como el transporte simultáneo de dos sustratos en la misma dirección por el mismo transportador sencillo, y el transporte activo se caracteriza por que uno de los sustratos, en este caso protones (H^+), crea previamente un gradiente de concentración cuya disipación es usada por el segundo sustrato, en este caso MDP, para transportarse con él. En el caso de los transportadores PHT1 y PHT2, el gradiente de protones está dado por el pH del compartimiento fagosomal proporcionado por la acción de ATPasas durante la hidrólisis de ATP (**Figura 8**) [Maloney, 1996; Steel, 1998; Rubio-Aliaga, 2002; Charrière, 2010; Smith, 2013; Ferrand, 2013;].

Hasta ahora se desconoce la dinámica de PHT1 y PHT2 con respecto a su capacidad de transporte y a su afinidad con sustratos, pero se ha reportado una importante relación funcional con los otros miembros de la familia SLC15A (PEPT1 y PEPT2). Todos los transportadores de dicha familia poseen 12 dominios transmembranales en donde sus extremos amino y carboxilo terminal se localizan en el citosol [Steel, 1998; Hannelore, 2004].

Recientemente, se demostró que PHT1 y PHT2 se expresan en macrófagos de bazo de ratón y en macrófagos humanos de la línea celular THP-1 [Sun, 2013]. Además, se demostró que el lipopolisacárido (LPS) es un factor regulador positivo de la expresión de PHT2 y que esta regulación se produjo principalmente a través de la vía de señalización de NF- κ B [Wang, 2014].

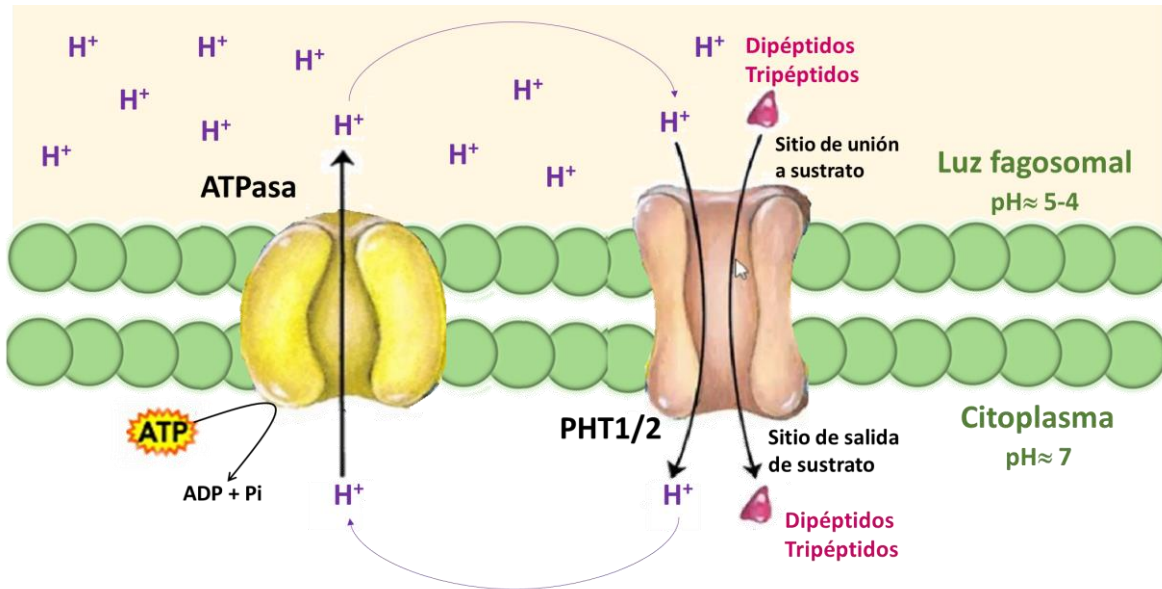


FIGURA 8: Mecanismo de transporte de dipéptidos y tripéptidos mediado por PHT1 y PHT2 [Modificado, Imagen sin autor (sin fecha). "Lípidos y membranas" recuperado el 10 de enero de 2017 de: <http://blogyanerthbioquimica.blogspot.mx/2016/06/lipidos-y-membrana.html>]

Asimismo, por medio de espectrometría de masas se demostró la expresión de PHT1 y PHT2 en membrana endosomal de células dendríticas de sangre periférica y en macrófagos murinos de la línea celular J774.1 y que la asociación de NOD2 con los compartimientos endocíticos que contienen patógenos son una importante característica para que se lleve a cabo el reconocimiento de MDP [Nakamura, 2014].

Estos antecedentes sugieren que los transportadores PHT1 y PHT2, al encontrarse expresados en macrófagos, ser regulados por LPS y asociarse a membranas endocíticas, podrían estar involucrados en el transporte de MDP desde el fagosoma al citosol y, de esta manera, desempeñar un papel importante en la respuesta inmune inducida por el reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* por parte del receptor NOD2.

JUSTIFICACION

En la última década se ha demostrado la importancia del receptor NOD2 en el reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. NOD2 reconoce a MDP, que es un motivo de peptidoglicano presente en la pared bacteriana, y ha mostrado tener un papel clave en la regulación de la respuesta inmune innata. Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual el MDP micobacteriano es transportado desde el compartimento fagosomal al citosol donde se presenta el reconocimiento por parte de NOD2. Estudios recientes han demostrado la expresión de los transportadores de péptidos PHT1 y PHT2 en compartimentos endosomales presentes en células inmunes; por lo tanto, el estudio de la expresión, localización celular e interacción con MDP de los transportadores PHT1 y PHT2 en macrófagos humanos infectados con *Mycobacterium bovis* BCG permitirá conocer su potencial implicación en el transporte de MDP micobacteriano de fagosoma a citosol.

HIPÓTESIS

Los transportadores PHT1 y PHT2 contribuyen al transporte de MDP de *Mycobacterium bovis* BCG desde el fagosoma al citosol

OBJETIVO GENERAL

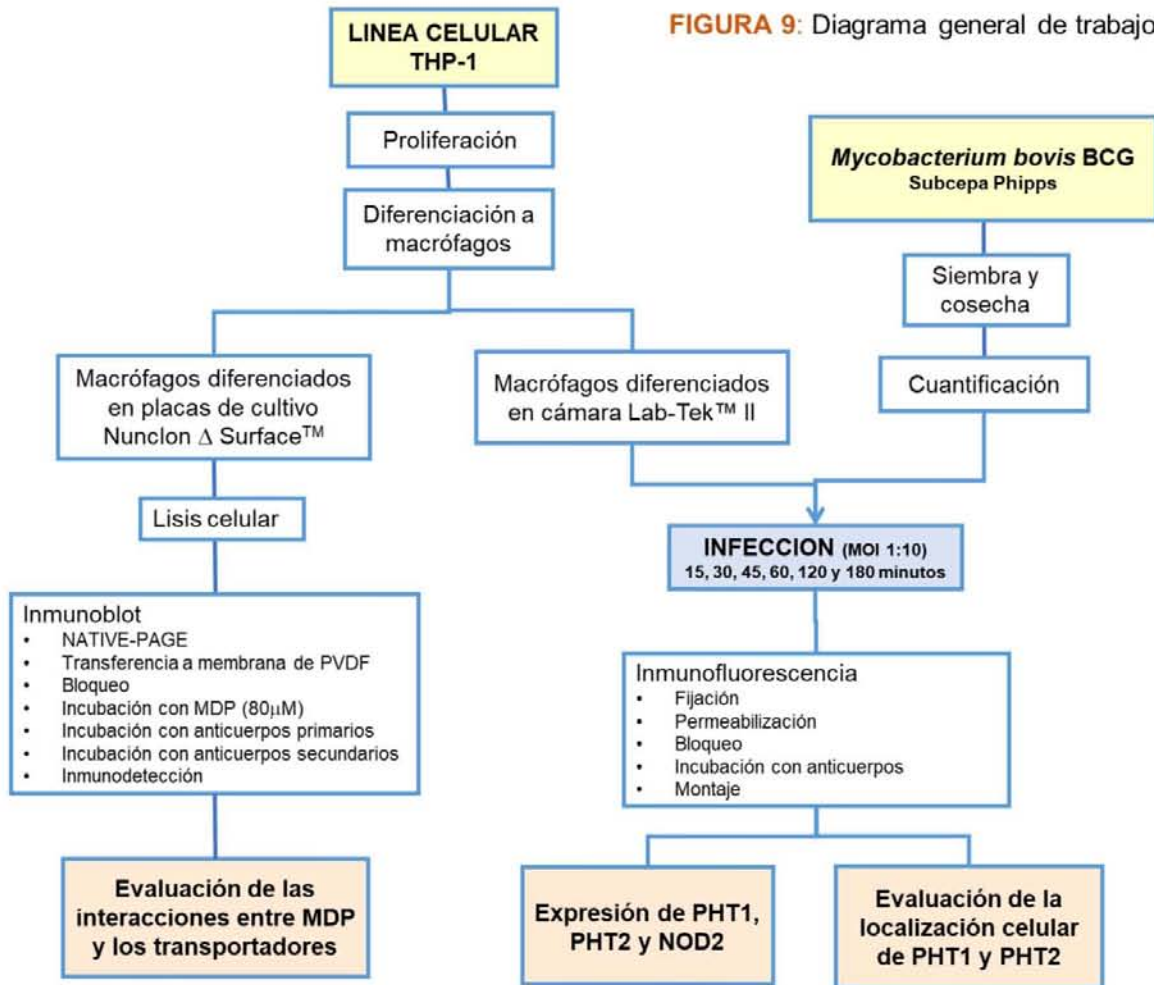
Determinar la implicación de los transportadores PHT1 y PHT2 en el transporte de MDP de *M. bovis* BCG desde el fagosoma al citosol en macrófagos humanos de la línea celular THP-1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la interacción física entre MDP y los transportadores PHT1 y PHT2
- Determinar la expresión de PHT1 y PHT2 en macrófagos humanos de la línea celular THP-1 infectados con *M. bovis* BCG a diferentes tiempos.
- Determinar la localización intracelular de PHT1 y PHT2 en macrófagos humanos de la línea celular THP-1 infectados con *M. bovis* BCG
- Identificar los genes involucrados en la vía de señalización de NOD2 mayormente expresados en macrófagos humanos de la línea celular THP-1 infectados con *M. bovis* BCG

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar las interacciones físicas entre MDP y los transportadores PHT1 y PHT2 se obtuvieron lisados de macrófagos THP-1 los cuales se separaron electroforéticamente en un gel nativo y se transfirieron a una membrana de PVDF, dicha membrana fue cortada en dos secciones: una sección se incubó con MDP y la otra se mantuvo en PBS como control. La presencia de interacciones entre MDP y los transportadores se evidenció al incubar las membranas con anticuerpos primarios que reconocen específicamente al “Sitio de unión a sustrato” de los transportadores. Así la interacción de los transportadores con MDP impide que los anticuerpos se unan a su epítipo presente en los transportadores. De esta manera, al incubar la membrana posteriormente con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa y obtener el blot, la disminución en la señal obtenida sugiere la presencia de interacciones entre MDP y los transportadores (**Ver Anexo III**). Para determinar la expresión y localización de PHT1, PHT2 y NOD2 en macrófagos THP-1 infectados con *Mycobacterium bovis* BCG, se empleó inmunofluorescencia y para identificar a los genes sobre-expresados involucrados en la vía de señalización de NOD2 se realizó un análisis bioinformático de genes expresados diferencialmente en macrófagos THP-1 infectados con BCG por medio de los programas KEGG v 81.0 y STRING v 10.0. Dichos genes fueron obtenidos previamente en el grupo de investigación por medio de microarreglos utilizando un chip GeneChip Human Gene 1.0 ST (Affymetrix) con una cobertura de 19,000 genes.



MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de la línea celular THP-1 (TIB-202, ATCC)

Un vial de la línea celular THP-1 obtenido de ATCC con 1 mL (1×10^6 células/mL) se descongeló y resuspendió en medio RPMI-1640 suplementado (**Ver Anexo I “Soluciones y Reactivos: Cultivo celular”**) a 37°C, se centrifugó a 180 xg por 5 minutos a temperatura ambiente. El precipitado celular se resuspendió en medio RPMI-1640 suplementado y se transfirió a botellas de cultivo. La incubación se realizó a 37°C con 5% CO₂ por 6 días. Se determinó la morfología y viabilidad del cultivo por exclusión con azul tripano. Se adicionó medio fresco cada 2-3 días para proliferar la línea celular y mantenerla a una concentración de 5×10^5 células/mL.

Obtención de macrófagos a partir de monocitos de la línea celular THP-1

[Daigneault, 2010; Maeß, 2014]

Para diferenciar monocitos a macrófagos, se utilizó forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a una concentración final de 50 nM en medio RPMI-1640 suplementado (**Ver Anexo I “Soluciones y Reactivos: Cultivo celular”**). En placas de cultivo Nunclon Δ Surface™ se agregaron 10 mL de suspensión de monocitos con PMA por placa a una concentración de 2×10^6 células/mL, y en cámaras Lab Tek™ II se agregaron 300 μ L de suspensión de monocitos con PMA por pozo a una concentración de 0.5×10^6 células/mL. Se incubó por 48 horas a 37°C con 5% CO₂. La viabilidad de los monocitos fue mayor al 95%. Posterior a la incubación se retiró el sobrenadante y se adicionó medio RPMI-1640 suplementado a las células adheridas, se incubó por 72 horas a 37°C con 5% CO₂ para re-establecer el fenotipo (**Ver Anexo II**).

Obtención de lisados celulares

A los macrófagos diferenciados en placas Nunclon Δ Surface™ se les retiró el sobrenadante y se desprendieron de la placa con EDTA 0.5 mM a 4°C. Se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 180 xg por 5 minutos y se realizaron 2 lavados con PBS a 4°C. Después de los lavados, el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de amortiguador de lisis frío (**Ver Anexo I “Soluciones y Reactivos: Cultivo celular”**) y se incubó en hielo por 30. El material insoluble del lisado se eliminó centrifugando a 13,000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se dializó por medio de un tubo de ultrafiltración Amicon® (Millipore) empleando una membrana con un peso molecular de corte de 3 kDa, se centrifugó a 4,000 xg por 30 minutos a 4°C y el lisado dializado se conservó a -70°C hasta su uso.

Detección de interacciones con MDP por inmunoblot

Muestras de 20 μ g de proteína del lisado dializado se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida nativa al 7% (Native-PAGE) y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas con los lisados transferidos fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 por 1 hora (**Ver Anexo I “Soluciones y Reactivos: Inmunoblot”**). Posterior al bloqueo, una de las membranas fue incubada con 80 μ M de MDP por 1 hora con agitación constante, mientras que una segunda membrana se mantuvo en TBS el mismo tiempo. Después de la incubación, las membranas fueron cortadas en carriles y se incubaron con anticuerpos primarios anti-PHT1 (LS-Bio; Dilución 0.25 μ g/mL), anti-PHT2 (LS-Bio; Dilución 1:1000) y anti-NOD2 (Abcam; Dilución 2 μ g/mL) por 12 horas. A continuación las membranas se lavaron con TBS-Tween 20 y se incubó con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-IgG de conejo (Bio-rad; Dilución 1:3,000) o anti-IgG de ratón (Jackson Immuno Research; Dilución 10,000) por 1 hora. Finalmente se llevó a cabo la inmunodetección empleando quimioluminiscencia (Immunocruz; Santa Cruz Biotechnology) y se reveló en placas fotográficas (Kodak) (**Ver Anexo III**).

Cultivo de *Mycobacterium bovis* BCG

Se cultivó *M. bovis* BCG subcepa Phipps en medio sólido Middlebrook 7H10 + OADC (Ver Anexo I “Soluciones y Reactivos: Cultivo bacteriano”) y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ por 3 semanas. Posteriormente, se tomó una colonia de dicho cultivo y se sembró en medio líquido Middlebrook 7H9 + ADC, se incubó a 37°C con 5% de CO₂ con agitación constante hasta obtener una densidad óptica de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm en espectrofotómetro (Biomates, Thermo Spectronic, England). Una vez que se obtuvo la densidad óptica antes mencionada, se determinó el número de bacterias por el método de cuantificación del contenido de ATP bacteriano. Se ajustó la suspensión bacteriana a una concentración de 5x10⁶ bacterias/mL con medio RPMI-1640 suplementado, una hora antes a los ensayos de infección.

Infección de macrófagos THP-1 con *Mycobacterium bovis* BCG

A los macrófagos diferenciados en cámaras Lab Tek™ II de 8 pozos se les retiró el sobrenadante quedando solo los macrófagos adheridos, se adicionó 300 µL de la suspensión bacteriana (Multiplicidad de infección 1:10 en relación a los macrófagos) y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ por 15, 30, 45, 60, 120 y 180 minutos. Como control positivo se estimuló con 10 µg/mL de MDP por 3 horas.

Localización intracelular por inmunofluorescencia

Después de los tiempos de infección, se retiró el estímulo de las cámaras Lab Tek™ y se realizaron tres lavados suaves con PBS. Posteriormente los macrófagos fueron fijados con 1% de Paraformaldehído por 5 minutos y se permeabilizaron con 0.3% de Triton-X100 por 5 minutos. Se bloqueó con 1% de SFB por 1 hora y se incubó con el correspondiente coctel de anticuerpos primarios PHT1 o PHT2 por 12 horas (Ver Anexo I “Soluciones y Reactivos: Inmunocitoquímica”). Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch; Dilución 1:800 en PBS) por 1 hora. Entre cada proceso se realizaron 3 lavados suaves con PBS. A continuación las cámaras

fueron desprendidas de los portaobjetos y éstos se dejaron secar al aire protegiendo de la luz. Una vez secas se adicionó una gota de medio de montaje a cada muestra, se montó el cubreobjetos y, finalmente, se sellaron las orillas del cubreobjetos con barniz transparente.

Microscopía confocal

Se utilizó el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM empleando las longitudes de excitación de 488 nm (verde), 561 nm (rojo) y 640 nm (azul). Las imágenes se capturaron con un objetivo de 100x y fueron analizadas por medio del programa ImageJ.

Análisis de genes expresados de la vía de señalización de NOD2

Para identificar a los genes que podrían ser útiles para evaluar la activación de la vía de señalización de NOD2 se realizó un análisis empleando la base de datos KEGG v 81.0 y el programa STRING v 10.0 en el que se analizaron 470 genes expresados diferencialmente en macrófagos THP1 infectados con *Mycobacterium bovis* BCG subcepa Phipps. Los genes expresados diferencialmente fueron obtenidos previamente en el grupo de investigación por medio de microarreglos utilizando un chip GeneChip Human Gene 1.0 ST (Affymetrix) con una cobertura de 19,000 genes. [Molina-Olvera; 2017. [Artículo en revisión](#)].

RESULTADOS

1. Los transportadores PHT1 y PHT2 interactúan físicamente con MDP.

Para determinar si MDP y los transportadores PHT1 y PHT2 interactúan físicamente se llevó a cabo un ensayo en donde la presencia de interacciones entre MDP y los transportadores se evidenció al incubar las membranas con los lisados de macrófagos transferidos con anticuerpos primarios que reconocen específicamente al “Sitio de unión a sustrato” de los transportadores. Así la interacción de los transportadores con MDP impidió que los anticuerpos se unieran a su epítipo presente en los transportadores. De esta manera, al incubar la membrana posteriormente con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa y obtener el blot, se observó un patrón de bandeo característico de los inmunoblots nativos en donde se apreciaron bandas correspondientes a PHT1 y PHT2 a la misma altura, lo cual se esperaba considerando sus masas y puntos isoeléctricos similares. También se observó una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a los transportadores PHT1 y PHT2 después de la incubación con MDP en comparación con el control. Esto sugiere que tanto PHT1 como PHT2 son capaces de interactuar con MDP (**Figura 10C**). También se observó la presencia de bandas de mayor masa molecular las cuales podrían corresponder a las posibles interacciones entre los transportadores y proteínas presentes en el lisado (**Figura 10A**).

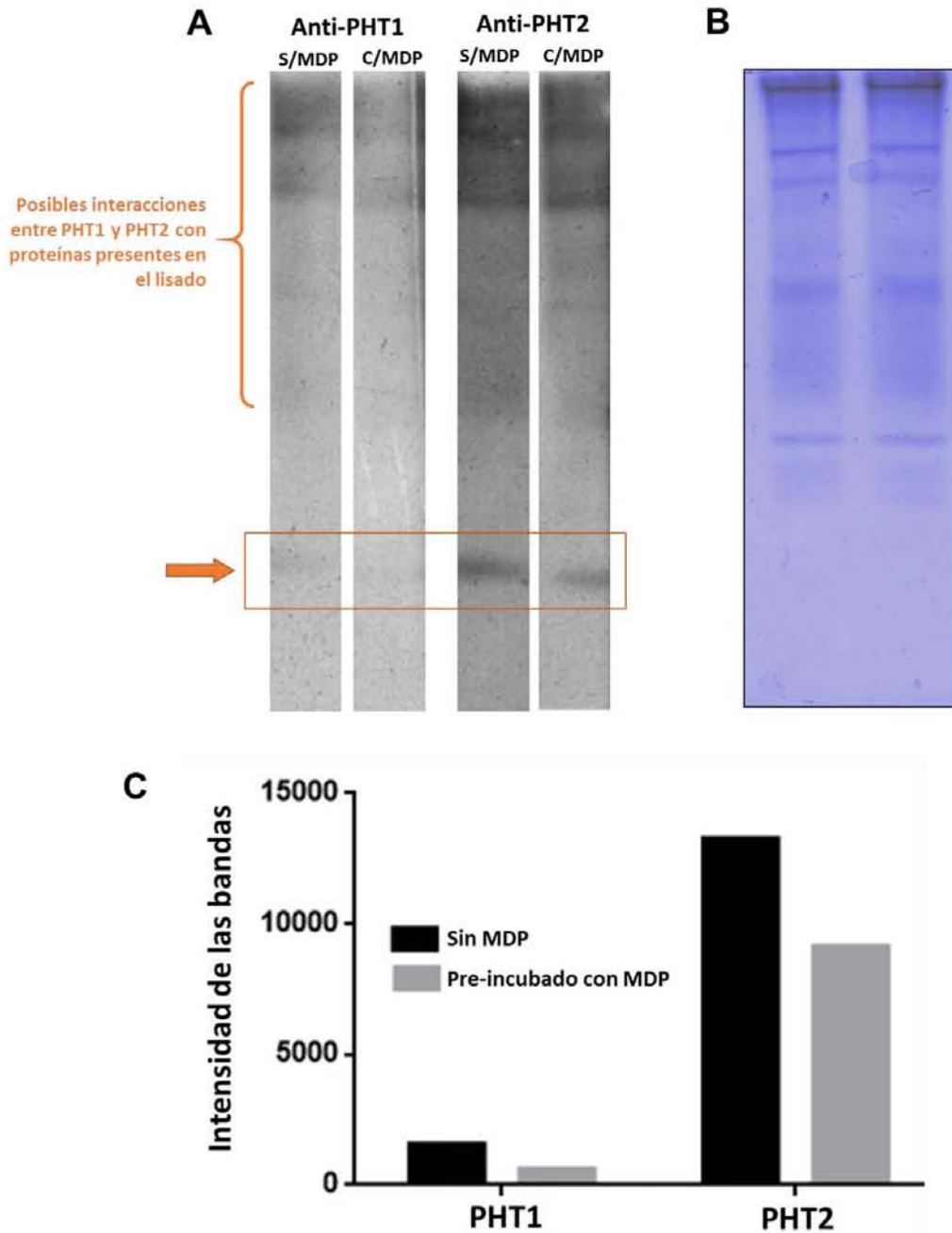


FIGURA 10: PHT1 y PHT2 son capaces de interactuar con MDP.

A. Inmunoblot de lisados de macrófagos THP-1 con o sin MDP (80 μ M). **B.** Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie el cual se empleó como control de carga. **C.** Representación gráfica de la intensidad de las bandas detectadas en el inmunoblot. La flecha indica las bandas correspondientes a los transportadores PHT1 o PHT2 cuya intensidad se cuantificó por medio del programa ImageJ.

2. La expresión de PHT2 y NOD2 en macrófagos THP-1 infectados con BCG es máxima a los 45 minutos.

Hasta la fecha, se desconoce si en la infección de macrófagos con *Mycobacterium tuberculosis* se estimula la expresión de los transportadores PHT1 y PHT2. En trabajos realizados anteriormente en nuestro grupo de investigación, se demostró que la infección de macrófagos THP-1 con BCG induce la activación de vías de señalización relacionadas con inflamación de manera inmediata y que el proceso fagocítico consecuente a la infección culmina a las 3 horas post-infección (180 minutos). Considerando estos antecedentes, se analizó la expresión de los transportadores a los 0, 15, 30, 45, 60, 120 y 180 minutos después de infectar a los macrófagos THP-1 con BCG.

En la cinética de expresión de PHT1 se observó que solo a los 45 minutos post-infección con BCG se presentó un incremento (**Figura 11**).

Por otra parte, en la cinética de expresión de PHT2 se observó que la infección con BCG indujo la expresión de PHT2 de manera gradual siendo a los 45 minutos el tiempo de mayor expresión. Después de los 45 minutos la expresión fue disminuyendo paulatinamente hasta los 180 minutos permaneciendo una expresión basal (**Figura 11**). En la cinética de expresión del receptor NOD2 se observó que a partir de los 30 minutos y hasta los 60 minutos post-infección se tuvo un aumento considerable en la expresión, siendo a los 45 minutos cuando se observó la mayor expresión (**Figura 11**).

Estos resultados obtenidos por inmunofluorescencia sugieren que la expresión de PHT2 y NOD2 es inducida por BCG mostrando, para ambos, una mayor inducción a los 45 minutos post-infección y que la expresión de PHT1 no cambia considerablemente después de la infección con BCG.

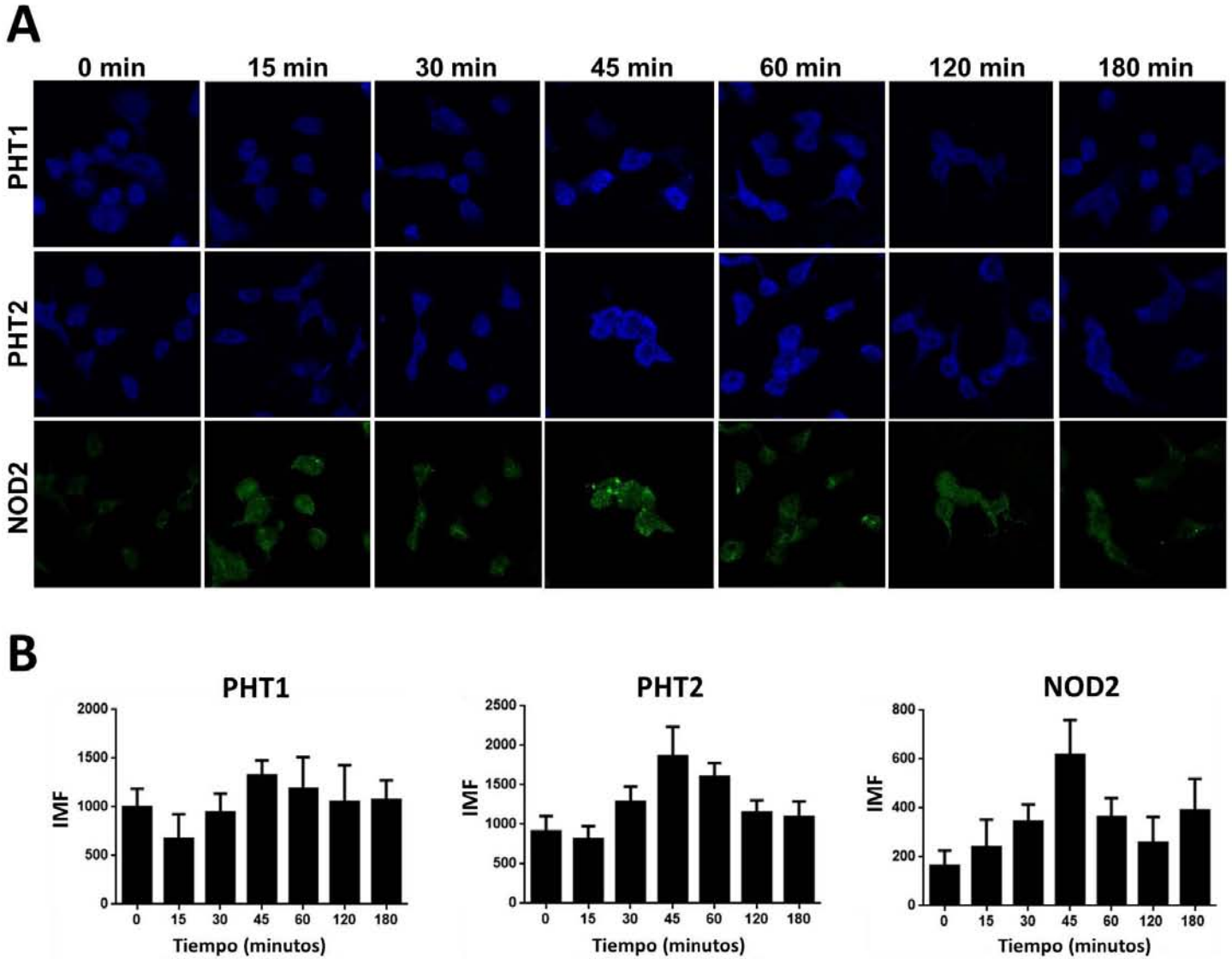


FIGURA 11: La expresión de PHT2 y NOD2 en macrófagos infectados con BCG es mayor a los 45 minutos.

A. Imágenes correspondientes a la cinética de expresión de PHT1, PHT2 y NOD2 obtenidas por microscopía de fluorescencia de macrófagos THP-1 infectados con BCG a una relación 1:10 (10 bacterias por macrófago). Se muestra una imagen representativa por tiempo. **B.** Representación gráfica de la intensidad media de fluorescencia de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia. La intensidad media de fluorescencia (IMF) fue calculada por medio del programa ImageJ a partir de 2 experimentos independientes.

3. PHT1, PHT2 y NOD2 se localizan en membrana fagosomal en macrófagos THP-1

Considerando que la expresión de PHT2 y NOD2 en macrófagos infectados con BCG es mayor a los 45 minutos, se prosiguió a determinar la localización de los transportadores y NOD2 en membrana fagosomal a dicho tiempo, relacionando así su posible papel en el transporte de MDP micobacteriano desde el interior del fagosoma al citosol.

Para determinar la localización intracelular de los transportadores y NOD2 en macrófagos THP-1 infectados con BCG se empleó inmunofluorescencia para visualizar a los transportadores. La localización de los fagosomas se determinó detectando a Rab5 (ATPasa vacuolar empleada como marcador fagosomal). Como control positivo se utilizaron macrófagos estimulados con 80 μ M de MDP por 1 hora y como control negativo se emplearon macrófagos sin infectar.

En el análisis de localización intracelular se observó una colocalización de PHT1 con Rab5 tanto en macrófagos sin infectar como en macrófagos estimulados con MDP e infectados con BCG, sugiriendo que PHT1 se localiza principalmente en membrana fagosomal (**Figura 12A**).

Sin embargo, no se observaron diferencias considerables en macrófagos infectados con BCG ni con MDP en comparación con el control sin infectar, sugiriendo que BCG y MDP no inducen la expresión de este transportador (**Figura 12B**).

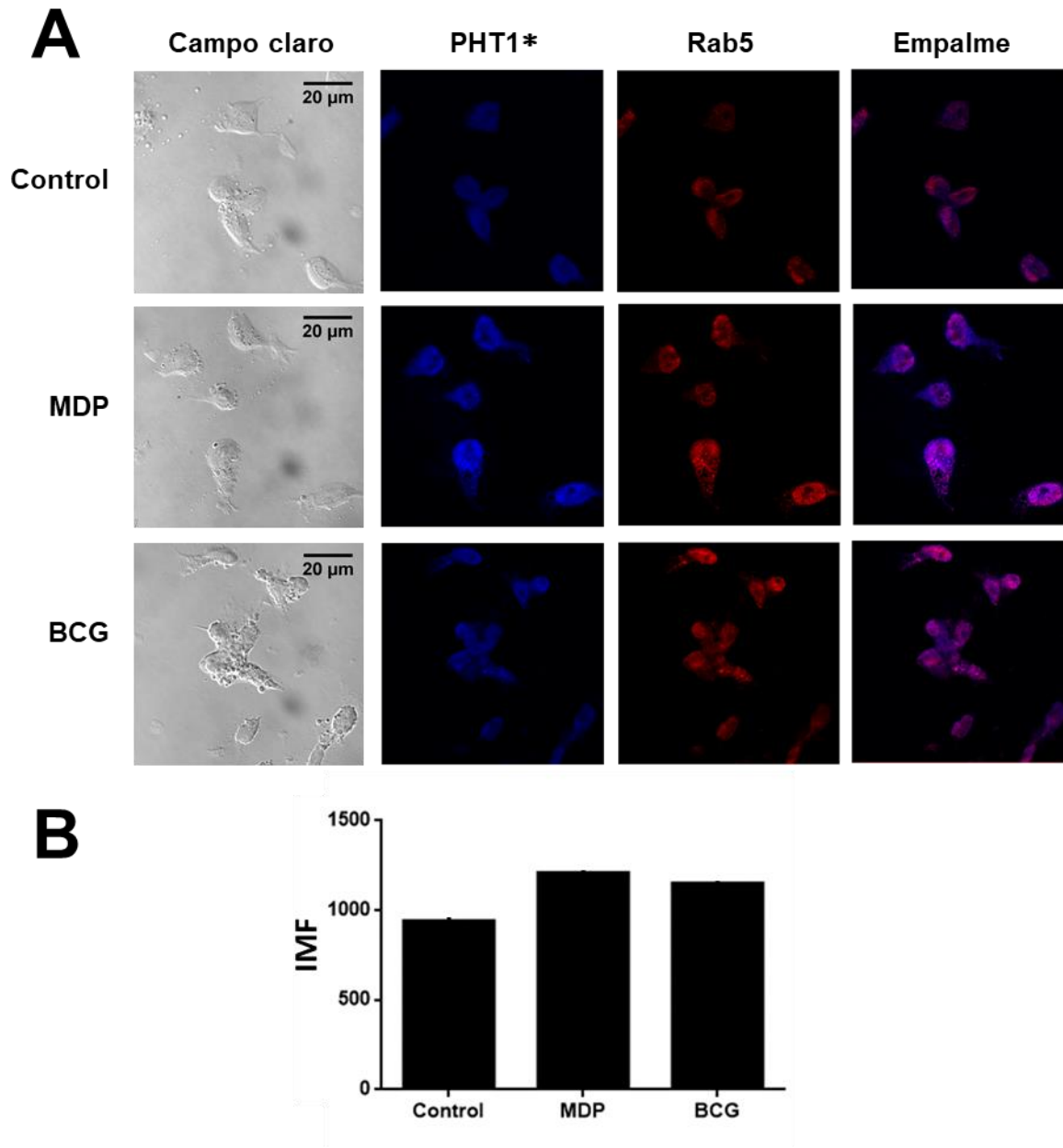


FIGURA 12: PHT1 se localiza en membrana fagosomal en macrófagos THP-1

A. Colocalización de PHT1 (azul) con el marcador fagosomal Rab5 (rojo) en macrófagos THP-1. La colocalización se muestra de color magenta. **B.** Representación gráfica de la intensidad media de fluorescencia de PHT1 (* segunda columna). La intensidad media de fluorescencia (IMF) fue calculada a partir de 2 experimentos independientes por medio del programa ImageJ.

De igual manera, se observó la colocación del transportador PHT2 con Rab5 - en macrófagos sin infectar, macrófagos estimulados con MDP y macrófagos infectados con BCG. Estos resultados sugieren que PHT2 se localiza principalmente en membrana fagosomal (**Figura 13A**).

En este caso, la expresión de PHT2 fue inducida mayormente en los macrófagos infectados con BCG en comparación con los macrófagos sin infectar y macrófagos estimulados con MDP (**Figura 13A y 13B**). Esto sugiere que otros patrones moleculares diferentes a MDP presentes en BCG son capaces de regular la expresión de PHT2 en etapas tempranas de infección.

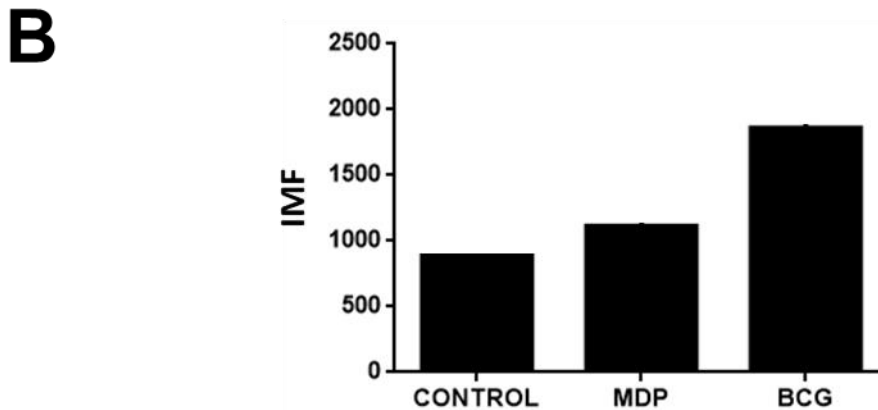
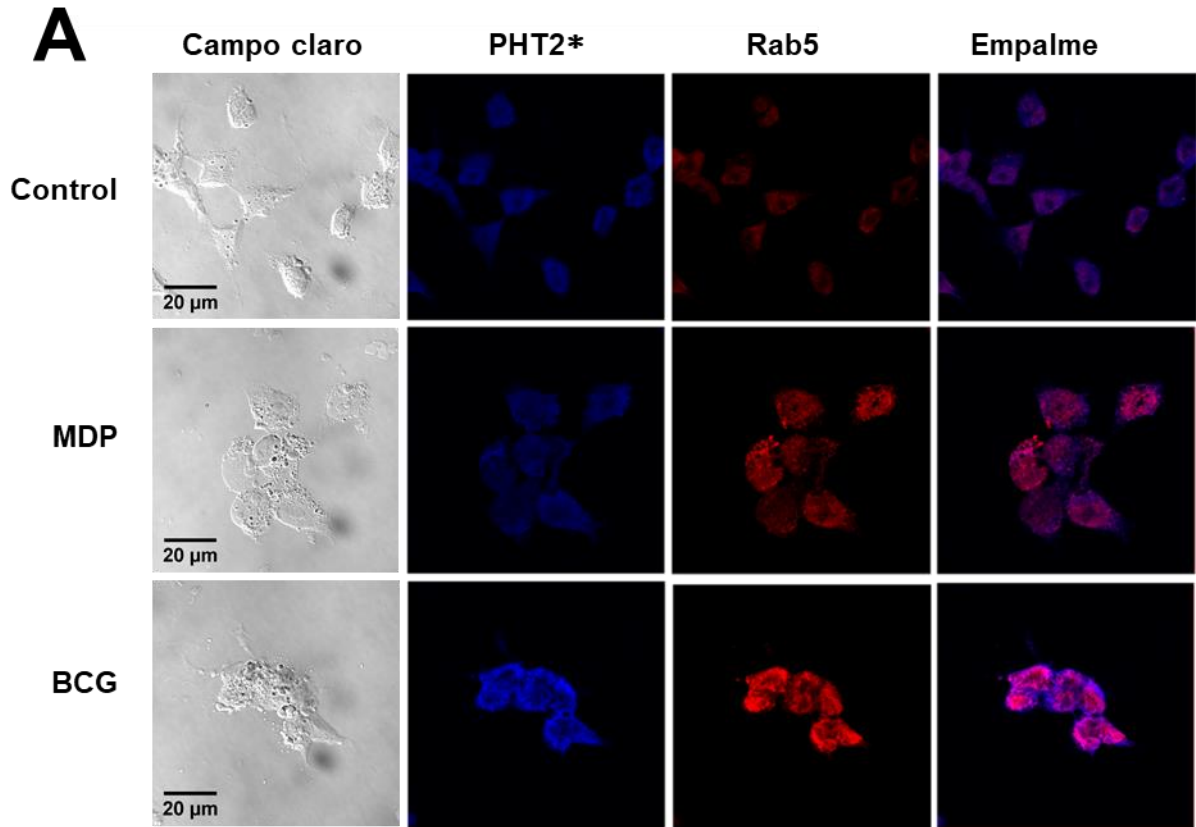


FIGURA 13: PHT2 se localiza en membrana fagosomal en macrófagos THP-1

A. Colocalización de PHT2 (azul) con el marcador fagosomal Rab5 (rojo) en macrófagos THP-1. La colocalización se muestra de color magenta. **B.** Representación gráfica de la intensidad media de fluorescencia de PHT2 (* segunda columna). La intensidad media de fluorescencia (IMF) fue calculada a partir de 2 experimentos independientes por medio del programa ImageJ.

Finalmente, en los macrófagos sin infectar no se observó colocalización de NOD2 con Rab5 sugiriendo que bajo esta condición el receptor NOD2 no se encuentra asociado a fagosomas.

De manera interesante, se observó la colocalización del receptor NOD2 con Rab5 en los macrófagos tratados con MDP y mayormente en los macrófagos infectados con BCG, sugiriendo que estos estímulos indujeron el reclutamiento de NOD2 a membrana fagosomal (**Figura 14A**).

En la inmunodetección se observó que BCG indujo considerablemente la expresión de NOD2 en los macrófagos infectados con BCG en comparación con los macrófagos sin infectar y macrófagos estimulados con MDP (**Figura 14B**), sugiriendo que otros patrones moleculares diferentes a MDP presentes en BCG son capaces de regular la expresión de NOD2.

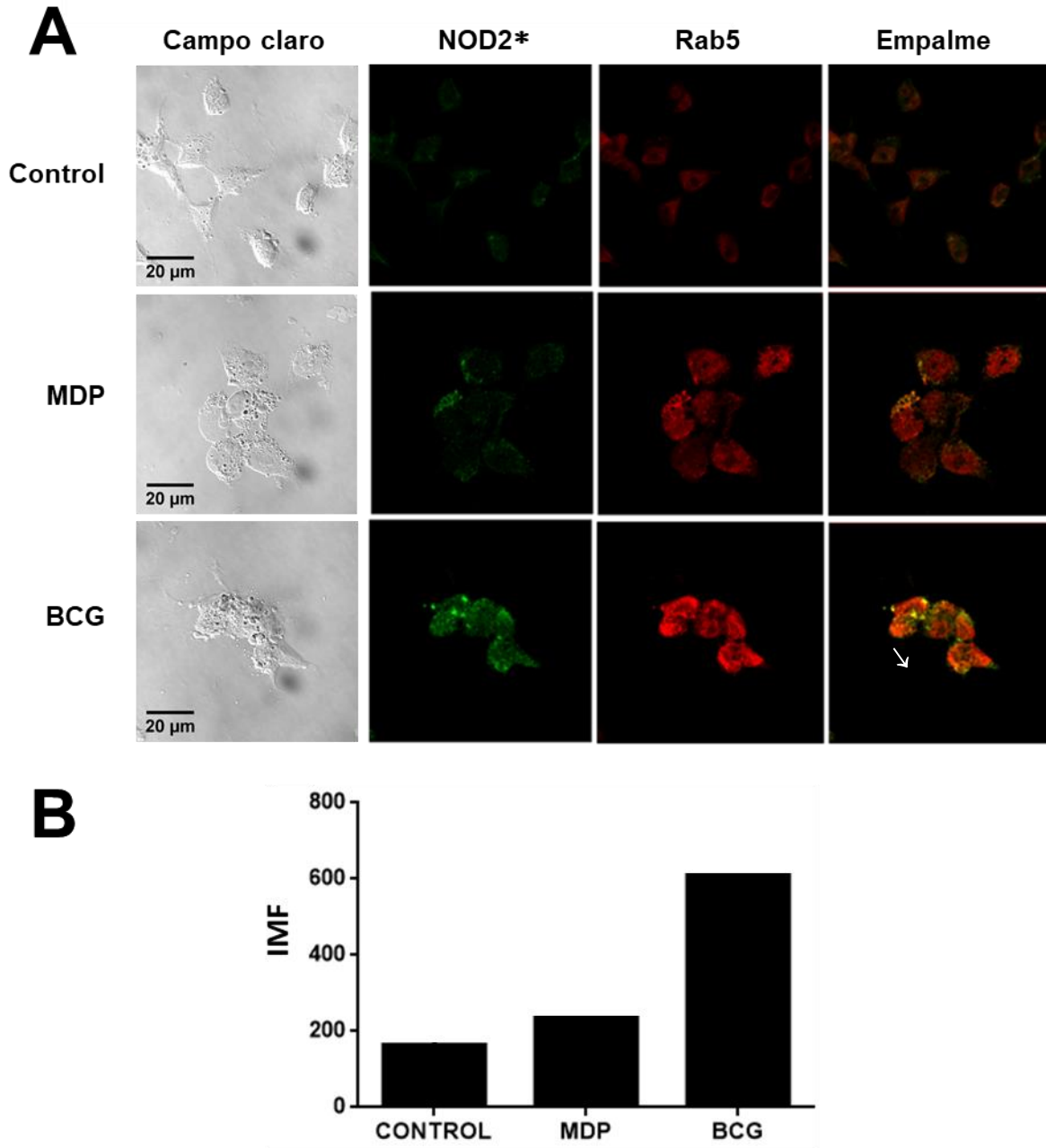


FIGURA 14: BCG induce la localización celular de NOD2 en membrana fagosomal en macrófagos THP-1
A. Colocalización de NOD2 (verde) con el marcador fagosomal Rab5 (rojo) en macrófagos THP-1. La colocalización se muestra de color amarillo. Con flechas se resaltan las zonas de colocalización.
B. Representación gráfica de la intensidad media de fluorescencia de NOD2 (* segunda columna). La intensidad media de fluorescencia (IMF) fue calculada a partir de 2 experimentos independientes por medio del programa ImageJ.

4. BCG induce la expresión de genes involucrados en la vía de señalización de NOD2 como RIPK2, NFKB1, CASP1, IL1B, BIRC3 y NLRP3 en macrófagos THP-1.

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se sugiere que los transportadores PHT1 y PHT2 se encuentran involucrados en el transporte de MDP micobacteriano desde el fagosoma al citosol, sin embargo para demostrar de manera concluyente esta afirmación es necesario evaluar la activación del receptor NOD2 en macrófagos infectados con BCG en ausencia de dichos transportadores. Para ello, en estudios posteriores, se realizará el silenciamiento génico de PHT1 y PHT2 mediante RNAs interferentes y se evaluará el impacto de dicho silenciamiento en la activación de NOD2.

Generalmente la activación del receptor NOD2 se determina por medio de la fosforilación de RIP2, que es la primer cinasa involucrada en la vía de señalización. Para evaluar el impacto del silenciamiento génico de los transportadores al inicio y al final de la vía de señalización de NOD2, proponemos evaluar la fosforilación de RIP2 y también evaluar otra molécula que se encuentre involucrada “corriente abajo” en la señalización de NOD2. Para identificar a la mejor molécula candidata para evaluar la activación de NOD2 “corriente abajo” se analizaron 470 genes expresados diferencialmente, identificados previamente en el grupo de trabajo, empleando la base de datos KEGG v 81.0 donde se mostró que los macrófagos infectados con BCG presentan un enriquecimiento en las vías de señalización de NLR, TLR, NF- κ B y en las vías descritas en Tuberculosis (Tabla 1). También se realizó dicho análisis utilizando el programa STRING v 10.0 obteniendo las mismas vías enriquecidas obtenidas por KEGG. De los genes sobre-expresados en estas vías, se seleccionaron los que codifican proteínas que, según la literatura, están relacionadas con la señalización mediada por NOD2 (Tabla 2).

Entre los genes sobre-expresados se encontraron genes que codifican citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-1 β y TNF; quimiocinas como CCL2, CXCL1 y CXCL2; moléculas de reconocimiento de patógenos como TLR2, CD14 y MYD88; la subunidad p50 de NF κ B y la MAP cinasa JNK3; inhibidores de la vía de NF κ B

como $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y TNFA1P3; y moléculas capaces de interactuar con NOD2 como RIP2, NLRP3, Caspasa 1, OAS y cIAP2 (**Figura 15**).

Por medio del análisis de vías y genes sobre-expresados se demostró que BCG induce la expresión a las 24 horas de genes como RIPK2, NFKB1, CASP-1, IL1B, BIRC3 y NLRP3, demostrando que la vía de señalización de NOD2 aún se encuentra activa a las 24 horas post-infección. De estos genes solo IL-1B podría considerarse como molécula candidata para evaluar la activación de NOD2 “corriente abajo” ya que los demás genes, al estar involucrados en otras vías, no mostrarían de manera selectiva la activación de la vía de señalización de NOD2.

TABLA 1: Vías enriquecida obtenidas a partir de genes sobre-expresados en macrófagos infectados con BCG. Los datos mostrados corresponden al análisis realizado por medio del programa KEGG v 81.0.

# ID de la vía	Descripción de la vía	Núm. Genes	Tasa de falso descubrimiento	Proteínas que coinciden en la vía (IDs)	Proteínas que coinciden en la vía (Designación)
04064	Vía de señalización NF-kappa B	18	9.79e-13	ENSP00000216797,ENSP00000226574,ENSP00000237289,ENSP00000250151,ENSP00000263464,ENSP00000264832,ENSP00000267953,ENSP00000304236,ENSP00000306512,ENSP00000312455,ENSP00000323889,ENSP00000356438,ENSP00000362994,ENSP00000369213,ENSP00000398698,ENSP00000401399,ENSP00000427279,ENSP00000428924	BCL2A1,BIRC3,CCL4,CD14,CFLAR,CXCL2,DDX58,ICAM1,IL8,LYN, MYD88, NFKB1,NFKBIA,PTGS2,TNF,TNFAIP3, TRAF1,TRIM25
04621	Vía de señalización receptores NOD-like	15	1.51e-11	ENSP00000216797,ENSP00000220751,ENSP00000225831,ENSP00000226574,ENSP00000237289,ENSP00000258743,ENSP00000263464,ENSP00000306512,ENSP00000337383,ENSP00000352157,ENSP00000379110,ENSP00000398698,ENSP00000410076,ENSP00000427279	BIRC3,CASP1,CCL2,CXCL1,CXCL2,IL1B,IL6,IL8,MAPK10,NFKB1,NFKBIA,NLRP3,RIPK2,TNF,TNFAIP3
04620	Vía de señalización receptores Toll-like	15	3.46e-09	ENSP00000216797,ENSP00000225245,ENSP00000226574,ENSP00000250151,ENSP00000258743,ENSP00000260010,ENSP00000304236,ENSP00000305651,ENSP00000306512,ENSP00000306884,ENSP00000329967,ENSP00000352157,ENSP00000354394,ENSP00000398698,ENSP00000401399	CCL3,CCL4,CD14,CXCL10,CXCL11,IL6,IL8,MAPK10,MYD88,NFKB1,NFKBIA,STAT1,TBK1,TLR2,TNF
05152	Vía de señalización Tuberculosis	15	3.21e-06	ENSP00000220751,ENSP00000226574,ENSP00000228534,ENSP00000245907,ENSP00000256458,ENSP00000258743,ENSP00000260010,ENSP00000263339,ENSP00000304236,ENSP00000308383,ENSP00000352157,ENSP00000354394,ENSP00000361275,ENSP00000398698,ENSP00000401399	C3,CD14,IL1B,IL23A,IL6,IRAK2,LSP1,MAPK10,MYD88,NFKB1,PLK3,RIPK2,STAT1,TLR2,TNF

TABLA 2: Genes y sus correspondientes proteínas codificadas relacionadas con la vía de NOD2 que se sobre-expresan en macrófagos infectados con BCG

Gen	Proteína codificada	Función
BIRC3	ciAP2	Ubiquitina a RIP2 aumentando la señalización de NF-κB y las vías de JNK [Bertrand M, 2009; Boyle, 2014]
CASP1	Caspasa 1	Induce la activación y la secreción de IL-1β y IL-18. [Jorgensen I, 2015]
NLRP3	NLRP3	Forma parte del inflamosoma NLRP3 que activa a la Caspasa 1 [Lu A, 2015]
RICK2	RIP2	Potente activador de NFκB y MAP cinasas [Kanneganti, 2007; Franchi, 2008]
CCL2	CCL2	Factor quimiotáctico que atrae monocitos y basófilos [Abbas, 2011]
CXCL1	CXCL1	Factor quimiotáctico para neutrófilos. Puede jugar un papel en la inflamación y ejerce sus efectos sobre las células endoteliales de forma autocrina [Abbas, 2011]
CXCL2	CXCL2	Quimiocina presente en sitios de inflamación que suprime la proliferación de células hematopoyéticas [Abbas, 2011]
IL6	IL- 6	Citocina implicada en la inflamación y maduración de linfocitos B [Abbas, 2011]
IL8	IL- 8	Induce la quimiotaxis en neutrófilos al sitio de la infección. También induce la fagocitosis una vez que han llegado. Potente promotor de la angiogénesis [Abbas, 2011]
IL1B	IL-1β	Potente citocina proinflamatoria. Induce la síntesis de prostaglandinas, la afluencia y activación de neutrófilos. Activa células T y la producción de citocinas. Activa células B y la producción de anticuerpos. Activa la proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno [Abbas, 2011]
TNF	TNF	Implicado en las respuestas celulares a estímulos tales como citocinas y estrés. Juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmunológica a las infecciones. Pirogeno por estimulación de IL-1 [Abbas, 2011]
TLR2	TLR2	Necesarios para el desarrollo de la inmunidad innata a través de la estimulación de NF-κB [Abbas, 2011; Killick, 2013]
CD14	CD14	Correceptor de TLR4. Media la respuesta inmune frente a LPS [Abbas, 2011]
MYD88	MYD88	Proteína adaptadora importante en la respuesta inmune mediada por TLRs. Conduce a la activación de NFκB [Abbas, 2011]
MAPK10	JNK3	Quinasa implicada en la proliferación, diferenciación, migración y regulación y desarrollo transcripcional [Kumar A, 2015]
NFKB1	Subunidad p50 de NFκB	Proteína que al ser sometida a procesamiento cotraduccional por proteasoma da como resultado la subunidad p50 de NF-κB. NF-κB es un factor de transcripción que se activa por varios estímulos como citocinas y productos bacterianos o virales. Se transloca en el núcleo y estimula la expresión de genes implicados en una amplia variedad de funciones biológicas [Chiba T, 2013]
NFKB1A	IκBα	Inhibe la actividad de los complejos diméricos de NF-kappa-B/REL atrapandolos en el citoplasma a través de enmascaramiento de sus señales de localización nuclear. En la estimulación celular por las respuestas inmunes y proinflamatorias, se promueve su ubiquitinación y degradación lo que permite la liberación del dimero, su traslado al núcleo y la activación de la transcripción [Chiba T, 2013]
TNFA1P3	TNFA1P3	Involucrado en las respuestas inmunes e inflamatorias señalados por las citocinas, como TNF-alfa e IL-1 beta, o agentes patógenos a través de TLR. Inhibe la activación de NF-κB al unirse a TRAF1, TRAF2 y/o TRAF6 [Chen ZJ, 2012]

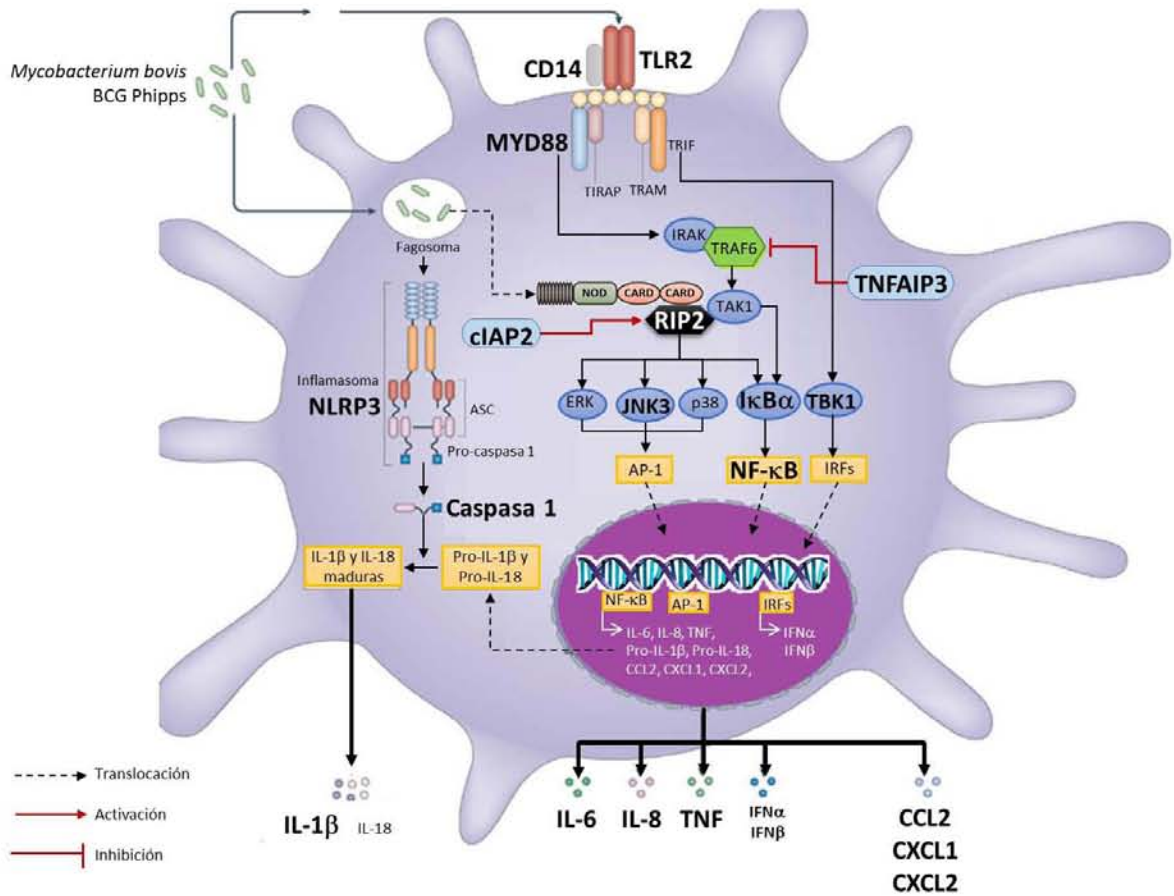


FIGURA 15: Vías de señalización relacionadas con NOD2 que se encuentran enriquecidas durante la infección con *M. bovis* BCG. Con negritas se muestran las moléculas cuyos genes se encuentran mayormente expresados [Modificado de Mills KH, 2011].

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A pesar de las diferentes investigaciones reportadas en los últimos años acerca del receptor citoplasmático NOD2 y la infección con micobacterias, aún se desconoce el mecanismo por el cual el MDP micobacteriano es capaz de transportarse desde el compartimento fagosomal al citosol para que se lleve a cabo su reconocimiento. Como se ha mencionado, el receptor NOD2 es sumamente importante en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que dilucidar el mecanismo por el que se lleva a cabo dicho transporte nos proporcionaría información sustancial respecto al reconocimiento y eliminación del bacilo. Se ha demostrado que PHT1 y PHT2 transportan dipéptidos y tripéptidos como MDP. Sin embargo aún no se ha descrito su implicación en el transporte de MDP micobacteriano y la activación del receptor NOD2.

Por medio de los ensayos de interacción se evidenció que tanto PHT1 y PHT2 son capaces de interactuar con MDP. La presencia de bandedo de mayor masa molecular en el inmunoblot muestra las posibles interacciones entre los transportadores y proteínas presentes en el lisado. Sería conveniente realizar estudios de co-inmunoprecipitación para comprobar la interacción entre los transportadores PHT con NOD2 o entre sí mismos. Si esto fuera así se podría evidenciar la formación de complejos que favorezcan la activación del receptor NOD2 o de la formación de homodímeros o heterodímeros entre los transportadores.

En macrófagos de la línea celular THP-1 infectados con BCG Phipps no se observó aumento de la expresión de PHT1 durante toda la cinética de infección, a diferencia de la expresión del transportador PHT2 y de NOD2 que presentaron un incremento a los 45 minutos post-infección. En trabajos realizados anteriormente en nuestro grupo de investigación, se demostró que a partir de los 30 minutos se empiezan a observar bacilos BCG en el interior de macrófagos THP-1 [[Molina-Olvera, 2010](#)]. Considerando estos datos, es posible deducir los procesos celulares relacionados con la activación de NOD2 a partir de la infección y hasta el final de la fagocitosis. Inicialmente, se presenta un primer encuentro entre los macrófagos THP-1 con BCG que correspondería al tiempo cero. A partir del tiempo cero y hasta los 30

minutos podría tomar lugar el reconocimiento de BCG por parte de receptores fagocíticos y TLR, los cuales estimularían la fagocitosis y la activación de vías de señalización dependientes de NF κ B, respectivamente. Justo durante este tiempo es cuando se empieza a mostrar un aumento en la expresión de PHT2 y NOD2. A los 30 minutos BCG se encuentra dentro del macrófago en fagosomas, tal como se describió previamente [Molina-Olvera, 2010]. Finalmente después de los 30 minutos se presentaría la degradación de BCG en fagosoma y el transporte de MDP al citosol, que se relaciona con el aumento en la expresión de PHT2 y NOD2 a los 45 minutos. Para confirmar estos hechos se requieren de ensayos a nivel celular donde se pueda observar en tiempo real la fagocitosis de BCG, su degradación en fagosoma y el transporte de MDP al citosol.

En cuanto a la localización intracelular, se observó la colocalización de PHT1 y PHT2 con Rab5, lo cual sugiere que los transportadores se encuentran localizados en la membrana fagosomal, aunque también se observó una fluorescencia mínima de PHT1 y PHT2 que no fue colocalizada en fagosoma. Esto podría sugerir que los transportadores también se distribuyen en membrana citoplasmática.

En el caso de NOD2, no se observó colocalización con Rab5 en macrófagos sin infectar. De manera interesante, en macrófagos estimulados con MDP y más visiblemente en macrófagos infectados con BCG, se encontraron sitios puntuales donde NOD2 se localizó en membrana fagosomal, sugiriendo que MDP y la infección con BCG indujeron el reclutamiento de NOD2 desde citoplasma a membrana fagosomal.

Trabajos reportados previamente han mostrado que mutaciones en el gen *Nod2* interfieren con su actividad y con su estructura terciaria alterando su localización celular [Barnich, 2005; Lécine, 2007; Legrand-Poels, 2007]. Un ejemplo donde se demostró la importancia funcional del reclutamiento de NOD2 a membranas celulares es la mutación 3020insC, característica de la enfermedad de Crohn. Dicha mutación se presenta en la región rica en leucinas, lo que impide que el receptor sea capaz de asociarse a membranas y como consecuencia se ve afectada su funcionalidad ya que no se lleva a cabo el reconocimiento de su ligando de manera

efectiva [Ogura,2001; Nakamura, 2014]. Considerando que el receptor NOD2 es capaz de asociarse a la membrana fagosomal y que en ésta se encuentran los transportadores PHT atravesándola, es posible que el comportamiento observado en el inmunoblot en cuanto a la probable interacción entre los transportadores PHT y NOD2 se atribuya a la formación de “andamios” en los que se encuentren fragmentos de membrana fagosomal con transportadores PHT y receptores NOD2 adosados. Por lo tanto, el reclutamiento de NOD2 a membrana fagosoma inducido por BCG y la cercanía de NOD2 con los transportadores podría indicar que la membrana fagosomal no solo desempeña una función de andamiaje sino que también actúa como una plataforma de señalización para favorecer el reconocimiento de MDP por parte de NOD2. Para confirmar esta hipótesis se requieren de ensayos en los que se evidencie que la formación de la plataforma formada por PHT, membrana fagosomal y NOD2 es crucial para el reconocimiento de MDP y la activación del receptor NOD2.

Asimismo, se observó que BCG induce una mayor expresión de PHT2 en comparación con la inducida por MDP. Lo anterior puede vincularse con la presencia de otros patrones moleculares asociados a patógenos presentes en BCG capaces de regular la expresión PHT2. También cabe mencionar que el género *Mycobacterium* presenta glicosilaciones en la estructura del MDP que le confiere una mayor capacidad estimulante de NOD2 en comparación con otras bacterias [Coulombe, 2009].

La literatura señala que el LPS es un regulador positivo de la expresión de PHT2 en tejidos de ratón y líneas celulares [Wang, 2014]. El LPS es reconocido por TLR4 de la membrana de macrófagos que induce la activación de NF- κ B y la expresión de citocinas inflamatorias. En trabajos realizados en nuestro grupo de investigación, se demostró que BCG subcepa Phipps es reconocida por TLR4 y TLR2 [Molina-Olvera, 2013], lo anterior podría ofrecernos información sobre la participación de la vía de TLR4 y/o TLR2 en la expresión de PHT2. Considerando estos hallazgos, se tiene como perspectiva investigar si BCG regula la expresión de PHT2 vía TLR4 y/o TLR2 o debido a la naturaleza y cantidad de MDP presente en BCG en comparación con el MDP empleado como control.

Finalmente, por medio del análisis de genes expresados diferencialmente en macrófagos THP-1 infectados con BCG a las 24 horas, se demostró que BCG induce la sobre-expresión de genes relacionados con la activación de NOD2. Entre estos se encontró al gen que codifica a la cinasa RIP2, encargada de iniciar la señalización una vez que NOD2 se une a su ligando [Kanneganti, 2007; Franchi, 2008].

Interesantemente, se encontraron genes sobre-expresados correspondientes a la familia de Oligoadenilato sintetetasas (OAS) las cuales no habían sido descritas en la infección por BCG. Las OAS son inducidas por interferón que al reconocer RNA de doble cadena utilizan ATP para sintetizar 2',5'-oligoadenilatos, los cuales activan la RNasa latente (RNasaL) favoreciendo la degradación del ARN viral y la activación del inflammasoma [Ezelle, 2016; Banerjee, 2016]. Si bien la vía OAS-RNasaL se ha relacionado generalmente con la respuesta antiviral, también ha mostrado ser importante en infecciones bacterianas. Se ha comprobado que OAS2 interacciona físicamente con NOD2, y que el aumento en la expresión de NOD2 mejora la activación de la RNasaL en células tratadas con miméticos de dsRNA viral. Un posible rol que se le ha atribuido a la interacción NOD2-OAS2 es promover la activación de RNasaL en infecciones bacterianas, principalmente para la regulación de genes importantes en la eliminación de bacterias fagocitadas [Dugan, 2009]. Recientemente se reveló que la RNasaL tiene un papel en la regulación de catepsina E (Cat E), una proteasa lisosomal relacionada con la eliminación de bacterias en el fagosoma [Pires, 2016]. Considerando esto, se propone que OAS podría jugar un papel importante en la infección por BCG activando señales que induzcan la intervención de vías alternas que favorezcan la eliminación de BCG en fagosoma. Si esto es así, se podría considerar a OAS como un nuevo receptor de reconocimiento involucrado en la respuesta inmune innata frente a BCG. Para comprobar esto se sugiere realizar ensayos que demuestren si BCG activa la vía OAS-RNasaL y si la interacción de OAS con NOD2 potencia dicha activación.

En cuanto a la vía de los TLR, el gen que codifica al receptor TLR2 se encontró sobre-expresado, al igual que el gen del correceptor CD14 y el de la proteína adaptadora MYD88. Esto sugiere que TLR2, y no TLR4, presenta una regulación

por la infección por BCG a las 24 horas que, probablemente, repercute con otras vías como la de NOD2 o en la regulación de PHT2 como se mencionó anteriormente.

De igual manera, se encontraron sobre-expresados los genes NLRP3 y CASP1. La proteína codificada NLRP3 forma parte del inflamosoma que activa a la Caspasa 1 y esta a su vez procesa proteolíticamente a la Pro-interleucina 1 β a IL-1 β funcional [Lu A, 2015; Jorgensen I, 2015]. En concordancia con este proceso, el gen que codifica a la IL-1 β también se encontró sobre-expresado. La producción de IL-1 β está relacionada con la activación de inflamosoma y NOD2 [Franchi L, 2009], por lo tanto IL-1 β podría considerarse como molécula candidata para evaluar el impacto del silenciamiento génico de los transportadores en la activación de NOD2 “corriente abajo” ya que los demás genes, al estar involucrados en otras vías, no mostrarían de manera selectiva la activación de la vía de señalización de NOD2.

En conjunto, nuestros resultados muestran que los transportadores PHT1 y PHT2 se expresan principalmente en membrana fagosomal y que de éstos, solo la expresión de PHT2 es inducida por BCG. También se observó que BCG induce la expresión de NOD2 y promueve su reclutamiento desde citoplasma a membrana fagosomal. Y finalmente, que BCG es capaz de inducir la sobre-expresión de genes como RIPK2, NFKB1, CASP-1, IL1B, BIRC3 y NLRP3, que en conjunto demuestran la activación de la vía de señalización de NOD2.

CONCLUSIONES

- ❖ PHT1 y PHT2 son capaces de interactuar con MDP
- ❖ BCG induce la expresión de PHT2 y NOD2 en macrófagos humanos de la línea celular THP-1.
- ❖ PHT1 y PHT2 se encuentran localizados principalmente en fagosomas en macrófagos de la línea celular THP-1
- ❖ BCG induce el reclutamiento del receptor NOD2 a membrana fagosomal de macrófagos de la línea celular THP-1
- ❖ BCG induce la expresión de genes como RIPK2, NFKB1, CASP1, IL1B, BIRC3 y NLRP3, involucrados en la señalización de NOD2.

PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar la expresión de PHT1, PHT2 y NOD2 en macrófagos infectados con BCG por qPCR.
- ❖ Determinar si BCG regula la expresión de PHT2 por medio de la vía de TLR2 o TLR4
- ❖ Llevar a cabo el silenciamiento génico de PHT2 en macrófagos THP-1 y determinar su importancia en la activación de NOD2 frente a la infección con BCG evaluando la fosforilación de RIP2 y la producción de IL-1 β .
- ❖ Identificar la presencia de plataformas formadas por los transportadores PHT-membrana fagosomal-NOD2 y, si es así, determinar su importancia en la activación del receptor NOD2.
- ❖ Determinar el papel funcional de las proteínas OAS en la respuesta inmune innata frente a BCG

ANEXOS

Anexo I: Soluciones y reactivos

► CULTIVO CELULAR

Medio RPMI-1640 suplementado (Gibco®)

- 2 g de NaHCO₃
- 10.4 g de medio RPMI-1640
- 9 mL de Glucosa al 50%
- 10 mL de Piruvato de sodio 100 mM
- 10 mL de HEPES (pH 7.4)
- 4 mL de 2-Mercaptoetanol 1:1000
- 10% de suero fetal bovino
- Ajustar el pH de 7 a 7.4
- Aforar con agua desionizada hasta 1 litro
- Esterilizar por filtración

HEPES

- 12 g de HEPES en 40 mL de agua desionizada.
- Ajustar el pH a 7.4 y aforar hasta 50 mL

Suero Fetal Bovino (Gibco®) inactivado

- Colocar las alícuotas de SFB en un baño de agua a 56°C por 1 hora

PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato) 50 nM

- 154 µl de PMA [100 µg/mL] en 50 mL de medio RPMI-1640
- Esterilizar por filtración

Amortiguador Fosfato Salino (PBS)

- 0.23 g de NaH₂PO₄
- 1.15 g de Na₂HPO₄
- 9 g de NaCl
- Disolver en 900 mL de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.2-7.4
- Aforar hasta 1 litro con agua desionizada.

EDTA 0.5 mM en PBS

- 0.1862 g de EDTA disódico dihidratado en 700 mL de PBS
- Ajustar el pH a 8,0 con NaOH 10 M
- Añadir PBS hasta 1 litro
- Titular antes de que la muestra se haya disuelto completamente.
- Esterilizar por filtración.

Amortiguador de lisis

- 1.25 mL de Tris-HCl 1 M
- 219 mg de cloruro de sodio
- 250 µl de NP-40
- 50 µl de Ortovanadato de sodio 1mM
- 100 µl de fluoruro de sodio 50 mM
- 40 µl de solución madre de coctel de proteasas Complete® (Roche)
- Aforar hasta 25 mL con agua desionizada

➤ **ELECTROFORESIS NATIVA EN GEL DE POLIACRILAMIDA**

Gel de corrida al 7%

- 3.45 mL de Acrilamida al 30%
- 3.75 mL de de Tris-HCl 1.5 M (pH=8.8)
- 75 µl de APS al 10%
- 10 µl de TEMED
- 7.65 mL de agua desionizada

Gel concentrador al 3%

- 650 µl de Acrilamida al 30%
- 1.25 mL de de Tris-HCl 1 M (pH=6.8)
- 25 µl de APS al 10%
- 5 µl de TEMED
- 3 mL de agua desionizada

Acrilamida 30%

- 30 g de Acrilamida
- 0.8 g de Bisacrilamida
- Disolver en un volumen final de 100 mL

Tris 1.5 M (pH 8.8)

- 45.43 g de Tris Base
- 150 mL de agua desionizada
- Agregar HCl 37% hasta obtener un pH de 8.8
- Aforar hasta 250 mL con agua desionizada

Tris 1M (pH 6.8)

- 33.33 mL de Tris 1.5 M
- 10 mL de agua desionizada
- Agregar HCl 37% hasta obtener un pH de 6.8
- Aforar hasta 50 mL con agua desionizada

Amortiguador de corrida 5x

- Glicina 192 mM (72 g)
- Tris-Base 25 mM (15 g)
- Aforar hasta 1 litro con agua desionizada

Amortiguador de transferencia

- Tris-Base 25 mM (03.03 g)
- Glicina 192 mM (14.4 g)
- Metanol 200 mL
- Aforar hasta 1 litro con agua desionizada.

► **CULTIVO BACTERIANO**

Medio Middlebrook 7H10 + AODC (Beckton-Dikinson)

- Disolver 19 gramos del medio en 900 mL de agua destilada con 5 mL de glicerol. Calentar con agitación y hervir durante 1 minuto hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 110°C por 10 minutos.
- Adicionar asépticamente 100 mL del enriquecimiento AODC (Ácido Oléico-Dextrosa-Catalasa) cuando se enfríe de 50 a 55°C. Verter en placas Petri estériles

Medio Middlebrook 7H9 + ADC (Beckton-Dikinson)

- Disolver 4.7 gramos del medio en 900 mL de agua destilada con 5 mL de glicerol. Esterilizar en autoclave a 110°C por 10 minutos
- Dejar enfriar hasta 45°C y agregar asépticamente 100 mL del enriquecimiento ADC (Albumina-Dextrosa-Catalasa). Alicuotar 10 mL en tubos de fondo plano con tapa de rosca

➤ INMUNOBLOT

TBS 1X (Amortiguador Tris salino)

- 2.4 g de Tris Base
- 8.8 g de NaCl
- Disolver en 900 mL de agua desionizada
- Ajustar el pH a 7,6 con HCl 12N y aforar a 1 litro

Leche descremada 5% (Solución de bloqueo)

- 2.5 g de leche descremada en un volumen total de 50 mL de TBS 1X

TBS-Tween 20 (Solución de lavado)

- 500 µl de Tween-20 en 500 mL de TBS 1X

➤ INMUNOFLUORESCENCIA

Paraformaldehído 1% en PBS

- Diluir 940 µl de paraformaldehído 16% (Cat.# 15710, Electron Microscopy Sciences) en un volumen total de 15 mL de PBS.

Triton-X100 0.3% en PBS

- 150 µL de Tritón-X100 en un volumen total de 50 mL de PBS.

Solución de bloqueo (1% SFB en PBS)

- 150 µl de SFB en un volumen total de 15 mL de PBS.

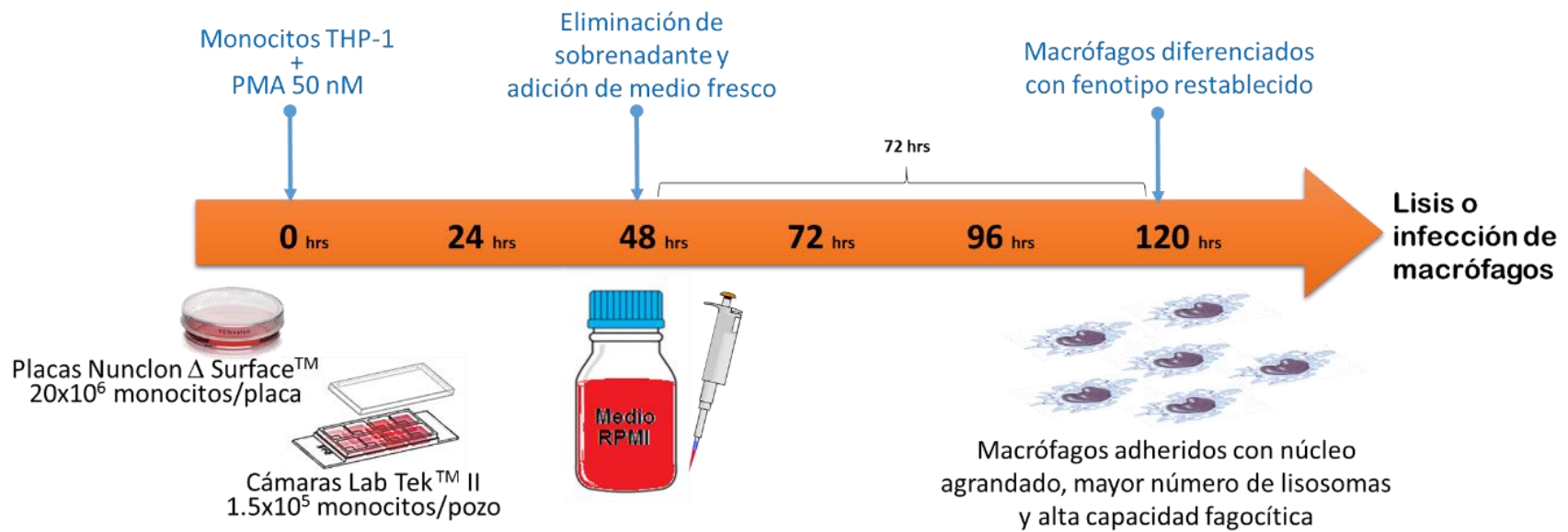
Medio de montaje

- 5 mL de glicerol en 5 mL de PBS

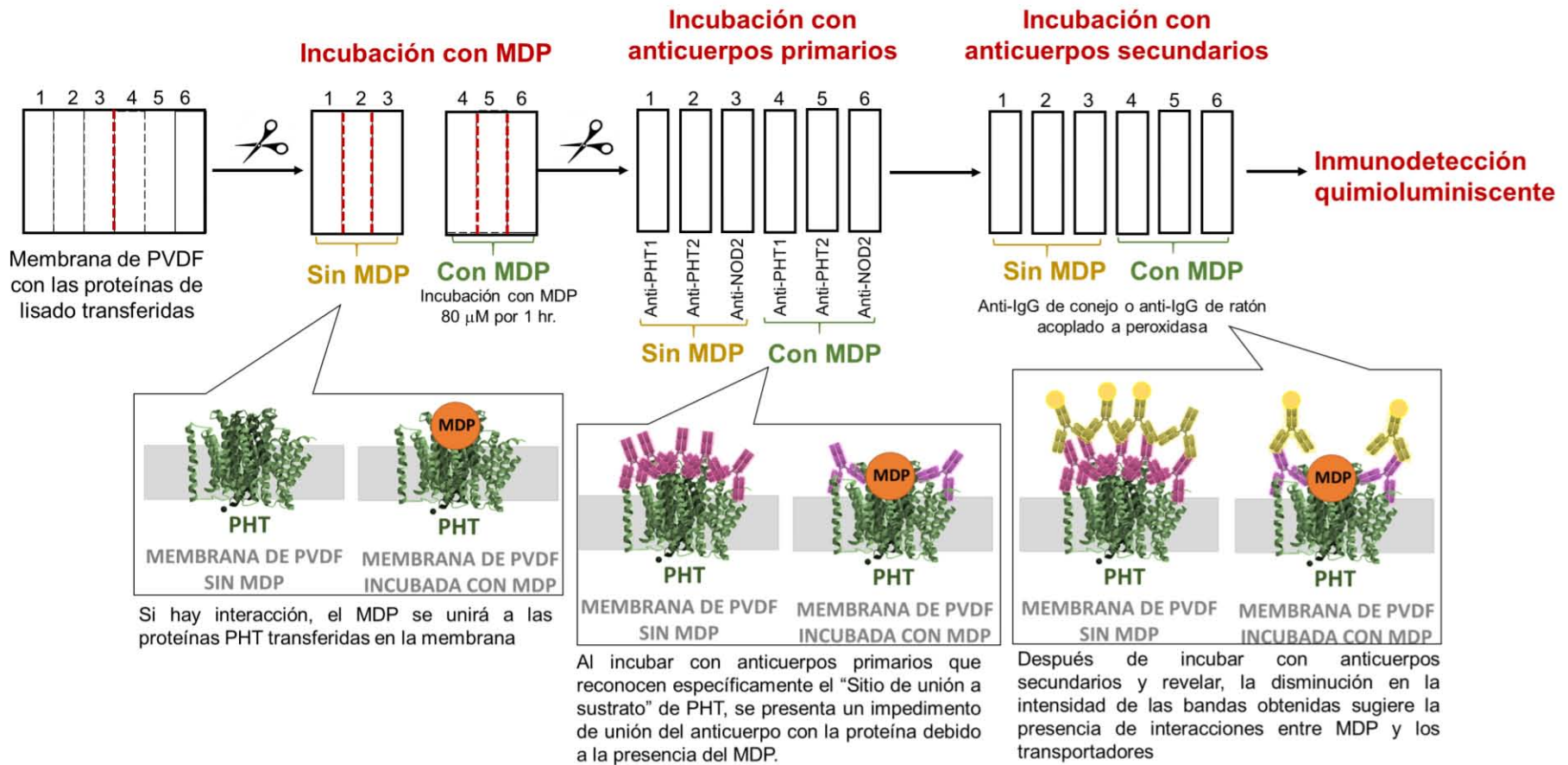
Coctel de anticuerpos primarios

	Anticuerpo	Compañía y # de catálogo	Huésped	Dilución en PBS	Anticuerpo Secundario
CÓCTEL PHT1	Anti-PHT1	LS-Bios #LS-C446097	Conejo	1:200	Anti-IgG de conejo acoplado a AF647 (Jackson Immunoresearch #111-605-144) Dilución 1:800 en PBS
	Anti-NOD2 AF488	Novus #NB100-524AF488	Ratón	10 µg/ml	
	Anti-Rab5 AF555	Bioss #bs-6175R-A555	Conejo	1:200	
CÓCTEL PHT2	Anti-PHT2	LS-Bios #LS-C161135	Conejo	1:50	Anti-IgG de conejo acoplado a AF647 (Jackson Immunoresearch #111-605-144) Dilución 1:800 en PBS
	Anti-NOD2 AF 488	Novus #NB100-524AF488	Ratón	10 µg/ml	
	Anti-Rab5 AF 555	Bioss #bs-6175R-A555	Conejo	1:200	

Anexo II: Obtención de macrófagos a partir de monocitos de la línea celular THP-1



Anexo III: Metodología empleada para determinar las interacciones entre los transportadores y MDP
















REFERENCIAS

- 📖 **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** Cellular and molecular immunology. Philadelphia, PA: Elsevier; 2011
- 📖 **Abul K. Azad, Wolfgang Sadee, and Larry S. Schlesinger.** Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. Infect Immun. 2012; **80** (10):3343-59.
- 📖 **Aderem A, Underhill DM.** Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol.** 1999; 17: 593-623.
- 📖 **Alcaraz C, De Diego M, Pastor MJ, Escribano JM.** Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus. J. Vet. Diagn. Invest. 1990; **2**(3): 191–6.
- 📖 **Angala S, Belardinelli J, Huc-Claustre E, Wheat W, Jackson M.** The cell envelope glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2014; 49(5): 361–399.
- 📖 **Askgaard DS, Gottschau A, Knudsen K, Bennedsen J.** Firefly luciferase assay of adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines. Biologicals. 1995; **23**(1):55-60.
- 📖 **Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G.** Mechanisms of Action of Adjuvants. Frontiers in Immunology. 2013;4:114.
- 📖 **Bardoel B, Strijp J.** Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity. J Mol Recognit 2011; **24**(6): 1077-1086.
- 📖 **Barnich N, Aguirre JE, Reinecker HC, Xavier R, Podolsky DK.** Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for NFκB activation in muramyl dipeptide recognition. J Cell Biol. 2005; 170(1):21-6.
- 📖 **Behr MA, Divangahi M.** Freund's adjuvant, NOD2 and mycobacteria. Curr Opin Microbiol. 2015; 23:126-32.
- 📖 **Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamailard M, Chareyre F, De Lagausie P, et al.** Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. Gut 2003; 52:840-6.
- 📖 **Bertrand MJM, Doiron K, Labbé K, Korneluk RG, Barker PA, Saleh M.** Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. Immunity. 2009; 30, 789–801.
- 📖 **Bobadilla-Lozoya K, Rivas-Santiago B, Sada-Díaz E, Torres-Rojas M.** Biogénesis del fagolisosoma micobacteriano y su papel en el procesamiento y presentación del antígeno. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2009; 22(1), 56-62

- 📖 **Brewer, T.F., Colditz, G.A.** Relationship between bacille Calmette-Guerin (BCG) strain and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1995; **20**(1): 128-135.
- 📖 **Brooks, M. N., Rajaram, M. V. S., Azad, A. K., Amer, A. O., Valdivia-Arenas, M. A., Park, J.-H., et al.** NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages. *Cellular Microbiology*, 2011; **13**(3), 402–418
- 📖 **Boyle JP, Parkhouse R, Monie TP.** Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biology*. 2014;4(12):140178.
- 📖 **Castaño D, Rojas M.** Alteraciones en el reclutamiento y activación de proteínas Rab durante la infección micobacteriana. *Biomédica*. 2010; **30**(2), 283-308
- 📖 **Charrière GM, Ip WE, Dejardin S, Boyer L, Sokolovska A, Cappillino MP, Cherayil BJ, Podolsky DK, Kobayashi KS, Silverman N, Lacy-Hulbert A, Stuart LM.** Identification of Drosophila Yin and PEPT2 as evolutionarily conserved phagosome-associated muramyl dipeptide transporters. *J Biol Chem*. 2010; **285** (26): 20147-54.
- 📖 **Chiba T, Inoko H, Kimura M, Sato T.** Role of nuclear IκBs in inflammation regulation. *Biomol Concepts*. 2013;4(2):187-96.
- 📖 **Cockle, P. J., Gordon, S. V., Lalvani, A., Buddle, B. M., Hewinson, R. G., & Vordermeier, H. M.** Identification of Novel *Mycobacterium tuberculosis* Antigens with Potential as Diagnostic Reagents or Subunit Vaccine Candidates by Comparative Genomics. *Infection and Immunity*, 2002; **70**(12), 6996–7003.
- 📖 **Coulombe F, Divangahi M, Veyrier F, de Leseleuc L, Gleason JL, Yang Y, et al.** Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J Exp Med*. 2009; **206**:1709–1716.
- 📖 **Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ.** Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiol* 2001;**11**:107R-118R.
- 📖 **Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH** (2010) The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* **5**(1): e8668.
- 📖 **de Souza MV, Ferreira M de L, Pinheiro AC, Saraiva MF, de Almeida MV, Valle MS.** Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific World Journal*. 2008; **8**:720-51.
- 📖 **Denes A, Lopez-Castejon G, and Brough D.** Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis*. 2012; **3**(7): e338.
- 📖 **Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J. & Flavell, R. A.** Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 2011; **34**, 665–679

- 📖 **Ellouz, F., A. Adam, R. Ciorbaru, and E. Lederer.** Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974; 59:1317–1325.
- 📖 **Ferrand J, Ferrero RL.** Recognition of Extracellular Bacteria by NLRs and Its Role in the Development of Adaptive Immunity. Front Immunol. 2013; 4:344.
- 📖 **Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg B, Le Bourhis L, De Jong DJ, et al.** NOD2 and Toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog 2005; 1(3): e34.
- 📖 **Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim YG, Núñez G.** Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. Cell Microbiol. 2008; 10(1):1-8.
- 📖 **Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G.** Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. Immunol Rev. 2009; 227(1): 106-28
- 📖 **Freund, J.** The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review. Am. J. Clin. Pathol. 1951; 21:645–656.
- 📖 **Freund, J.** The mode of action of immunologic adjuvants. Bibl. Tuberc. 1956:130–148.
- 📖 **Fox S I.** Fisiología humana. 13a. ed. Mexico: McGraw-Hill; 2014. pp 142-148
- 📖 **Gordon S.** Phagocytosis: An Immunobiologic Process. Immunity. 2016; 15;44(3): 463-75.
- 📖 **Grimes CL, Ariyananda LDZ, Melnyk JE, O’Shea EK.** The Innate Immune Protein Nod2 Binds Directly to MDP, a Bacterial Cell Wall Fragment. J Am Chem Soc. 2012; 134(33):13535-13537.
- 📖 **Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, et al.** Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor- κ B activation. J Biol Chem 2002; 1: 277:41701-5.
- 📖 **Haas A.** The phagosome: compartment with a license to kill. Traffic. 2007; 8:311-30.
- 📖 **Hannelore D. & Gabor K.** The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. Pflugers Arch. 2004; 447(5):610-8.
- 📖 **Hansen JM, Golchin SA, Veyrier FJ, Domenech P, Boneca IG, Azad AK, Rajaram MV, Schlesinger LS, Divangahi M, Reed MB, Behr MA.** N-glycosylated peptidoglycan contributes to the immunogenicity but not pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis. J Infect Dis. 2014; 1; 209(7):1045-54.
- 📖 **Ho MM, Markey K, Rigsby P, Jensen SE, Gairola S, Seki M, Castello-Branco LR, López-Vidal Y, Knezevic I, Corbel MJ.** Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine. Vaccine. 2008; 26(36):4754-7.
- 📖 **Inohara, N.; Ogura, Y.; Fontalba, A.; Gutierrez, O.; Pons, F.; Crespo, J.; Fukase, K.; Inamura, S.; Kusumoto, S.; Hashimoto, M.; Foster, S. J.; Moran, A. P.; Fernandez-Luna,**

- J. L.; Nuñez, G.** "Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. Implications for Crohn's Disease". *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278 (8): 5509–5512.
-  **Jensen SE, Hubrechts P, Klein BM, Hasløv KR.** Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine. *Biologicals*. 2008; **36**(5):308-14.
-  **Jorgensen, I., & Miao, E. A.** Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological Reviews*. 2015; 265(1), 130–142.
-  **Juárez E, Carranza C, Hernández-Sánchez F, León-Contreras JC, Hernández-Pando R, Escobedo D, Torres M, Sada E.** NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Eur J Immunol.*, 2012; 42(4):880-9.
-  **Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G.** Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 2007; 27(4):549-59.
-  **Kumar S., Belardinelli J., Huc-Claustre E., Wheat W., and Jackson M.** The cell envelope glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; **49**(5): 361–399.
-  **Kurenuma T, Kawamura I, Hara H, Uchiyama R, Daim S, et al.** The RD1 Locus in the Mycobacterium tuberculosis Genome Contributes to Activation of Caspase-1 via Induction of Potassium Ion Efflux in Infected Macrophages. *Infect. Immun*. 2009; 77(9): 3992–4001
-  **Killick, K., Cheallaigh, C., O'Farrelly, C., Hokamp, K., MacHugh, D., Harris, J.** Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. *Cell Microbiol*. 2013 **15**(9): 1484-1495
-  **Kotani, S., Y. Watanabe, F. Kinoshita, T. Shimono, and I. Morisaki.** Immunoadjuvant activities of synthetic N-acetyl-muramyl-peptides or -amino acids. *Biken J*. 1975; 18:105–111.
-  **Kufer TA, Kremmer E, Adam AC, Philpott DJ, Sansonetti PJ.** The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell Microbiol*. 2008; 10(2):477-86.
-  **Kumar A, Singh UK1, Kini SG2, Garg V, Agrawal S, Tomar PK, Pathak P, Chaudhary A, Gupta P, Malik A.** JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases. *Future Med Chem*. 2015;7(15):2065-86.
-  **Lécine P, Esmiol S, Métails JY, Nicoletti C, Nourry C, McDonald C, Nunez G, Hugot JP, Borg JP, Ollendorff V.** The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2007; 282(20):15197-207.
-  **Leclerc C, Audibert F, Chedid L.** Influence of a synthetic adjuvant (MDP) on qualitative and quantitative changes of serum globulins. *Immunology*. 1978; 35(6):963-70.
-  **Legrand-Poels S, Kustermans G, Bex F, Kremmer E, Kufer TA, Piette J.** Modulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2007; 120(Pt 7):1299-310.

- 📖 **Liu J, Tran V, et al.** BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum Vaccin* 2009; **5**(2): 70-78.
- 📖 **Lu A, Wu H.** Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J.* 2015; **282**(3):435-44.
- 📖 **Maeß MB, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S.** Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods.* 2014 ; **402**(1-2):76-81.
- 📖 **Maloney, P.C., T. Hastings Wilson** (1996): Ion-coupled transport and transporters. En: "Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology", 2ª edición (F.C. Neidhart, ed.). American Society for Microbiology Press. Washington, D.C., págs. 1130-114
- 📖 **Marina-García N, Franchi L, Kim YG, Hu Y, Smith DE, Boons GJ, Núñez G.** Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *J Immunol.* 2009; **182**(7):4321-7.
- 📖 **Mills KH.** TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2011; **11**(12):807-22.
- 📖 **Mishra AK, Driessen NN, Appelmek BJ, Besra GS.** Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. *Bott M, ed. Fems Microbiology Reviews.* 2011; **35**(6):1126-1157.
- 📖 **Molina-Olvera G.** (2010). Sobrevivencia y multiplicidad de diferentes subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG en macrófagos de la línea celular THP-1. Bachelor, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.
- 📖 **Nakamura N, Lill JR, Phung Q, Jiang Z, Bakalarski C, de Mazière A, et al.** Endosomes are specialized platforms for bacterial sensing and NOD2 signalling. *Nature* (2014) **509**:240-4
- 📖 **Ogura, Y. et al.** A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* (2001) **411**, 603-606
- 📖 **Owen JA., Punt J., Stranford SA.** Kuby Inmunología. 7º ed. México: McGraw-Hill; 2013. pp 141-166
- 📖 **Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, Fortune SM, Coulombe F, Behr MA, Fitzgerald KA, Sassetti CM, Kelliher MA.** NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000500
- 📖 **Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE.** NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2014; **14**(1):9-23.
- 📖 **Ramírez-Rivera N, Cocotle-Ronzón B, Méndez-Pérez a, Arenas-Benhumen J.** *Mycobacterium tuberculosis*: Su pared y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Rev.Méd.Univ. Veracruzana.* 2002 vol 2. Núm. 2.

- 📖 **Riedel DD, Kaufmann SH.** Differential tolerance induction by lipoarabinomannan and lipopolysaccharide in human macrophages. Microbes Infect 2000; 2:463-471.
- 📖 **Rubio-Aliaga I, Daniel H.** Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. Trends Pharmacol Sci. 2002; 23(9):434-40.
- 📖 **Secretaria de salud** (29 de agosto de 2016). CIFRAS OFICIALES TUBERCULOSIS. Retrieved 10 de enero de 2017, from: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html
- 📖 **Smith DE, Cléménçon B, Hediger MA.** Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. Mol Aspects Med. 2013; 34(2-3):323-36.
- 📖 **Steel A, Hediger MA.** The Molecular Physiology of Sodium- and Proton-Coupled Solute Transporters. News Physiol Sci. 1998; 13:123-131.
- 📖 **Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T.** Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. Nat Rev Immunol, 2006; 6(1):9-20.
- 📖 **Sun D, Wang Y, Tan F, Fang D, Hu Y, Smith DE, Jiang H.** Functional and molecular expression of the proton-coupled oligopeptide transporters in spleen and macrophages from mouse and human. Mol Pharm. 2013; 1:10(4):1409-16.
- 📖 **Underhill DM, Ozinsky A.** Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 825-52.
- 📖 **Verschoor JA, Baird MS, Grooten J.** Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*. Prog Lipid Res. 2012; 51(4):325-39.
- 📖 **Wang Y, Sun D, Song F, Hu Y, Smith DE, Jiang H.** Expression and regulation of the proton-coupled oligopeptide transporter PhT2 by LPS in macrophages and mouse spleen. Mol Pharm. 2014; 2:11(6):1880-8.
- 📖 **World Health Organization.** (2015). Global tuberculosis report: WHO Report, WHO/HTM/TB/2015.08
- 📖 **Zenteno-Cuevas R.** Update on the development of TB Vaccines. Curr Pharm Biotechnol 2013;14(11):940-6