

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN  
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**

**“PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DEL  
OXÍGENO Y REARREGLOS DEL  
CITOESQUELETO EN CÉLULAS  
ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL  
HUMANAS INFECTADAS POR  
MICOBACTERIAS”**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA  
P R E S E N T A:**

**QBP. DANIELA ALEJANDRA VILLAGÓMEZ PALATTO**

**DIRECTORAS DE TESIS:**

**DRA. JULIETA LUNA HERRERA  
DRA. BLANCA ESTELA GARCÍA PÉREZ**

**MÉXICO, D.F.**

**DICIEMBRE. 2009**



**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología II del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Julieta Luna Herrera y la Dra. Blanca Estela García Pérez.**

**Este trabajo recibió apoyo financiero de la SIP-IPN a través de los proyectos 20091328 y 20090962 y del CONACyT a través del proyecto SEP-2004-CO1-47496**

**La autora de este trabajo agradece el apoyo económico recibido del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI-IPN), así como la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).**

# AGRADECIMIENTOS

**Dra. Julieta Luna Herrera:** creo que no podría pagarle con nada, la gran confianza que depositó en mí para realizar este trabajo, y sobre todo por el voto de confianza que me dio al darme la oportunidad de aventurarme en un sueño que tenía desde hace tiempo y al mismo tiempo de seguir en este proyecto que me ha llenado de mucha satisfacción. Gracias porque sin su apoyo y sin su ayuda, esto no hubiera sido posible.

**Dra. Blanca Estela García Pérez:** agradezco mucho su apoyo y sobre todo su paciencia para conmigo, sé que muchas veces fallé y sin embargo usted siempre estuvo allí para apoyarme, muchas gracias por escucharme y por sus consejos que me alentaron para seguir adelante cuando estuve a punto de claudicar. Muchas gracias.

**Dr. Juan Carlos Hernández González:** quisiera darte las gracias por todo tu apoyo, por tus consejos y comentarios que enriquecieron en mucho este trabajo, por resolver mis dudas y ser siempre muy amable conmigo, por ayudarme siempre cuando te lo pedía y sobre todo por brindarme tu amistad.

**Dra. Jeanet Serafín López, Dra. María Eugenia Castro Mussot, Dra. María Lilia Domínguez López:** les agradezco mucho por sus observaciones y comentarios para mejorar este trabajo y por ser unas grandes profesoras e investigadoras de las cuales hay que aprender, son un ejemplo a seguir.

**Dr. Ramón Coral Vázquez:** usted fue el que proporcionó lo esencial de este trabajo, las HUVEC, por lo cual estoy muy agradecida, gracias por sus opiniones y comentarios para hacer de este trabajo un gran proyecto, del cual todavía queda mucho para seguir trabajando y seguir descubriendo lo maravilloso que son estas células. Gracias.

**Dra. Rosa María Ordoñez Razo:** agradezco mucho la atención que tuvo conmigo, su compromiso, su amistad y su apoyo que facilitó en mucho la marcha de este trabajo.

**Dra. María Esther Sánchez Espíndola:** muchas gracias por tu apoyo y ayuda para tomar mis fotos con el microscopio electrónico de barrido, sobre todo por tu amistad y por ser tan ameno el trabajo en la unidad de microscopía.

**Dra. Iris Estrada García:** a usted no le debo una, sino muchas, porque me apoyó, ayudó y me dio la oportunidad al igual que la Dra. Julieta Luna de aventurarme en un gran sueño que a la par de este trabajo, me ha llenado de grandes satisfacciones. Muchas gracias de verdad.

# DEDICATORIAS

Primero que nada quisiera empezar dándoles las gracias por haberme traído a este mundo, por darme la vida, porque he sido y soy feliz, ustedes son lo esencial de mi vida, porque sin ustedes, mis hermanas y yo no seríamos lo que ahora somos, por todo su sacrificio y entrega para que nunca nos faltara nada, hoy esto es sólo un logro más que se ha cumplido gracias a ustedes, yo los amo con toda mi alma y no sé qué haría si algún día me llegaran a faltar, porque gracias a ustedes somos una familia muy unida, que se apoya incondicionalmente, una familia como muy pocas. Gracias papás: **Guillermina Palatto Cervantes y Carlos Villagómez Salcedo.**

**A mi Yona:** hay tanto que quisiera decirte pero tengo que ser breve, y empezaré por decirte que además del amor que siento por ti, he de confesarte que te tengo una gran admiración, porque eres un chico muy maduro, muy inteligente, con una gran seguridad en sí mismo, con una gran capacidad y potencial y sobre todo porque eres una gran persona, honestamente, gracias a ti, he podido seguir mis sueños, nuestros sueños, sin tus consejos y apoyo no hubiera sido posible esto, pues tu siempre me has impulsado a ser mejor cada día, a no rendirme y has puesto en mí la seguridad que yo necesitaba sentir, gracias por estar en todo momento conmigo y por ser antes que nada mi mejor amigo. Te amo.

**Bárbara,** sabes?, eres una persona muy fácil de querer porque eres muy noble y siempre piensas en los demás antes que en ti, y eso es de admirarse, aunque a veces no esté bien, porque luego abusan de eso. Nunca dejes que nadie te quite la alegría y la esencia que te caracteriza, ya una vez demostraste que podías salir adelante y ahora es momento de volver a hacerlo.

**Adriana,** has sido un gran apoyo y ejemplo para nosotras, tu gran fortaleza, inteligencia y madurez te ha convertido en una gran mujer, madre, hija y esposa, yo creo que nadie te podría pagar con nada el apoyo que nos has dado a todos, sabes que te admiro y quiero mucho, y siempre podrás contar conmigo incondicionalmente.

**Carolina,** a veces es difícil expresar lo que uno siente, y eso me pasa contigo, pero quiero que sepas que te quiero mucho y que siempre podrás contar conmigo, es increíble cómo pasa el tiempo, hace no tanto vivíamos las cuatro con mis padres, nos reíamos y platicábamos antes de dormir, unas en la litera y otras en la colchoneta, era muy padre, hoy, ya no vives tan cerca, pero recuerda siempre que no hay distancia que nos pueda separar ni problemas que no se puedan resolver, siempre y cuando tomes las decisiones correctas.

**A mis sobrinos Valeria, Miguel, Gael, Andrea, María Fernanda, Valentina y Adrianita:** porque han traído a la familia mucha alegría, a pesar de ser muy latosos y en ocasiones desesperantes, sin embargo, eso es lo que le da el plus a esta vida. Ustedes son una gran inspiración para mí, y siempre podrán contar conmigo. Los quiero mucho.

**Carmen Palacios y Fernando Alvarado,** a ustedes también va dedicado este trabajo porque gracias a ustedes llegó a este mundo el ser más precioso y amoroso que me ha impulsado día tras día a salir adelante, porque se han preocupado y nos han apoyado, por ser unas personas con grandes valores, por ser unos padres entregados en cuerpo y alma a sus hijos, y sobre todo por aceptarme y tratarme como si fuera de su familia, en verdad gracias.

**Mis amigos: Alejandro, Nancy y Frank** que siempre han estado cuando los he necesitado, por compartir esos momentos inolvidables. Como ya había dicho antes, es increíble cómo pasa el tiempo, apenas hace 7 años comenzamos nuestra travesía por la gloriosa ENCB que nos convirtió en H. Q.B.P. de lo cual estoy muy orgullosa, y hoy me da más orgullo, el saber que a pesar del tiempo y la distancia, cuento aún con su amistad que es muy preciada para mí. Gracias.

**A Mayra y Luis Fernando,** porque en ustedes he encontrado unos verdaderos amigos, porque además de ser unas grandes personas, son un ejemplo a seguir, en ustedes veo reflejados mis sueños, gracias por apoyarnos a Yona y a mí, los aprecio y admiro mucho.

## **ÍNDICE GENERAL**

	<b>PÁGINA</b>
<b>Índice de Abreviaturas</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>III</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>V</b>
<b>Resumen</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract</b>	<b>VII</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Generalidades de Tuberculosis</b>	<b>1</b>
<b>Mecanismos de interiorización</b>	<b>3</b>
<b>Células endoteliales</b>	<b>8</b>
<b>Mecanismos de destrucción de patógenos intracelulares</b>	<b>13</b>
<b>Justificación</b>	<b>21</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos Particulares</b>	<b>23</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>24</b>
<b>Resultados</b>	<b>29</b>
<b>Discusión</b>	<b>51</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>59</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CRs</b>	Receptores para el complemento
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EDHF</b>	Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio
<b>EDRF</b>	Factor Relajador Derivado del Endotelio
<b>EBM</b>	Medio Basal Endotelial
<b>FAD</b>	Flavina-Adenina-Dinucleótido
<b>FcRs</b>	Receptores para el Fc
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HBSS</b>	Solución Salina Balanceada de Hanks
<b>Hsp90</b>	Proteína de choque térmico90
<b>HUVEC</b>	Células Endoteliales de Cordón Umbilical de Humano
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio
<b>L-NMMA</b>	N- monometil- L- arginina
<b>MAB</b>	<i>Mycobacterium abscessus</i>
<b>MSM</b>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

<b>MOI</b>	Multiplicidad de Infección
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>cNOS</b>	Óxido nítrico sintasa constitutiva
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>OADC</b>	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
<b>.OH</b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO</b>	Peroxinitrito
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PI-3K</b>	Fosfatidil- inositol- 3- fosfato
<b>PMA</b>	Éster de forbol-12, miristato-13, acetato
<b>ROS</b>	Por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SV40</b>	Virus símico 40
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>TLRs</b>	Receptores tipo Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias

## ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
<b>Figura 1</b>	Presencia de DNA de <i>M. tuberculosis</i> en tejido pulmonar superficialmente sano.	2
<b>Figura 2</b>	Diferentes formas de endocitosis.	4
<b>Figura 3</b>	Organización de las caveolas.	5
<b>Figura 4</b>	Formación de lamelipodios durante la macropinocitosis.	7
<b>Figura 5</b>	Células endoteliales de cordón umbilical de humano.	9
<b>Figura 6</b>	Microscopía óptica y multiplicación intracelular de diferentes cepas de micobacterias en las HUVEC.	11
<b>Figura 7</b>	Comparativo de la producción de NO por las HUVEC a 1h de infección con las 3 micobacterias.	16
<b>Figura 8</b>	Cuantificación de la producción de óxido nítrico por las HUVEC infectadas con las tres cepas micobacterianas.	16
<b>Figura 9</b>	Producción de especies reactivas del oxígeno en células fagocíticas y no fagocíticas.	18
<b>Figura 10</b>	Estructura de las NADPH oxidasas.	19
<b>Figura 11</b>	Fotografías de la reducción de NBT por las HUVEC infectadas por <i>M. smegmatis</i> .	30
<b>Figura 12</b>	Fotografías de la reducción de NBT por las HUVEC infectadas por <i>M. abscessus</i> .	31
<b>Figura 13</b>	Fotografías de la reducción de NBT por las HUVEC infectadas por <i>M. tuberculosis</i> .	32
<b>Figura 14</b>	Fotografías comparativas de la reducción de NBT por las HUVEC infectadas por las tres cepas micobacterianas.	33
<b>Figura 15</b>	Producción de ROS por las HUVEC infectadas con las tres cepas micobacterianas.	35
<b>Figura 16</b>	Imágenes del citoesqueleto de las HUVEC infectadas por <i>M. smegmatis</i> .	37
<b>Figura 17</b>	Imágenes del citoesqueleto de las HUVEC infectadas por	38

	<i>M. abscessus.</i>	
<b>Figura 18</b>	Imágenes del citoesqueleto de las HUVEC infectadas por <i>M. tuberculosis.</i>	<b>39</b>
<b>Figura 19</b>	Imágenes comparativas de los rearrreglos del citoesqueleto inducidos por la infección con las tres cepas micobacterianas.	<b>40</b>
<b>Figura 20</b>	Micrografías de las HUVEC infectadas por <i>M. smegmatis.</i>	<b>42</b>
<b>Figura 21</b>	Formación de los lamelipodios membranales inducidos por <i>M. smegmatis.</i>	<b>43</b>
<b>Figura 22</b>	Micrografías de las HUVEC infectadas por <i>M. abscessus.</i>	<b>44</b>
<b>Figura 23</b>	Formación de los lamelipodios membranales inducidos por <i>M. abscessus.</i>	<b>45</b>
<b>Figura 24</b>	Micrografías de las HUVEC infectadas por <i>M. tuberculosis.</i>	<b>46</b>
<b>Figura 25</b>	Formación de los lamelipodios membranales inducidos por <i>M. tuberculosis.</i>	<b>47</b>
<b>Figura 26</b>	Micrografías comparativas de la formación de lamelipodios inducidos por la infección con las tres cepas micobacterianas.	<b>48</b>
<b>Figura 27</b>	Porcentajes de inhibición de la interiorización de las diferentes micobacterias a las HUVEC usando el inhibidor amilórico a dos diferentes concentraciones.	<b>49</b>
<b>Figura 28</b>	Porcentajes de inhibición de la interiorización de las diferentes micobacterias a las HUVEC usando el inhibidor wortmanina a dos diferentes concentraciones.	<b>50</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
<b>Tabla 1</b> Miembros de la familia NADPH Oxidasas.	19

## RESUMEN

Recientemente se ha empezado a reconocer la participación de las células de tipo no fagocítico en la tuberculosis. Previamente demostramos que las células endoteliales de cultivo primario de cordón umbilical de humano (HUVEC), son susceptibles de infectarse con micobacterias, y producir y modular la producción de óxido nítrico (NO), en respuesta a la infección. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como determinar la vía endocítica que utilizan las micobacterias para interiorizarse en las HUVEC. Esto se llevó a cabo infectando a las HUVEC con: *Mycobacterium smegmatis* (MSM), *Mycobacterium abscessus* (MAB), y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MTB). Se estimó la producción de ROS por microscopía óptica y cuantificando por espectrofotometría la capacidad de reducir el reactivo NBT (Nitroazul de tetrazolio); la vía de interiorización se estableció por microscopía confocal, microscopía electrónica de barrido y mediante el uso de inhibidores. Se observó que MSM indujo la mayor producción de ROS, seguida de MTB; la micobacteria que indujo menor producción fue MAB. Se observó por microscopía confocal que las tres micobacterias estimularon el rearrreglo del citoesqueleto, también de manera diferencial, siendo MAB la que indujo una mayor distribución de los filamentos de actina, comprometiendo la morfología celular, con MTB se observó un efecto similar al de MAB, aunque en un menor grado. La cepa de MSM fue la que indujo de una manera discreta la distribución de los filamentos de actina, básicamente en la periferia sin comprometer la estructura celular. La microscopía de barrido demostró que en la infección con MAB se produjeron grandes y abundantes lamelipodios y ruffles, las imágenes con MTB fueron similares, en cambio la infección con MSM indujo pocos y discretos lamelipodios y muy poca alteración de la estructura celular con excepción de un hinchamiento de la zona perinuclear. Estas observaciones sugieren a la macropinocitosis como el mecanismo responsable de la interiorización, hecho que se confirmó por la utilización del amilorido, compuesto que redujo la interiorización de las tres micobacterias de manera significativa. Interesantemente la wortmanina, únicamente inhibió la interiorización de MTB y MSM, sugiriendo que MAB durante su infección no activa a la PI3-K. En las HUVEC las micobacterias utilizan la macropinocitosis para interiorizarse y su eliminación depende de la producción de ROS, y la activación de la PI3-K.

## ABSTRACT

Lately, it has been acknowledged the participation of non-phagocytic cells in tuberculosis. Previously we demonstrated that human vein cord primary cells (HUVEC) are susceptible of mycobacterial infection, and produce and modulate nitric oxide (NO) in response to the infection. The goal of the present study was to analyze the participation and production of reactive oxygen species (ROS) triggered by mycobacterial infection, as well as to establish the endocytic via used by the mycobacteria to be internalized by HUVEC. To fulfill these goals HUVEC were infected with *Mycobacterium smegmatis* (MSM), *Mycobacterium abscessus* (MAB), and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MTB). Reactive oxygen species (ROS) production was evidenced with the Nitro blue tetrazolium reactive and observed by optic microscopy and quantified by spectrophotometry. The endocytic via responsible of mycobacterial internalization was established by confocal microscopy, scanning electron microscopy and by the use of endocytic inhibitors like amiloride and wortmanin. We found that MSM infection triggered the highest ROS production, followed by MTB infection, MAB induced the lowest ROS levels. Only MSM-induced ROS levels were statistically significant high in comparison with the other two mycobacteria. Confocal microscopy revealed that the 3 mycobacteria stimulated differential cytoskeleton rearrangements, the most dramatic changes were observed with MAB, followed by MTB, the cellular morphology changed importantly. On the contrary, MSM infection induce discrete actin rearrangements' but not compromise in cell morphology. Scanning electron microscopy revealed that, during MAB infection long and abundant lamellipodia and ruffles were produced. Similar images were observed with MTB, in comparison, MSM infection induced only scarce lamellipodia formation, no changes in cell morphology except for a swelling in the perinuclear area. These observations points to macropinocytosis as the mechanism responsible of mycobacterial internalization in the HUVEC. This assumption was confirmed by the inhibition shown by amiloride treatment. Interestingly, the use of wortmanin during mycobacterial infections showed that MTB and MSM infections involved PI-3K activity, but this is not the case for MAB. In conclusion, during HUVEC-mycobacterial infections macropinocytosis, and the intracellular bacteria elimination depends of ROS production and PI-3K activation.

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades de Tuberculosis

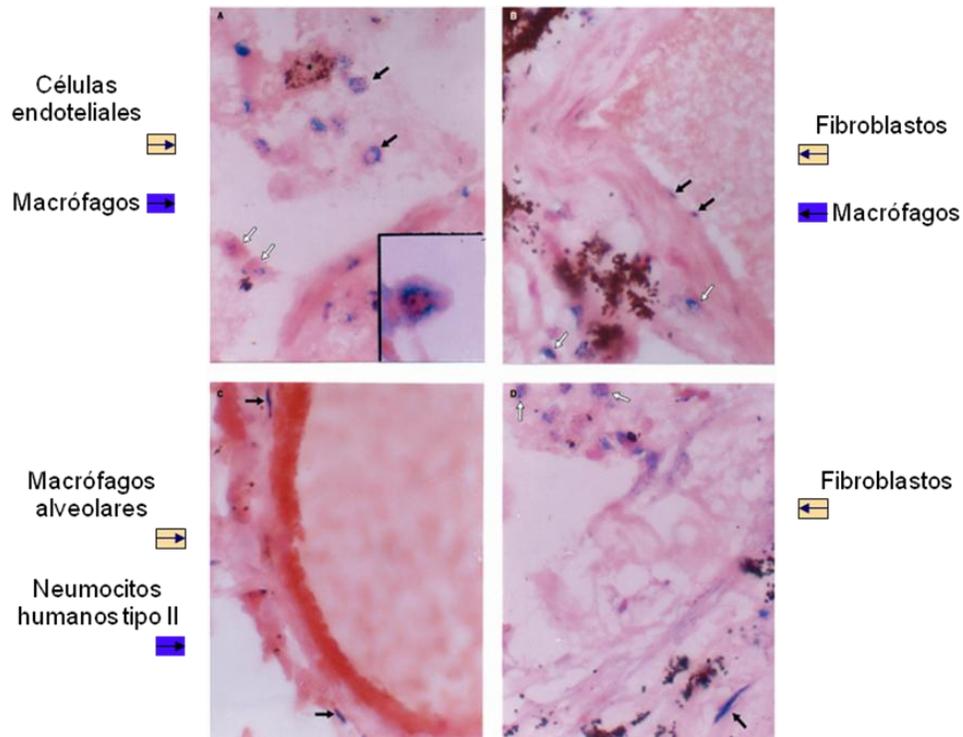
La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por diversas especies del género *Mycobacterium*, todas ellas pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La especie más importante y representativa es *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch. La TB es la segunda enfermedad infecciosa de mayor prevalencia en el mundo (Kumar y Abbas, 2007).

En 1999 la OMS cifró en 3.689.833 nuevos casos de tuberculosis en el mundo, aunque este organismo cifró en 8.500.000 casos totales con una tasa global de 141/100.000 habitantes. La TB mantiene una prevalencia de 245/100.000 habitantes, y una tasa de mortalidad de 28/100.000. En el informe de la OMS de 2006 se calcula que 1,6 millones de personas murieron por esta enfermedad en 2005. La tendencia epidemiológica de la incidencia de TB sigue aumentando en el mundo. La infección ataca preferentemente los pulmones, pero puede también afectar otros órganos como los riñones, hígado, piel, meninges, etcétera. Es más grave en los niños y ancianos, siendo los pacientes que mayor mortalidad presentan (WHO, 2007).

La TB se trasmite a través de partículas expelidas con la tos, estornudo, al hablar, etcétera. De esta manera, el bacilo es fagocitado por los macrófagos alveolares. En un 30% de los casos, estos macrófagos son incapaces de destruirlo. Entonces se genera la infección, que se caracteriza por el crecimiento en el interior de los macrófagos infectados. Ello es debido a que el bacilo es capaz de frenar la unión fago-lisosoma entre otros mecanismos de evasión (Comstock, 1994). Histopatológicamente, en el foco de infección se genera un granuloma, que se caracteriza por la presencia de tejido necrótico intragranulomatoso y que se estructura finalmente con la adquisición de la inmunidad. Con la inmunidad, los macrófagos infectados pueden activarse y destruir el bacilo, de manera que se controla la concentración de éste.

En la TB y en las micobacteriosis, el papel y la relevancia de la participación de los macrófagos en el desarrollo de la enfermedad han sido ampliamente estudiados. Recientemente, se ha empezado a reconocer la participación de otras células en la

etiopatogénesis de estas enfermedades, concretamente, en el caso de la TB, Hernández-Pando buscando la presencia de bacterias latentes en tejido pulmonar de individuos que murieron por causas diferentes a la tuberculosis, describieron la presencia de DNA micobacteriano en macrófagos alveolares e intersticiales, así mismo encontraron el mismo material genético en células de tipo no macrófágico como son los neumocitos tipo II (células epiteliales), células endoteliales y fibroblastos pulmonares (figura 1). Diversos estudios han demostrado que la micobacteria puede interactuar con células epiteliales, lo cual puede ser una propiedad muy importante para el establecimiento de la infección (Hernández-Pando *et al*, 2000)



**Figura 1. Presencia de DNA de *M. tuberculosis* en tejido pulmonar superficialmente sano.**  
Presencia de DNA micobacteriano en macrófagos alveolares e intersticiales, neumocitos tipo II (células epiteliales), células endoteliales y fibroblastos pulmonares.

Fuente: Hernández-Pando *et al*, 2000.

La interacción de *M. tuberculosis* con células del epitelio respiratorio fue descrita primeramente por Bermúdez y Goodman, quienes utilizando como modelo la línea celular A549, demostraron la capacidad de la micobacteria para infectar y replicarse dentro de estas células (Bermúdez y Goodman, 1996). También se ha demostrado

que la interiorización de *M. tuberculosis* a estas células se da por un mecanismo de macropinocitosis (García-Pérez *et al*, 2003).

## **Mecanismos de Interiorización**

### **Endocitosis**

En las células eucariotas las moléculas son transportadas a través de la membrana plasmática por diferentes vías, dependiendo de su masa molecular.

Las moléculas de baja masa molecular son captadas a través de un transporte pasivo como una difusión simple o una difusión facilitada. También éstas pueden ser transportadas a través de las vías de transporte activo como la bomba de sodio y potasio o bombas como la de calcio, estas vías requieren de proteínas transportadoras para poder translocar las moléculas a través de la membrana plasmática.

Las moléculas de elevada masa molecular son captadas a través de la membrana plasmática por medio de mecanismos complejos que requieren de la participación activa de la célula. Las principales vías que regulan el transporte de moléculas de elevada masa molecular son la endocitosis, la exocitosis y la transcitosis.

En la endocitosis, hay porciones de la membrana superficial externa de la célula que se invaginan y separan por estrangulación, formando unas vesículas citoplasmáticas, rodeadas de membrana y que contienen sustancias que se hallaban presentes en el medio exterior o que fueron adheridas en la superficie celular (Alberts *et al*, 1996).

Las diferentes formas de endocitosis incluyen la pinocitosis, la fagocitosis y la macropinocitosis, que se describen con mayor detalle a continuación (Conner y Schmid, 2003):

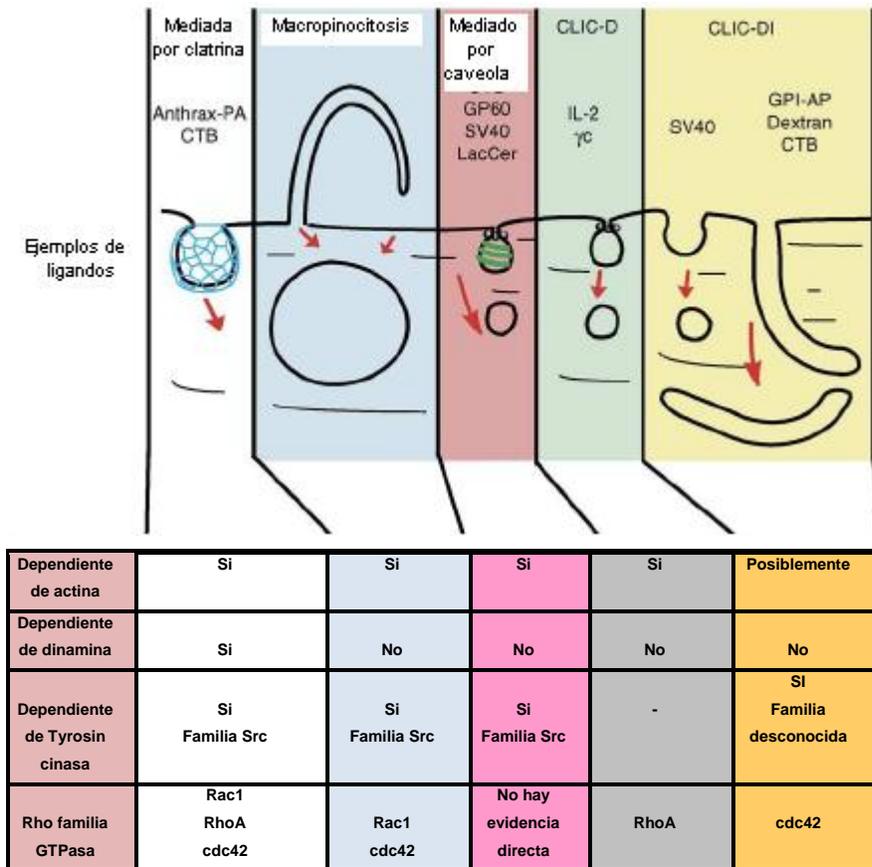
### **Pinocitosis**

La pinocitosis es una característica constitutiva de todas las células, se define como el proceso por el cual macromoléculas y fluidos son captados a través de pequeñas invaginaciones en la membrana celular, los cuales dan origen a los endosomas o pinosomas, que son generalmente menores de 150 nm de diámetro.

Existen diferentes vías endocíticas que se han identificado en células eucariotas dependiendo del tamaño de la vesícula y la composición de la cubierta (figura 2) (Neuhaus y Soldati, 1999).

**1. Endocitosis mediada por receptores:**

- 1.1 Endocitosis mediada por receptores (vesículas cubiertas de clatrina)
- 1.2 Endocitosis mediada por caveolas
- 1.3 Endocitosis mediada por vesículas pequeñas no cubiertas
- 1.4 Fagocitosis



**Figura 2. Diferentes formas de endocitosis.**

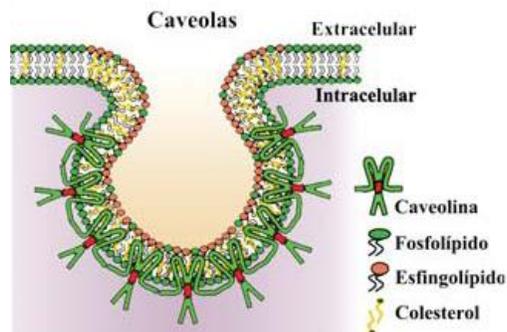
Características principales de las diferentes vías endocíticas de células eucariotas.

Fuente: Kirkham y Parton, 2005.

**1.1- Endocitosis mediada por receptores:** la principal característica de esta vía es la formación de invaginaciones en la membrana plasmática cubiertas de clatrina. La formación de vesículas cubiertas de clatrina se da después de la unión

ligando-receptor y a través de una serie de pasos altamente regulados. Dentro de los ligandos mejor caracterizados están las toxinas (toxina colérica), las lectinas, algunos virus (adenovirus), hormonas y factores de crecimiento (insulina, hormona de crecimiento, etc.) y algunas proteínas y anticuerpos (lipoproteína de baja densidad, IgE, IgA, IgG). La clatrina es el componente central de esta vía, conformada por tres cadenas pesadas asociadas a tres cadenas ligeras, que se ensamblan en forma poligonal, esta forma de ensamble permite la flexibilidad de la membrana plasmática durante la formación de la invaginación (Conner y Schmid, 2003).

**1.2 Endocitosis mediada por caveolas:** se caracteriza por la formación de invaginaciones en la membrana plasmática en forma de botella conocidas como caveolas, se encuentran en muchos tipos celulares, pero son especialmente abundantes en las células endoteliales, en donde están implicadas en la transcitosis y en la endocitosis de los componentes sanguíneos (figura 3).



**Figura 3. Organización de las caveolas.**

La Cav forma homo-oligómeros que proveen la estructura tridimensional necesaria para formar las caveolas. El dominio de oligomerización de Cav-1 se muestra en rojo.

Fuente: Mayoral *et al*, 2007.

La forma y organización estructural de las caveolas depende de la caveolina, la caveolina es una proteína dimérica que se une al colesterol y se inserta como una asa en la cara interna de la membrana plasmática. Esta proteína se auto-asocia para formar una cubierta estriada sobre la superficie de la invaginación. Desde su descubrimiento, se ha propuesto que las caveolas son sitios de endocitosis, principalmente por su apariencia similar a las invaginaciones recubiertas de clatrina. Sin embargo, existe evidencia que propone a las caveolas como dominios

estáticos descartando su participación en la endocitosis (Thomsen *et al*, 2002). No obstante se ha demostrado que el virus SV40 es captado por caveolas y que estas estructuras pueden cambiar de un estado variable a un estado dinámico a partir de señales derivadas del mismo virus (Pelkmans *et al*, 2002).

**1.3 Endocitosis mediada por vesículas pequeñas no cubiertas:** es una de las vías endocíticas menos estudiadas, se encuentran principalmente en las neuronas y las células neuroendocrinas, su principal función es la recuperación de proteínas de la membrana (Conner y Schmid, 2003).

**1.4 Fagocitosis:** es la forma de endocitosis más conocida y la más estudiada. La fagocitosis la llevan a cabo principalmente células especializadas como los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos, su principal función es la eliminación de patógenos. La fagocitosis involucra algunas formas de mecanismos ligando-receptor. Después de que una partícula se une a la superficie celular, la célula se prepara para fagocitar extendiendo prolongaciones de la membrana plasmática y el citoplasma (llamados pseudópodos) alrededor de la partícula. Así los ligandos que están presentes en la superficie de la partícula se unen a los receptores de superficie celular a través de un mecanismo de “zipper” o cremallera. Entre la gran variedad de proteínas de superficie dedicadas a la fagocitosis, se encuentran los receptores para el Fc (FcRs) de las inmunoglobulinas y los receptores para el complemento (CRs), que en muchos casos facilitan la eliminación de patógenos opsonizados por anticuerpos o complemento respectivamente (Roitt,2001).

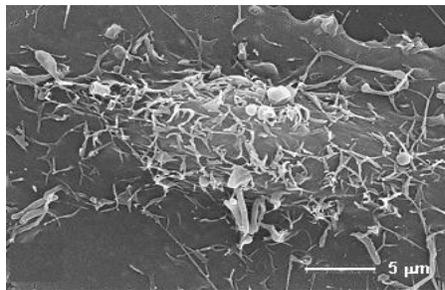
## 2. Endocitosis independiente de receptores

### 2.1 Macropinocitosis

También conocido como “ruffling” de membrana, este proceso involucra la formación de lamelipodios dependientes de actina, que son extensiones de membrana plasmática parecidas a sábanas sostenidas por una red de filamentos de actina (figura 4) (Zenni *et al*. 2000). Este proceso no requiere la participación de receptores celulares específicos y sucede durante la estimulación de una respuesta celular fisiológica particular. Los macropinosomas son estructuras dinámicas que frecuentemente se mueven hacia el centro de la célula. La

macropinocitosis es un mecanismo parecido a la fagocitosis, dependiente de energía y actina y es realizado por células fagocíticas y no fagocíticas.

Aunque la macropinocitosis fue la primera forma descubierta de endocitosis no particulada, la investigación se ha enfocado por décadas a la endocitosis mediada por receptores en vista de su especificidad, implicaciones fisiológicas y regulación por maquinaria multiproteica de gran complejidad (Marsh y McMahon, 1999). Sin embargo, recientemente la macropinocitosis ha recibido gran atención desde una perspectiva funcional, ya que puede explicar la captación de nutrientes por cepas axénicas de *Dyctiostelium discoideum* (Hacker *et al*, 1997). Así mismo, la macropinocitosis ha surgido como un mecanismo clave de captura antigénica por las células dendríticas con la consecuente presentación de antígenos por las moléculas de histocompatibilidad clase I o clase II (West *et al*, 1999).



**Figura 4. Formación de lamelipodios durante la macropinocitosis.**  
Extensiones de membrana plasmática dependientes de filamentos de actina.

Fuente: García-Pérez *et al*, 2003

En las células epiteliales, la macropinocitosis es una respuesta temporal a ésteres de forbol incrementando la abundancia de macropinosomas y mejorando la velocidad de captación de fase fluida a través de los compartimentos endocíticos (Swanson, 1989). En contraste, la macropinocitosis es constitutiva en cepas axénicas de *D. discoideum*, en macrófagos y en células dendríticas (Veinthen *et al*, 1998).

Recientemente se ha puesto gran interés en las células no fagocíticas de tipo endotelial en las cuales se ha visto que pueden ser susceptibles de infección por TB y que probablemente usen esta vía de interiorización para establecer una población persistente (Villagómez-Palatto, 2007).

## **Células endoteliales**

Las últimas décadas han sido muy productivas en el conocimiento de la célula endotelial y de sus funciones, antes, al endotelio se le consideraba como una simple barrera física que separaba la sangre de los tejidos subyacentes. No obstante que su estructura es aparentemente sencilla, actualmente se sabe que es un tejido altamente especializado y metabólicamente muy activo.

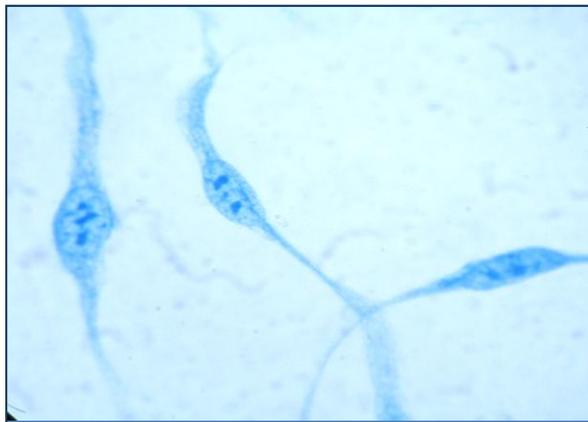
El núcleo de las células endoteliales está muy aplanado y por eso aparece elíptico en los cortes visualizados al microscopio. La región nuclear y más gruesa de la célula hace prominencia en la luz, la porción periférica y más delgada de la célula es tremendamente fina, y las membranas que miran a la luz o al tejido están separadas por una capa de citoplasma de un grosor de 0.2 a 0.4 micras. Hay en la región cercana al núcleo un complejo de Golgi y unas pocas mitocondrias, mientras que en la región delgada periférica del citoplasma hay elementos tubulares tortuosos del retículo endoplásmico. Son raros los lisosomas. La superficie luminal de las células es normalmente de perfil liso. En la superficie extraluminal o externa, las células endoteliales están en contacto con la membrana basal y sustancias como colágeno, proteoglicanos, heparán sulfato, integrinas (Atilio, 1997) (figura 5).

Algunos autores consideran al endotelio como un órgano verdadero presente dentro de otros órganos (los vasos sanguíneos y linfáticos) que alcanza un peso de casi 3.5 kg. (5% del peso corporal total en un adulto de 70 kg). De forma descriptiva, el endotelio participa en las siguientes funciones:

1. Forman una superficie lisa que facilita el flujo laminar de la sangre y previenen la adherencia de las células sanguíneas.
2. Forman una barrera de permeabilidad para el intercambio de nutrientes entre el plasma y el intersticio celular, regulando al mismo tiempo el transporte de sustancias entre ambos.
3. Regulan la angiogénesis y el remodelado vascular.
4. Contribuyen a la formación y mantenimiento de la matriz extracelular.
5. Producen factores de crecimiento en respuesta al daño vascular, influyendo especialmente en la proliferación del músculo liso vascular.

6. Producen sustancias que regulan la agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis.
7. Sintetizan y degradan diversas hormonas.
8. Participan en la respuesta inmune generando citocinas que modulan la actividad de los linfocitos.
9. Liberan agentes que actúan de forma paracrina sobre las células musculares lisas adyacentes, regulando su contracción. El endotelio vascular produce y libera sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Entre las vasodilatadoras figuran: el óxido nítrico (NO), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y prostaciclina. Entre las sustancias vasoconstrictoras figuran: las endotelinas y el tromboxano A<sub>2</sub>. (Atilio, 1997).

La superficie de las células endoteliales está tapizada de receptores, lo que hace que un sin número de actividades fisiológicas tengan al endotelio como escenario. De tal manera que la disfunción endotelial está involucrada en numerosas patologías.



**Figura 5. Células endoteliales de cordón umbilical de humano.**  
Células en forma de huso teñidas con azul de metileno.  
Fuente: original del autor.

### **Infección de células endoteliales por patógenos**

Se ha descrito en diversos artículos la susceptibilidad de las células endoteliales a la infección por diferentes patógenos, entre los cuales encontramos a *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram positiva, que al infectar a células endoteliales de vena umbilical, provocó una expresión de IL-6 e IL-1 $\beta$ . Los autores

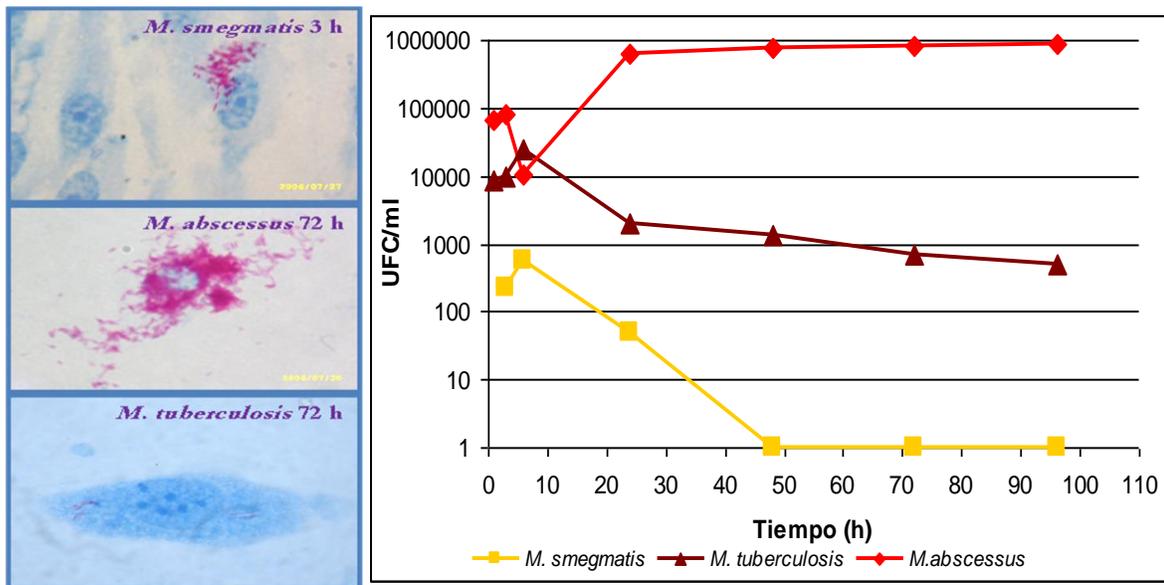
de esta investigación encontraron que la interiorización de *S. aureus* en las células es necesaria para la expresión de estas citocinas, sugiriendo que el endotelio vascular juega un papel muy importante en la patogénesis de la septicemia causada por microorganismos gram positivos (Yao *et al*, 1995).

Otro microorganismo de interés médico y que se ha visto que es capaz de infectar este tipo de células es *Listeria monocytogenes* que es una bacteria intracelular facultativa que causa sepsis e invade el sistema nervioso central en humanos y en algunos animales domésticos. Esta bacteria tiene como blanco primario a las células endoteliales para iniciar la infección en el hospedero y sugieren que la invasión de estas células puede ser un evento importante en la patogénesis de esta bacteria. Así mismo encontraron que *L. monocytogenes* puede parasitar las células endoteliales *in vitro* por dos diferentes mecanismos: invasión directa o a través de una célula fagocítica (Drevets *et al*, 1995).

La infección de células endoteliales por *Mycobacterium leprae* también ha sido descrita histológicamente en todos los tipos de lepras y en algunas reacciones cutáneas que ocurren en esta enfermedad. La infección de *M. leprae* sugiere que la interacción entre estas células y esta micobacteria juega un papel muy importante en la localización selectiva de este organismo a los nervios periféricos (Scollard, 2000).

Recientemente se describió la entrada y replicación intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en dos líneas de células endoteliales microvasculares humanas (de pulmón y subcutáneas), el autor analizó estas líneas celulares para establecer si en estas células la micobacteria podía establecerse, multiplicarse, diseminarse o escapar de la respuesta inmune, encontrando que los bacilos pueden adherirse, interiorizarse y replicarse en las dos líneas celulares, sin embargo, muestran un mayor tropismo por las células endoteliales microvasculares de pulmón y llegando a observar que después de 7 días de incubación la viabilidad de los cultivos no cambió apreciablemente, sugiriendo que pueden servir como una fuente de replicación intracelular y de una infección crónica (Mehta, 2006).

Hasta donde sabemos el único trabajo de investigación sobre la infección de cultivos primarios de células endoteliales de este tipo fue el realizado por nuestro grupo en el año 2007, usando células endoteliales de cordón umbilical de humano de cultivo primario (HUVEC) (Villagómez-Palatto, 2007). En este trabajo se estudió si las HUVEC se infectaban con 3 especies micobacterianas seleccionadas, una de baja virulencia (*M. smegmatis*), una no tuberculosa de alta virulencia (*M. abscessus*) y la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, la interiorización se evaluó mediante tinción y observación microscópica (Zielh-Neelsen) y mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias, encontrando por ambos métodos que las tres especies micobacterianas eran capaces de infectar a las HUVEC, pero de manera diferencial dependiendo de la micobacteria, siendo la más infectiva *M. abscessus*, seguida de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (figura 6). De momento no se contaba con evidencias que permitieran suponer cual era el proceso de responsable de la interiorización, mismo que pudiera ser macropinocitosis, considerando lo observado en otras células no fagocíticas (García-Pérez *et al*, 2003).



**Figura 6. Microscopía óptica y multiplicación intracelular de diferentes cepas de micobacterias en las HUVEC.** Comportamiento diferencial de la infección de las cepas micobacterianas en las HUVEC. Fuente: original del autor.

De acuerdo a lo observado, las HUVEC son infectadas por las micobacterias de estudio independientemente de su virulencia, sin embargo, la sobrevivencia intracelular de las micobacterias si correlacionó con dicha propiedad. Así, la

micobacteria no virulenta: *M. smegmatis* fue eliminada rápida y eficientemente por las células endoteliales. En comparación, *M. abscessus* fue la micobacteria que mostró no sólo la mayor eficiencia de infección, sino la que presentó la mayor multiplicación y sobrevivencia intracelular, con un crecimiento logarítmico a lo largo de la cinética de observación, y observándose microscópicamente células repletas de bacilos al final de tiempo de estudio. *M. tuberculosis* mostró un comportamiento diferente a los descritos anteriormente ya que no se multiplicó intracelularmente y tampoco fue eliminada por las HUVEC, presentando así un estado similar a la latencia (Villagómez-Palatto, 2007). Es importante resaltar que este comportamiento no se observó en otros modelos de infección de células no fagocíticas, como el de la línea celular A549 (neumocitos tipo II) o el de la línea celular de fibroblastos pulmonares (MLg) (García-Pérez, 2004).

De esta manera se podría postular que en la infección micobacteriana, las células no fagocíticas (epiteliales, endoteliales, fibroblastos) participan de manera importante en la respuesta inmune, quizá en el establecimiento de poblaciones bacterianas persistentes generando un estado de latencia y por otra parte es necesario entender y reconocer los mecanismos de eliminación bacteriana desarrollados por las células no fagocíticas. Con respecto a este último punto, se cuenta con evidencias claras que demuestran que dos tipos de células no fagocíticas: neumocitos de humano tipo II y fibroblastos de pulmón son capaces de controlar eficientemente la infección causada por *M. smegmatis* y contrariamente la infección con *M. tuberculosis* no la resuelven, aunque su multiplicación en estas células no es mayor a la observada en macrófagos (García-Pérez *et al*, 2003). Estas evidencias sugieren que las micobacterias son capaces de modular los mecanismos antibacterianos exhibidos por las células no fagocíticas y dicha modulación repercute en la sobrevivencia o eliminación intracelular de dicha bacteria.

Dentro de los mecanismos de la respuesta inmune con los que las células huésped cuentan para controlar la replicación intracelular micobacteriana están la producción de óxido nítrico (NO), especies reactivas del oxígeno (ROS), producción de defensinas, enzimas lisosomales, entre otros.

## **Mecanismos de destrucción de patógenos intracelulares**

Cuando los patógenos invaden al huésped son eliminados inicialmente por reacciones de inmunidad innata, seguidas de la respuesta adaptativa (Oppenheim *et al*, 2005). La inmunidad innata consiste en un amplio rango de defensas de movilidad rápida preexistentes del huésped, las cuales incluyen neutrófilos y macrófagos, células epiteliales, células cebadas, eosinófilos y células asesinas naturales (Hoffmann *et al*, 1999; Medzhitov y Janeway, 1997). Estas células expresan una amplia variedad de receptores de patrones de reconocimiento, como son los receptores tipo toll (TLRs), receptores tipo lectina C, y receptores *scavenger*, los cuales son activados por componentes de patógenos microbianos. Esto deriva en la liberación y/o activación de numerosas moléculas efectoras y mediadores de la respuesta del huésped incluyendo la cascada de complemento, citocinas, quimiocinas, superóxidos, óxido nítrico, prostaglandinas, proteínas de fase aguda y péptidos antimicrobianos (Oppenheim *et al*, 2005).

## **Destrucción a través de intermediarios reactivos del nitrógeno**

El óxido nítrico (NO) era considerado un destacado mediador fisiológico, cuando se demostró que era idéntico al factor de relajación derivado del endotelio, pero se ha demostrado que ésta es sólo una de sus funciones ya que también participa en los mecanismos de transducción, neurotransmisión, citotoxicidad y de defensa (Barnes, 1993). Por este último punto tiene mayor interés debida a una óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), dentro de la mayoría de las células, sobre todo en macrófagos y neutrófilos humanos por lo que crea un poderoso sistema antimicrobiano. Se expresa después de la exposición a ciertas citocinas y endotoxinas, esta forma no requiere de la calmodulina (Kwan, 1997). Los substratos para la producción de NO mediado por la NOS son el aminoácido arginina, el oxígeno molecular y la NADPH. Los cofactores que se requieren para la generación de NO son la tetrahidrobiopterina, el dinucleótido flavina adenina y el mononucleótido flavina. El mecanismo del NO puede operar contra microorganismos que invaden el citosol; por lo tanto, no sorprende que la mayoría de las células no fagocíticas que son infectadas estén dotadas de NOS. La enzima

puede ser inhibida por el análogo de arginina *N*- monometil- L- arginina (L- NMMA). El NO se forma por el rompimiento de la L-arginina generando este compuesto y la L-citrulina, siendo catalizada esta reacción siempre por alguna de las isoformas de la óxido nítrico sintasa, el NO es un gas muy inestable cuya acción bactericida más potente se debe por su combinación con otro radical proveniente de los mecanismos oxidativos de defensa: anión superóxido produciendo así el muy tóxico radical peroxinitrito ONOO, que se escinde al aceptar un protón y formar las moléculas reactivas: OH y NO<sub>2</sub>. La formación de NO trae como consecuencia el agotamiento de los depósitos de hierro y la inhibición de varias enzimas vitales para la sobrevivencia bacteriana (Roitt, 2001):

También el NO puede asociarse a daño de membranas y esta acción se ha demostrado con el peroxinitrito más que con el NO. El peroxinitrito media la peroxidación lipídica de las preparaciones liposomales a través de un mecanismo que no requiere hierro. Un estudio mostró que el NO ejerce efectos inmunomoduladores sobre la adherencia y función celular, la proliferación celular y la producción de citocinas (Wei *et.al*, 1995).

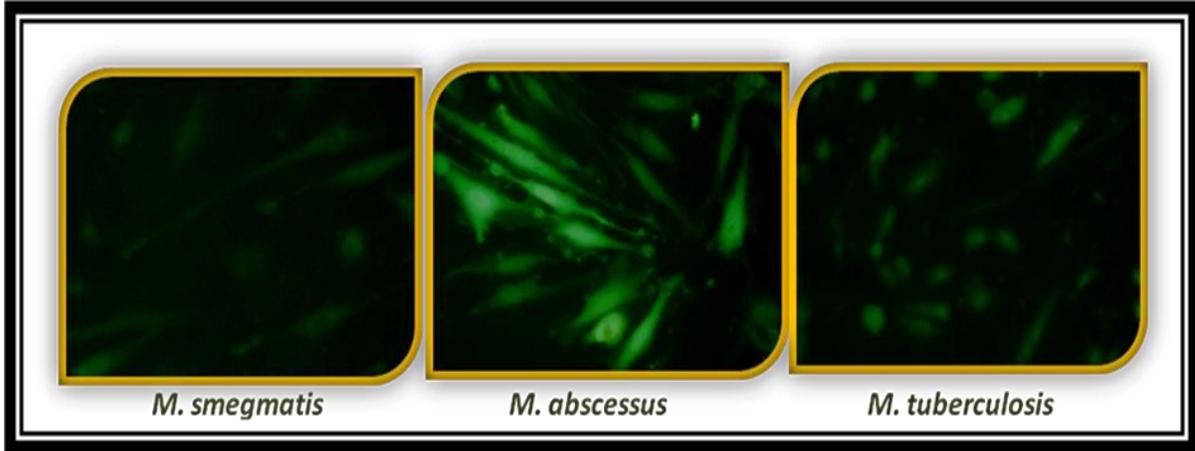
Además de la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS o NOS2), también puede expresarse de forma constitutiva (cNOS). En dos formas principales presentes en las células endoteliales (eNOS o NOS3) y en células neuronales (nNOS O NOS1) y siendo en ambos casos dependiente de Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina, constituyendo así una diferencia importante con la iNOS. En el caso de la eNOS, la enzima contiene sitios de unión para el grupo hemo y la calmodulina, que son elementos indispensables para la actividad enzimática, además contiene un motivo de unión del Zinc. Cada dímero de eNOS contiene un ión Zinc que contribuye con la estabilización de la molécula dimérica (Govers y Rabelink, 2001).

La eNOS se expresa principalmente en las células endoteliales, al igual que en miocitos cardíacos y en plaquetas. Se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos, la estimulación agonista de los receptores de las células endoteliales activa a una o más isoformas de la Fosfolipasa C, con lo cual se incrementa la formación del inositol-1,4,5-trifosfato. La elevación de este inositol incrementa los

niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y en consecuencia la activación de la eNOS a través de interacción con  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina. Sin embargo las interacciones moleculares que regulan esta actividad son más complejas que una simple unión reversible del  $\text{Ca}^{2+}$  a la calmodulina, ya que por ejemplo, la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) también parece ser un efector alostérico positivo de la eNOS. Otros factores que contribuyen a la regulación de la actividad enzimática de la eNOS son los efectores alostéricos negativos como la caveolina-1, la cual interactúa con la eNOS e inhibe su actividad catalítica.

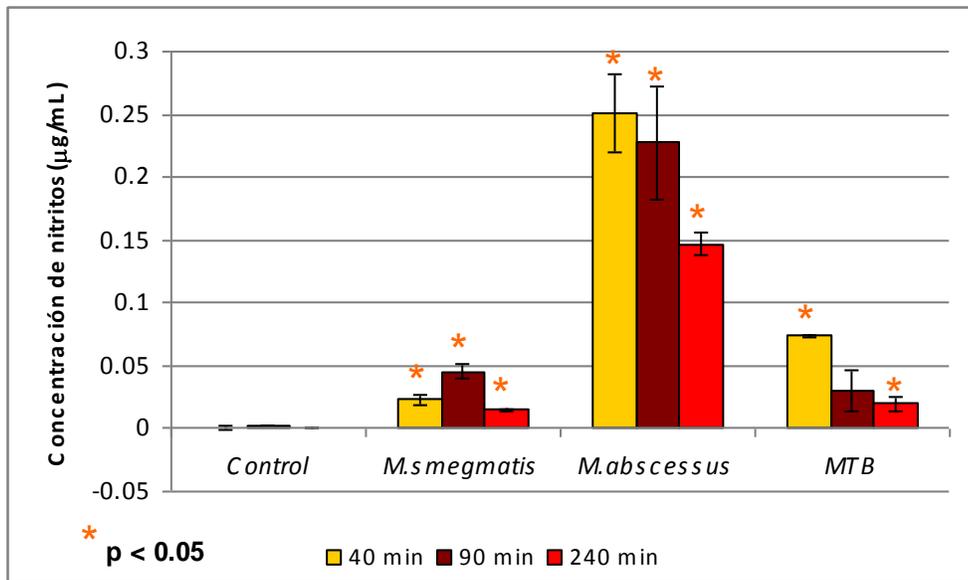
Se tienen una gran cantidad de antecedentes de la participación del NO como microbicida en diversas infecciones. En el caso de las infecciones ocasionadas por *Mycobacterium*, diferentes especies de *Mycobacterium* han mostrado variaciones en cuanto a su susceptibilidad al NO y a los intermediarios reactivos del nitrógeno. Nuestro grupo de trabajo ha evaluado de igual manera la participación del NO como uno de los mecanismos de defensa a la infección micobacteriana exhibidos por las HUVEC dado que éstas cuentan con la enzima eNOS descrita anteriormente.

En este estudio se analizó la producción de NO *in situ* y en tiempo real mediante microscopía de fluorescencia y se observó que las tres cepas micobacterianas modularon de manera diferencial la producción de óxido nítrico por las HUVEC, siendo *M. smegmatis* la micobacteria que indujo una producción discreta y sostenida de NO durante todo el tiempo de observación; *M. abscessus* indujo la mayor producción de NO, esta producción cesó rápidamente. En el caso de *M. tuberculosis* se observó un patrón similar de producción de NO al de *M. abscessus* (figura 7).



**Figura 7. Comparativo de la producción de NO por las HUVEC a 1h de infección con las 3 micobacterias.** Producción de NO *in situ* mediante microscopía de fluorescencia. *M. smegmatis* indujo una producción discreta y sostenida de NO; *M. abscessus* indujo la mayor producción de NO, *M. tuberculosis* mostró un patrón similar de producción de NO al de *M. abscessus*. Fuente: original del autor.

Además se cuantificó el óxido nítrico producido durante la infección con las tres cepas micobacterianas y los resultados obtenidos corroboraron y fueron congruentes con las observaciones obtenidas anteriormente descritas (figura 8) (Villagómez-Palatto, 2007).



**Figura 8. Cuantificación de la producción de óxido nítrico por las HUVEC infectadas con las tres cepas micobacterianas.** *M. smegmatis* indujo una producción discreta de NO; *M. abscessus* indujo la mayor producción de NO, *M. tuberculosis* mostró un patrón similar de producción de NO al de *M. abscessus*. Fuente: original del autor.

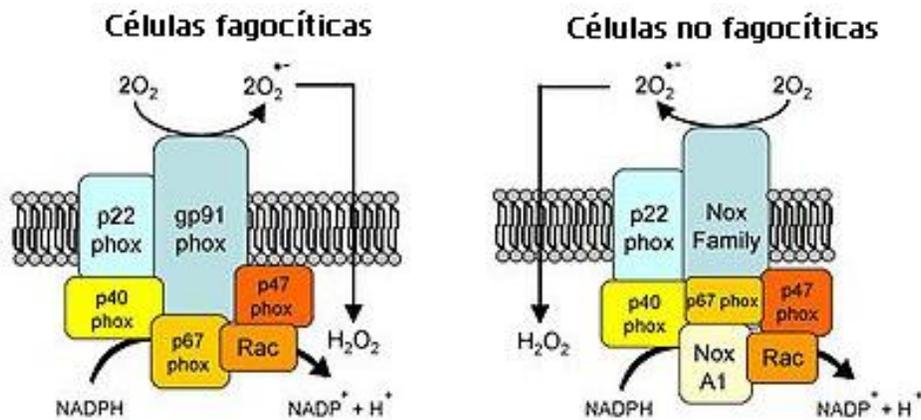
Por lo anterior se postuló que la infección de HUVEC constituye un modelo interesante de estudio de la patogénesis de la tuberculosis ya que permite la expresión de un estado de “latencia” debido a que estas células sólo contienen el crecimiento bacteriano sin llegar a eliminarlo, funcionando así como un reservorio de la micobacteria y explicando las observaciones obtenidas por Hernández-Pando y colaboradores, quienes reconocen la infección de células endoteliales en humanos y ratones (Hernández-Pando *et al*, 2000; Arriaga *et al*, 2002).

De esta manera, en nuestro modelo observamos el comportamiento diferencial de tres patógenos, dos que establecen una relación hospedero-bacteria destructiva, representada por *M. abscessus* (en la que la célula hospedera es destruida) y por *M. smegmatis* (en la que la bacteria es destruida), y otro que establece una relación tipo “simbiótica” en donde *M. tuberculosis* no destruye a la célula pero tampoco se elimina. Nosotros atribuimos la producción del NO por la activación de la eNOS, que es la que se encuentra en mayor proporción en el endotelio, además de ser una enzima constitutiva y de que su activación es más rápida que la de la iNOS (Govers y Rabelink, 2001); por esto es necesario establecer y estudiar el tipo de NOS que las diferentes micobacterias activan al infectar a las HUVEC, así como otros mecanismos de defensa que pueden estar involucrados en la misma.

### **Destrucción a través de intermediarios reactivos del oxígeno**

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son radicales libres que contienen el átomo de oxígeno. Son moléculas muy pequeñas que incluyen iones del oxígeno y peróxidos, son altamente reactivas y tienen importantes papeles en la señalización celular y pueden resultar en un daño muy significativo en las estructuras celulares (Novo y Parola, 2008). Los problemas para el invasor comienzan desde el momento en que se inicia la fagocitosis. Hay un espectacular aumento en la actividad de las hexosas monofosfato que genera nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Los electrones pasan del NADPH a una flavoproteína de membrana que contiene flavina-adenina-dinucleótido (FAD) y de allí a un citocromo singular de la membrana plasmática (cyt b<sub>558</sub>). Éste posee el muy bajo potencial

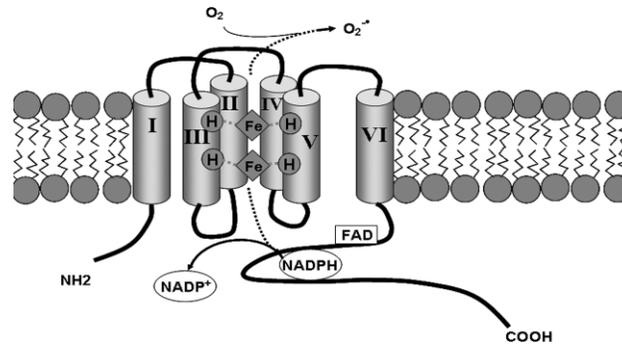
redox medio de  $-245\text{mV}$  que le permite reducir oxígeno molecular directamente a anión superóxido. El anión superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno por la acción de la superóxido dismutasa y luego en radicales hidroxilo (OH). Cada uno de estos productos posee una reactividad química notable con una variada gama de blancos moleculares, lo que los convierte en formidables agentes microbicidas; el .OH en particular es uno de los radicales libres más reactivos que se conocen (Roitt, 2001). Este tipo de estallido respiratorio ha sido ampliamente estudiado en células especializadas en fagocitosis como son los macrófagos, sin embargo, se ha documentado recientemente que las especies reactivas del oxígeno (ROS) también son producidas por las células de tipo no fagocítico, gracias a que existen diversos miembros de la familia de las NADPH oxidasas, que las células no fagocíticas contienen en gran número (figura 9).



**Figura 9. Producción de especies reactivas del oxígeno en células fagocíticas y no fagocíticas.** Familias de NADPH oxidasas, como principales fuentes celulares de ROS

Fuente:

Las NADPH oxidasas son una familia de enzimas multiméricas específicamente dedicadas a translocar electrones a través de la membrana de tal manera que resulta en la formación de ROS. El centro de su función es una subunidad catalítica oficialmente conocida como Nox o Duox, con un dominio conservado en su estructura (figura 10). Consiste de seis hélices transmembranales uniendo sitios para NADPH y FAD. Existen cinco isoformas (Nox 1 al 5), su función es estrictamente como oxidasas, y dos isoformas (Duox 1 y 2) que contienen dominios homólogos de peroxidasa (Chen *et al*, 2009).



**Figura 10. Estructura de las NADPH oxidasas.** Formadas de seis hélices transmembranales uniendo sitios para NADPH y FAD. Fuente: Chen *et al*, 2009.

Esta familia de las NADPH oxidasas se encuentra distribuida en diversos tejidos como lo muestra la tabla 1.

**Tabla 1. Miembros de la familia NADPH Oxidasas.** Localización intracelular, distribución en tejidos y función celular. Fuente: Chen *et al*, 2009.

Miembro de la familia Nox	Localización	Tejido de distribución	Función celular
Nox 1	Citoplásmica	Colón	Mantenimiento de
	Nuclear	Tejido muscular	la presión sanguínea
	RE	Endotelio	Activación neurotóxica de la
	Caveolar	Útero	microglia
		Placenta	
		Próstata	
Nox 2	Citoesqueleto	Alta expresión en células	Defensa del huésped
	Sinaptosomas	fagocíticas	Inflamación
	Membrana plasmática	Amplia distribución	
	Endosomas		
Nox 3	No determinado	Oído interno	Desarrollo del sistema
		Riñón fetal	vestibular del oído interno
		Bazo fetal	
		Cerebro	
Nox 4	Adhesiones focales	Riñón	Angiogénesis
	RE	Endotelio	Proliferación
	Núcleo	Musculo esquelético	Diferenciación
		Células hematopoyéticas	Migración celular
		Fibroblastos	Sensor de oxígeno
		Neuronas	
Nox 5	No determinado	Bazo	Proliferación celular
		Nódulos linfáticos	Canales dependientes de Ca <sup>++</sup>
		Músculo esquelético vascular	
		Médula ósea	
		Páncreas	
		Placenta	
		Ovario	
		Útero	
Estómago			
Duox 1/2	Membrana apical	Tiroides	Biosíntesis de hormonas
	RE	Próstata	tiroideas
		Epitelio pulmonar	

Las células endoteliales expresan Nox2, Nox4 y Nox1; la Nox2 endotelial está localizada en la membrana plasmática y puede ser activada por una variedad de agentes incluyendo hormonas y mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL 1, la localización de la Nox4 es menos certera pero puede expresarse primariamente en la membrana nuclear. Las Noxs endoteliales han demostrado participar en la señalización celular y en la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, resultado de la activación de la tirosina cinasa y la fosforilación de las proteínas (Fisher, 2009). Las células endoteliales *in situ* están expuestas a una gran variedad de fuerzas mecánicas, incluyendo la presión intraluminal y responden con una producción de ROS. El incremento de estrés mecánico activa la señalización con la generación de ROS gracias a la activación de la Nox2. Por otra parte, un estudio reciente demostró que las células endoteliales a causa de estrés fisiológico producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Coyle y Kader, 2007). Estos antecedentes nos sugieren que estas células ante la infección con los diversos patógenos pueden generar cantidades considerables de ROS como mecanismo de defensa.

En el caso de la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, la participación de los ROS ha sido muy importante, ya que se demostró el papel de este metabolito en la infección micobacteriana, siendo evidentes y contundentes en modelo de ratón y falta aún esclarecer su participación en los humanos (Raja, 2004).

## **JUSTIFICACIÓN**

Se ha demostrado que las micobacterias son interiorizadas a líneas celulares de naturaleza no fagocítica por un proceso de macropinocitosis, pero aún se desconoce el probable mecanismo de defensa que las células endoteliales de cultivos primarios utilizan ante la infección con las micobacterias. Por lo que en este trabajo se decidió estudiar la infección de células endoteliales con micobacterias de diferente virulencia y analizar la participación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la probable eliminación de dichas bacterias, así como también elucidar el mecanismo de interiorización que las micobacterias utilizan para infectar a estas células.

## **HIPÓTESIS**

Las micobacterias son interiorizadas por las células endoteliales humanas (HUVEC) mediante macropinocitosis y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) será modulada dependiendo de la virulencia de la micobacteria.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer las características de la infección de micobacterias de diferente virulencia en cultivos primarios de células endoteliales humanas, determinando el mecanismo de interiorización y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante la infección.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar si la infección de células endoteliales humanas por micobacterias de diferente virulencia induce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).
- Determinar los rearrreglos del citoesqueleto y los cambios citoplasmáticos inducidos durante la infección micobacteriana de cultivos primarios de células endoteliales.
- Determinar la vía endocítica de las micobacterias a las HUVEC usando inhibidores específicos de la macropinocitosis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVEC).

Los cultivos primarios de células endoteliales se obtuvieron a partir de cordones umbilicales de partos normales o cesáreas, cada cordón se pinzó por ambos extremos después de agregarle una solución de tripsina al 0.125% en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (SIGMA), incubándose durante 15 min a 37° C. Una vez transcurrido este tiempo se colectó el contenido del cordón y se agregó un volumen de 0.1ml de suero fetal bovino (SFB). Las células fueron cosechadas y centrifugadas a 2700 rpm durante 15 min. Posteriormente el botón celular fue resuspendido en Medio Basal de Célula Endotelial (EBM) (LONZA), suplementado con hidrocortisona, factor de crecimiento epidermal humano, extracto de cerebro bovino, anfotericina B-gentamicina y suero fetal bovino (LONZA). Dependiendo del experimento las células se colocaron directamente en cajas de cultivo de 24 ó 96 pozos o en cubreobjetos de vidrio colocados sobre los pozos de dichas cajas, incubándose a 37° C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez alcanzada la confluencia requerida, las células se utilizaron en los diferentes ensayos. La pureza del cultivo celular se estableció evaluando la morfología celular y la expresión del factor von Willebrand mediante una técnica inmunohistoquímica. (Ramírez-Sánchez *et al*, 2005). Las células fueron donadas amablemente por el Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez (Adscrito a la Escuela Superior de Medicina- IPN).

### Cepas micobacterianas

- Cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MTB) (virulenta), procedente de la ATCC.
- Micobacteria no tuberculosa: *Mycobacterium smegmatis* (no patógena), procedente de la ATCC.

- Cepa de *Mycobacterium abscessus* (micobacteria no tuberculosa), aislada de un caso clínico de endoftalmitis.

Las diferentes cepas de micobacterias se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 (DIFCO), adicionado de Tween 80 (SIGMA) y suplementado con enriquecimiento OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (DIFCO).

Para todos los ensayos las cepas bacterianas en fase logarítmica se lavaron tres veces por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min con HBSS. Después del último lavado, las micobacterias se resuspendieron nuevamente en HBSS y se transfirieron a tubos de vidrio de 13x100 estériles para ser ajustadas al tubo No.1 del nefelómetro de Mc Farland. De estas suspensiones se realizaron las diluciones respectivas para obtener la MOI deseada de cada ensayo.

### **Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante la reducción del NBT por microscopía óptica.**

Monocapas de HUVEC preparadas sobre cubreobjetos contenidos en placas de 6 pozos con una confluencia del 80 al 90%, se lavaron con HBSS para eliminar las células no adheridas. Las monocapas se infectaron con las cepas micobacterianas (MOI 10) y se incubaron durante 30 min y 150 min, cuando se cumplió cada uno de los tiempos de incubación se les adicionaron 500  $\mu$ l del reactivo de nitroazul de tetrazolio (NBT) (SIGMA-ALDRICH CHEMIE) a una concentración de 1.6 mg/ml. La reducción del NBT por los ROS se usa como un indicador directo de las especies reactivas del oxígeno que produce la célula. Subsecuente a la adición del NBT, las células se incubaron nuevamente durante 30 min. Posteriormente las monocapas se lavaron tres veces con HBSS y se fijaron con metanol frío durante 10 min, se dejaron secar a temperatura ambiente y por último se tiñeron durante 20 min con safranina, se lavaron hasta eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar para su posterior montaje en resina y su observación en el microscopio óptico. La reducción del reactivo se observó por la presencia de un precipitado morado en el citoplasma celular. La captura de imágenes se realizó con la ayuda de una cámara

digital (CANON POWERSHOT A620) adaptada a un microscopio óptico (AXIOSTAR PLUS, CARL ZEISS).

### **Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante la reducción del NBT por espectrofotometría.**

Monocapas de HUVEC preparadas en placas de 96 pozos con una confluencia del 90 al 100%, se lavaron tres veces con HBSS para eliminar las células no adheridas. A las monocapas se les adicionó 20  $\mu$ l del reactivo de NBT a una concentración de 1.6 mg/ml y se infectaron con las tres cepas de micobacterias (MOI 10) siguiéndose una cinética durante 10 min, 30 min, 1h, 2h, 3h y 4h. Transcurridos los tiempos de infección se les retiró el sobrenadante y se les adicionó una mezcla de dimetilsulfóxido (92.3  $\mu$ l) (DMSO) (AMERESCO) y KOH 2M (107.7 $\mu$ l), la cual produce la disolución del compuesto reducido del NBT. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (LABSYSTEMS MULTISKAN PLUS) a una longitud de onda de 630 nm.

Los resultados obtenidos se analizaron por ANOVA de una sola vía, aplicando la prueba de T- Student, bajo el modelo de Student-Newman-Keuls, que maneja un intervalo de confianza de  $p < 0.05$ . Para tal propósito se utilizó el programa SigmaStat v3.1

### **Determinación de los cambios en la distribución de los filamentos de actina por microscopía confocal,**

Previo a la infección de las monocapas, las micobacterias se tiñeron con isotiocianato de fluoresceína (FITC, 0.1mg/ml, SIGMA), diluido en solución reguladora de fosfatos (PBS; 0.15M, pH 7.2, SIGMA) y se incubaron a 37°C por 30 min, posteriormente se lavaron 5 veces por centrifugación para eliminar el exceso de FITC. Se ajustaron al tubo no. 1 del nefelómetro de McFarland y se diluyeron hasta alcanzar una MOI de 10.

Las monocapas de HUVEC preparadas sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos con una confluencia del 80 al 90%, se lavaron con HBSS para eliminar las células

no adheridas. Las monocapas se infectaron con las cepas micobacterianas teñidas durante 1h y 3h y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, transcurrido el tiempo de incubación se lavaron tres veces con PBS para eliminar las bacterias extracelulares y se fijaron con paraformaldehído (SIGMA) al 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron tres veces con PBS. Para la tinción de filamentos actina, las monocapas se cubrieron con faloidina rodaminada en PBS (80ng/cubreobjeto), se incubaron durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 4 veces con PBS para eliminar el exceso de la faloidina. Por último los cubreobjetos conteniendo las monocapas celulares se montaron sobre portaobjetos con solución Vectashield (VECTOR, LABORATORIES) para su posterior observación en un microscopio confocal (LSM5 PASCAL, ZEISS). Las muestras se analizaron en modo de multitracking, para el FITC se empleó el filtro 488-530nm y para la rodamina el filtro 543-560nm.

### **Determinación de cambios ultraestructurales por microscopía electrónica de barrido.**

Las monocapas de HUVEC preparadas sobre cubreobjetos redondos contenidos en placas de 6 pozos con una confluencia del 80 al 90%, se lavaron con HBSS para eliminar las células adheridas. Las monocapas se infectaron con las cepas micobacterianas durante 1h y 3h y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, transcurrido el tiempo de incubación las monocapas se lavaron tres veces con HBSS para eliminar las bacterias extracelulares y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de Sorensen durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron lavados con solución de Sorensen, adicionada con sacarosa (SIGMA) al 1% y cloruro de calcio (SIGMA) al 1%. Después se realizó una postfijación con tetraóxido de osmio al 1% durante 2h. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con la solución de Sorensen y posteriormente se realizó una deshidratación de las monocapas con alcohol etílico de manera gradual empezando con alcohol al 10% por 10 min, hasta finalizar con alcohol al 100% durante 20 min por tres veces. Las

muestras se sometieron a un secado final al punto crítico con CO<sub>2</sub> (SAMDR1 780B) durante 1h y finalmente los cubreobjetos conteniendo las monocapas se montaron sobre portaobjetos especiales y se cubrieron con oro (DENTON VACUUM) para su posterior observación en el microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM-5800LV).

### **Determinación de la vía endocítica de las micobacterias a las HUVEC.**

Las monocapas de HUVEC preparadas en placas de 24 pozos con una confluencia del 90 al 100%, se lavaron tres veces con HBSS para eliminar las células no adheridas. Se usaron los inhibidores wortmanina, la cual inhibe a la fosfatidilinositol-3-cinasa, a una concentración de 1 μM y 0.5 μM y amilórido, el cual es un inhibidor de la macropinocitosis por interferir con el intercambio de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, a una concentración de 50 μM y 100 μM. A las monocapas se les realizó un pre-tratamiento con cada una de las concentraciones de los inhibidores por 30 min. Posteriormente las monocapas se infectaron con las cepas micobacterianas durante 3h en presencia de los inhibidores y se incubaron a 37° C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación las monocapas se lavaron tres veces con HBSS para eliminar las bacterias extracelulares y se les adicionó el medio de cultivo EBM suplementado con amikacina a una concentración de 20 μg/ml incubándose durante 1 h; posteriormente se retiró el medio y las monocapas se lavaron una vez más y se lisaron con solución de Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) al 0.25% por 5 min y se neutralizaron con albúmina sérica bovina estéril (US BIOLOGICAL) al 5%, los lisados se congelaron hasta su siembra. Para determinar las unidades formadoras de colonias, los lisados se sembraron en agar Middlebrook 7H11(DIFCO) con enriquecimiento OADC. 10 μl de los lisados diluidos 1:10, 1:100 y 1:1000 en HBSS, se inocularon en el agar Middlebrook, permitiendo que se absorbiera a totalidad. Una vez sucedido esto, las placas se incubaron a 37° C hasta obtener las unidades formadoras de colonias (UFC).

## RESULTADOS

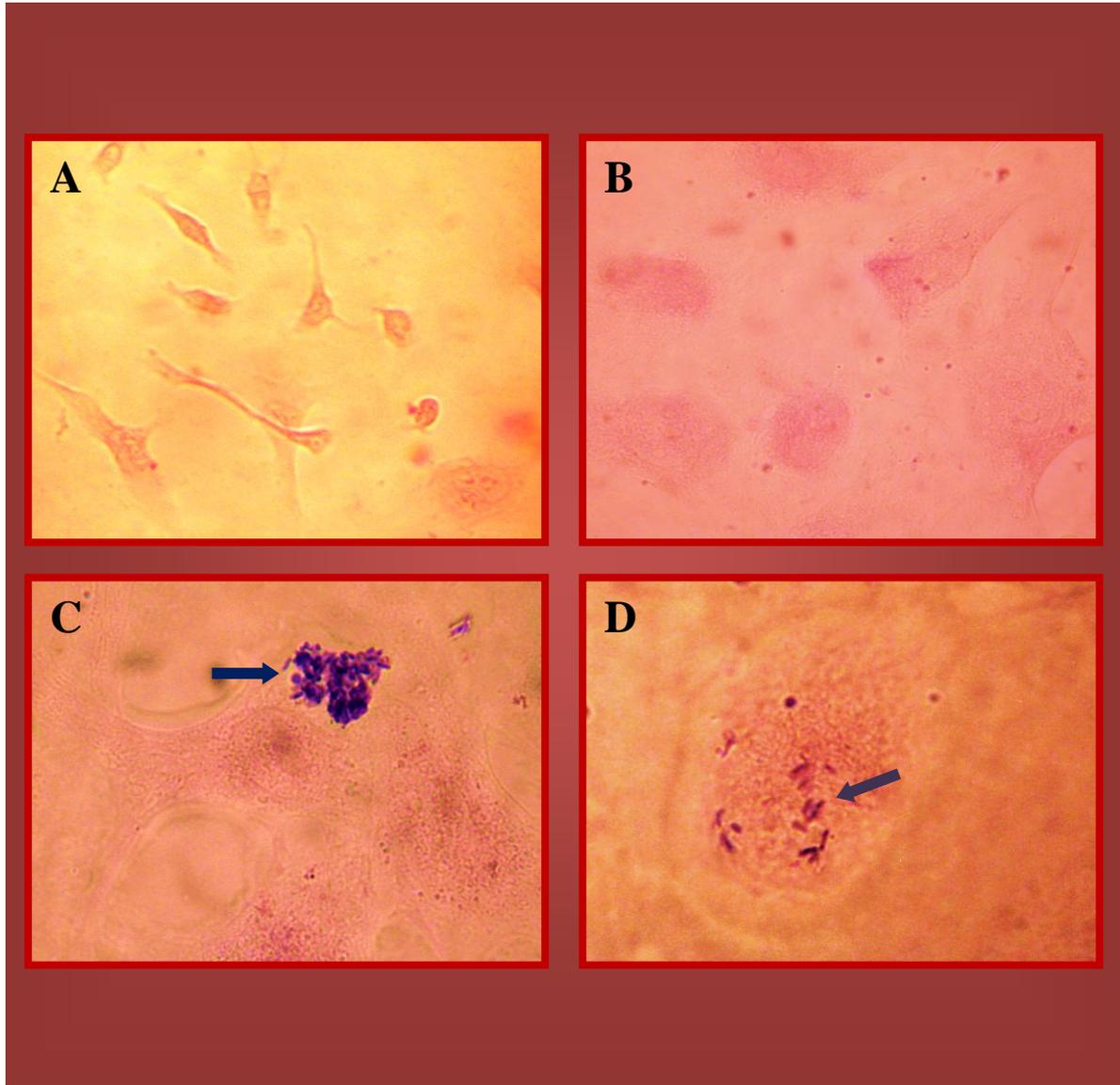
### **Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante la reducción del NBT por microscopía óptica.**

En la infección con la cepa de *Mycobacterium smegmatis* se observó que las células produjeron una cantidad de ROS muy evidente gracias a la formación de un precipitado de color azul llamado formazán que tiñó a las micobacterias intracelulares y también extracelulares, sugiriendo una gran actividad de ROS inducida por dicha infección (figura 11).

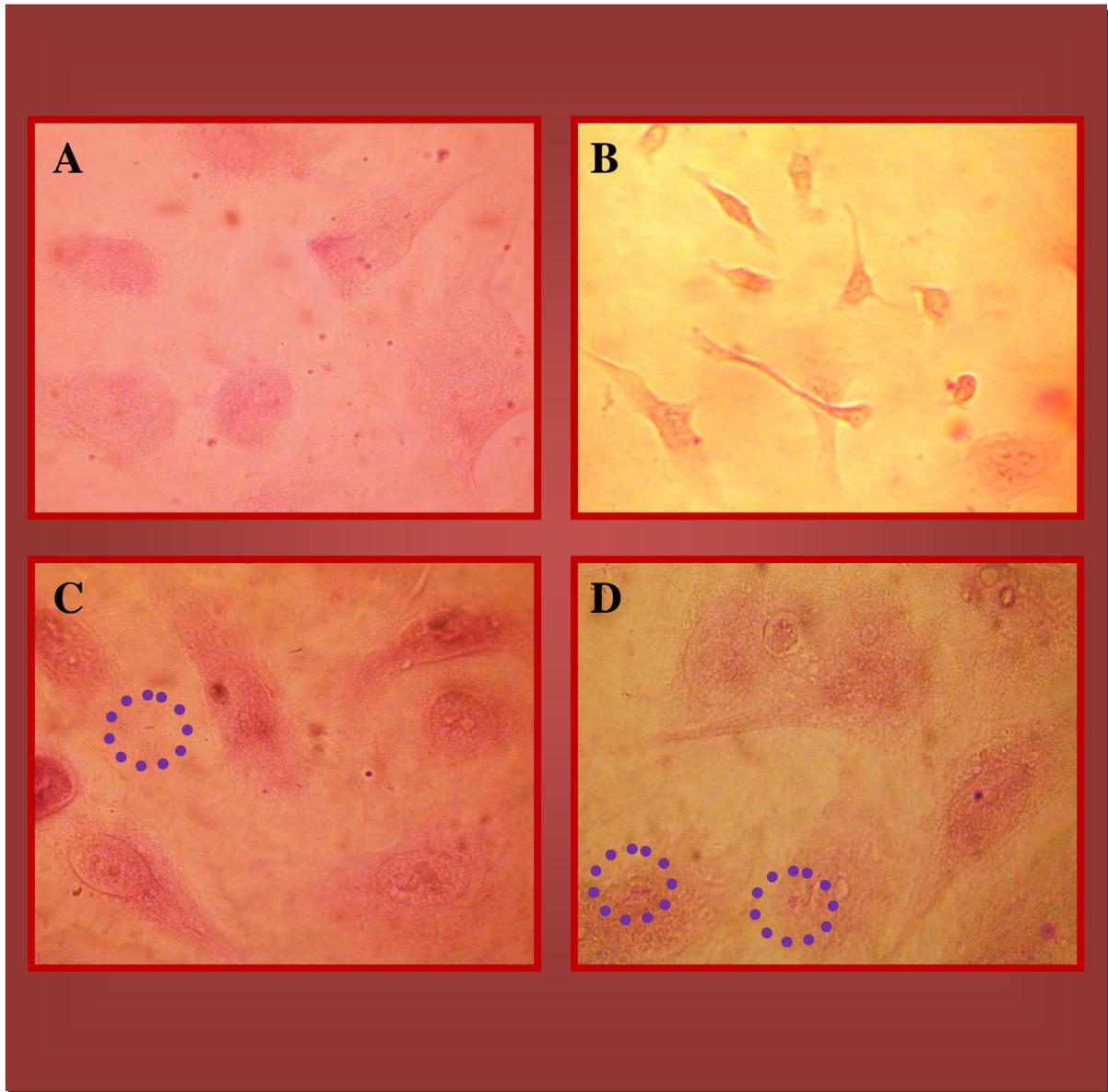
En la infección por *Mycobacterium abscessus*, se encontró que esta cepa casi no indujo una producción de ROS por las HUVEC, fue difícil observar micobacterias teñidas en el citoplasma de la célula, tampoco se observaron extracelularmente y las que se lograron observar no se mostraron teñidas por el formazán que se produce gracias a la formación de ROS (figura 12).

En el caso de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* se observó que esta cepa indujo una producción de ROS muy discreta en comparación con lo que se observó con la infección por *M. smegmatis*, pero en mayor grado en comparación con lo sucedido en la infección por *M. abscessus*, se pudieron observar algunas bacterias extracelulares y en el citoplasma escasamente teñidas por el formazán, sugiriendo que hay producción de ROS pero ésta es muy discreta (figura 13).

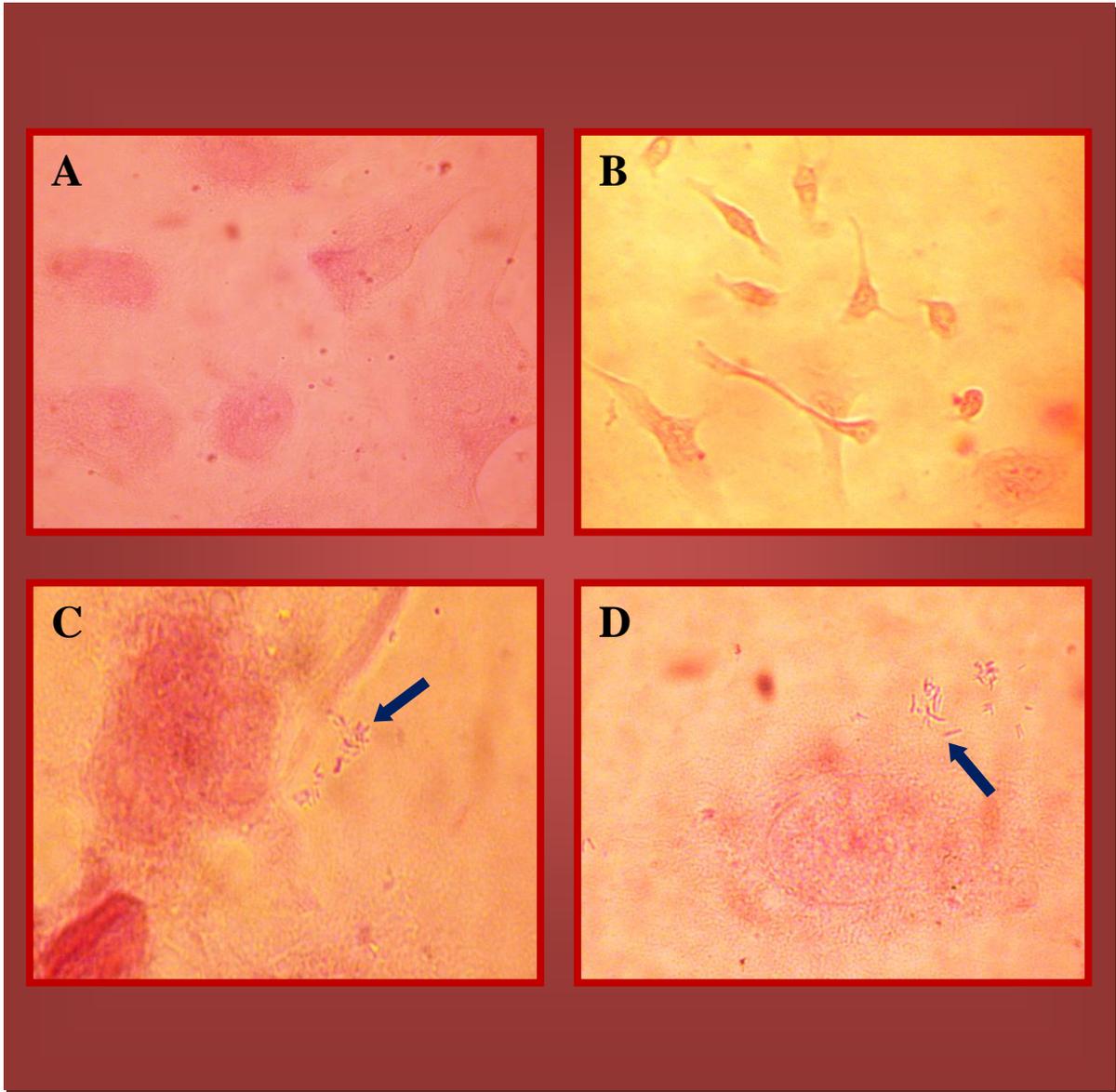
En la figura 14 se muestra un comparativo de la infección de las HUVEC con cada una de las micobacterias, observándose que la cepa de *M. smegmatis* fue la que indujo una gran cantidad de ROS, *M. tuberculosis* fue la cepa que indujo una producción discreta de ROS, y por último la cepa de *M. abscessus* casi no indujo una producción de ROS.



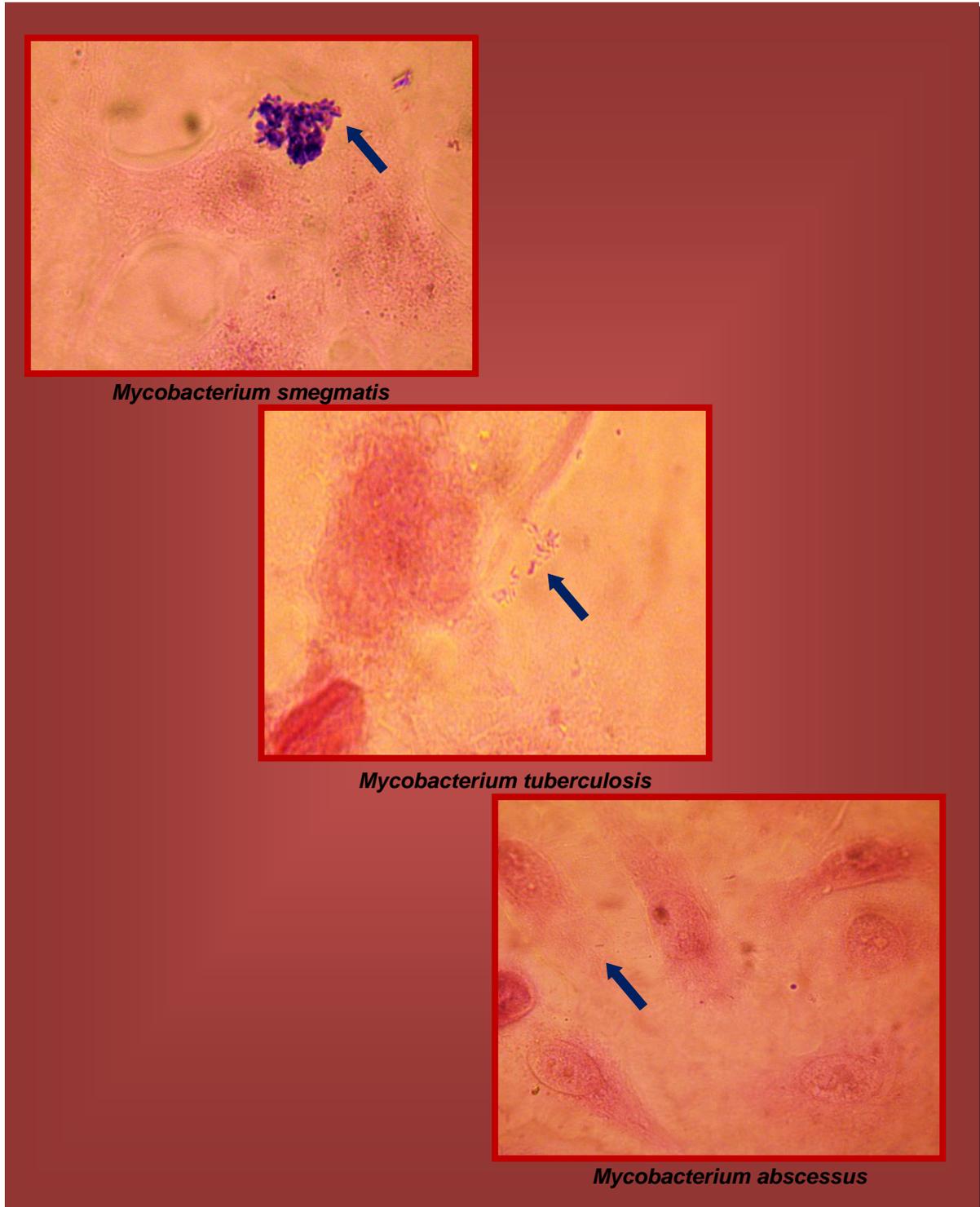
**Figura 11. Fotografías de la reducción de NBT por las HUVEC infectadas por *M. smegmatis*. A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas. Se encontraron células con bacterias intra y extracelulares teñidas por el formazán, las micobacterias se observaron presentes en la región citoplasmática y zona perinuclear (flechas). (1000X).**



**Figura 12. Fotografías de la reducción de NBT por las HUVEC infectadas por *M. abscessus*. A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas. Se observaron células con escasas bacterias sin teñir tanto en el citoplasma como extracelulares (círculo punteado). (1000X).**



**Figura 13. Fotografías de la reducción de NBT por las HUVEC infectadas por *M. tuberculosis*. A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas. Se observaron células con bacterias extracelulares muy pobremente teñidas por el formazán (flechas). (1000X).**



**Figura 14. Fotografías comparativas de la reducción de NBT por las HUVEC infectadas por las tres cepas micobacterianas.** La cepa de *M. smegmatis* fue la que indujo una gran cantidad de ROS, *M. tuberculosis* indujo una producción discreta de ROS, y por último la cepa de *M. abscessus* casi no indujo una producción de ROS (flechas). (1000X).

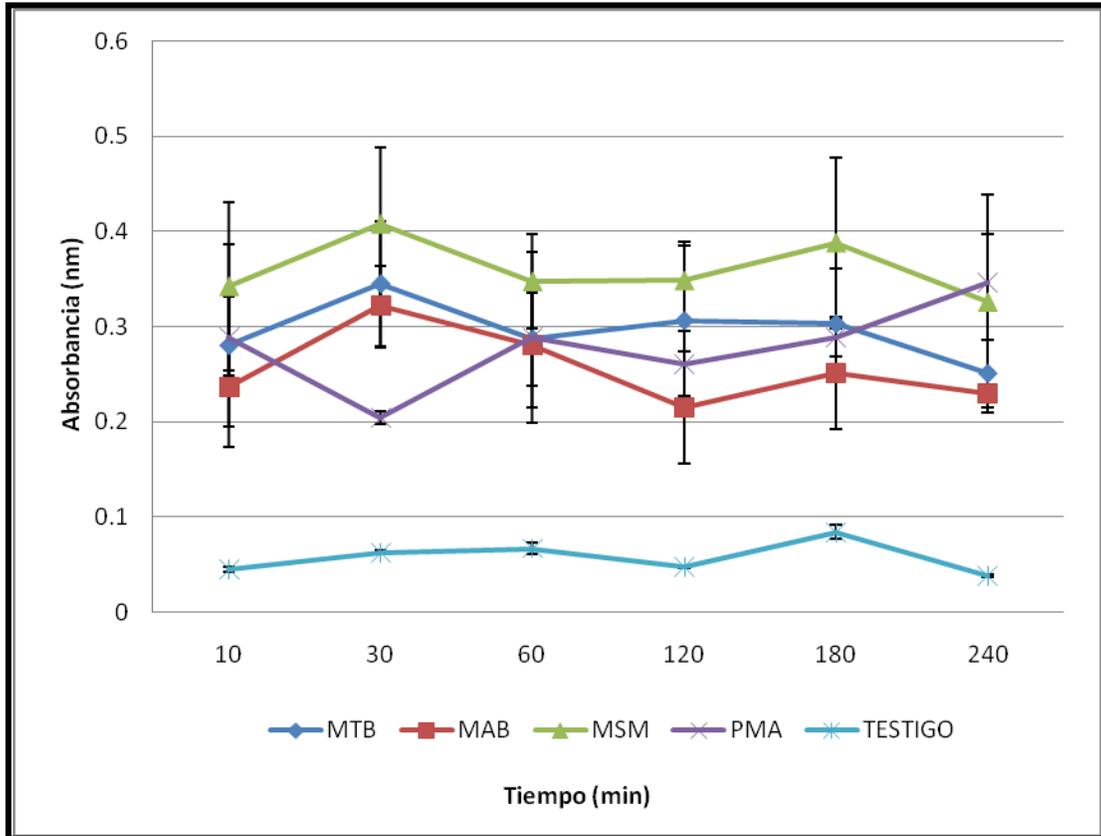
## **Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante la reducción del NBT por espectrofotometría.**

De manera constitutiva las células sin infectar no presentaron producción de ROS. Cuando las HUVEC se infectaron con la suspensión de *M. abscessus*, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* desde los primeros 10 min de infección se comenzó a observar la producción de ROS. La producción de ROS por las HUVEC inducida por la infección con *M. smegmatis* fue la que alcanzó los niveles mayores durante todo el tiempo de observación. La siguiente micobacteria inductora de la producción de ROS fue *M. tuberculosis* y por último *M. abscessus* (figura 15).

Las células infectadas con las tres cepas y las células tratadas con PMA tuvieron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo ( $p < 0.001$ ).

La cepa de *M. smegmatis* fue la única que indujo una producción de ROS estadísticamente significativa cuando se comparó con las cepas de *M. abscessus* y *M. tuberculosis* y también con respecto al PMA ( $p < 0.05$ ).

Las células tratadas con la cepa de *M. tuberculosis* no registraron diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon con las células tratadas con *M. abscessus* y el PMA. Las células tratadas con *M. abscessus* tampoco mostraron diferencia estadísticamente significativa con respecto a las tratadas con PMA.



**Figura 15. Producción de ROS por las HUVEC infectadas con las tres cepas micobacterianas.** Las células tratadas con *M. smegmatis* (MSM) mostraron diferencia estadísticamente significativa en comparación con las otras células tratadas con *M. tuberculosis* (MTB), *M. abscessus* (MAB) y el PMA. *M. tuberculosis*, *M. abscessus* y el PMA no mostraron diferencia significativa entre ellas. Todas las células tratadas con las cepas micobacterianas y el PMA mostraron diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo. Cada punto representa el promedio de cuatro experimentos independientes ( $p < 0.05$ ).

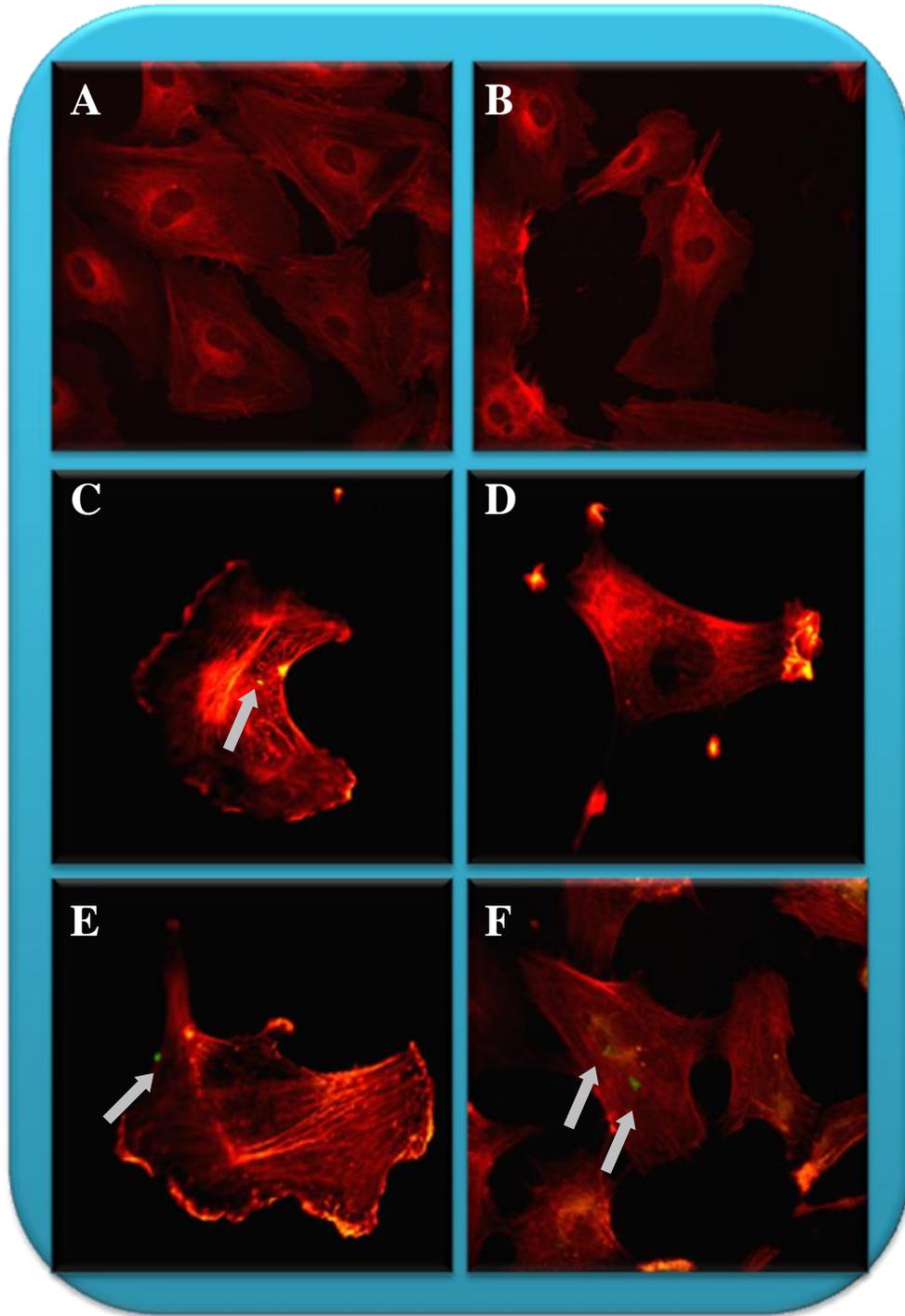
## **Determinación de los cambios en la distribución de los filamentos de actina por microscopía confocal.**

En las células infectadas por *M. smegmatis*, se encontró que las micobacterias que se interiorizaron durante la primera hora de infección se localizaron sobre el citoplasma celular y sólo hubo cambios discretos en la estructura de las células, casi no se observó pérdida de distribución de los filamentos de actina, sólo algunas zonas con colocalización (zonas amarillas). A las 3h de infección se apreció una mayor cantidad de micobacterias interiorizadas y localizadas sobre el citoplasma celular y la región perinuclear, a este tiempo de infección sólo se observaron cambios muy discretos en el rearreglo del citoesqueleto y zonas con colocalización (figura 16).

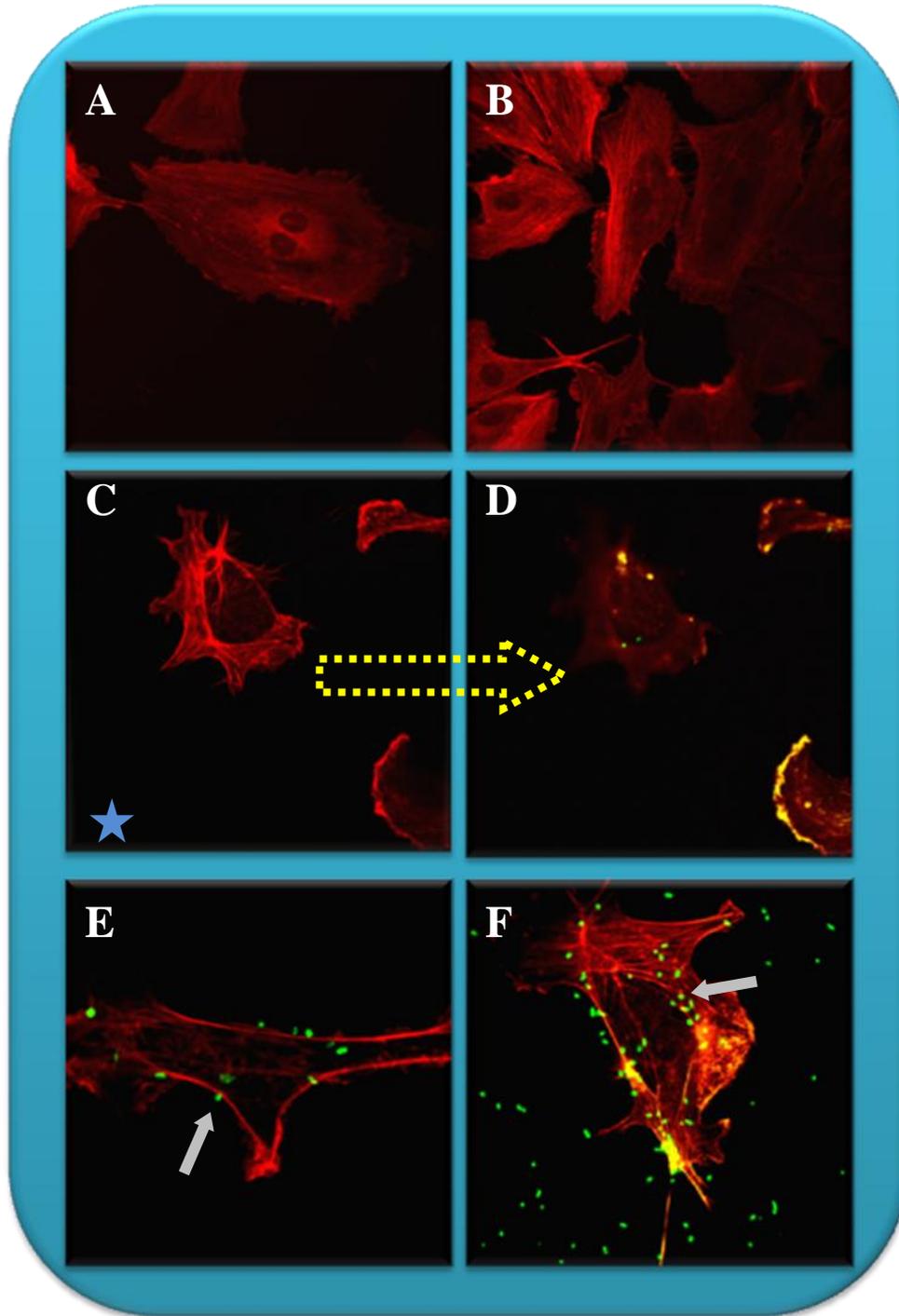
En la infección con *M. abscessus* se observó que durante la primera hora indujo la formación de lamelipodios, perdiéndose totalmente la distribución de los filamentos de actina así como también la morfología natural de la célula endotelial, en general mostró un importante rearreglo del citoesqueleto, las micobacterias interiorizadas se localizaron sobre el citoplasma a diferentes niveles y la región perinuclear, y también se lograron observar zonas de colocalización. A las 3h de infección, se detectó un importante cambio en la estructura del citoesqueleto de la célula con gran cantidad de micobacterias interiorizadas y localizadas en el citoplasma y región perinuclear, así como también zonas de colocalización (figura 17).

La infección durante 1h con *M. tuberculosis* indujo cambios muy significativos en el rearreglo del citoesqueleto de tal forma que llega a perderse la morfología celular y se pudo observar a micobacterias localizadas en diferentes puntos de las células, así como también zonas con colocalización. Las células endoteliales infectadas durante 3h con MTB, mostraron cambios estructurales muy importantes en las HUVEC perdiéndose completamente la distribución de los filamentos de actina y también micobacterias interiorizadas, de igual manera se observaron algunas zonas con colocalización (figura 18).

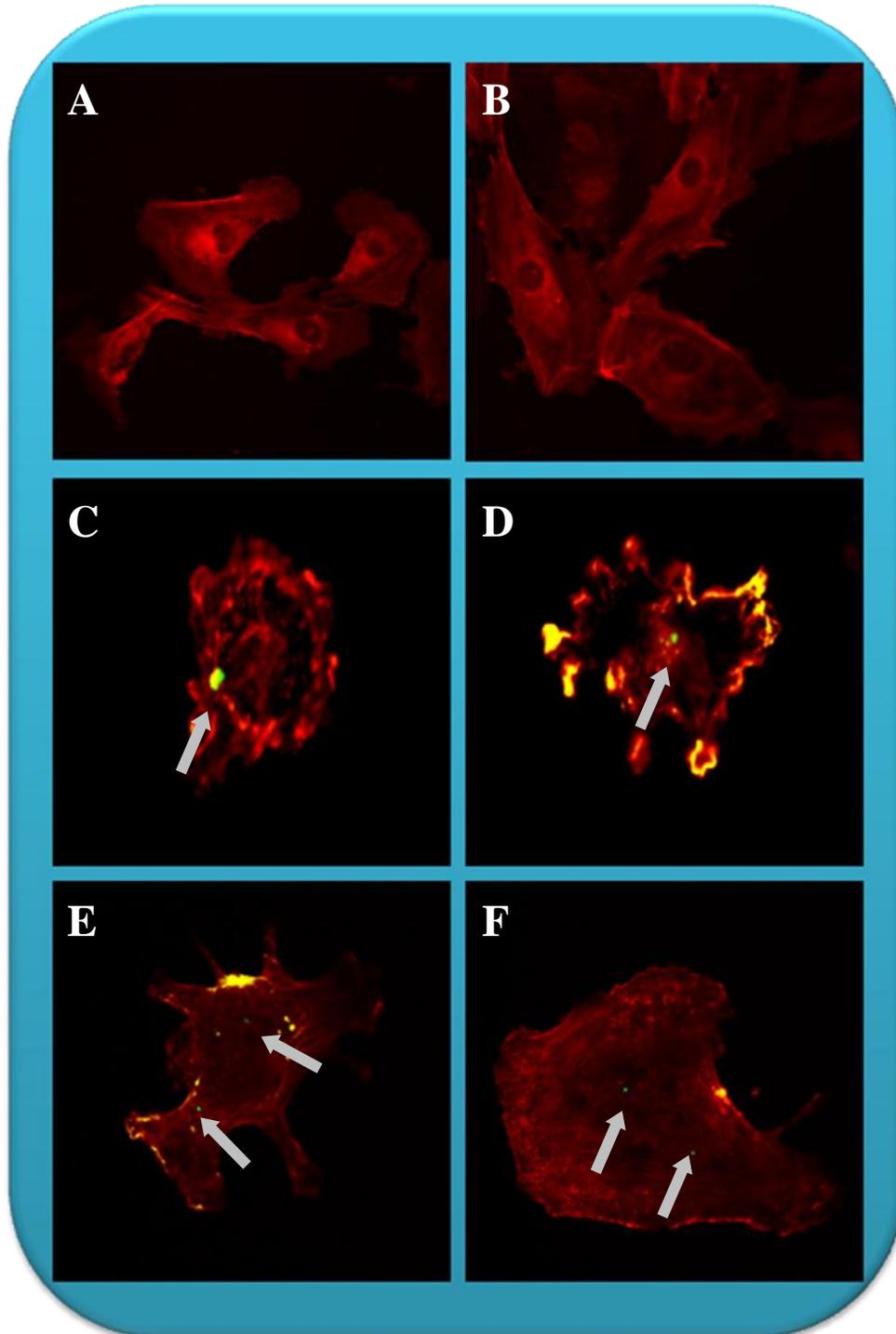
En la figura 19 se muestran una imágenes comparativas los rearreglos del citoesqueleto por la infección con las tres cepas micobacterianas.



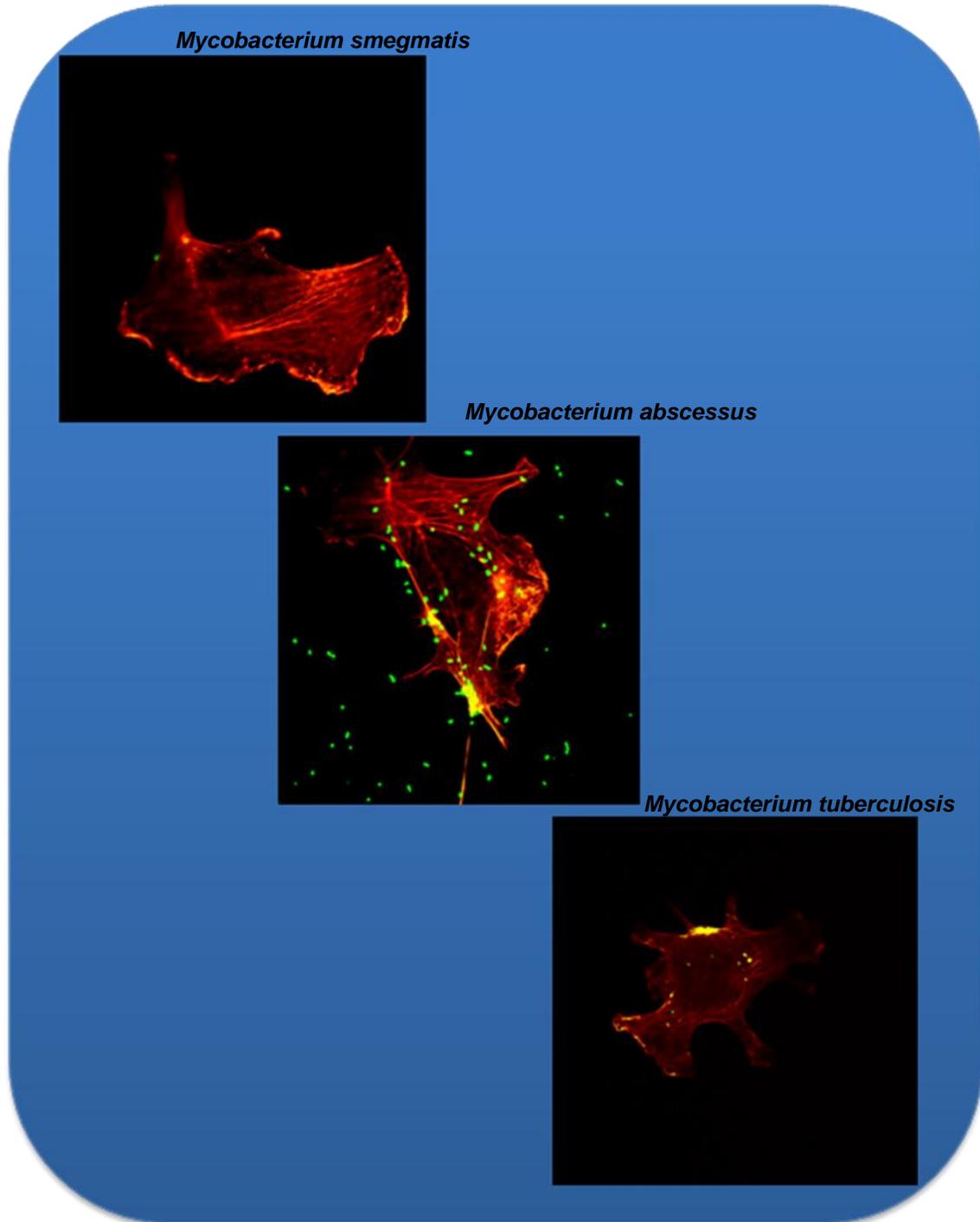
**Figura 16. Imágenes del citoesqueleto de las HUVEC infectadas por *M. smegmatis*.** A, B) HUVEC sin infectar con aspecto plano y la distribución de los filamentos de actina sobre todo el citoplasma celular. C, D) HUVEC infectadas durante 1h. Hay pérdida discreta de la distribución de los filamentos de actina sobre todo en la periferia celular, zonas con colocalización (zonas amarillas) y las micobacterias en el citoplasma celular (flecha). E, F) HUVEC infectadas durante 3h. Se encontró la pérdida discreta de la distribución de los filamentos de actina así como zonas con colocalización y las micobacterias en el citoplasma celular y la región perinuclear (flecha). (1000X).



**Figura 17. Imágenes del citoesqueleto de las HUVEC infectadas por *M. abscessus*.** A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas durante 1h. Se observó la pérdida de la distribución de los filamentos de actina, las micobacterias se localizaron en el citoplasma celular a diferentes niveles (foto con estrella) y la región perinuclear (flecha) y algunas zonas de colocalización (zonas amarillas). E, F) HUVEC infectadas durante 3h. Hay pérdida en la distribución de los filamentos de actina así, se observó una gran cantidad de micobacterias interiorizadas localizadas en el citoplasma celular y la región perinuclear (flecha) y algunas zonas de colocalización. (1000X).



**Figura 18. Imágenes del citoesqueleto de las HUVEC infectadas por *M. tuberculosis*.** A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas durante 1h. Se encontró pérdida de la distribución de los filamentos de actina, micobacterias interiorizadas localizadas en diferentes puntos de la célula (flecha) y algunas zonas de colocalización (zonas amarillas). E, F) HUVEC infectadas durante 3h. Hay pérdida de la distribución de los filamentos de actina, micobacterias interiorizadas localizadas en diferentes puntos de la célula (flecha) y algunas zonas de colocalización. (1000X).



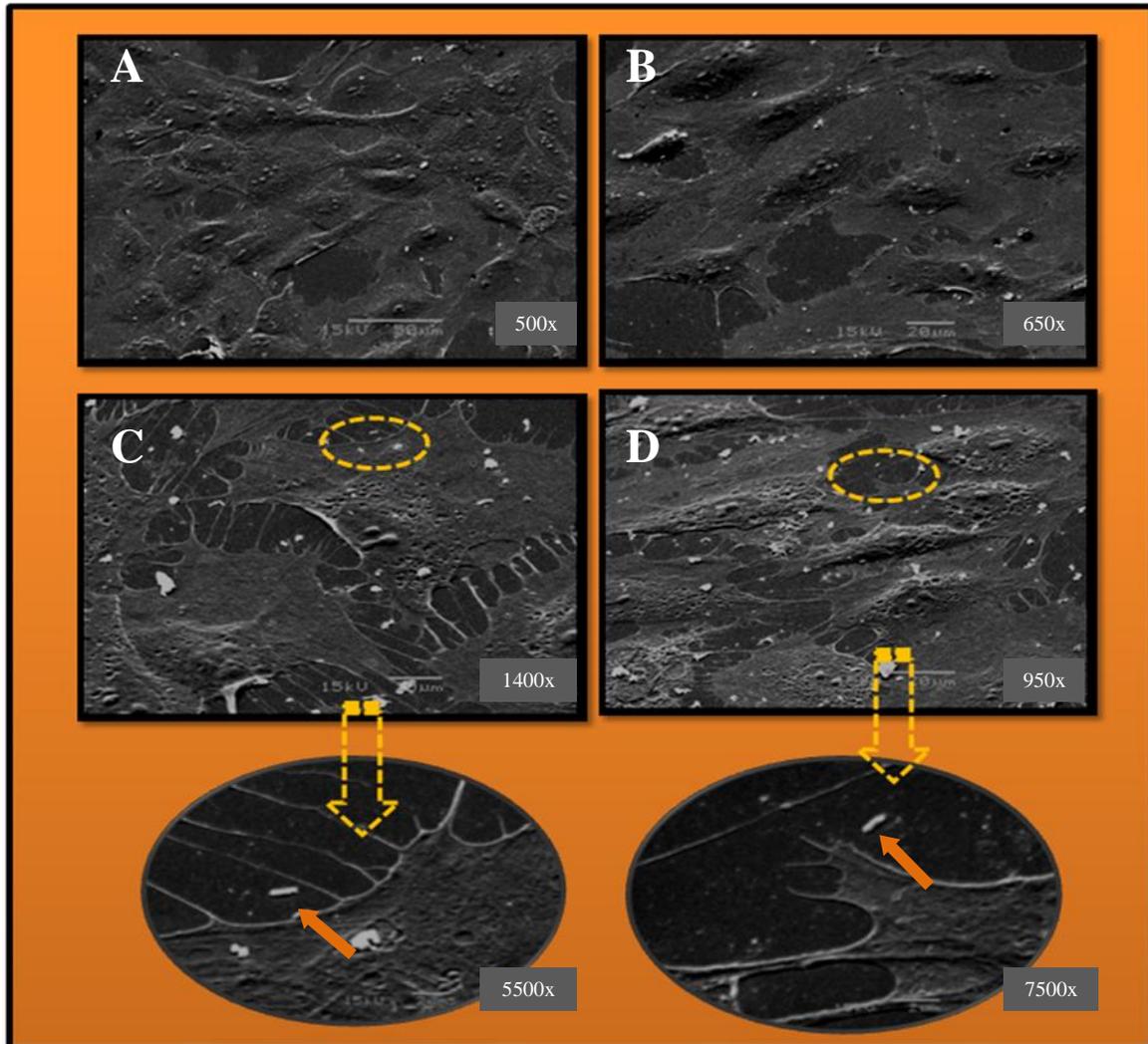
**Figura 19. Imágenes comparativas de los rearrreglos del citoesqueleto inducidos por la infección con las tres cepas micobacterianas. *M. smegmatis* es la cepa que indujo un discreto rearrreglo del citoesqueleto sin comprometer la morfología celular, *M. tuberculosis* indujo importantes rearrreglos del citoesqueleto al igual que *M. abscessus* a tal grado de comprometer la estructura celular. (1000X).**

## **Determinación de los cambios ultraestructurales por microscopía electrónica de barrido.**

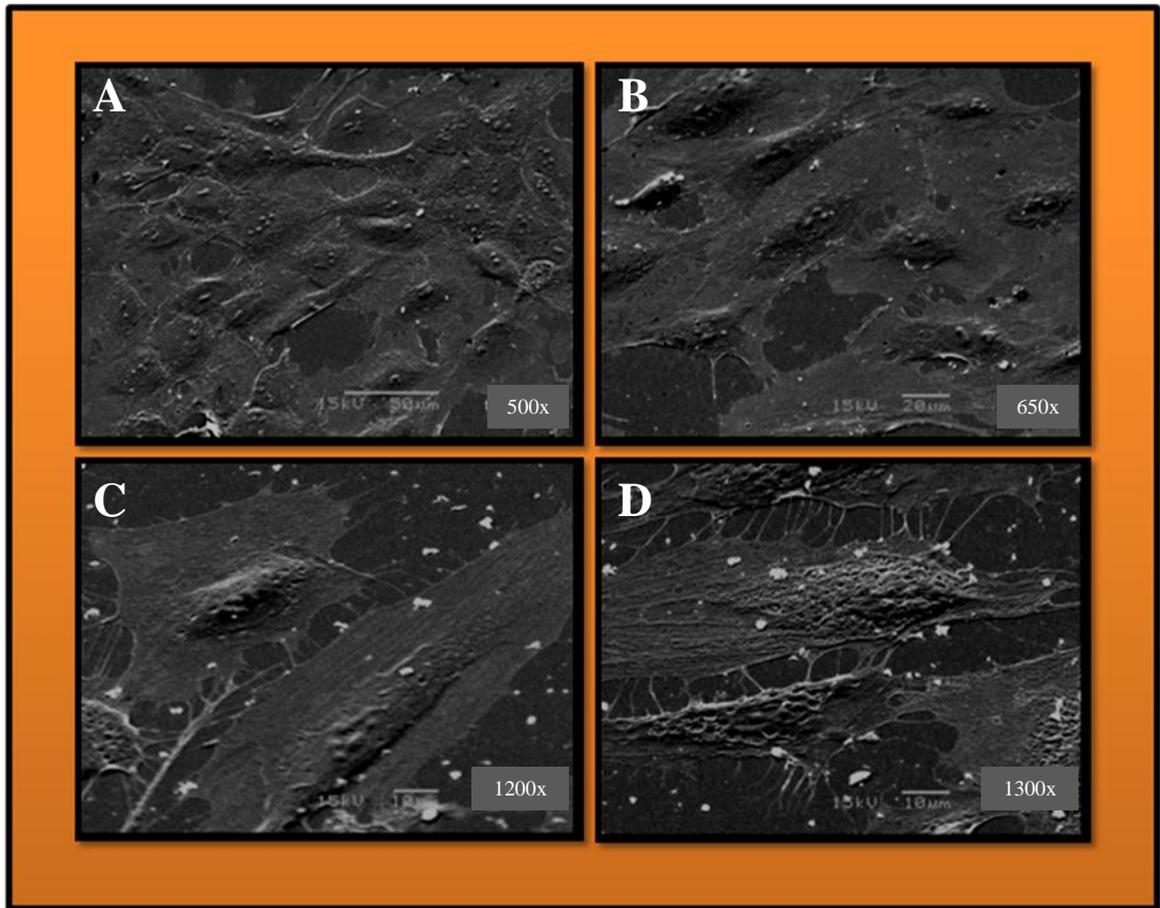
Durante la primera hora de infección con *M. smegmatis*, hubo una muy discreta producción de lamelipodios membranales lo que ocasionó que la estructura de la célula quedara casi intacta, además se observaron micobacterias extracelulares que parecieran a punto de interiorizarse (figura 20). A las 3h de infección la gran mayoría de las células analizadas estaban produciendo lamelipodios membranales sugestivos de una interiorización, sin que éstos comprometieran la morfología de la célula endotelial y su adherencia a la superficie, solo muestran además de las prolongaciones, un pequeño aumento en la zona perinuclear (figura 21).

La infección por *M. abscessus* indujo cambios importantes en la estructura celular estimulando prolongaciones membranales de gran longitud en los bordes y de menor longitud en la zona apical, además la célula mostró un aumento importante en el volumen de la zona perinuclear y pérdida de la adherencia a su superficie (figura 22). A las 3h de infección se pudo observar que la estructura celular estaba totalmente comprometida, las células ahora no se mostraron más planas sino formando grandes prolongaciones membranales (lamelipodios) inducidas por la micobacteria, hubo una pérdida importante de la adherencia y aumento importante de volumen en la zona perinuclear (figura 23).

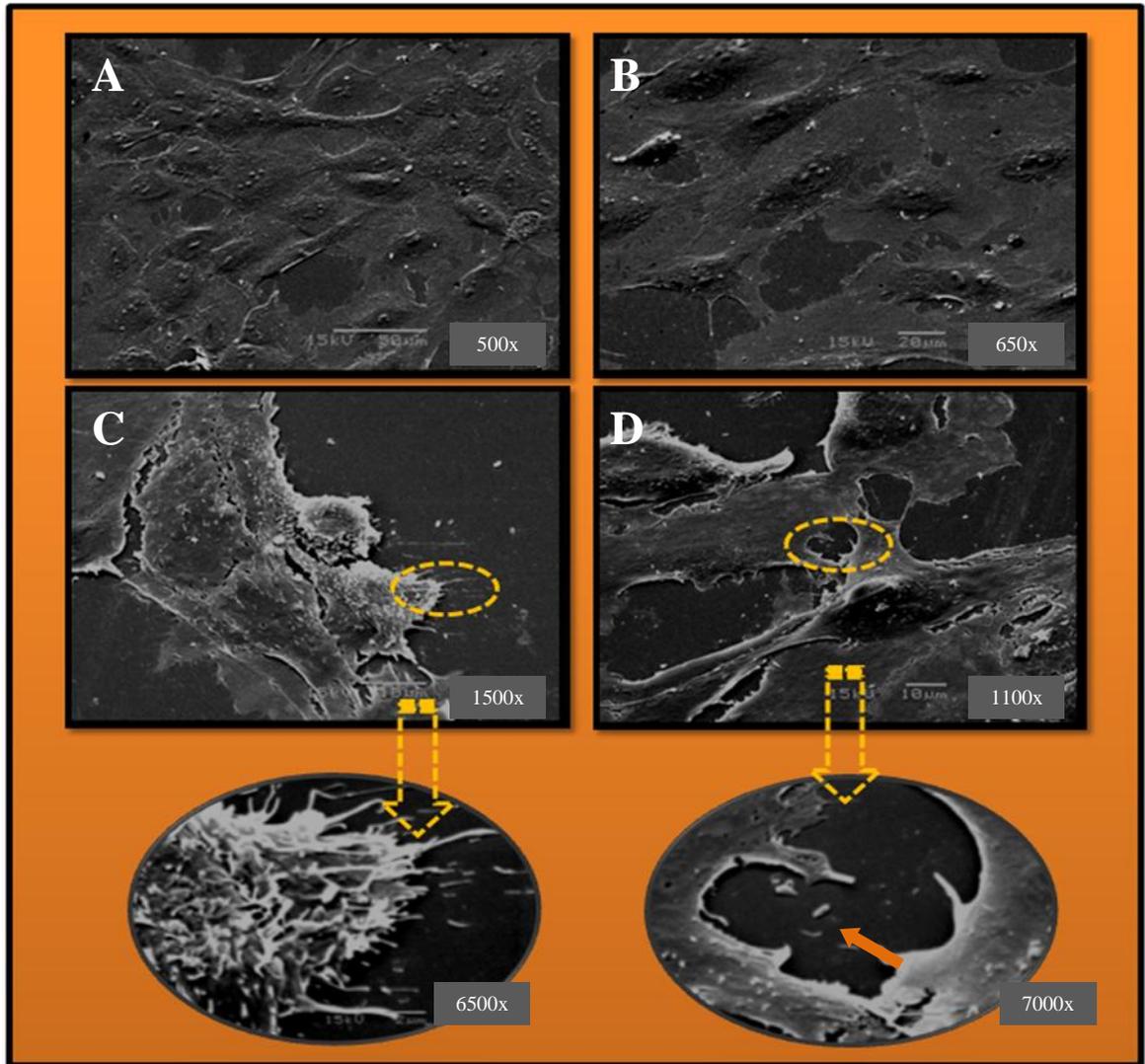
En la infección por *M. tuberculosis* se apreció que a 1h de infección indujo la formación de prolongaciones aunque de una manera más discreta comparándolo con lo sucedido con *M. abscessus*, los cambios en la morfología celular no fueron muy importantes, aún se observó adherencia a la superficie y se lograron observar micobacterias (figura 24). A las 3h de infección con esta micobacteria (figura 25), fueron muy evidentes los cambios inducidos, ya que en comparación con la primera hora, aquí si hubo una pérdida total de la morfología celular y su adherencia, además de mostrar grandes prolongaciones membranales tanto en los bordes como el zona apical, y algunas micobacterias teniendo contacto con las células endoteliales. En la figura 26 se muestra un comparativo de la infección con las tres cepas.



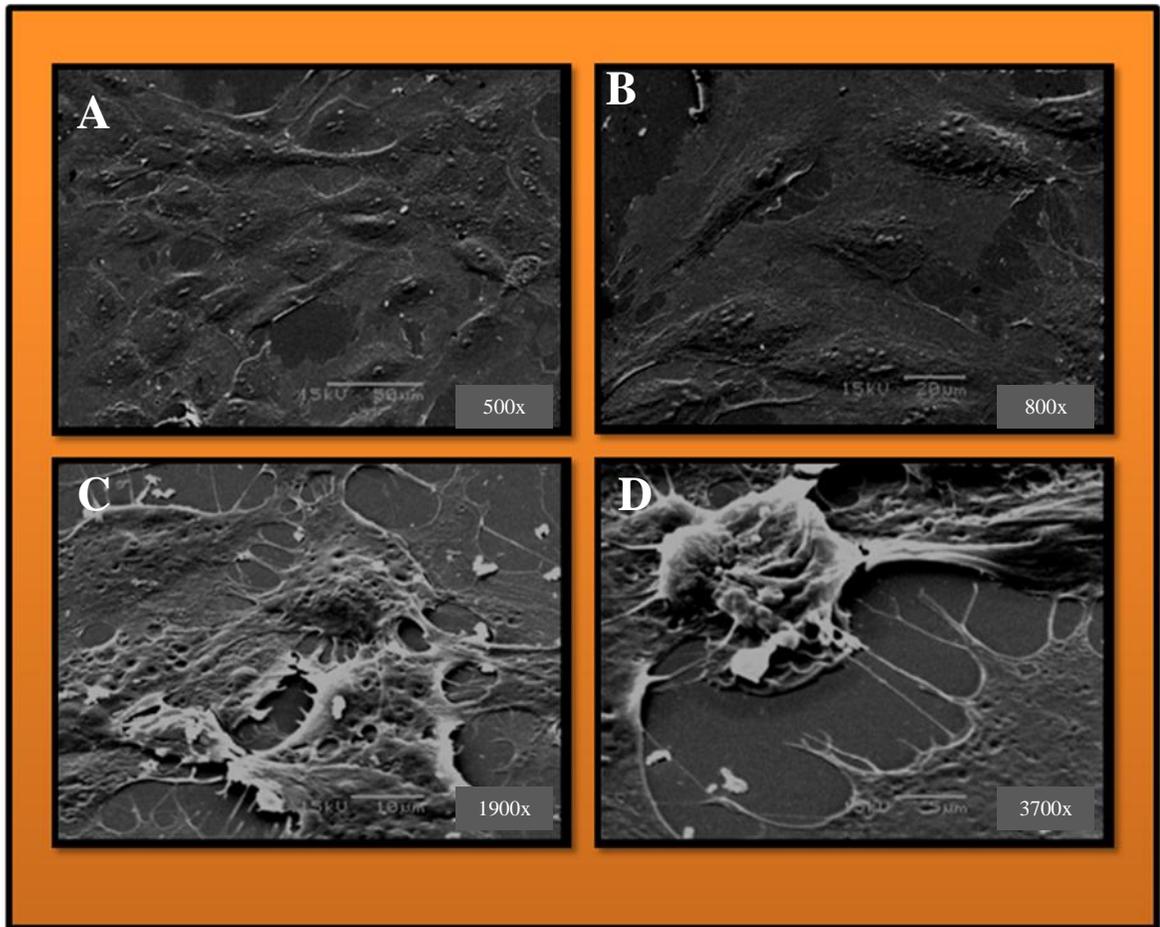
**Figura 20. Micrografías de las HUVEC infectadas por *M. smegmatis*.** A, B) HUVEC sin infectar con aspecto plano y adherente. C, D) HUVEC infectadas durante 1h. Se encontraron micobacterias extracelulares, las células aún se mostraron adherentes con discretas prolongaciones membranales (flechas naranjas).



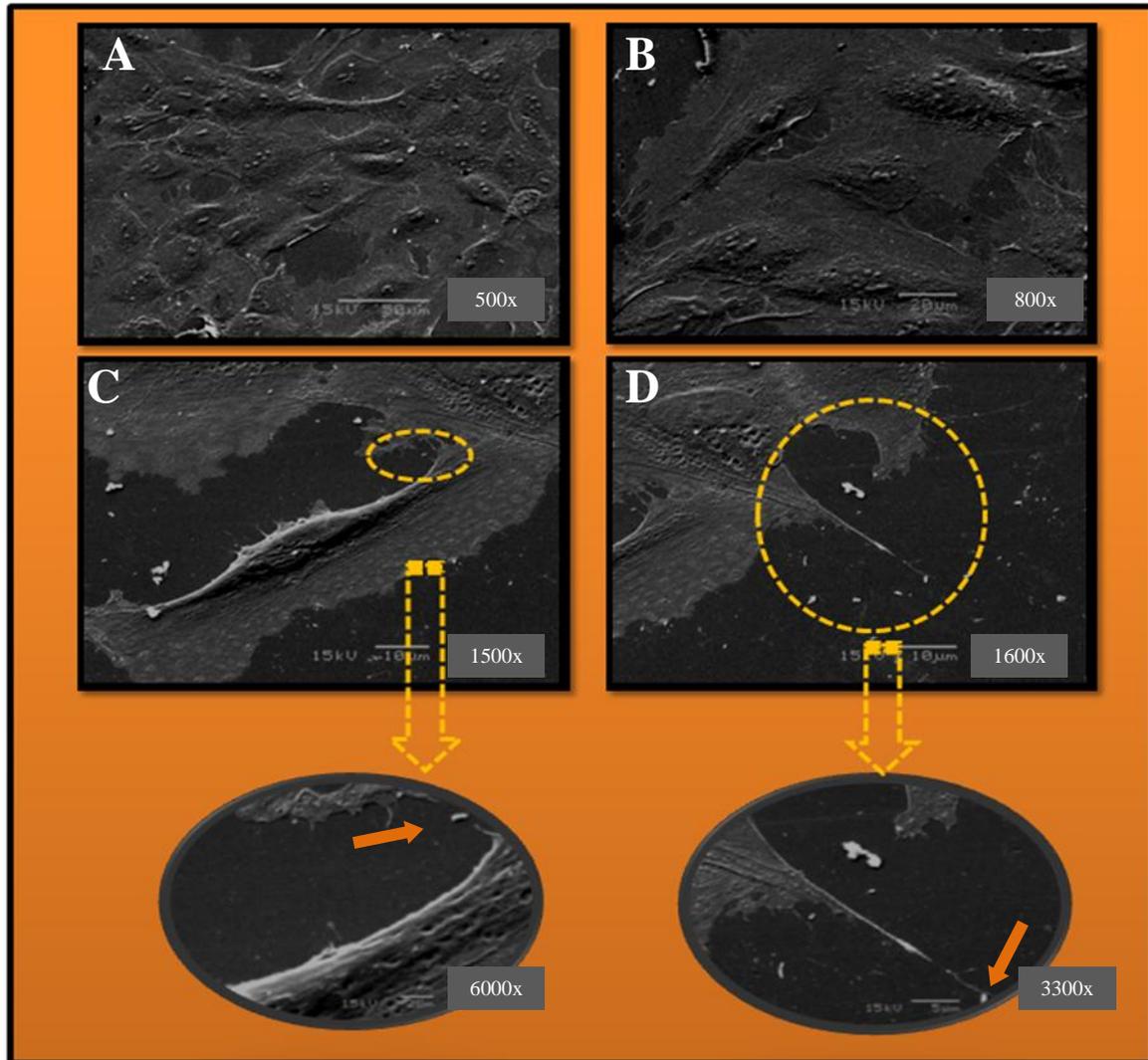
**Figura 21. Formación de los lamelipodios membranales inducidos por *M. smegmatis*.** A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas durante 3h. Las células se observaron adherentes con discretas prolongaciones membranales sin comprometer importantemente la morfología celular, además de presentar un pequeño aumento en el volumen de la zona perinuclear.



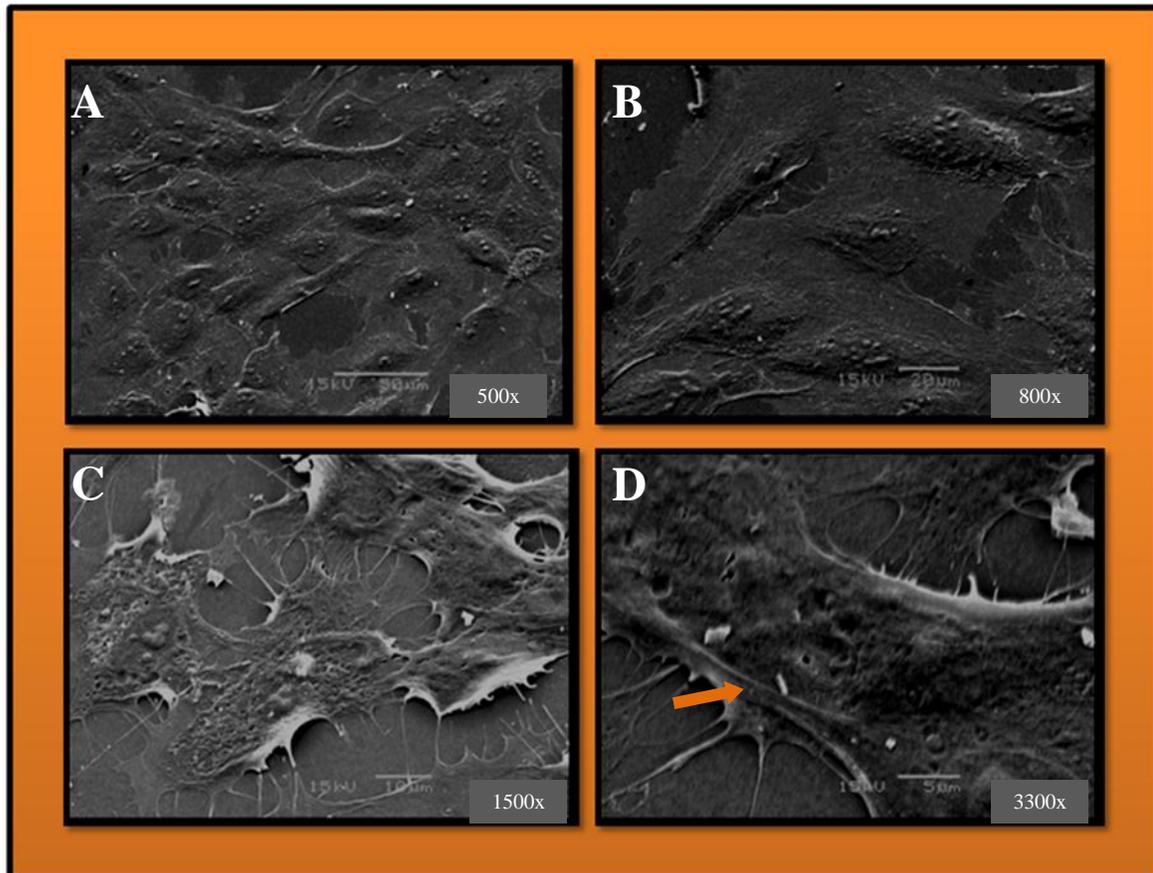
**Figura 22. Micrografías de las HUVEC infectadas por *M. abscessus*.** A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas durante 1h. Las células se encontraron con grandes extensiones membranales tanto en los bordes como en la zona apical, y con pérdida de adherencia y morfología. Se observaron micobacterias extracelulares (flecha naranja).



**Figura 23. Formación de los lamelipodios membranales inducidos por *M. abscessus*.** A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas durante 3h de infección. Hubo pérdida total de la adherencia y morfología celular. Las células mostraron grandes extensiones membranales tanto en los bordes como en la zona apical.



**Figura 24. Micrografías de las HUVEC infectadas por *M. tuberculosis*.** A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas durante 1h. Las células se apreciaron con extensiones citoplasmáticas discretas, aún mostraban su adherencia y morfología característica. Algunas micobacterias se lograron observar en contacto con las células endoteliales (flechas naranja).



**Figura 25. Formación de los lamelipodios membranales inducidos por *M. tuberculosis*.** A, B) HUVEC sin infectar. C, D) HUVEC infectadas durante 3h. Se encontraron a las células con grandes extensiones membranales, así como la pérdida total de su morfología y adherencia. Algunas micobacterias se lograron observar en contacto con las células endoteliales (flecha naranja).

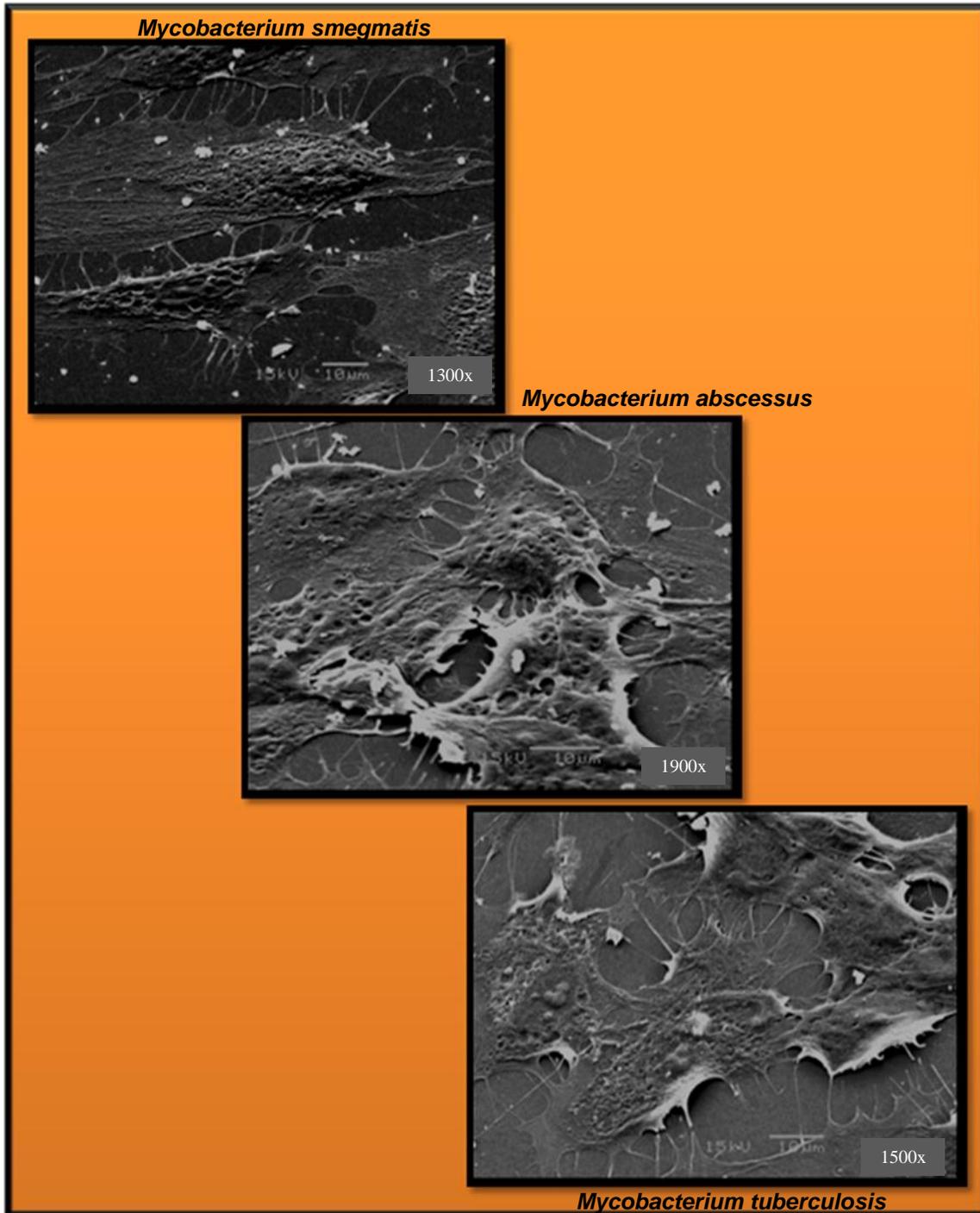
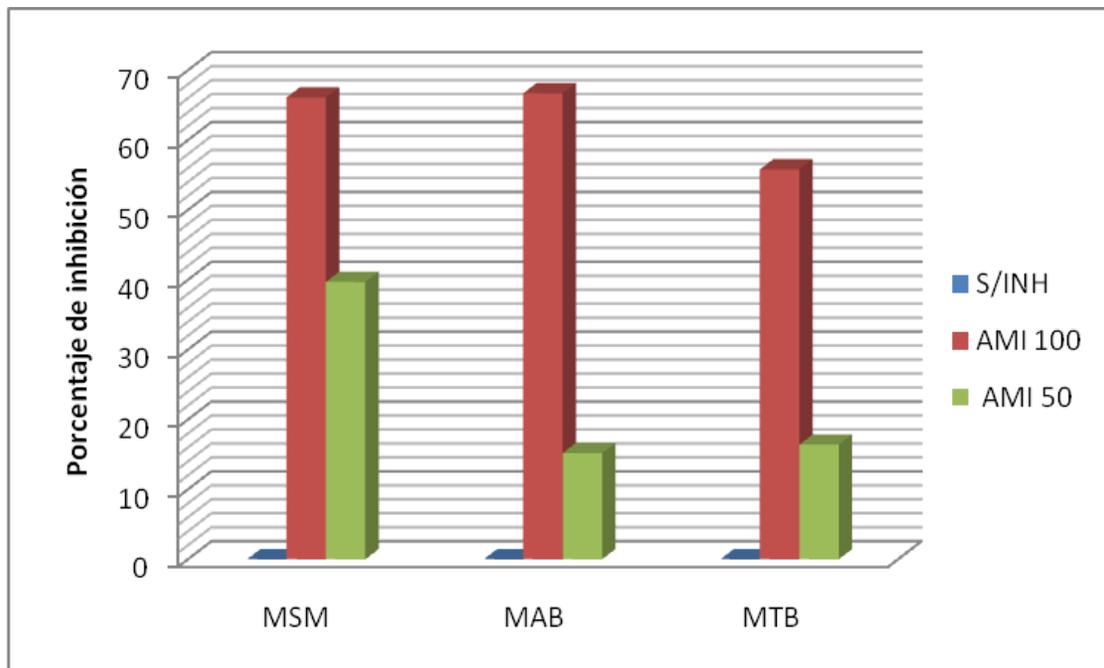


Figura 26. Micrografías comparativas de la formación de lamelipodios inducidos por la infección con las tres cepas micobacterianas. La infección por *M. smegmatis* indujo prolongaciones membranales discretas sin comprometer importantemente la morfología celular, en cambio la infección por *M. tuberculosis* y *M. abscessus* indujo grandes extensiones membranales que provocaron un cambio muy evidente en la estructura celular.

## Determinación de la vía endocítica de las micobacterias a las HUVEC.

### **Inhibición de la interiorización de las micobacterias en presencia de amilórido.**

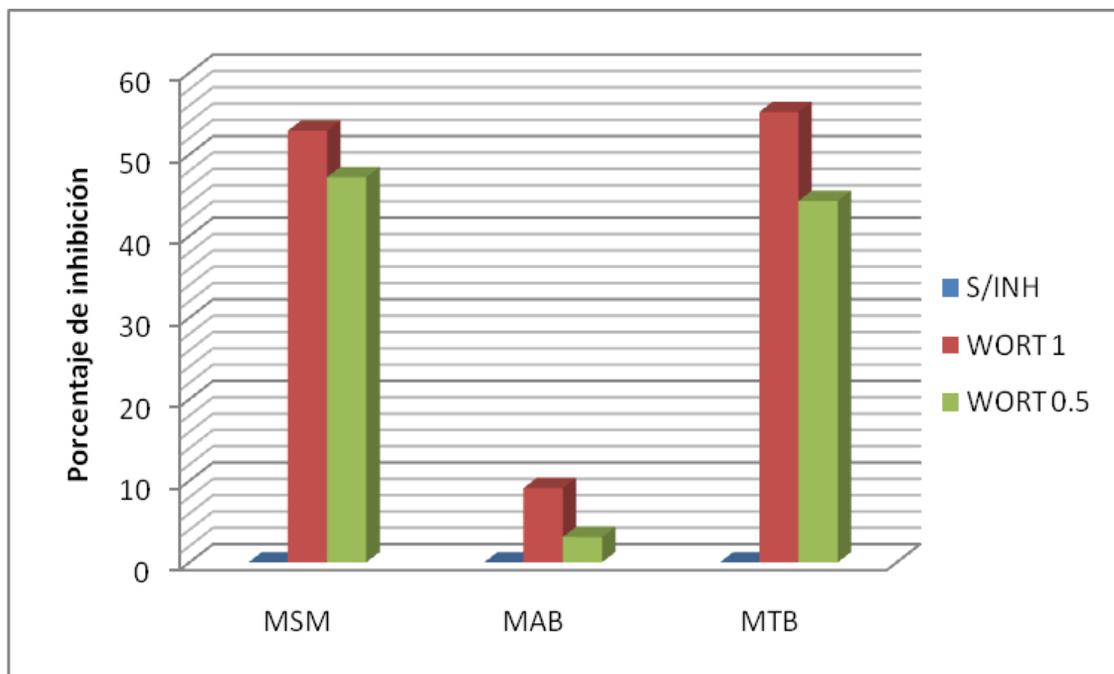
En la figura 27 se puede observar que las concentraciones utilizadas del amilórido inhibieron en mayor grado la interiorización de *M. smegmatis*: con 50  $\mu\text{M}$  hubo una inhibición del 39.7% y a 100  $\mu\text{M}$  hubo una inhibición del 66.1%. La interiorización de *M. abscessus* fue inhibida mayormente por el amilórido a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (66.7%) en comparación con la concentración de 50  $\mu\text{M}$  (15.2%). *M. tuberculosis* mostró un comportamiento similar al de *M. abscessus* en donde la mayor concentración (100  $\mu\text{M}$ ) inhibió en un 55.8% la interiorización, en tanto que la concentración de 50  $\mu\text{M}$  inhibió un 16.4% de la interiorización.



**Figura 27. Porcentajes de inhibición de la interiorización de las diferentes micobacterias a las HUVEC usando el inhibidor amilórido a dos diferentes concentraciones.** La interiorización que mostró la mayor inhibición fue la de *M. smegmatis* (MSM) tanto por el amilórido a 100  $\mu\text{M}$  (AMI 100) como a 50  $\mu\text{M}$  (AMI 50). Le siguió *M. tuberculosis* (MTB) que también se vio afectada mayormente por el amilórido a 100  $\mu\text{M}$ . La inhibición de la interiorización de *M. abscessus* (MAB) mostró un comportamiento similar a lo sucedido con MTB.

### Inhibición de la interiorización de las micobacterias en presencia de wortmanina

Los porcentajes de inhibición en presencia de este inhibidor demostraron que la interiorización de *M. smegmatis* fue la inhibida casi en un 50% en las dos concentraciones usadas: 0.5  $\mu\text{M}$  (47.2%) y 1  $\mu\text{M}$  (52.9%), un comportamiento similar tuvo la interiorización de *M. tuberculosis*, que casi fue inhibida un 50% con ambas concentraciones: 0.5  $\mu\text{M}$  (44.3%) y 1  $\mu\text{M}$  (55.2%), la interiorización de *M. abscessus* fue la menos afectada por la presencia de este inhibidor ya que a una concentración de 0.5  $\mu\text{M}$  se inhibió solo 3.1% y a 1  $\mu\text{M}$  se inhibió un 9.1% (figura 28).



**Figura 28. Porcentajes de inhibición de la interiorización de las diferentes micobacterias a las HUVEC usando el inhibidor wortmanina a dos diferentes concentraciones.** *M. smegmatis* (MSM) y *M. tuberculosis* (MTB), mostraron un comportamiento similar, la inhibición de su interiorización se vio afectada casi en un 50% en presencia de la wortmanina a 1  $\mu\text{M}$  (WORT 1) y a 0.5  $\mu\text{M}$  (WORT 0.5). La interiorización de *M. abscessus* (MAB), fue la menos afectada en presencia de este inhibidor.

## DISCUSIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca de 2 mil millones de personas, es decir, un tercio de la población del mundo, han estado expuestas al bacilo de la tuberculosis, sin embargo, no todas las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* provocan la enfermedad y muchos casos permanecen asintomáticos. La tuberculosis es la mayor asesina del mundo, es la causal de la muerte del mayor número de las mujeres en edad reproductiva y es la principal causa de muerte entre las personas con VIH/SIDA. Por ello, todas las investigaciones llevadas a cabo se han enfocado al estudio de este patógeno, conociéndose muchos datos de su patogénesis y de su capacidad para infectar a células fagocíticas profesionales como los macrófagos; sin embargo, hoy en día se ha visto que no sólo este tipo de células son susceptibles de la infección, sino que existen otras estirpes celulares que pueden ser un blanco benéfico para la micobacteria, como son las células de tipo no fagocítico, de las cuales hay muchos aspectos aun por estudiar. De los primeros estudios que señalan la importancia de estas células en la tuberculosis, está el trabajo publicado en el año 2000, por Hernández-Pando y col., quienes buscando la presencia de bacterias latentes en tejido pulmonar de individuos que murieron por causas diferentes a la tuberculosis, encontraron la presencia de DNA micobacteriano en macrófagos alveolares e intersticiales, así como también encontraron el mismo material genético en células de tipo no macrofágico, como son los neumocitos tipo II (células epiteliales), células endoteliales y fibroblastos pulmonares, sugiriendo que estas células eventualmente se infectaron con la micobacteria (Hérmendez-Pando *et al*, 2000). La presencia del DNA micobacteriano en estas células no fagocíticas, vislumbra la posibilidad del estudio de la infección de la micobacteria en cada una de las diferentes estirpes celulares señaladas por Hernández-Pando. Dentro de éstas, las células endoteliales son un modelo interesante por representar un puente entre la presencia de las células linfoides circulantes y su alojamiento en los tejidos.

Años atrás, a las células endoteliales sólo se les consideraba como unas células aplanadas que recubrían el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los

capilares formando parte de su pared, sin embargo, hoy se sabe que es un tejido altamente especializado y metabólicamente activo que realiza diversas funciones, entre ellas están el facilitar el flujo laminar de la sangre y prevenir la adherencia de las células sanguíneas, el intercambio de nutrientes entre el plasma y el intersticio celular, el transporte de sustancias de la sangre y la linfa hacia los tejidos y viceversa, regulan la angiogénesis y el remodelado vascular, contribuyen a la formación y mantenimiento de la matriz extracelular, sintetizan y degradan diversas hormonas, participan en la respuesta inmune generando citocinas que modulan la actividad de los linfocitos, liberan sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, etc (Atilio, 1997). Por lo anterior estas células son de gran interés, sin embargo, hasta ahora ha sido pobremente estudiado el papel que juegan estas células en diversas infecciones; se han descrito algunas infecciones causadas en el endotelio por *Staphylococcus aureus* (Yao *et al*, 1995) o *Listeria monocytogenes* (Drevets *et al*, 1995), y muy poco se puede encontrar sobre las micobacteriosis. Hace poco se describió la entrada y replicación intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en una línea de células endoteliales microvasculares humanas (Mehta, 2006), de igual manera se describió histológicamente la infección de las células endoteliales por *Mycobacterium leprae* (Scollard, 2000), ambos autores concuerdan en que la interacción entre estas células y estas micobacterias puede servir como una fuente de replicación intracelular o de una infección crónica para así diseminarse o escapar de la respuesta inmune y de esta manera establecer una población persistente o latente.

Nuestro grupo de trabajo realizó en el 2007 el estudio de la infección por micobacterias de diferente virulencia en cultivos primarios de células endoteliales provenientes de cordón umbilical humano (HUVEC), observando que las tres cepas utilizadas: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (cepa virulenta), *Mycobacterium abscessus* (micobacteria no tuberculosa: aislado clínico humano) y *Mycobacterium smegmatis* (de baja patogenicidad), poseen la capacidad de interiorizarse a las HUVEC de manera diferencial dependiendo de la micobacteria, siendo la más

infectiva *M. abscessus*, seguida de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (Villagómez-Palatto, 2007).

Observando además que la micobacteria no virulenta *M. smegmatis* fue eliminada rápida y eficientemente por las células endoteliales, *M. abscessus* presentó la mayor multiplicación y sobrevivencia intracelular, *M. tuberculosis* mostró un comportamiento muy interesante y diferente ya que no se multiplicó intracelularmente y tampoco fue eliminada por las HUVEC, presentando un estado similar a la latencia. Esto es un aspecto muy importante de resaltar ya que este comportamiento no se observó en otros modelos de infección de células no fagocíticas, como el de la línea celular A549 (neumocitos tipo II) o el de la línea celular de fibroblastos pulmonares (MLg) (García-Pérez, 2004), aunque es conveniente reforzar esta observación evidenciando por ejemplo la expresión de proteínas de latencia características de este estado como la proteína alfa-cristalina (Yuan *et al*, 1996). Como observamos un fenómeno de defensa de la célula endotelial ante la infección micobacteriana, en este mismo proyecto se estudió la producción de óxido nítrico (NO) como probable mecanismo de defensa de la célula endotelial, observándose que de las tres micobacterias, la que indujo la menor producción de NO, fue *M. smegmatis*, en el caso de *M. abscessus*, la producción de NO fue la más alta, sin embargo, esta producción fue suprimida rápidamente, en comparación con las otras especies micobacterianas, la infección de las HUVEC por *M. tuberculosis* indujo la producción intermedia de óxido nítrico que alcanzó un pico máximo de producción de NO y que cesó rápidamente (Villagómez-Palatto, 2007). Englobando los resultados que se observaron vimos que la micobacteria eficientemente eliminada (*M. smegmatis*) es la que no indujo niveles significativos en la producción de NO, y las otras dos especies micobacterianas que no son eliminadas por las HUVEC son las que indujeron una importante producción de NO, por esta razón concluimos que existen otros mecanismos de defensa que pueden estar involucrados en la misma. En este trabajo, continuamos con el análisis de estos mecanismos de defensa y decidimos estudiar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Para establecer la producción de ROS durante la infección de la HUVEC con las diferentes micobacterias, se determinó en primera instancia la capacidad de las células endoteliales para reducir el reactivo NBT (Nitroazul de tetrazolio) que sirve como un indicador de la reducción debida a la producción de ROS. De acuerdo a nuestros resultados, la producción de especies reactivas del oxígeno fue mayormente estimulada por la cepa de *M. smegmatis*, en donde se pudo observar a las micobacterias tanto intracelulares como extracelulares de color morado característico del formazán. *M. tuberculosis* indujo una discreta producción de ROS, si se compara con lo sucedido con *M. smegmatis*. La cepa de *M. abscessus* no indujo o fue muy poca la estimulación de la producción de ROS ya que no se lograron observar micobacterias teñidas de formazán sugerentes de una producción de ROS.

Para corroborar los resultados observados por microscopía, se cuantificó la producción de ROS por espectrofotometría; los resultados obtenidos confirmaron lo observado por microscopía óptica, en donde *M. smegmatis* fue la bacteria que estimula en mayor grado y de manera significativa, la producción de especies reactivas del oxígeno. *M. tuberculosis* indujo una producción de ROS mayor que *M. abscessus*, sin embargo esta producción no fue estadísticamente significativa entre ambas bacterias ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que las bacterias de mayor capacidad de multiplicación o sobrevivencia intracelular modulan negativamente la producción de ROS como son *M. tuberculosis* y *M. abscessus*, en contraste, durante la infección con *M. smegmatis*, la producción de ROS se ve estimulada en niveles mayores que los inducidos por el PMA. De esta manera, es probable que la célula endotelial pueda eliminar eficientemente a la micobacteria, por los altos niveles de ROS producidos en consecuencia de la infección, aunados con las bajas cantidades de NO producidas durante la infección, como lo demostramos anteriormente. La presencia conjunta de ROS y NO conlleva a la producción del muy tóxico metabolito peroxinitrito (Roitt, 2001), siendo esta molécula un candidato importante

responsable de la eliminación bacteriana, sin embargo, no hay que descartar que existen otros mecanismos de defensa innata que de igual manera pudieran estar contribuyendo en la eliminación micobacteriana, como por ejemplo las defensinas, etc. Por otro lado, el hecho de que las bacterias de mayor sobrevivencia o multiplicación induzcan niveles muy elevados de NO y bajos de ROS, sugiere que el NO sólo no tiene suficiente poder bactericida para eliminar a la micobacteria y que es indispensable la presencia de los ROS para que este efecto se produzca.

Para establecer el mecanismo responsable de la interiorización micobacteriana, se realizaron diversos ensayos de microscopía confocal, microscopía de barrido y se utilizaron diversos inhibidores específicos de endocitosis para determinar la vía de interiorización. Los ensayos de microscopía confocal permitieron evidenciar un rearrreglo importante del citoesqueleto en las células infectadas por *M. tuberculosis* y *M. abscessus*, que incluyó una alteración de la distribución de los filamentos de actina y cambios importantes en la estructura celular, además se observó un “levantamiento o hinchamiento” de la zona perinuclear. Los cambios en el citoesqueleto culminaron en la formación de lamelipodios observados posteriormente por microscopía de barrido. En comparación, *M. smegmatis* se interiorizó poco en las células endoteliales y fueron pocos los cambios generados en el rearrreglo del citoesqueleto; los filamentos de actina sufrieron cambios más discretos, lo que puede explicar porque la célula conservó bastante su estructura y morfología. Los lamelipodios generados por la infección con *M. smegmatis* fueron menos abundantes y fundamentalmente periféricos, probablemente su baja producción correlacione con la menor interiorización por parte de las HUVEC hacia esta especie micobacteriana y con el mayor tiempo de contacto requerido para permitir una mayor infección (6 horas).

Existen antecedentes que describen que *M. smegmatis* colocaliza con la proteína Rab7 de las células A549 (pneumocitos humanos tipo II), y que tal hecho no impide la acidificación de la vacuola, por lo que la unión macropinosoma-lisosoma es importante para que estas células logren controlar la infección por esta

micobacteria, y sucede lo contrario con *M. tuberculosis* en donde se ha comprobado que ésta es capaz de evitar el reclutamiento de la proteína Rab7 permaneciendo dentro de las vacuolas inmaduras y así de esta forma sobrevivir dentro de la célula (García-Pérez *et al*, 2008). Es posible que en las HUVEC se presente un fenómeno similar y que esto contribuya a la eliminación por un lado de la micobacteria (*M. smegmatis*) o a su sobrevivencia o multiplicación (*M. tuberculosis* y *M. abscessus* respectivamente).

Al usar un inhibidor específico de la macropinocitosis, encontramos que la interiorización en general de las tres cepas de micobacterias se inhibió entre un 60% y 70% con el amilórido a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , y entre un 20% y 40% con el amilórido a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , lo que sugiere que el proceso de interiorización involucrado es la macropinocitosis, y que es necesario probar concentraciones mayores de ambos inhibidores para lograr una inhibición total, y si esto no se diera, entonces se podría sugerir que otros mecanismos pudieran estar participando, aunque es difícil porque el resto de los procesos endocíticos culminan en la generación de vacuolas en tamaño muy inferior al de la micobacteria (Conner y Schmid, 2003; Neuhaus y Soldati, 1999), aunque esto es necesario corroborarlo. Además de esto, en los resultados obtenidos tanto por microscopía confocal y microscopía de barrido, se observaron las características que se han descrito del proceso de la macropinositosis, como son los rearrreglos del citoesqueleto y la formación de lamelipodios membranales.

La utilización de la wortmanina generó resultados muy interesantes, y permiten hipotetizar que durante la infección, las micobacterias despiertan diferentes vías de señalización, las cuales pueden llevar a la sobrevivencia o la muerte intracelular. La wortmanina es un inhibidor de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI-3K), de tal forma que en caso de inhibición de la interiorización en presencia de este compuesto, se puede concluir que durante este proceso se activó esta cinasa. De esta manera, podemos sugerir que la infección con *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* depende de la participación de la fosfatidil-inositol-3-cinasa, y que la eliminación de esta bacteria, o la contención de su crecimiento, dependen de la activación de los

mecanismos de eliminación relacionados con esta cinasa. En comparación, la interiorización de *M. abscessus* fue totalmente refractaria al efecto de este inhibidor lo que sugiere que la infección de esta bacteria es independiente de PI-3K, y que de alguna forma, la exclusión de esta cinasa, facilita la producción de ruffles, permite la producción excesiva y desregulada de NO, y suprime la producción de ROS. Respecto a ese último punto, se sabe que una forma de producción de ROS por las células endoteliales está mediada por la vía PI-3K-Akt (Zhou *et al*, 2009; Cook-Mills y Deem, 2005), de tal forma que la infección con *M. abscessus*, pudiera estarse llevando a cabo sin que esta cinasa sea activada, o bien que de darse su activación, esta sea bloqueada o desregulada por efecto de los factores de virulencia expresados por esta micobacteria o por los mismos metabolitos celulares como son el NO producido en cantidades excesivas; son necesarios más estudios para establecer cuál de estas hipótesis es la correcta.

Estos resultados en conjunto con los resultados del trabajo realizado en el 2007 demuestran que las micobacterias tienen la capacidad de infectar a células endoteliales de cultivo primario y que dicha infección podría favorecer el estado de latencia (en el caso de *M. tuberculosis*) y además que dichas bacterias pueden modular los mecanismos de respuesta bactericida que como lo pudimos ver aquí, al menos dos de los mecanismos de defensa característicos de las células fagocíticas, participan en las células endoteliales siendo estos la producción de óxido nítrico y de especies reactivas del oxígeno. Es probable también que la modulación de la producción de estos metabolitos sea consecuencia de los cambios morfológicos observados durante la infección de las células como resultado de la macropinocitosis, ya que como se sabe, tanto la eNOS (responsable de la producción de NO y ROS) como las NOX (responsable de la producción de ROS) se localizan sobre la membrana celular (Govers y Rabelink, 2001; Chen *et al*, 2009).y cualquier fuerza mecánica ejercida sobre la célula puede ser la responsable de su activación, en nuestro caso dicha fuerza sería la macropinocitosis y *M. abscessus* la bacteria inductora de los mayores cambios. Pero lo más serio de la pérdida de la morfología celular, es su impacto sobre la

integridad del tejido endotelial como tal, mismo que compromete la funcionalidad de este tejido. Si extrapolamos esta idea al panorama de la tuberculosis, se pudiera hipotetizar que aquellas cepas con alta capacidad inductora de macropinocitosis en la célula endotelial pudieran ser las responsables de la pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica y por ende responsables de la tuberculosis meníngea, mientras que aquellas cepas con baja capacidad inductora de macropinocitosis no tendrían esta propiedad y este es un tema actualmente abordado por nuestro grupo de trabajo.

Además de los cambios morfológicos, las infecciones con *M. abscessus*, y *M. tuberculosis*, inducen la producción de niveles tan desproporcionados de NO, que lejos de ser benéficos para las HUVEC, probablemente conduzcan a una desregulación celular tan grave que, como en el caso de la infección con *M. abscessus*, la célula no pueda funcionar adecuadamente y sucumba a la infección, y en caso contrario como sucede con *M. smegmatis*, una inducción discreta es bien manejada por la célula, y permite que otros mecanismos de defensa se puedan generar sin problema.

Los aspectos fisiológicos de la producción de NO y ROS por las células endoteliales son cada vez más conocidos, pero es escaso el conocimiento que se tiene sobre la infección de células endoteliales por patógenos, la producción de estos metabolitos, su participación en la enfermedad micobacteriana, su regulación, etc., por lo que esta área de estudio es un campo fértil de investigación.

## CONCLUSIONES

- La infección por *M. smegmatis* induce la producción temprana de ROS, que se incrementa conforme transcurre la infección.
- Las infecciones por *M. tuberculosis* y *M. abscessus* no producen ROS de manera temprana, y en tiempos más avanzados su producción es discreta.
- *M. smegmatis* es eliminada eficientemente de las células endoteliales, la combinación de ROS y NO pueden ser responsables de esta actividad (peroxinitritos).
- *M. abscessus* y *M. tuberculosis* parecen no inducir la producción de ROS, y sí un exceso de NO que no permite la eliminación eficiente de estas bacterias, lo cual puede contribuir a una desregulación celular, responsable sobre todo en el caso de *M. abscessus* de la gran replicación bacteriana y tal vez en el caso de *M. tuberculosis* en la inducción del estado de “latencia”.
- *M. smegmatis* induce en mucho menor grado la alteración del citoesqueleto con la formación principalmente de lamelipodios en la periferia celular que son más escasos, por lo que el proceso de macropinocitosis inducido pareciera ser más discreto.
- *M. tuberculosis* y *M. abscessus* inducen la formación de grandes y abundantes prolongaciones membranales (lamelipodios y ruffles) compatibles con la macropinocitosis.
- Se confirmó la inducción de macropinocitosis por las tres micobacterias ya que su interiorización se vio inhibida por el amilórido.
- Durante la infección con *M. abscessus* no participa la PI-3K, en contraste con las infecciones causadas por *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.
- Las micobacterias son interiorizadas por las HUVEC mediante macropinositosis, la modulación de la producción de NO y ROS es dependiente de la virulencia de la micobacteria, lo cual contribuye a su eliminación, sobrevivencia o multiplicación intracelular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1996. Biología molecular de la célula, 3<sup>o</sup> ed. Omega. 509-843
2. Atilio M. 1997 Inflamación, aterosclerosis y eventos isquémicos. NJEM 336
3. Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GA, Hernández-Pando R. 2002. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. Clin Exp Immunol. 128:229-237
4. Barnes PJ. 1993. Nitric oxide and lung disease. Thorax. 48:1034-1043
5. Bermudez EL, Goodman J. 1996 *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. Infect Immun. 64:1400-1406
6. Chen K, Siobhan E., Keaney C., Keaney J. 2009. Downstream targets and intracellular compartmentalization in Nox Signaling. Antioxidants & Redox Signaling. DOI: 10.1089/ars.2009.2594
7. Comstock GW. 1994. The International Tuberculosis Campaign: a pioneering venture in mass vaccination and research. Clin Infect Dis. 19:528-540
8. Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 422:37-44
9. Cook-Mills JM, Deem TL. 2005. Active participation of endothelial cells in inflammation. J Leukoc Biol. 77: 487–495
10. Coyle CH, Kader KN. 2007. Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in endothelial cells exposed to physiologic shear stress. ASAIO J. 53:17-22
11. Drevets D, Sawyer R, Potter T, Campbell P. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/utils/fref.fcgi?PrId=3159&itool=AbstractPlus-def&uid=17237644&db=pubmed&url=http://meta.wkhealth.com/pt/pt-core/template-journal/lwwgateway/media/landingpage.htm?an=00002480-200701000-00004> Infect Immun. 4268–4276
12. Fisher A. 2009. Redox Signaling Across Cell Membranes. Antioxidants & Redox Signaling. DOI: 10.1089/ars.2008.2378

13. García-Pérez BE, Mondragón-Flores, Luna-Herrera J. 2003. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microb Pathog.* 35:49-55
14. García-Pérez BE. 2004. Tesis de Doctorado: Interiorización de *Mycobacterium tuberculosis* por macropinocitosis: ¿un mecanismo de virulencia?. México D.F. ENCB. IPN
15. García-Pérez BE, Hernández-González J, García-Nieto S, Luna-Herrera J. 2008. Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells. *Microb Pathog.* 45: 1-6
16. Govers R, Rabelink TJ. 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280:F193-F206
17. Hacker U, Albrecht R, Maniak M. 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* 110:105-112
18. Hernández-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, Orozco H, Harboe M, Rook GA, Bjune G. 2000. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet.* 356:2133-2134
19. Hoffman JA, Katatos FC, Janeway CA Jr, Ezekowitz RAB. 1999. Halogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 284:1313-1318
20. Kirkham M, Parton RG. 2005. Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid rafts carriers. *Biochimica et Biophysica acta* 1746: 350-363
21. Kumar V; Abbas AK. 2007. *Robbins Basic Pathology* (8th Ed.). Saunders Elsevier. 516-522
22. Kwan OJ. 1997. The role of nitric oxide in the immune response of tuberculosis. *JKMS.* 12:481-487
23. Marsh M, McMahon HT. 1999. The structural era of endocytosis. *Science.* 285:215-220
24. Mayoral R, Fernández-Martínez A, Roy R, Boscá L, Martín-Sanz P. 2007. Papel de la Caveolina-1 en la regeneración hepática tras hepatectomía

- parcial. Mecanismos de señalización y función en la regulación de la proliferación hepática. *An R Acad Nac Farm.* 73: 1093-1125
25. Medzhitov R, Janeway CA Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91:295-298
  26. Mehta PK, Karls KK, White EH, Ades EW, Quinn FD. 2006. Entry and intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in cultured human microvascular endothelial cells. *Microb Pathog.* 41:119-124
  27. Neuhaus EM, Soldati T. 1999. Molecular mechanisms of membrane trafficking. What do we learn from *Dictyostelium discoideum*?. *Protist.* 150:235-243
  28. Novo E, Parola M. 2008. Major cellular sources of ROS in living cells. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 1:5-10
  29. Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. 2005. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 62: 17-21
  30. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A. 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 296:535-539
  31. Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 213-232
  32. Ramírez-Sánchez I, Rosas-Vargas H, Ceballos G, Salamanca F, Coral-Vázquez RM. 2005 Expression analysis of the SG-SSPN complex in smooth muscle and endothelial cells of human umbilical cord vessels. *J Vasc Res.* 42:1-7
  33. Roitt I. 2001. *Inmunología Fundamental.* 10<sup>o</sup> ed. Editorial Médica Panamericana. 6-10
  34. Scollard D. 2000. Association of *Mycobacterium leprae* with human endothelial cells *in vitro*. *Lab Inv.* 663-669
  35. Swanson JA. 1989. Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J Cell Sci.* 94:135-142
  36. Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhant M, van Deurs B. 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell.* 13:238-250

37. Veinthen A, Amyere M, Van Der Smissen P, Cupers P, Courtoy PJ. 1998. Regulation of macropinocytosis in v-Src-transformed fibroblast: cyclic AMP selectively promotes regurgitation of macropinosomes. *J Cell Sci.* 111:2329-2335
38. Villagómez-Palatto D. 2007. Mecanismos de defensa innata de células endoteliales humanas infectadas con micobacterias. Tesis de Licenciatura. México D.F. IPN- ENCB.
39. Wei XQ, Charles LG, Smith A, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 375:408-411
40. West MA, Antoniou AN, Prescott AR, Azuma T, Kwiatkowski DJ, Watts C. 1999. Membrane ruffling, macropinocytosis and antigen presentation in the absence of gelsolin in murine dendritic cells. *Eur J Immunol.* 29:3450-3455
41. World Health Organization. 2007. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.htm>
42. Yao L, Bengualid V, Lowy F, Gibbons J, Hatcher V, Berman J. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun.* 1835–1839
43. Yuan Y, Crane DD, Barry CE. 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol.* 178:4484-4492
44. Zenni MK, Giardina PC, Harvey HA, Shao J, Ketterer MR, Lubaroff DM, Williams RD, Apicella MA. 2000. Macropinocytosis as a mechanism of entry into primary human urethral epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* 68:1696-1699
45. Zhou YJ, Yang HW, Wang XG, Zhang H. 2009. Hepatocyte growth factor prevents advanced glycation end products-induced injury and oxidative stress through a PI3K/Akt-dependent pathway in human endothelial cells. *Life Sci.* 85:670-7

