



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

---

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

**“COMPONENTES MICOBACTERIANOS  
INVOLUCRADOS EN LA INTERIORIZACIÓN  
A CÉLULAS NO FAGOCÍTICAS”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN INMUNOLOGIA**

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

**M. en C. JUAN CARLOS HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. JULIETA LUNA HERRERA**



**MÉXICO, D. F.**

**Abril, 2009**

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunoquímica 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, quien pertenece al SNI y es becaria COFAA y EDI del IPN.**

**Este trabajo recibió apoyo de la SIP-IPN (Proyectos 20070271, 20070610, 20082372 y 20091328), el CONACyT (Proyecto SEP-2004-C01-47496) y la Fundación Miguel Alemán.**

**El autor agradece la beca PIFI otorgada en el periodo de Agosto del 2006 a Julio del 2008, así como la beca CONACyT otorgada de Febrero del 2005 a Diciembre del 2008.**

# AGRADECIMIENTOS

**Dra. Julieta Luna Herrera**, agradezco que su confianza fuera el principio de mi andar en el camino del conocimiento, con su guía mis pasos fueron más seguros. Mi estancia bajo su dirección me permitió descubrir mis habilidades y la reflexión acompañada de la comprensión, alejaron los temores para enfrentar lo desconocido.

**Dra. Blanca Estela García Pérez**, agradezco su apoyo incondicional, su amabilidad al darme la oportunidad de participar en sus proyectos. Sus consejos siempre acompañados de paciencia y solidaridad. Además, esta oportunidad académica y laboral me permitió contar con su amistad.

**Dra. Clara I. Espitia Pinzón**, agradezco su amable disposición al permitir que este trabajo contara con su colaboración y experiencia. Al proporcionarnos las proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*, hizo posible que este proyecto alcanzara mayores y mejores expectativas. Sus consejos, tiempo y dirección fueron en extremo valiosos para mejorar este trabajo.

**Dr. Ramón Coral**, agradezco su apoyo al permitirme acceder al uso de su microscopio con tecnología APOTOM, con el cual fue posible analizar con mayor detalle los efectos de macropinocitosis en las células no fagocíticas.

**Dra. M. Lilia Domínguez López**, por su ayuda incondicional y apoyarnos proporcionándonos de sus proteínas recombinantes de choque térmico de las especies bacterianas *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Agradezco al **Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI)**, por el apoyo brindado con el cual me fue posible la realización de este trabajo.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el apoyo brindado para llevar a cabo mis estudios y para finalizar este trabajo.

A mis sinodales, **Dr. Javier Sánchez García**, **Dra. María E. Castro Mussot** y **Dra. María Maximina B. Moreno Altamirano**, por sus observaciones y consejos dirigidos a mejorar este trabajo.

A **Dios**, el cual sin haberle visto o escuchado, me conocía desde mi concepción y su aliento de vida me ha permitido llegar a alcanzar mis mayores anhelos en la vida, por jamás dejarme a pesar de mis errores.

# DEDICATORIAS

A mis padres, **Sr. Carlos Hernández G.**, y **Sra. M. Isabel González H.**, por confiar en mí y darme la oportunidad de alcanzar mis metas sacrificando su tiempo y recursos. Agradezco su amor que vive en mi y donde encuentro la fuerza para salir adelante en los momentos difíciles. Gracias por hacer lo imposible por que no interrumpiera el camino que elegí, les estaré siempre agradecido.

A mi hermana, **Nancy Hernández G.**, por tu cariño, paciencia, ayuda en todos los aspectos. A pesar de ser la menor, Dios te ha dado la fuerza con la cual nuestros padres y yo hemos salido adelante. Gracias por contar siempre con tu ayuda y ejemplo. Juntos somos más fuertes y siempre seremos una familia unida.

A mis compañeros y amigos. Dr. Isidoro De Paz P., y a su apreciable familia, Dr. Juan J. De la Cruz y su apreciable familia, M. en C. Carlos Rubén, M. en C. Heleodora G, M. en C. Rocío Thompson, Ricardo Ruiz, Nayeli Castrejón, Eneira Hernández, Magali Ruiz, Shantal B, Daniela Villagómez, Vladimir, Margarita Juárez, Juventino Vázquez, Marcela, Yolanda Ortega, Sofía Pérez, Antonio N, Yoana, Ariadna, Raúl y Carmen Lara, con quienes ha sido más agradable aprender y trabajar juntos, agradezco su amistad, alegría, paz y motivación que le han dado a mi ser. Siempre seremos amigos.

†En memoria del M. en C. Ernesto Longoria Revilla, por contar con su apoyo y amistad.

†En memoria del Sr. Ernesto Severo, por ser un amigo ejemplar, su valor y amor por sus seres queridos son el legado para quienes le conocimos.

# INDICE GENERAL

---

	PÁGINA
<b>Índice de Abreviaturas</b>	III
<b>Índice de Tablas y Figuras</b>	IV
<b>Resumen</b>	VII
<b>Abstract</b>	VIII
<b>I. Introducción</b>	1
<b>1.1 MICROORGANISMOS QUE SECUESTRAN VIAS ENDOCITICAS PARA SU INTERIORIZACIÓN.</b>	6
<b>1.1.1 INTERIORIZACIÓN DE MICROORGANISMOS POR FAGOCITOSIS.</b>	8
1.1.1.1 Bacterias patógenas que regulan positiva o negativamente la fagocitosis.	8
1.1.1.2 La fagocitosis de bacterias es dependiente de la unión a receptores.	9
<b>1.1.2 PATÓGENOS QUE ACTIVAN LA MACROPINOCITOSIS EN LA CÉLULA FAGOCÍTICA.</b>	11
<b>1.1.3 INTERIORIZACIÓN DE <i>M. tuberculosis</i> EN LA CÉLULA FAGOCÍTICA</b>	13
1.1.3.1 Reconocimiento de <i>M. tuberculosis</i> por receptores tipo Toll en la célula fagocítica.	17
<b>1.1.4 INTERIORIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA CÉLULA NO FAGOCÍTICA</b>	18
1.1.4.1 Microorganismos que se interiorizan a células no fagocíticas por macropinocitosis.	19

---

---

	PÁGINA
1.1.4.2 La célula no fagocítica como blanco de la infección micobacteriana.	20
1.1.4.3 Reconocimiento de <i>M. tuberculosis</i> por receptores tipo Toll en la célula no fagocítica.	24
<b>1.2 Justificación</b>	26
<b>1.3 Hipótesis</b>	27
<b>1.4 Objetivos</b>	28
<b>1.5 Objetivos Particulares</b>	28
<b>II Material y métodos</b>	29
<b>III Resultados</b>	35
<b>IV Discusión</b>	59
<b>V Conclusiones</b>	75
<b>VI Bibliografía</b>	77

---

# INDICE DE ABREVIATURAS

---

DNA	Acido desoxirribonucleico.
Ag85	Del inglés “ <i>antigen 85 complex</i> ”.
CR1; CR3; CR4	Receptores de complemento 1, 3 y 4.
CFP-10	Del inglés “ <i>culture filtrate protein, 10 kDa</i> ”.
EGF	Del inglés “ <i>epidermal growth factor</i> ”.
ESAT-6	Del inglés “ <i>6 kDa early secreted antigenic target</i> ”.
GPI	Glicosilfosfatidilinositol.
Man-LAM	Lipoarabinomana con manosa en su residuo terminal.
MBP	Proteína de unión a manosa.
MCSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos.
MDR	Multidrogorresistencia.
MEB	Microscopía electrónica de barrido.
MF	Microscopía de fluorescencia.
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.
MR	Receptor de manosa.
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
OMS	Organización mundial de la salud.
NO	Del inglés “ <i>Nitric oxide</i> ”.
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PLC	Fosfolipasa C.
PMA	Éster de forbol forbol-12, miristato-13 acetato.
PPD	Proteínas purificadas derivadas de <i>M. bovis</i> (subesp. AN5).
PRR	Receptores de reconocimiento de patrón.
SrtA	Sortasa A de <i>S. aureus</i> (transpeptidasa).
SPA-R	Receptor de proteína surfactante tipo A.
TbD1	Del inglés “ <i>M. tuberculosis-specific deletion 1 region</i> ”.
TB	Tuberculosis.
TB-MDR	Tuberculosis multidrogorresistente.

# INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Diferentes tipos de endocitosis en células eucariotas.	7
Tabla 1	Interiorización de microorganismos patógenos y componentes efectores por diferentes vías endocíticas en la célula huésped.	7
Tabla 2	Bacterias que inhiben su interiorización en la célula fagocítica.	8
Tabla 3	Bacterias que promueven su interiorización en la célula fagocítica.	9
Figura 2	Fagocitosis mediada por FcR (modelo tipo “zipper”).	10
Figura 3	Fagocitosis tipo I y tipo II.	11
Figura 4	Macropinocitosis en la célula fagocítica.	12
Tabla 4	Receptores de unión a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en células fagocíticas.	13
Figura 5	Tipos de unión de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a macrófagos de mamíferos.	15
Tabla 5	TLR's que reconocen componentes micobacterianos.	18
Figura 6	Microorganismos patógenos que utilizan la macropinocitosis para su interiorización.	20
Figura 7	Lesión ósea en costilla donde se evidenció DNA micobacteriano.	21
Figura 8	Micrografía electrónica de barrido en la que se muestra la interacción de la cepa <i>M. tuberculosis</i> con células A549.	23
Figura 9	Captación de fase fluida en células A549 con diferentes estímulos.	24
Figura 10	Células A549 infectadas con micobacterias y marcadas con anticuerpos anti-Rab7.	24
Figura 11	Células A549 sin estímulo e infectadas por una hora con diferentes especies de micobacterias.	36
Figura 12	Formación de macropinosomas en células A549 inducidos por diferentes micobacterias.	38



---

	<b>PÁGINA</b>	
Figura 13	Neumocitos humanos tipo II estimulados con sobrenadantes de cultivo de diferentes micobacterias.	39
Figura 14	Captación de fase fluida de células A549 estimuladas con micobacterias Msm y Mtb viables e inactivadas.	40
Figura 15	Captación de fase fluida de células A549 estimuladas con <i>M. abscessus</i> viable e inactivada.	41
Figura 16	Células A549 estimuladas con sobrenadantes de células previamente infectadas con micobacterias por tres horas.	42
Figura 17	Osteoblastos humanos MG63 infectados con <i>M. tuberculosis</i> por 3 horas.	43
Figura 18	Proteínas recombinantes de <i>M. tuberculosis</i> como estímulo sobre la captación fase fluida en células A549.	44
Figura 19	Micrografías de células A549 estimuladas con diferentes proteínas recombinantes de <i>M. tuberculosis</i> , analizadas por microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de fluorescencia.	46
Figura 20	Micrografías de células A549 estimuladas con proteínas recombinantes de MTB, ESAT-6 y PE-PGR-32kDa durante 2 hrs.	47
Figura 21	Micrografías de células A549 estimuladas con diferentes proteínas no relacionadas a bacterias	48
Figura 22	Efecto de LPS en células A549 sobre la captación de fase fluida y citoesqueleto.	49
Figura 23	Captación de fase fluida de células A549 estimuladas con la proteína recombinante SrtA de <i>S. aureus</i> .	50
Figura 24	Células A549 estimuladas durante 2 horas con la proteína recombinante sortasa A de <i>S. aureus</i> .	50
Figura 25	Micrografías de células A549 estimuladas con proteínas recombinantes de choque térmico de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> .	51
Figura 26	Captación de fase fluida en células A549 estimuladas con sulfátido de Mtb	52
Figura 27	Micrografías de células A549 estimuladas con sulfátido de <i>M. tuberculosis</i> .	53
Figura 28	Células A549 estimuladas con ácidos micólicos de Mtb durante dos horas.	53

---

---

	<b>PÁGINA</b>	
Figura 29	Imágenes de fluorescencia de células A549 que indican la presencia NO después del estímulo con diferentes micobacterias por una hora	54
Figura 30	Imágenes de fluorescencia de células A549 que indican la presencia de NO después del estímulo con sobrenadantes de cultivo micobacteriano por una hora	55
Figura 31	Imágenes de fluorescencia de células A549 que indican la producción de NO después del estímulo con sulfátido y ácidos micolicos de Mtb a los 5 min.	56
Figura 32	Emisión de fluorescencia que indica la producción de NO en células A549 estimuladas con lípidos micobacterianos.	57
Figura 33	Emisión de fluorescencia que indica la producción de NO en células A549 estimuladas con diferentes proteínas recombinantes de Mtb	58
Figura 34	Tres diferentes vías por el que la infección micobacteriana estimula la macropinocitosis en la célula no fagocítica	66
Figura 35	Estímulo de la macropinocitosis por micobacterias de diferente virulencia en células no fagocíticas	66

---

# RESUMEN

En las zonas endémicas de TB, algunos individuos que jamás presentaron síntomas de la enfermedad, en estado post-mortem mostraron la presencia de DNA micobacteriano en diferentes estirpes celulares del tejido pulmonar, además de los macrófagos. Para explicar este fenómeno, estudios *in vitro* muestran que las micobacterias se interiorizan en la célula no fagocítica activando la macropinocitosis, aunque aún no se conoce el mecanismo por el que la micobacteria logra activar esta vía endocítica. El objetivo de este trabajo fue analizar algunos componentes proteicos y lipídicos de *M. tuberculosis* H37Rv (MTB), como posibles activadores de la macropinocitosis, simultáneamente se comparó la inducción de la macropinocitosis por tres especies de micobacterias de diferente patogenicidad (MTB H37Rv, *M. smegmatis* y *M. abscessus*). Las células no fagocíticas (neumocitos humanos tipo II) se pusieron en contacto con los diferentes estímulos y posteriormente se evaluó la captación de fase fluida y la producción de óxido nítrico (NO), en ambos casos se empleó la técnica de fluorimetría en placa; el rearrreglo del citoesqueleto se observó empleando técnicas de fluorescencia analizadas por microscopía confocal y la morfología de la membrana celular se evaluó por microscopía de barrido. Se encontró que las tres micobacterias se interiorizaron en las células A549 estimulando la macropinocitosis de forma diferencial, siendo *M. abscessus*, la especie que indujo la mayor interiorización y la mayor producción de NO. Estas propiedades sólo se observaron con las bacterias metabólicamente activas, con excepción de *M. abscessus* que conservó cierto grado de estímulo sobre la captación de fase fluida en la célula. Por su parte, las proteínas recombinantes de Mtb H37Rv, lograron inducir la macropinocitosis en las células A549, ya sea que fueran proteínas de naturaleza secretora (Ag85B, ESAT-6, APA y P16) o que formaran parte de la pared de la bacteria (HBHA, PE-PGRS33), la especificidad de la respuesta se corroboró utilizando lipopolisacárido de *E. coli*, proteínas no relacionadas a bacterias (albumina sérica humana, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina) y una proteína bacteriana recombinante no relacionada al complejo tuberculosis (sortasa A de *S. aureus*), de estas ninguna disparó la macropinocitosis. En general, estas proteínas de MTB, no estimularon la producción de NO. Entre los lípidos de Mtb estudiados, sólo el sulfátido activó la macropinocitosis en la célula A549, aunque a una concentración más alta que la utilizada en las proteínas recombinantes. Los ácidos micólicos no causaron cambios morfológicos en la célula estimulada, aunque si lograron estimular una ligera producción de NO. Estos resultados indican que las micobacterias poseen diversos componentes proteicos que participan importantemente en la activación de la macropinocitosis. Además, la micobacteria requiere un estado metabólico activo para lograr la inducción de esta vía endocítica. La baja producción de NO, por las proteínas y lípidos analizados sugiere que otros componentes micobacterianos son responsables de la inducción de la producción de este metabolito.

# ABSTRACT

Individuals from TB endemic countries had shown mycobacterial DNA in apparently healthy lung tissue, although they didn't suffer the disease in whole life. Aside from macrophages, DNA was also present in other cells like endothelial, epithelial and fibroblasts. Already we have shown that mycobacteria is internalized into non-phagocytic cells by macropinocytosis, however yet it is not known with precision the mycobacterial component(s) that activates this endocytic pathway. The aim of this work was to analyze the macropinocytosis induction capabilities of three different *Mycobacterium* species: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MTB), *Mycobacterium smegmatis* (MSM) and *Mycobacterium abscessus* (MABSC) and several protein and lipid components from *M. tuberculosis* H37Rv reported as important antigens for the pathogenesis of tuberculosis. Human pneumocyte type II (A549 cells) were stimulated with the mycobacterial components (recombinant proteins or pure lipids) and several features of the macropinocytic process were evaluated, eg., fluid phase uptake, cytoskeleton rearrangements, lamellipodia and macropinosome formation. Cytoskeleton rearrangement and micropinosomes were observed by confocal microscopy, changes in cell membrane morphology were analyzed by scanning electron microscopy, nitric oxide (NO) and fluid phase uptake were evaluated by plate fluorometry. All three mycobacteria, were interiorized by A549 cells stimulating macropinocytosis. However, MABSC stimulated macropinocytosis and NO production at highest degree. Induction of macropinocytosis is an active process since death mycobacteria was unresponsive. Two groups of Mtb H37Rv recombinant proteins were studied, secretion proteins (Ag85B, ESAT-6, APA and P16) or cell wall proteins (HBHA, PE-PGRS-33kDa), both groups stimulated macropinocytosis activity. As controls for the system, non-mycobacterial products like *E. coli* lipopolisaccharide, bovine serum albumin, human serum albumin, egg albumin or recombinant protein sortase A from *S. aureus* were included and non one of them induce macropinocytosis. None of the mycobacterium recombinant proteins studied stimulate NO production. Of the two mycobacterium lipids compounds studied, only sulfatide trigger macropinocytosis but at doses 5 times higher than those for proteins, mycolic acids did not induce cell membrane alteration but they induced a low NO production by the A549 cells. Our findings suggest that mycobacteria possess secreted and constitutive proteins and lipids that participate in the induction of macropinocytosis facilitating their entrance in the non-phagocytic cell and for the case of pathogenic bacteria for supporting their survival. In a future study it is necessary to analyze proteins from non-pathogenic mycobacteria.

## INTRODUCCIÓN

La generación del agente etiológico de la tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), se debe aparentemente a un proceso evolutivo reciente ocurrido hace 15000 a 35000 años aproximadamente (Arnold, 2007), sin embargo, su presencia ha aquejado al ser humano desde épocas muy antiguas, hecho evidenciado por la detección de DNA micobacteriano en tejidos conservados en momias de Egipto, Asia y Sudamérica que datan de las primeras civilizaciones (Donoghue y col, 2004; Zink y col, 2003; Salo y col, 1994; Konomi y col, 2002). Las evidencias genéticas sugieren incluso, que desde la aparición del primer homínido en la Tierra hace tres millones de años, Mtb pudo haberse constituido un agente infeccioso (Gutierrez, 2005).

Desde entonces, la relación que adquirió Mtb con el ser humano tuvo tal éxito que desarrolló la habilidad de mantenerse latente durante años en el individuo infectado, posee la capacidad de mutar generando resistencia a diferentes fármacos antituberculosos. Además, un individuo infectado que desarrolla la TB activa, atraviesa por un periodo prolongado en la aparición de los primeros signos característicos de la enfermedad, lo que hace difícil la identificación y tratamiento oportuno (Gillespie, 2007).

El grado en que la TB puede afectar al ser humano se ha registrado a través de la historia, eventos particulares nos muestran la magnitud que puede alcanzar *M. tuberculosis* como agente infeccioso y como la primer causa de muerte ocasionada por un solo patógeno. Al final del siglo XIX, la TB alcanzó uno de los mayores índices de mortalidad ocasionando el fallecimiento del 40-50% de la población económicamente activa en las principales ciudades de Europa (Kaufmann y Winau, 2005), para esta época no se conocía la causa y por lo tanto, no existía tratamiento alguno, lo que motivó al microbiólogo alemán Roberto Koch a iniciar los primeros estudios de la enfermedad que lo llevarían a descubrir el agente etiológico de la TB en 1882. Unos cuantos años más tarde, en 1921, Albert Calmette y Camille Guérin desarrollaron la vacuna a partir de una cepa atenuada de *M. bovis* y en 1943, Selman Waksman descubre la estreptomycinina como el primer antibiótico antituberculoso, marcando así el inicio de la lucha contra esta enfermedad. Estos avances se sumaban a la esperanza de disponer de medidas eficaces para el control y la erradicación de la enfermedad. Sin embargo, la TB ha sido la causa de una gran cantidad de pérdidas humanas, dejando huella a través de la historia con pérdidas lamentables que alcanzaron a figuras destacadas en la música y el arte, como Frederick Chopin, Franz Kafka y Charlotte Brontë entre otros.

La situación actual de la TB parece agravarse dramáticamente, los datos de la OMS indican que *M. tuberculosis* se ha diseminado infectando a una tercera parte de la población mundial (2 mil millones de individuos), la cual no ha desarrollado la enfermedad pero muestra inducción en la respuesta de células T antígeno-específica en la prueba dérmica a PPD (Dye y col., 1999). Inevitablemente, el 10% de este grupo tienen el riesgo de desarrollar TB en algún momento de su vida (Bloom y Murria, 1992), por lo que al año se presentan de 8 a 9 millones de nuevos casos y al mismo tiempo causa la muerte de 5000 individuos diariamente (Dye y col., 1999).

Al final de los 80's, la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana se convirtió en una de las más peligrosas pandemias, provocando que la TB re-emergiera, debido a que se establece una asociación estrecha entre ambos patógenos (Palmero, 2007), por lo que en 1993 la OMS declara a la TB como emergencia global.

Los cambios políticos y socioeconómicos, son otro factor que modificó la epidemiología de la TB, principalmente por el aumento de la migración entre continentes y la desaparición de la Unión Soviética, eventos que colocaron a la TB de regreso a la agenda en el tema de salud pública (Kaufmann, 2006). Por otra parte, se registró una rápida aparición de multidrogoresistencia (MDR), para el 2005 varias ciudades presentaron TB-MDR en más del 10% de todos los casos, lo que ha incrementado los costos de tratamiento y al mismo tiempo se reducen las opciones en el uso de fármacos, obligando a crear otros nuevos de mayor potencia (Kaufmann y col., 2006).

La complejidad de la TB se vuelve más evidente al considerar que se han reportado alteraciones genéticas en los seres humanos que afectan el sistema inmune innato y adaptativo, lo que incrementa la susceptibilidad a la TB (Doffinger y col., 2006).

En un futuro inmediato, no se vislumbra que la TB desaparezca de la población mundial. Este panorama ha demandado mayores esfuerzos en la investigación de la TB con el fin de descubrir la forma de “desarmar” a la bacteria por completo y fortalecer al huésped hasta lograr el éxito de controlar la enfermedad.

Actualmente, la suma de descubrimientos importantes en la biología y patogenia de este agente infeccioso, ha logrado explicar y comprender su origen, características fenotípicas, genotípicas, metabólicas, así como sus principales factores de virulencia. En conjunto, estos conocimientos tienen el objetivo de aplicarse en la mejora de los sistemas de vacunación, diagnóstico y en un tratamiento más eficaz.

Una de las preguntas más importantes que pudo resolverse sólo hace unos cuantos años, era como *Mtb* llegó a infectar al hombre. La primera hipótesis que parecía lograr una

explicación satisfactoria, proponía que Mtb había evolucionado a partir de *M. bovis*, un patógeno animal que infectó y se adaptó en los seres humanos después de la domesticación del ganado (Stead y col., 1995). Esta idea cambió cuando se logra la secuenciación completa del genoma de Mtb y se revela que esta especie es altamente conservada, en contraste al resto de las especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*), las que han sufrido mutaciones y deleciones en su DNA, mostrando su sucesiva aparición (Brosch y col., 2002). De esta forma, se determinó que *M. tuberculosis* fue la primera especie en aparecer, mientras que *M. bovis* había sido el último miembro en desarrollarse y diferenciarse del resto de las especies del complejo Mtb. Esta aportación permitió explicar, entre otras cosas, la razón por la que *M. bovis* BCG, no es la cepa micobacteriana ideal en la vacunación debido a la pérdida de regiones del genoma importantes involucradas en la producción de proteínas de valor antigénico que se expresan en la especie Mtb (ESAT-6 y CFP-10), por lo que al presente, una de las estrategias considera implementar estas regiones genómicas a la subespecie vacunal BCG (recombinantes) (Horwitz y col., 2003; Pym y col., 2003) y mejorar la protección contra TB.

Sin embargo, aún se sigue empleando la especie atenuada *M. bovis* BCG, como única medida preventiva para controlar y evitar la TB, aplicándola anualmente a 120 millones de personas en más de 230 países (WHO, 1995). La mayoría de los datos que apoyan continuar utilizándola en la vacunación, es por que logra proteger contra las formas más severas de la enfermedad durante la infancia (tuberculosis miliar y meningitis tuberculosa) (Wiegshauss y col., 1989). Cuando la vacuna se aplica a individuos de edad adulta, la eficacia protectora de BCG disminuye significativamente y varía de un 80% (Fine, 1995) a un 50% (Colditz y col., 1994).

El desarrollo de una vacuna efectiva, aún requiere resolver el grado de protección que se desea obtener es decir, si el estímulo inmunológico deba lograr la erradicación del patógeno en el organismo ó solo prevenga la infección (Kaufmann y col., 2006). Por ejemplo, en regiones con alta incidencia de TB un gran número de individuos sanos han sido infectados, para este grupo se requiere de vacunas para uso pos-exposición. Las vacunas actuales que utilizan BCG y las más recientes de segunda generación, han sido diseñadas preferentemente como vacunas pre-exposición.

Actualmente, una segunda teoría sobre el origen de la TB es la más comúnmente aceptada y señala que Mtb es una de las primeras micobacterias derivadas de un ancestro que se cree, fue saprófito del suelo y la cual pudo haberse adaptado directamente al ser



humano haciéndolo su huésped (Brosch y col., 2002). Para ello, se han realizado diferentes análisis de lesiones sugerentes a TB en los restos humanos más antiguos de los que se cuenta en la actualidad (momias de Egipto) y se ha logrado la amplificación de ADN micobacteriano con patrones que corresponden a las especies *M. tuberculosis* y *M. africanum*, pero en ningún caso se encontraron vestigios de material genético que correspondiera a *M. bovis* (Zink y col, 2003).

La aportación de este descubrimiento ha llevado a comprender que la interacción de *M. tuberculosis* con el ser humano es muy estrecha, lo que le ha conferido al patógeno la oportunidad de desarrollar mecanismos efectivos de evasión de la respuesta inmune y de latencia, lo que explica que en la mayoría de los casos se establezca en el organismo sin causar ningún daño aparente, aunque al mismo tiempo se vuelve un riesgo potencial el que inicie una incontrolada multiplicación causando la muerte de su huésped.

En los individuos PPD<sup>+</sup>, se pensaba que a nivel celular, los macrófagos y las células dendríticas eran las únicas estirpes que podían contener a Mtb y su efectiva respuesta de defensa evitaba que estos individuos desarrollaran TB. A partir del año 2000 el Dr. Hernández-Pando y col., descubrieron que en lugares endémicos de TB, grupos de individuos que murieron por causas diferentes a la enfermedad y que nunca mostraron signos clínicos del padecimiento, presentaron ADN micobacteriano en el tejido pulmonar, a pesar de que el órgano parecía estar sano a nivel macroscópico. Interesantemente, la presencia de ADN tuberculoso se observó en diferentes estirpes celulares, como neumocitos humanos tipo II, células endoteliales y fibroblastos, además de los clásicos macrófagos.

Estos datos han creado nuevas interrogantes sobre la participación que tienen las células no fagocíticas en la infección por *M. tuberculosis*: (1) únicamente intervienen como reservorios en la latencia o (2) son capaces de montar mecanismos de la inmunidad innata y de colaboración con el sistema inmune adaptativo en defensa contra la TB.

Para encontrar respuesta a esta y otras interrogantes, ha sido necesario replantear un nuevo análisis del papel que desempeñan este grupo de células no-fagocíticas en la infección por Mtb. Se requiere redefinir el proceso que emplea Mtb para invadir estas células, ya que entre otras cosas, carecen de los receptores comúnmente localizados en el macrófago. Además debe analizarse la capacidad de respuesta de la inmunidad innata con la que cuentan estas células para enfrentar la infección por micobacterias, debido a que estos procesos en parte, parecen no ser los mismos a los que ocurre en la célula fagocítica.



En el modelo de células no fagocíticas, los factores de virulencia de Mtb podrían comportarse de manera diferente al observado en la célula fagocítica, debido a la gran variedad química y funcional de los componentes micobacterianos. Por ejemplo, en la actualidad aún continúa el descubrimiento de nuevos componentes proteicos de Mtb, para este fin se utilizan herramientas de cómputo que permiten predicciones de genes transcritos a partir de la secuencia del genoma de Mtb y se comprueban por la tecnología de proteómica. De esta forma se han reportado proteínas de membrana en Mtb H37Rv, que poseen una gran capacidad de adhesión en células epiteliales (A549). Entre estas proteínas se encuentra la Rv2004c, presente en varias especies de micobacteria, con excepción de *M. bovis* (Forero y col, 2005); la proteína Rv1490 posee dos péptidos (11063 y 11073) que al unirse a las células A549 interfirieron con la habilidad de invasión de Mtb H37Rv (Patarroyo y col., 2008), lo que llevó al grupo de investigación a proponerlos como probables candidatos en la elaboración de vacunas.

Entre los primeros avances en nuestro grupo de investigación, se ha utilizado el modelo *in vitro* de células no fagocíticas (células epiteliales y fibroblastos) infectadas con las especies *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, y se ha establecido que ambas micobacterias estimulan su entrada activando una vía endocítica característica, conocida como macropinocitosis (García-Pérez y col., 2003). La forma exacta como la micobacteria dispara este proceso es desconocida e igualmente se ignora como interviene en la activación de vías de señalización en las células no fagocíticas que son necesarias para lograr los eventos en la formación de prolongaciones membranales y tráfico endocítico.

Interesantemente, una vez que las células no fagocíticas se infectan, la respuesta del sistema inmune innato, aunque inespecífico, logra la intensidad suficiente que permite controlar y eliminar la infección cuando se trata de una micobacteria de baja virulencia (*M. smegmatis*) (García-Pérez y col., 2008), lo que supone que las herramientas moleculares del sistema inmune innato que posee son semejantes a las que se activan en el macrófago, aunque aún no se ha identificado el perfil de la respuesta inmune, su cuantificación y la función en diferentes células no fagocíticas.

En este trabajo se analiza la acción individual de algunos componentes micobacterianos determinando su participación como probables estimuladores de la macropinocitosis a nivel morfológico, estructural, endocítico y en la respuesta inmune innata activada en la célula no fagocítica.

## 1.1 MICROORGANISMOS PATÓGENOS SECUESTRAN VÍAS ENDOCÍTICAS PARA SU INTERIORIZACIÓN.

En el ser humano, los microorganismos patógenos expresan un amplio rango de moléculas que interactúan con componentes en la célula huésped con el fin de estimular diferentes acciones que favorecen la infección (Pizarro-Cerda J., y Cossart, 2006) y encontrar un nicho que les permita la sobrevivencia asegurando su existencia.

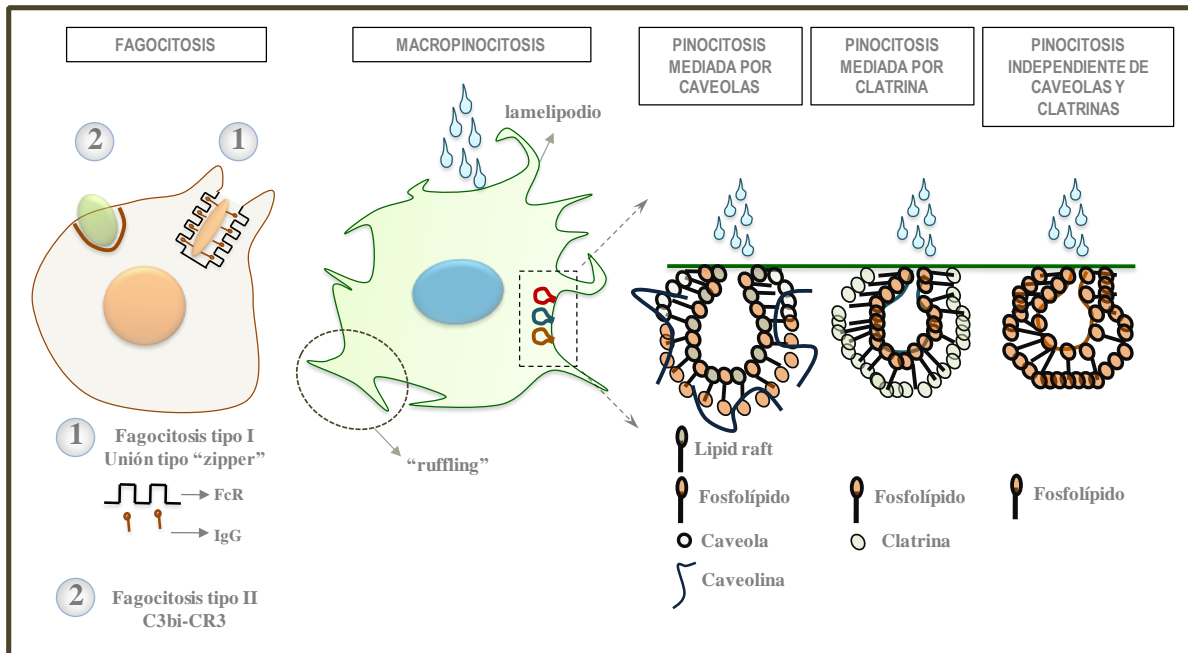
Los virus, algunas bacterias y protozoarios patógenos se han constituido parásitos intracelulares obligados y solo pueden replicarse dentro de la célula huésped, mientras que otros patógenos se replican extracelularmente, aunque pueden utilizar diferentes métodos para introducir sus proteínas efectoras a la célula hospedadora, por ejemplo, las toxinas, que una vez liberadas son reconocidas por receptores membranales y endocitadas por la célula (Sandvig y Van Deurs., 2002).

Algunas bacterias Gram-negativas han desarrollado sofisticados “inyectores moleculares”, como son los sistemas de secreción tipo III o IV, que son maquinarias moleculares formadas por subunidades que atraviesan la membrana bacteriana y la del huésped, con el fin de translocar sus productos directamente a la célula. Los parásitos protozoarios utilizan organelos secretores como son los micronemas y gránulos densos de *Plasmodium* y *Toxoplasma* los cuales liberan sus proteínas en la interfase huésped-patógeno.

Para el caso de los microorganismos intracelulares, su interiorización se lleva a cabo mediante la activación de vías endocíticas que la célula utiliza normalmente durante su homeostasis. La célula acarrea macromoléculas a su interior por vesículas que se forman de la membrana y que derivan de la invaginación de la misma por un proceso de endocitosis, el cual se clasifica en dos grandes categorías, fagocitosis (paso de partículas grandes) y pinocitosis (paso de fluidos y solutos) (Conner y col., 2003).

La fagocitosis está restringida a células especializadas en los mamíferos, incluyendo a los macrófagos, monocitos y neutrófilos, cuya función es eliminar patógenos, detritus celulares, depósitos arteriales de grasa, etcétera (figura 1). Este es un proceso altamente regulado por receptores específicos presentes en la superficie celular y cascadas de señalización mediadas por GTPasas de la familia Rho (Conner y col., 2003).

La pinocitosis ocurre en todas las células, al menos por cuatro mecanismos básicos: macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas y endocitosis independiente de caveolas y clatrina (figura 1).



**Figura 1. Diferentes tipos de endocitosis en células eucariotas.** La fagocitosis es una vía dependiente de la unión ligando-receptor, el resto de las vías pinocíticas se emplean para el paso de fluidos y solutos. Entre las diferentes vías pinocíticas, la vacuola que se forma varía de tamaño (Macropinocitosis, >1µm; dependiente de caveolas, 60 nm; dependiente de clatrin, 120 nm; independiente de clatrin y caveolas 90 nm).

Aunque prácticamente en todas las vías pinocíticas se han reportado por lo menos un agente patógeno que la utiliza (tabla 1), para los fines de este trabajo se exponen solo dos vías que son moduladas por microorganismo, la fagocitosis y la macropinocitosis.

**Tabla 1. Interiorización de microorganismos patógenos y componentes efectores por diferentes vías endocíticas en la célula huésped.**

TIPO DE ENDOCITOSIS	MICROORGANISMO	TIPO CELULAR	REFERENCIA
Endocitosis mediada por caveolas	Poliomavirus murino	Fibroblastos,	Richterová y col., 2001.
	Virus SV40	Epiteliales	Pelkmans y col., 2001.
	Toxina del cólera (GM1*)	Epiteliales	Puri y col., 2001.
	Toxina diftérica (GPI*)	Fibroblastos	Skretting y col., 1999.
	<i>E. coli</i> uropatogénica	Epiteliales	Rosenburger y col., 2000.
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Macrófago	Rosenburger y col., 2000.
	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Macrófago	Lin y col., 2003.
Endocitosis mediada por clatrina	Adenovirus tipo II †	Epiteliales	Meier y col., 2002.
	Toxina Shiga**	Epiteliales	Sandvig y col., 1989.
	Toxina del cólera	Epiteliales	Torgersen y col., 2001
Endocitosis independiente de clatrina y caveolas.	Toxina del cólera	Epiteliales	Torgersen y col., 2001

\*Proteínas de unión a glicosilfosfatidilinositol, complementarias a caveolinas.

\*\* Toxina de *Shigella dysenteriae*.

† Interioriza a la célula por endocitosis mediada por clatrina, aunque su salida de la célula infectada se realiza activando la macropinocitosis.

Los microorganismos que modulan la fagocitosis y la macropinocitosis se incluyen en otro apartado más adelante de esta revisión.

## 1.1.1 INTERIORIZACIÓN DE MICROORGANISMOS POR FAGOCITOSIS

### 1.1.1.1 Bacterias patógenas que regulan positiva o negativamente la fagocitosis.

Las estrategias de infección utilizadas por algunas bacterias patógenas, a nivel molecular, pueden ser únicas o muy conservadas en varias y diferentes especies. Entre estos procesos, recientemente se ha descubierto que las bacterias patógenas pueden regular uno de los principales mecanismos de defensa del huésped, la fagocitosis. Un grupo de estas bacterias infectan al ser humano y se establecen a nivel extracelular inhibiendo la fagocitosis, mientras que otro grupo estimulan por sí mismas su entrada a la célula fagocítica. Actualmente, en un grupo reducido de bacterias infecciosas ha sido posible la identificación de un conjunto de proteínas que determinan el destino que la bacteria selecciona convenientemente para mantenerse viable, ya sea al promover su interiorización a la célula fagocítica ó al inhibir su entrada bloqueando la fagocitosis (Ernst, 2000). En las tablas 2 y 3 se describen algunos microorganismos en los que se han descrito proteínas que regulan el estímulo o la inhibición de la fagocitosis.

**Tabla 2. BACTERIAS QUE INHIBEN SU INTERIORIZACIÓN EN LA CÉLULA FAGOCÍTICA.**

BACTERIA	REGULACIÓN DE LA FAGOCITOSIS	EFECTOR BATERIANO	MECANISMO	REFERENCIAS
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Inhibe la fagocitosis	LspA1 y LspA2	Suprimen la actividad de las proteínas Src, involucradas en la fagocitosis mediada por receptor Fcy.	Mock y col., 2005.
<i>Yersinia pestis</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> .	Inhiben la fagocitosis	YopH (Yop2b)	Potente inhibidor de la fagocitosis a través del receptor Fcy e integrina $\beta$ 1.	Rosqvist y col., 1988. Fallman y col., 1995.
		YodA	Expresado en <i>Y. enterocolitica</i> , previene la deposición de C3b en la superficie bacteriana, evitando su reconocimiento por receptores del complemento.	China y col, 1993.
		YopE	Expresado en <i>Y. pestis</i> , es una GTPasa que incrementa la hidrólisis de GTP de las proteínas RhoA, Rac y Cdc42 convirtiéndolas a su forma inactiva, deteniendo a su vez la polimerización de actina.	Rosqvist y col, 1991. Von Pawel-Rammingen y col, 2000.
<i>Streptococcus del grupo A.</i>	Inhibición de la fagocitosis	Proteínas M	Interfieren con la unión al receptor CR3 en los neutrófilos, y de esta forma bloquea la subsecuente ingestión de la bacteria.	Weinisen M y col., 2004.

Tabla 3. BACTERIAS QUE PROMUEVEN SU INTERIORIZACIÓN EN LA CÉLULA FAGOCÍTICA.

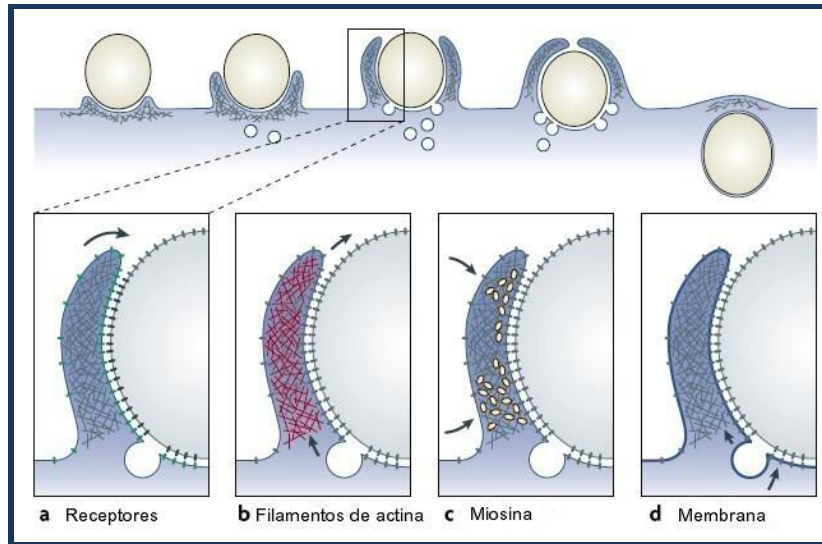
BACTERIA	REGULACIÓN DE LA FAGOCITOSIS	EFECTOR BATERIANO	MECANISMO	REFERENCIAS
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	Promueve la fagocitosis	Antígeno de 19kDa	Adhesina que promueve la fagocitosis <i>in vitro</i> . Mecanismo desconocido	Díaz-Silvestre y col., 2005.
<i>Mycobacterium marinum</i>	Promueve la fagocitosis	Proteínas desconocidas, expresadas por dos loci, <i>mel1</i> y <i>mel2</i> .	Estos loci son grandes segmentos en el genoma, contienen 5 y 6 genes respectivamente. Se han encontrado también en MTB, lo que sugiere que estos genes <i>mel</i> tienen una función similar. Los mecanismos por los que estos genes afectan la interiorización en el macrófago, se desconocen.	EI-Etr y col., 2004.
<i>M. avium</i>	Promueve la fagocitosis	Isla de patogenicidad.	Cuando se inactiva, se observa una disminución en la infección de células fagocíticas tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> en modelo murino. Esta región de su genoma, incluso le permite infectar amibas.	Danelishvili y col., 2007.
<i>Shigella flexneri</i>	Promueve la fagocitosis	IpaC	Induce la macropinocitosis en el macrófago y la interiorización, probablemente a través del receptor Mac-1.	Kuwaie y col., 2001.

\* Las micobacterias patógenas, necesitan unirse y ser reconocidas por varios receptores a nivel de la superficie del macrófago. El concepto de que el macrófago fagocita a las micobacterias a través de receptores de complemento y de manosa principalmente ha cambiado. Una lista de ligandos-receptores en la célula fagocítica se mencionan en el cuadro 3.

### 1.1.1.2 La fagocitosis de bacterias es dependiente de la unión a receptores.

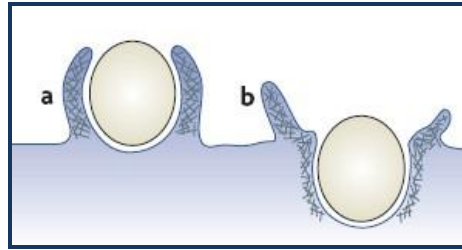
Las bacterias intracelulares invaden a la célula fagocítica por tres vías diferentes: **1)** Cuando la bacteria es opsonizada por inmunoglobulinas y posteriormente son fagocitadas al ser reconocidas por receptores Fc (fagocitosis tipo I) (Cox y col., 2001); **2)** La bacteria es opsonizada con moléculas C3bi, las que se unen al receptor CR3 para ser fagocitadas (fagocitosis tipo II), y la vía más recientemente reconocida en el macrófago **3)** La macropinocitosis, una vía endocítica que se estimula sin la participación de receptores específicos (fagocitosis tipo activadora).

La fagocitosis tipo I, regulada por FcR, caracteriza al modelo tipo “zipper”, donde la partícula o bacteria está recubierta por inmunoglobulinas IgG, las que son fuertemente ancladas al receptor FcR ubicado en la membrana de la célula, provocando que esta última se prolongue y avance conforme se realiza la unión con el receptor, para que finalmente se lleve a cabo la interiorización en un fagosoma (Cox y col., 2001) (figura2).



**Figura 2. Fagocitosis mediada por FcR (modelo tipo “zipper”).** La membrana plasmática se extiende estrechamente sobre la partícula a través de la unión progresiva de receptores para la región Fc (verde; **a**) con las inmunoglobulinas que cubren la partícula (negro; **a**). Los filamentos de actina (rojo; **b**) y la miosina (amarillo; **c**) se concentran en la prolongación membranosa que continúa avanzando (flechas) dirigida por los receptores a ser cubiertos. Partículas grandes requieren que porciones de membrana de compartimentos intracelulares (azul; **d**) se inserten en la base del fagosoma para que continúe prolongándose. Tomado de Nat Rev Mol Cell Biol. 2008; 9(8).

El receptor para la región Fc se activa e inicia una cascada de señalización hacia proteínas Rho (familia de GTPasas pequeñas) y se recluta a Rac y Cdc42 al sitio de la fagocitosis. La proteína Cdc42 causa la extensión de filopodios que se proyectan alrededor de la partícula, mientras que Rac se requiere en la interiorización. Este mecanismo es dependiente de actina y se ha comprobado que ambas proteínas se requieren para el reclutamiento del complejo Arp2/3 junto con su regulador WASP al sitio del fagosoma, que a su vez promueven la nucleación y polimerización de actina. La proteína Rac activa a la cinasa-5 Ptd14P tipo  $\alpha$ , que genera PtdIns(4,5) $P_2$  e interviene en la regulación de actina-F. La presencia de RhoA, también se ha podido observar, aunque su papel se desconoce. La fagocitosis tipo II, donde la bacteria o la partícula se opsonizan cubriéndose por moléculas del complemento iC3b, depende del reconocimiento al receptor CR3 (integrina  $\alpha_M\beta_2$ ) y es morfológicamente distinta de la fagocitosis mediada por FcR. En este tipo de fagocitosis, se forma una depresión en la membrana celular donde la partícula parece “hundirse” al interior y se observa ausencia de las prolongaciones membranales que se presenta en el caso de la fagocitosis por FcR (figura 3).



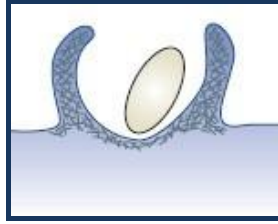
**Figura 3. Fagocitosis tipo I y tipo II. a)** Fagocitosis mediada por FcR (tipo I o de “zipper”) donde las prolongaciones membranales se extienden uniéndose de forma muy estrecha a la partícula opsonizada. **b)** Fagocitosis mediada por CR3 (tipo II), el fagosoma parece hundirse dentro del citoplasma, aunque los “ruffles” pueden acompañar el proceso.

La fagocitosis por CR3 depende de la activación de la proteína RhoA y no requiere de Cdc42 o Rac, como en el caso de la fagocitosis tipo I. La nucleación de actina en el sitio de formación del fagosoma es posible por el reclutamiento del complejo Arp2/3, que también depende exclusivamente de RhoA. La contractibilidad del fagosoma en este caso, es posible por la proteína cinasa ROCK/ROK, que regulan moléculas de actina y miosina, y probablemente también contribuya a que la partícula opsonizada culmine su interiorización.

### 1.1.2 PATÓGENOS QUE ACTIVAN LA MACROPINOCITOSIS EN LA CÉLULA FAGOCÍTICA.

La macropinocitosis se describió inicialmente en macrófagos de rata por Warren Lewis en 1931 (Jones, 2007), sin embargo la comprensión y diferenciación de este proceso como una vía pinocítica característica es muy reciente. La célula emplea esta vía para la interiorización de fluidos y solutos, morfológicamente se caracteriza por la protrusión de la membrana plasmática formando largas prolongaciones (lamelipodios), que al mismo tiempo toman el aspecto de laminas onduladas (“ruffles”), éstas capturan fase fluida del espacio extracelular y la interiorizan en un macropinosoma cuyo tamaño varía entre 0.2 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 4). Interesantemente, esta vía endocítica no depende de receptores específicos y se da de manera espontánea en cualquier célula, aunque también puede ser activada por factores de crecimiento (EGF y MCSF) y ésteres de forbol (PMA) (Racoosing y col., 1989).





**Figura 4. Macropinocitosis en la célula fagocítica.** Las bacterias son rodeadas por lamelipodios que la rodean e interiorizan formando un macropinosoma.

La macropinocitosis es un mecanismo importante para la célula dendrítica, en su etapa inmadura muestra una gran actividad en el “ruffling” de membrana y macropinocitosis, cuyo objetivo es capturar antígeno exógeno soluble que posteriormente es transportado a lisosomas, derivando en péptidos que son presentados al MHC clase II. Una vez que la célula dendrítica madura, se detiene la macropinocitosis y se activa la liberación de complejo Ag-MHC II a la superficie celular para ser presentado a células T (Mellman y col., 2001).

La señalización de la macropinocitosis se asemeja a la fagocitosis tipo I, interviene la cinasa-5 PtdIns4P y Rac recluta a la proteína PAK1.

Las bacterias patógenas *Salmonella typhimurium* (Alpuche-Aranda y col., 1994) y *Legionella pneumophila* (Watarai y col., 2001) utilizan esta vía para entrar a la célula fagocítica. Entre los virus se ha observado que el de la viruela empleado en la vacunación y algunos adenovirus, también estimulan su entrada por esta vía.

En el 2002 Watarai y col., infectaron macrófagos derivados de médula ósea de ratón con *Brucella abortus* y observaron la aparición del efecto “ruffling” a nivel de la membrana celular de forma generalizada durante varios minutos, después la bacteria fue interiorizada y contenida en macropinosomas. Interesantemente, diversas moléculas fueron incorporadas en los macropinosomas, incluyendo a proteínas de anclaje a GPI asociadas a “lipids rafts”, el gangliósido GM1 y colesterol. Al remover las proteínas de anclaje a GPI y colesterol de la membrana del macrófago se inhibió la macropinocitosis y la replicación intracelular (Watarai M., y col. 2002b). El mecanismo por el que *B. abortus* estimuló su interiorización y replicación fue dependiente de un complejo proteico conocido como VirB, parecido al sistema secretor tipo IV de otras bacterias, ya que al inhibir el gen *virB4*, uno de los diferentes genes que constituyen el operón que regula la síntesis del complejo proteico, se redujo la interiorización y multiplicación intracelular de *B. abortus* (Watarai M., y col. 2002a).



### 1.1.3 INTERIORIZACIÓN DE *M. tuberculosis* EN LA CÉLULA FAGOCÍTICA.

La TB se adquiere inicialmente a través de la inhalación de aerosoles que contengan el bacilo de Mtb y aunque este patógeno puede invadir y manifestarse en cualquier tejido, el pulmón representa la vía de entrada principal, llega a las regiones distales del órgano hasta alcanzar los alveolos donde es fagocitado por células dendríticas y macrófagos. En una primera etapa, la función del macrófago parece ser la clave para contener el bacilo. La entrada de la micobacteria tuberculosa sucede casi exclusivamente en estas células mediante la vía de la fagocitosis, que permite mantenerla aislada, evitando así que permanezca libre y alcance la circulación sanguínea o linfática e infecte otros tejidos.

Este eficiente proceso depende del reconocimiento de elementos micobacterianos en la célula fagocítica mediante la unión a receptores específicos de su membrana. Éstos incluyen a receptores del complemento (CR1, CR3 y CR4), receptor de manosa (MR), receptor de proteína surfactante (SPA-R), receptores de anclaje (CD14) a glicosilfosfatidilinositol (GPI), receptor de fragmentos Fc de la cadena pesada de inmunoglobulina y receptores depuradores (“scavenger receptors”) (Tabla 4).

**Tabla 4. RECEPTORES DE UNIÓN A *Mycobacterium tuberculosis* EN CÉLULAS FAGOCÍTICAS**

RECEPTOR	TIPO	DISTRIBUCIÓN	LIGANDOS	COMENTARIOS
CR1	Glicoproteína Tipo I, TM; monomérica	Leucocitos	C3b, C4b	La unión sucede después de la opsonización con C3b por la vía alterna y vía C2a. Cooperar con CR3
CR3	$\beta_2$ integrina, heterodímero $\alpha\beta$ ; CD11b/CD18	Células mieloides y NK	C3bi, Fb, ICAM, factor X, LPS, $\beta$ -glucanos.	Unión opsonica vía C3bi, y unión directa vía D-glucanos; dependiente de activación; ausente en el estallido respiratorio.
CR4	$\beta_2$ integrina, CD11c/CD18	Macrófagos	C3bi	Unión opsonica vía C3bi; presente en estallido respiratorio.
MR	Glicoproteína Tipo I, TM; monomérica	Macrófagos	Manosa, fucosa, manana, Man-LAM	Unión no opsónica vía LAM, AM, PIMs (?); especificidad por lectinas similar a MBP, SP-A; desregulada después de que el macrófago se activa
SPA-R	Proteína de 210-kDa; no se ha clonado	Macrófago y células tipo II	SP-A, MBP	Unión opsónica vía SP-A (o MBP?), sobrerregulada después de la activación del macrófago; estallido respiratorio.
CD14	Glicoproteína de anclaje a GPI; monomérica	Células mieloides	LPS, proteína de unión a LPS, LAM	Unión no opsónica vía LAM (?); puede cooperar con CR3 y CR4.

ABREVIATURAS: **AM**, arabinomanana; **CR**, receptor de complemento; **Fb**, fibrinogeno; **GPI**, glicosilfosfatidilinositol; **ICAM**, molécula de adhesión intercelular; **LAM**, lipoarabinomanana; **LPS**, lipopolisacárido; **Man-LAM**, LAM con manosa en su residuo terminal; **MBP**, proteína de unión a manosa; **MR**, receptor de manosa; **NK**, célula asesina (natural killer); **PIMs**, fosfatidilinositol manosidos; **SP-A**, proteína A surfactante; **SPA-R**, receptor de SP-A; **TM**, membrana.

Tomada de Trends in Microbiology. 1998 (8); 328-335.

Una vez que *Mtb* es interiorizada en el macrófago, inicia el procesamiento de sus antígenos para después ser presentados a las células T por moléculas MHC de clase II junto con la expresión de moléculas coestimuladoras (CD28 y CTLA-4). Las células T y NK activadas, expresan IFN- $\gamma$  que a su vez estimula a las células fagocíticas a continuar produciendo citocinas del perfil Th1, que ayudan a la protección específica contra TB promoviendo el control de la infección al contener al bacilo en estado quiescente (latencia) o probablemente, favorezca su eliminación. Cuando un individuo no logra controlar la infección, ésta progresará e iniciará un proceso de inflamación en el tejido pulmonar. La eficiencia de la célula fagocítica se verá afectada cuando la inmunidad celular cambia de un perfil Th1 a Th2, provocando que disminuya la producción de IFN- $\gamma$  y aumente la IL-4. Esta respuesta celular del perfil Th2 favorece el progreso de la enfermedad.

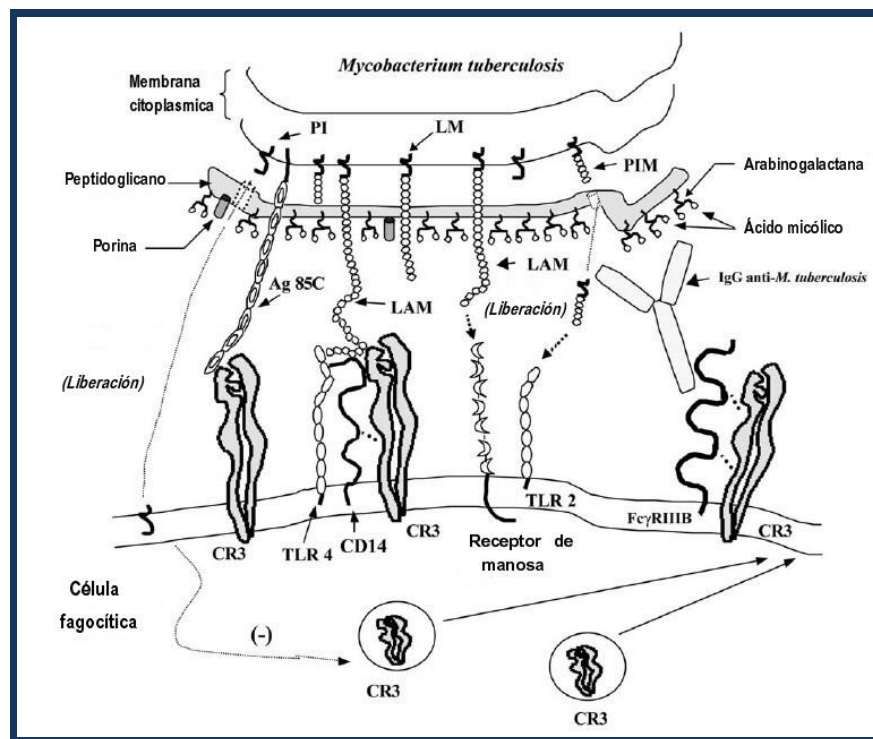
A nivel celular, la adherencia y entrada de *M. tuberculosis* en la célula fagocítica puede seguir tres vías diferentes, de acuerdo al grupo de receptores de la célula al que tenga acceso, **1)** La unión sucede directamente (vía no-opsónica), **2)** Después que el bacilo es sensibilizado por diferentes proteínas opsonizantes (vía opsónica) y **3)** Por macropinocitosis, sin la participación de receptores específicos.

En la infección primaria, la unión y entrada de la micobacteria a la célula fagocítica se da principalmente por la vía no-opsónica, debido a que los componentes del complemento son limitados en el tejido pulmonar (Velasco-Velázquez y col., 2003). La pared de *Mtb*, constituida por abundantes oligosacáridos (D-glucanos y posiblemente D-mananos), le permiten adherirse directamente a la célula fagocítica mediante su receptor CR3 tipo lectina, específicamente en su dominio carboxilo terminal, de la subunidad  $\alpha$  (CD11b) (Figura 5-a). Este sitio de unión es específico entre los azúcares de la pared micobacteriana al receptor CR3, y es útil diferenciarlo debido a que es un receptor importante en la participación de la vía opsónica como de la no-opsónica, aunque en sitios de activación diferente en cada caso.

La composición de oligosacáridos puede variar entre cepas de *Mtb* y al parecer, afecta la afinidad al receptor CR3, por ejemplo, se ha observado que *Mtb* H37Rv posee una mayor cantidad de glucosa y arabinosa que el resto de las cepas de esta especie, lo que incrementa su unión al CR3 en macrófagos derivados de monocitos (Cywes y col., 1997). Otras moléculas involucradas en la interacción de la micobacteria con la célula fagocítica por la vía no-opsónica incluyen al lipoarabinomanana (LAM), que puede unirse por su porción glicosilada a MR o al receptor de lipopolisacárido (CD14) (Ilangumaran y col., 1995). El receptor CR3 también puede reconocer a LAM directamente o al formarse un

complejo con CD14 y TLR-4, además, puede interactuar con la proteína Ag85C de la pared celular de *Mtb*. En los neutrófilos, CR3 requiere una asociación funcional con proteínas de anclaje a GPI, como el receptor Fc $\gamma$  IIIb (CD16) que se une a la región de la cadena pesada de inmunoglobulinas IgG anti-micobacterias. El fosfatidilinositol de la micobacteria, parece regular negativamente la expresión de CR3 por la inducción de TNF- $\alpha$ .

La función de las moléculas que interactúan en la vía no-opsónica se desconocen, sin embargo, la cooperación de CR3 con otros receptores, parece ser importante para el reconocimiento y entrada de la micobacteria a la célula fagocítica y durante la fusión fagosoma-lisosoma.



**Fig. 5. Tipos de unión de *Mycobacterium tuberculosis* a macrófagos de mamíferos.** Las bacteria no opsonizada expresa abundantes polisacáridos en su cápsula que se unen directamente a los receptores del macrófago (MR, CD14), y el sitio tipo lectina CR3, éste último puede formar un trímero con CD14 y TLR4 para la unión con LAM. CR3 también puede interactuar con el Ag 85C. La bacteria puede ser previamente opsonizada por proteínas del suero (MBP y SP-A) o con C3bi siguiendo la ruta de la vía alterna y potencialmente por la vía de la lectina mediada por la proteína de unión a manosa (MBP). Estas opsoninas interactúan con receptores del complemento en el macrófago (CR1, CR3 and CR4) y el receptor de la SP-A (SPA-R) (ver cuadro 4). La unión directa al receptor de manosa involucra conjugados que pueden incluir PIMs o arabinomanana capsular (AM). **LAM:** Lipoarabinomanana; **PIM:** Fosfatidilinositol manósido; **SP-A:** Proteína surfactante tipo A.

Tomada de Trends in Microbiology. 1998 (8); 328-335.

En la segunda vía, cuando el bacilo es previamente opsonizado, las proteínas MBP en el suero y la SP-A en el fluido alveolar, constituyen opsoninas que puede adoptar el patógeno

para entrar a las células fagocíticas e inclusive también podrían participar ayudando a la interiorización de la micobacteria en células endoteliales, fibroblastos y células alveolares tipo II (Figura 5-b). El IFN- $\gamma$ , puede sobrerregular la actividad del receptor de SPA y favorecer la unión con su ligando, la proteína surfactante tipo A, lo que mejora la producción de superóxidos.

Otra forma como Mtb puede ser opsonizada, es mediante la activación de la vía alterna del complemento, por las moléculas C3b e iC3b que interactúan con receptores del complemento (CR1, CR3 y CR4). Esta unión, dispara la señalización que activa la reorganización del citoesqueleto, la transcripción de genes y la liberación de productos reactivos del oxígeno, lo que promueve la fagocitosis y la muerte efectiva de la bacteria.

La unión de iC3b con la subunidad  $\beta$  del CR3 (CD18), activa tyrosin-quinasas y proteínas del citoesqueleto:  $\alpha$ -actinin, paxilina y talina. Las tyrosin-quinasas dirigen a la fosforilación de la isoforma 2 de la PLC- $\gamma$  que promueve la liberación de calcio intracelular, la diferencia en su concentración activa la actina promoviendo su reorganización. Sin embargo, Mtb y *M. avium*, pueden bloquear el incremento en los niveles de calcio y la organización del citoesqueleto.

La tercera forma de interiorización de Mtb en la célula fagocítica es de reciente descubrimiento, se desconocen los mecanismos que la disparan y la respuesta efectora ocasionada cuando la micobacteria utiliza esta vía de infección.

En pruebas con fagocitos mononucleares, se ha observado con video por microscopía, que *M. avium* y *M. marinum* una vez que infectan a las células, ocasionan la necrosis para salir e infectar de manera diferente, una segunda población de macrófagos que no han tenido contacto previo con la micobacteria. Esta segunda forma de infección se lleva a cabo por macropinocitosis, donde se ha comprobado que los receptores de complemento y de manosa no participan, además la vacuola que resguarda a la micobacteria es diferente morfológicamente y su contenido se torna más ácido (Bermudez y col., 2004).

Estudios *in vivo* e *in vitro* con Mtb, *M. avium*, *M. marinum* y *M. paratuberculosis* muestran la adquisición de un fenotipo “invasivo” dentro de la célula del hospedador durante la primera infección, lo que les permite entrar con mayor eficiencia a una segunda población de macrófagos (Danelishvili y col., 2007).

### 1.1.3.1 Reconocimiento de *M. tuberculosis* por receptores tipo Toll en la célula fagocítica.

La unión de *M. tuberculosis* a la célula fagocítica, simultáneamente ocupa otro tipo de receptores que permiten el reconocimiento del bacilo a nivel de la membrana del citoplasma y del fagosoma, dirigiendo su respuesta efectora a la activación del sistema inmune innato, y se conocen como receptores tipo Toll (TLR's).

Los TLR's pertenecen a una familia conservada de receptores de reconocimiento de patrón (PRR), sus ligandos en los mamíferos lo constituyen una variedad de productos microbianos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés), que al ser reconocidos activan a los PRR's facilitando la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno (siglas en inglés ROI y RNI), la transcripción de genes incluyendo quimiocinas y citocinas proinflamatorias, así como la sobre expresión de moléculas coestimuladoras. Estos receptores participan como intermediarios en la respuesta efectora coordinada con la inmunidad adaptativa.

La señalización por TLR's requiere la unión con MyD88 para formar dímeros que resultan en una rápida y potente sobrerregulación de citocinas Th1, que son esenciales para una efectiva defensa inmune innata contra la TB. Además provocan un profundo impacto en la inmunidad adaptativa por sus efectos en la activación y maduración de la célula T. Se ha observado que en ausencia de MyD88, la expresión de citocinas Th1 se ve seriamente comprometida, ocasionando que predominen las citocinas del perfil Th2 que atenúan la respuesta de defensa contra TB.

En la infección tuberculosa, los TLR's son sensores clave y se sabe que juegan un papel importante en la respuesta inmune innata de la célula fagocítica. Diversas proteínas y lípidos micobacterianos han demostrado de forma individual estar involucrados en las cascadas de señalización dependientes de la unión a TLR's (tabla 5). Actualmente, se han reconocido once TLR's presentes en las células de mamíferos, de éstos, TLR2, TLR4 y más recientemente TLR1 y TLR6 que heterodimerizan con TLR2, han sido implicados en el reconocimiento de antígenos micobacterianos. Entre los componentes de la micobacteria que activan a los macrófagos y a las células dendríticas a través de TLR2 y TLR4 se ha identificado a la lipoarabinomana, lipomana, la lipoproteína de 19 kDa y fosfatidilinositolmanósidos entre otros (Tabla 5).

Un papel predominante lo adquiere la activación de TLR2 al causar la muerte intracelular del bacilo tuberculoso, demostrado en macrófagos de humano y de ratón así como su participación en la inducción de la respuesta proinflamatoria. Experimentos recientes con

macrófagos de ratones deficientes de TLR2 e infectados con BCG, han mostrado una reducida expresión de iNOS e INF- $\gamma$ . La ausencia de TLR2 en los ratones mutantes los hizo más susceptibles a la infección por BCG que aquellos deficientes para TLR4, sugiriendo que la mayoría de citocinas inducidas y la actividad bactericida de los macrófagos, es dependiente de la señalización de TLR2 como el principal mediador proinflamatorio (Tjärnlund y col, 2006).

**Tabla 5. TLR's QUE RECONOCEN COMPONENTES MICOBACTERIANOS.**

Componente micobacteriano	TLR de unión	Especies	Referencia
Lipoproteína 19 kDa (LpqH)	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Brightbill y col. (1999); Noss y col. (2001)
Lipoproteína 27 kDa	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Hovav y col. (2004)
Lipoproteína 33 kDa	TLR2	<i>M. leprae</i>	Krutzik y col. (2003)
Glicoproteína 38 kDa	TLR2, TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Jung y col. (2006)
Ara-LAM	TLR2	<i>M. smegmatis</i>	Wieland y col. (2004)
GPL	TLR2	<i>M. avium</i>	Sweet y Schorey (2006)
HSP65	TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Bulut y col. (2005)
HSP70	TLR2, TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Bulut y col. (2005)
Lipomanana	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Quesniaux y col. (2004b)
Lipoproteína LprA	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Pecora y col. (2006)
Lipoproteína LprG	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Gehring y col. (2004)
Man-LAM	--	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. kansasii</i>	Quesniaux y col. (2004b)
PE-PGRS33	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Basu y col. (2007)
PIM 2, PIM 6	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. smegmatis</i>	Gilleron y col. (2003)
PILAM	TLR2	<i>M. smegmatis</i>	Heldwein y Fenton (2002)
Factor soluble de tuberculosis	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Means y col. (1999)

Tomado de Cellular Microbiology (2007) 9(5): 1087–1098

#### 1.1.4 INTERIORIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA CÉLULA NO FAGOCÍTICA.

La célula no fagocítica, durante la homeostasis se nutre utilizando todas las diferentes vías pinocíticas (figura 1), aunque queda excluida del proceso de la fagocitosis. Algunos microorganismos pueden estimular su interiorización o verter sus productos efectoros por cualquiera de estas vías al espacio intracelular de la célula, en el cuadro 1 se resume los que se conocen hasta el momento.

A continuación solo se describirá a la macropinocitosis por el interés particular de este trabajo.

#### 1.1.4.1 Microorganismos que se interiorizan a células no fagocíticas por macropinocitosis.

En el caso particular de las células no fagocíticas, éstas poseen la capacidad de interiorizar vesículas relativamente grandes (>250 nm) de bordes y tamaño irregular, generados por la evaginación de la membrana plasmática, que a su vez depende de la movilización de filamentos de actina, por el cual la célula ávidamente incorpora fluido extracelular.

En múltiples tipos celulares, la macropinocitosis es una respuesta transitoria a factores de crecimiento. Cuando *Dictyostelium discoideum* en su forma amebode, se cultiva bajo condiciones axénicas, la macropinocitosis se induce para suplir requerimientos nutricionales (Cardelli J., 2001). Los macropinosomas también se forman en el extremo frontal de neuronas y leucocitos móviles.

La transformación de fibroblastos con v-Src y K-Ras resulta en la formación constitutiva de macropinosomas en zonas donde se han formado ondulaciones de la membrana (“ruffling”), lo que demuestra que no se necesita de receptores específicos en la membrana para que se active este proceso (Amyere y col., 2000).

Una vez que el macropinosoma se forma, éste puede fusionarse a lisosomas o regurgitar su contenido de regreso hacia el espacio extracelular. Los macropinosomas son idénticos a fagosomas “vacíos” y no muestran diferencia con los “fagosomas espaciosos” activados por las bacterias enteropatógenas *Salmonella* y *Shigella*.

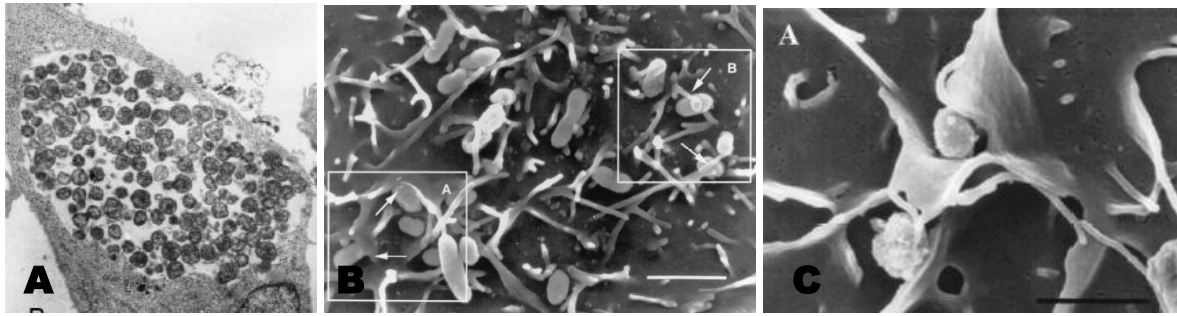
Así como la fagocitosis, la macropinocitosis depende de la señalización a filamentos de actina en el citoesqueleto, donde el PI3K y PLC actúan en orden secuencial.

Este mecanismo puede ser aprovechado por algunos patógenos utilizándola como vía de entrada.

Ojcius y col., descubrieron que *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia psittaci* pueden ser interiorizadas por la línea celular HeLa y células dendríticas (DC) mediante macropinocitosis. Esta interacción dirigió a la maduración de las DC y los macropinosomas se fusionaron con lisosomas favoreciendo la muerte del microorganismo (Ojcius y col., 1998) (Figura 6-A).

En cultivo primario de células epiteliales humanas de vías respiratorias, al ser infectadas con *Haemophilus influenzae*, se presentó un rearrreglo del citoesqueleto formando microvellosidades y lamelipodios que se extendieron hacia la bacteria, rodeándola y atrapándola, posteriormente la bacteria pudo ser localizada en el interior de la célula dentro de grandes vacuolas. Estos datos indicaban que *H. influenzae*, favorecía su interiorización a la célula mediante macropinocitosis (Ketterer y col., 1999) (Figura 6-B).





**Figura 6. Microorganismos patógenos que utilizan la macropinocitosis para su interiorización. (A)** Micrografía de microscopía de transmisión de células HeLa infectadas con *C. psittaci* a las 24 hrs. **(B)** Micrografía de microscopía de barrido de células epiteliales bronquiales humanas, infectadas con *Haemophilus influenzae*, las flechas indican prolongaciones de membrana (lamelipodios) que rodean a la bacteria. **(C)** Células epiteliales de uretra infectadas con *Neisseria gonorrhoeae*, lamelipodios rodean a la bacteria.

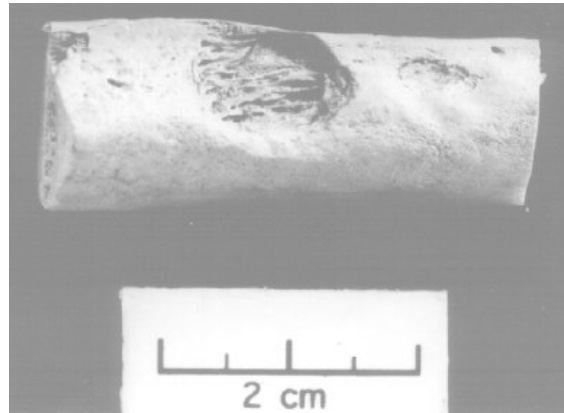
La macropinocitosis también es una vía de entrada para *Neisseria gonorrhoeae* en células epiteliales uretrales de cultivo primario humano. La microscopía electrónica de barrido mostró lamelipodios rodeando a la bacteria. Cuando se utilizó la wortmanina como inhibidor de la fosfoinositol 3-cinasa junto con la citocalasina D, como inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina, se evitó la entrada de las bacterias a las células. Los cambios morfológicos y pruebas de inhibición farmacológica, confirmaban que la macropinocitosis fue la vía de entrada utilizada por la bacteria (Zenni y col., 2000) (Figura 6-C).

#### 1.1.4.2 La célula no fagocítica como blanco de la infección micobacteriana

Las primeras evidencias de tuberculosis extrapulmonar, se encontraron en momias de Egipto y Sudamérica que datan de 3000 a 5000 años A. C., algunas de estas presentaron lesiones óseas a nivel de la columna vertebral que corresponden a la enfermedad conocida actualmente como “mal de Pott”, lo que indicaba que las micobacterias poseen la capacidad de entrar a células no fagocíticas (Figura 7).

La TB extrapulmonar, en la actualidad representa el 15% de los casos, y puede presentarse en ganglios linfáticos (escrófula), bazo, hígado, pericardio, órganos genitourinarios, en la región abdominal con frecuencia afecta el peritoneo y región ileocecal, en tanto que la afección ósea involucra las vértebras en el 50% de los casos.





**Figura 7.** Lesión ósea ubicada en una costilla, donde se encontró presencia de DNA micobacteriano. Tomado de Anthropologie 2000; 38: 193–200.

En las últimas décadas también ha sido posible identificar micobacterias de baja patogenicidad como causantes de lesiones extrapulmonares, sin que invadan el tejido pulmonar previamente (Lillo y col., 1990; Inderlied y col., 1993). Estos casos, son de menor proporción comparados a los casos pulmonares por *Mtb*, sin embargo, ocupan un lugar importante por su diagnóstico difícil al confundirse con otros padecimientos del órgano afectado, por el nivel de resistencia a fármacos que pueden llegar a desarrollar y por que epidemiológicamente se ha dado un aumento en el número de casos por la asociación al VIH y otras enfermedades crónico degenerativas, así como a ciertas complicaciones postquirúrgicas como es el caso de la corrección visual por la técnica de LASIK.

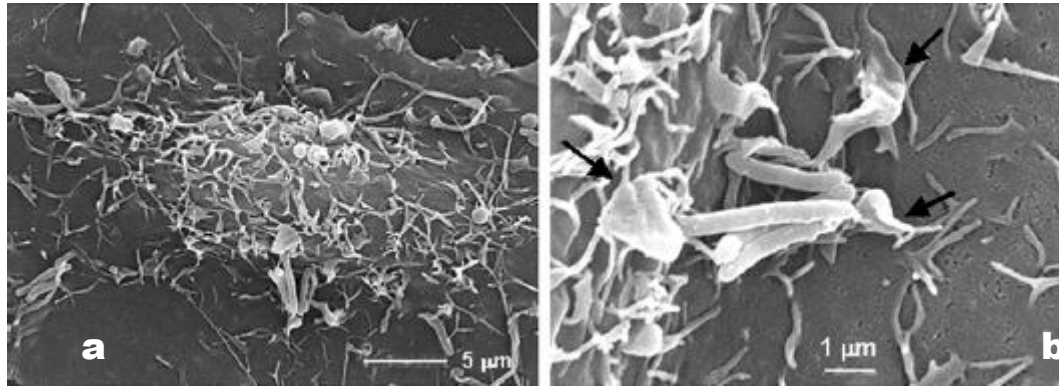
La capacidad de *M. tuberculosis* de interiorizarse en la célula no fagocítica se cree que es debida, en parte, a un factor de virulencia presente a nivel genético. Arruda *et al.*, identificó el gen que denominó gen de entrada a células de mamífero (*mce*), el cual al ser transferido a la bacteria no patógena *E. coli*, le proporcionó la capacidad de invadir y sobrevivir en la línea tipo epitelial HeLa de origen humano, así como en macrófagos (Arruda y col., 1993). Posteriormente, la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* reveló la presencia de cuatro operones *mce* homólogos. Este mecanismo de virulencia se ha confirmado recientemente, al utilizar una cepa mutante de *M. bovis* BCG, deficiente del gen *mce*, lo cual redujo la capacidad de invasión a células epiteliales, no fagocíticas.

Bermudez y col., tomando el modelo de infección en la línea celular A549 (neumocitos humanos tipo II) observó que la interiorización de *M. tuberculosis* H37Rv se inhibía por métodos farmacológicos con citocalina D en un 70%, este producto evita la polimerización de actina; al probar con cafeína, un inhibidor de pinocitosis, el bacilo tuberculoso mantuvo su capacidad de infección. Estos resultados indicaban hasta ese momento que la entrada de la micobacteria era dependiente de un rearrreglo de microfilamentos y microtúbulos.

A nivel de receptores de membrana, se utilizaron anticuerpos bloqueadores del receptor de vitronectina (Ab CD51, 55.7%) y de la integrina  $\beta_1$  (Ab CD29, 55%), y al probar ambos se inhibió el paso del bacilo en un 79%, demostrando así que la interiorización de *M. tuberculosis* es dependiente de receptores de integrina (Bermudez LE., y col., 1996).

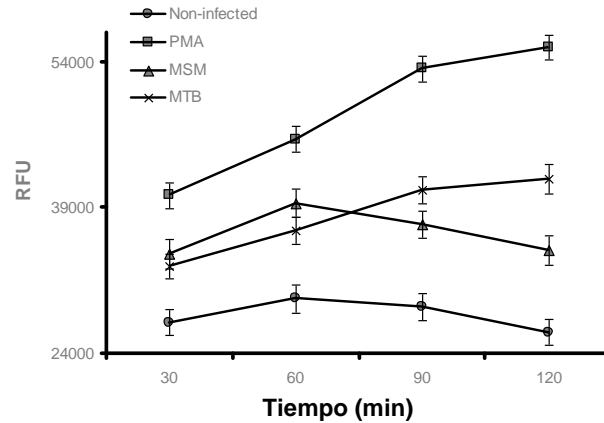
Hernández-Pando en el año 2000 demuestra la presencia de DNA micobacteriano en individuos que murieron por causas diferentes a la tuberculosis, a pesar de que ninguna lesión macroscópica se observó en el pulmón, lo cual demostró que *M. tuberculosis* es capaz de persistir en el tejido pulmonar sin causar lesiones. La presencia de material genético micobacteriano no fue exclusiva de los macrófagos, se halló en otras células no fagocíticas, como neumocitos humanos tipo II, células endoteliales y fibroblastos (Hernandez-Pando R y col., 2000).

En nuestro grupo de trabajo se confirmó que la interiorización de *M. tuberculosis* en células no fagocíticas (epitelio de pulmón humano y fibroblastos pulmonares murinos), se lleva a cabo por macropinocitosis, este mecanismo induce un rearrreglo importante de filamentos de actina dirigiendo la formación de elevaciones membranales. Mediante microscopía electrónica de barrido fue posible observar, a nivel de la membrana plasmática, la formación de filopodios (formando "ruffles") que rodeaban a la bacteria en una larga vacuola endocítica (macropinosoma,  $>1\mu\text{m}$ ) (Fig 8). El bacilo tuberculoso aprovecha este mecanismo para su interiorización y como hallazgo adicional en este estudio, se comprobó que la micobacteria se multiplica una vez dentro. De esta forma se concluyó que la entrada de la micobacteria en este modelo celular, se lleva a cabo por macropinocitosis y que probablemente se deba a productos de secreción de la micobacteria, debido a que al utilizar bacterias muertas por calor, no se observó movilización de los filamentos de actina (García-Pérez y col., 2003).

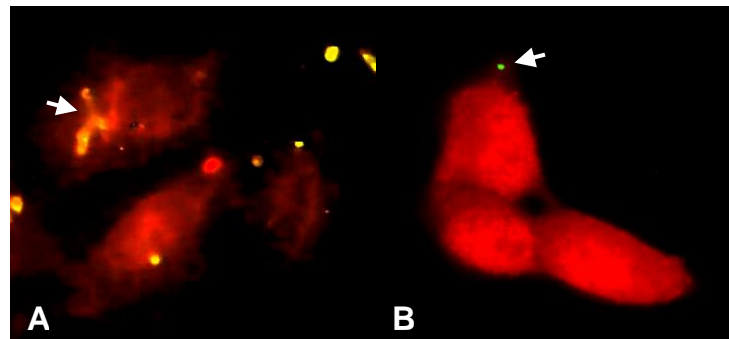


**Figura 8. Micrografía electrónica de barrido en la que se muestra la interacción de la cepa *M. tuberculosis* con células A549.** La membrana celular forma prolongaciones denominadas ruffles que rodean a los bacilos. Tomas realizadas después de 1 hora posinfección. Tomado de *Microbial Pathogenesis* 35 (2003) 49–55.

Continuando con esta línea de investigación se complementaron los análisis morfológicos y de multiplicación intracelular, con metodologías cuantitativas de la macropinocitosis a través de ensayos de fluorometría en placa midiendo la fase fluida. La infección con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis* en células A549, provocó un aumento en la captación de fase fluida, en contraste a las células control. En el caso de *M. smegmatis*, a partir de los 60 min de infección los niveles de fluorescencia decayeron y fueron comparables a las lecturas del control. Por el contrario *M. tuberculosis* registró niveles crecientes de fluorescencia con un pico máximo al final del experimento (Figura 9). El marcador Dextran-FITC que fue endocitado en ambos casos, posee la característica de ser sensible a pH ácido, disminuyendo la fluorescencia en forma directamente proporcional, lo que permitió proponer que *M. tuberculosis*, mantiene lecturas crecientes de fluorescencia en la células por evitar la acidificación del macropinosoma. Esta observación se comprobó por colocalización de fluorescencia, donde *M. tuberculosis* evitó la adquisición de Rab7 (Figura 10-B) y catepsina D a nivel de la membrana de la vacuola, proteínas que identifican la maduración del endosoma, en cambio la proteína Rab 5, marcador de endosoma temprano, colocalizó con la micobacteria patógena. Por el contrario *M. smegmatis* (una micobacteria no patógena), no logra evadir la acidificación y por lo tanto los niveles de fluorescencia disminuyeron drásticamente, además de que se comprobó que la proteína Rab7 colocalizó con la micobacteria interiorizada en el macropinosoma (Figura 10-A). Estos resultados indicaron que *M. tuberculosis* como modelo de micobacteria patógena, bloquea la regulación bactericida en neumocitos humanos tipo II, un mecanismo muy similar a lo que se observa en el macrófago.



**Figura 9. Captación de fase fluida en células A549 con diferentes estímulos.** PMA, forbol miristato-acetato. MTB, *Mycobacterium tuberculosis*. MSM, *Mycobacterium smegmatis*. \* $p < 0.05$ . Tomado de Tesis de Maestría: García N. S. 2004.



**Figura 10. Células A549 infectadas con micobacterias y marcadas con anticuerpos anti-Rab7.** (A) Colocalización (amarillo) correspondiente a Rab7 (rojo) y *M. smegmatis* (verde) en el macropinosoma. (B), *M. tuberculosis* (verde) en el macropinosoma no se une a Rab7 (rojo). Ambas imágenes corresponden a 15 min de maduración. Aumento a 100X. Tomado de Tesis de Maestría. García N.S. 2004.

#### 1.1.4.3 Reconocimiento de *M. tuberculosis* por receptores tipo Toll en la célula no fagocítica.

El reconocimiento innato de las micobacterias ocasiona cambios en otros tipos celulares, además de los macrófagos y células dendríticas, que influyen importantemente en la generación de la respuesta inmune, como son las células asesinas naturales (NK) y células endoteliales. La expresión de TLR's por parte de estas células permite su activación y la subsecuente producción de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos.

Es posible que en el tracto respiratorio, la inducción de la respuesta inmune antimicobacteriana, sea en alto grado dependiente de la señalización por TLR's que a nivel sistémico, debido a que existe una expresión diferencial de moléculas TLR's por células del tejido estromal y células innatas del tejido epitelial residente. Se ha propuesto que la señal

originada, principalmente por TLR2 está involucrada en la activación y maduración de la célula presentadora de antígeno y logra el primer contacto específico con la célula T y la generación de citocinas proinflamatorias que dirigen a las células T CD4<sup>+</sup> a una respuesta Th1, esencial para la protección contra la infección tuberculosa.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Las micobacterias se interiorizan a la célula no fagocítica activando la macropinocitosis como vía principal de acceso al espacio intracelular, sin embargo se desconoce el mecanismo utilizado por el patógeno para estimular y regular esta vía endocítica. Los componentes de la pared micobacteriana y los productos secretados constituyen un conjunto de moléculas que podrían participar en cierto grado en la activación de la macropinocitosis en la célula no fagocítica.

### 1.3 HIPÓTESIS

Algunos de los componentes protéicos y lipídicos de las micobacterias, así como sus productos solubles, participan estimulando la macropinocitosis en la célula no fagocítica favoreciendo la entrada de la micobacteria a la célula no fagocítica.

## 1.4 OBJETIVO

Identificar y determinar la participación de proteínas recombinantes y lípidos de *M. tuberculosis H37Rv* así como productos de secreción de la micobacterias, que estimulen la macropinocitosis en células no fagocíticas.

## 1.5 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la captación de fase fluida en la línea celular A549, utilizando como estímulo a *M. tuberculosis H37Rv* (Mtb), *M. smegmatis* (Msm), *M. abscessus* (aislado clínico), proteínas recombinantes, ácidos micólicos y sulfátido de Mtb.
- Determinar si los componentes de la pared estimulan la macropinocitosis al inactivar las diferentes bacterias por métodos físicos y químicos.
- Analizar el efecto de diferentes proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* sobre la estructura membranal de las célula no fagocíticas.
- Analizar el efecto de las proteínas recombinantes sobre el citoesqueleto de las células A549.
- Evaluar la producción de óxido nítrico por las células A549 infectadas por las micobacterias y tratadas con los productos proteícos y lípidos de *M. tuberculosis*.



## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### Línea celular

La línea A549 (neumocitos humanos tipo II), como modelo de células no fagocíticas, se obtuvo de la ATCC (CCL185). Para todos los experimentos, las células se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-SIGMA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest) previamente descomplementado.

### Cepas bacterianas

Se incluyeron las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (virulenta; 25618) y *M. smegmatis* (no patógena; 281), ambas procedentes de la ATCC. Se incluyó además, una micobacteria no tuberculosa, la cual fue aislada a partir de una endoftalmitis, e identificada por secuenciación del gen *rRNA 16S* (región V2 y región de promotores), como *M. abscessus* (González y Merchand, comunicación personal). Las diferentes micobacterias se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit, USA), suplementado con OADC (ácido oléico, albúmina, dextrosa y catalasa, DIFCO, Detroit, USA). Previo a los ensayos de infección, las diferentes micobacterias se lavaron tres veces por centrifugación (6,500 g/3min) con solución balanceada de Hanks (HBSS; Sigma). Al final se resuspendió la masa bacteriana en la misma solución hasta igualar la turbidez al tubo No 1 del nefelómetro de McFarland.

### Tinción de bacterias con isotiocianato de fluoresceína

Para los ensayos de fluorescencia, las diferentes micobacterias se tiñeron con isotiocianato de fluoresceína (0.1mg/ml; SIGMA) diluido en HBSS y se incubaron a 37°C por 20 min. El exceso de FITC se eliminó con lavados por centrifugación (6,500 g/3min), repitiendo la operación hasta la ausencia de niveles de fluorescencia en la solución de lavado (485/538 nm; Fluoroskan Lab). Las bacterias teñidas con FITC, se resuspendieron en HBSS hasta alcanzar una turbidez igual al tubo No. 1 del nefelómetro de McFarland y posteriormente la suspensión bacteriana se ajustó una MOI de 10.

### **Sobrenadantes de cultivo micobacteriano.**

Las diferentes micobacterias se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 libre de OADC, una vez que las micobacterias alcanzaron la fase logarítmica, se centrifugaron (6,500 g/3min), se separó la masa bacteriana y se recuperó el sobrenadante de cultivo, el cual se filtró por membrana de 0.22 µm (Millipore) y se congeló a -70°C hasta su uso.

### **Inactivación de micobacterias por métodos físicos y químicos**

Las micobacterias *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *M. abscessus* (aislado clínico) se inactivaron por el método físico de calor a presión (120 °C, 15 lb presión, 15 min) y con el método químico utilizando azida de sodio (SIGMA). Con este último compuesto se estableció que la concentración que inactivó a las micobacterias en 24 horas fue de 10 mg/mL. Las micobacterias inactivadas se lavaron 3 veces con HBSS para eliminar cualquier resto de azida de sodio. En ambos métodos la viabilidad de las bacterias se comprobó al sembrarlas en caldo 7H9 (Middlebrook) y capa delgada en medio sólido 7H11. Las suspensiones bacterianas inactivadas se utilizaron en los ensayos de captación de fase fluida.

### **Proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*.**

Se emplearon las siguientes proteínas recombinantes: P16 (alfa cristalina), P38, ESAT-6, APA, Ag85B y PE-PGR33kDa de *M. tuberculosis* H37Rv, todas proporcionadas por la Dra. Clara Espitia Pinzón (Instituto de Biomédicas, UNAM, México). Estas proteínas se expresaron en la cepa de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Paisley, UK) transformada con los plásmidos respectivos para cada proteína. Posteriormente los antígenos recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad (QIAgen), se cuantificaron y se suspendieron en diferentes soluciones amortiguadoras. Además, se incluyó la proteína recombinante Sortasa A (SrtA) de *S. aureus*, la cual fue obtenida con la misma metodología y en la misma clona de *E. coli* que las proteínas recombinantes de Mtb.

La concentración de las proteínas se ajustó a 1µg/mL en HBSS para los ensayos de captación de fase fluida, como estimulantes sobre los cambios en la membrana celular, citoesqueleto y producción de óxido nítrico.

Como testigo de endotoxina, se incluyó al lipopolisacárido (SIGMA) en las pruebas de captación de fase fluida y rearrreglo del citoesqueleto a una concentración de 0.1 µg/mL en HBSS.

**Proteínas Recombinantes de bacterias Gram-negativas.**

Se incluyeron dos proteínas recombinantes de choque térmico de 60 kDa, de las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae*, proporcionadas por la Dra. M. Lilia Dominguez López (Depto. Inmunol, ENCB, México). Ambas, fueron expresadas en la cepa de *E. coli* XL1-Blue, transformada con el plásmido que codifica para cada proteína. La purificación se realizó mediante una columna conteniendo resina con níquel (Ni-NTA; QIAgen, Life Technologies). El producto se dializó con PBS para eliminar el exceso de imidazol y se determinó la concentración proteica por el método de Bradford. Se usaron como estímulo en las diferentes pruebas a una concentración de 1µg/mL en HBSS.

**Lípidos micobacterianos.**

Entre los componentes lipídicos de *M. tuberculosis* H37Rv, se incluyeron a los ácidos micólicos (SIGMA) y sulfátido, lo que se emplearon a una concentración de 1µg/mL. El sulfátido fue proporcionado por la Dra. Julieta Luna-Herrera (Depto. Inmunología, ENCB, México) y se purificó a partir de una masa bacteriana de Mtb H37Rv, deslipidizada por el método de Folch y col (1957), siguiendo el protocolo modificado de Goren (1970) según lo descrito por Luna-Herrera (1991).

**Proteínas no relacionadas a bacterias.**

Como testigos de proteínas no relacionadas a bacterias, se incluyeron a la albúmina sérica bovina (ASB; Fracción-V, USBiological), albúmina sérica humana (ASH; SIGMA) y ovoalbúmina (OVA; SIGMA). Se emplearon para los ensayos de estímulo sobre el citoesqueleto a una concentración de 1µg/mL en HBSS.

**Productos de células A549 infectadas con micobacterias**

Se colocaron 300, 000 células en placas de 24 pozos y se incubaron a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> por 24 hr, en este tiempo la confluencia alcanzó el 90-100%. Las células se infectaron con *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* en una suspensión ajustada a una MOI de 10 por tres horas. Después de este tiempo, se recuperaron los sobrenadantes y se filtraron por membrana de 0.22 µm (Millipore) para eliminar las micobacterias.

**Análisis del citoesqueleto por microscopía confocal.**

En cajas petri conteniendo cubreobjetos estériles se colocaron 150 mil células, se incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 hrs. Las monocapas así preparadas se

infectaron con las diferentes micobacterias teñidas con FITC durante 1 h y a una MOI de 10. Paralelamente, se trataron monocapas con las proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* H37Rv, con las proteínas no relacionadas a micobacterias, con los lípidos micobacterianos y con los productos de las células previamente infectadas, el tratamiento para todos los casos fue de 1 hora. Después de los tiempos de infección y tratamiento, las monocapas se lavaron tres veces y se fijaron con paraformaldehído (SIGMA) al 4% durante una hora a temperatura ambiente, el fijador se retiró con tres lavados de solución reguladora de fosfatos (PBS; 0.15M, pH 7.2). Las monocapas se cubrieron con faloidina rodaminada (50ng/cubreobjeto; SIGMA) en PBS por 20 min., a temperatura ambiente y el exceso de faloidina se eliminó realizando 5 lavados con PBS. Las preparaciones teñidas se montaron en portaobjetos de vidrio con solución de Vectashield (Vector, Laboratories) y fueron analizadas en un microscopio confocal (LSM5 Pascal, Zeiss). Las muestras se analizaron en modo de multitracking para evitar el empalme de las dos marcas fluorescentes, para el FITC se empleó el filtro 488-530nm y para la rodamina el filtro 543-560nm. Se realizaron capturas de imágenes en X-Y y en X-Y-Z, éstas últimas permitieron la reconstrucción de proyecciones en 3D. En este último caso, el equipo realizó capturas a diferentes niveles ópticos, desde la base de la célula hasta su parte apical con una distancia de 0.5  $\mu\text{m}$ , con el conjunto de imágenes el programa del microscopio (Zeiss LSM Image Examiner Version 4.0) construyó una animación de la célula en rotación 3D, de donde se hicieron capturas de las proyecciones laterales.

#### **Análisis de macropinosomas por fluorescencia.**

Las células se prepararon de la misma forma que para los ensayos de citoesqueleto, descritos anteriormente. La infección con las diferentes micobacterias se llevó a cabo durante una hora con un MOI de bacteria ajustada a 10, resuspendidas en HBSS adicionada con Dextran-FITC de 70 kDa (SIGMA) a una concentración de 0.1 mg/mL. Después de este tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, el exceso del fijador se eliminó con tres lavados con HBSS y se montaron en cubreobjetos con Vectashield. Las diferentes células infectadas se analizaron con un microscopio de fluorescencia (filtro 485/538 nm) equipado con el sistema APOTOM (Zeiss). El programa del equipo permitió realizar diversas tomas de la célula con distancia de 0.2  $\mu\text{m}$  entre ellas y recrear una animación en rotación.

### **Captación de fase fluida**

Para cada ensayo se prepararon monocapas en placas de 24 pozos, con aproximadamente 300,000 células/pozo y se mantuvieron en atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 90 al 100%. Se lavaron 3 veces con HBSS, para eliminar células no adheridas. Se preparó la solución de HBSS adicionada con Dextran-FITC de 70 kDa (SIGMA) a una concentración de 0.1 mg/mL. Esta solución se utilizó como base para agregar las micobacterias (tanto las viables como las inactivadas), y los diferentes estímulos micobacterianos. De esta mezcla se agregó 1 mL por cada pozo, se incubó en atmósfera de CO<sub>2</sub> y se tomaron lecturas a los 30, 60, 90 y 120 minutos en un fluorómetro (Fluoroskan Lab.) con filtro de 485 nm de excitación y 549 nm de emisión.

### **Detección de la producción de óxido nítrico por fluorescencia.**

Se monitoreó indirectamente la producción de óxido nítrico (NO) utilizando DAF (diaminofluoresceína, SIGMA), el cual es un reactivo que al unirse a esta molécula, cambia a DAF-2 triazol, el cual es altamente fluorescente. Los niveles de fluorescencia emitidos por las células ante los diferentes estímulos se analizaron en ensayos *in vivo* con microscopía de fluorescencia y por fluorimetría en placa.

Las monocapas se prepararon en placas de 24 pozos con una confluencia del 50-60% para el primer caso y del 100% para la segunda técnica, descritas anteriormente. Una vez que las células se lavaron para retirar el medio de cultivo, se incubaron 60 min con el DAF a una concentración de 5 mM en atmósfera de CO<sub>2</sub>, para permitir la difusión pasiva del reactivo, el exceso de reactivo se retiró al lavar una vez con HBSS. Después de este tiempo las células se estimularon con las diferentes micobacterias, los sobrenadantes de cultivo micobacteriano, los ácidos micólicos y el sulfátido de *M. tuberculosis* y a partir de los 15 min de incubación con los estímulos, la fluorescencia emitida se monitoreó en un microscopio invertido de fluorescencia (Zeiss; filtro de 485/538) a los 30, 60, 120, 180 y 240 min. La captura de las imágenes se realizó por fluorescencia e iluminación por contraste de fases, fijando un solo campo para cada tratamiento con la ayuda de una cámara digital (Canon PowerShot A620) adaptada al microscopio.

Paralelamente se realizaron monocapas a una confluencia del 100%, las cuales fueron tratadas y estimuladas como previamente se describe, la fluorescencia emitida por las monocapas estimuladas se cuantificó por fluorimetría en placa (Fluoroskan Lab.) siguiendo la misma cinética.

### **Microscopia electrónica de barrido**

Las células A549 se cultivaron en placas de 24 pozos (Costar 3524), conteniendo en su interior cubreobjetos de vidrio previamente lavados con ácido sulfúrico (70 °C/30 min), agua ultrapura y esterilizados por calor seco (150 °C/30 min). En cada pozo se colocaron 10, 000 células aproximadamente, resuspendidas en medio DMEM, adicionado con antibióticos (penicilina-gentamicina) y suplementado con SFB al 10%. Veinticuatro horas después se lavaron las células con HBSS para eliminar las células no adheridas. Las diferentes proteínas recombinantes, se prepararon en HBSS a una concentración de 1 µg/ml y se adicionó un mililitro a cada pozo. A las dos horas del estímulo celular con los diferentes componentes micobacterianos, cada pozo se lavó tres veces con HBSS y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de fosfatos de Sorensen, por dos horas. Después de este tiempo las muestras se lavaron con solución de Sorensen, adicionado con sacarosa (SIGMA) al 1% y 100 µl de cloruro de calcio (SIGMA) al 1% por cada 10 ml de volumen total. Las muestras se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% a 4°C por dos horas. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con la solución de lavado previamente descrita. Se procedió a la deshidratación de las muestras de forma gradual en alcohol etílico, desde 70% hasta llegar al 100%. Las muestras deshidratadas se secaron al punto crítico y se recubrieron con oro para ser analizadas con un microscopio electrónico de barrido (Jeol).

### **Análisis Estadístico.**

Los resultados de captación de fase fluida y emisión de fluorescencia utilizando la técnica de fluorimetría en placa con las micobacterias y productos micobacterianos, se analizaron por ANOVA de una sola vía, aplicando el modelo Kruskal-Wallis, con un intervalo de confianza de  $p < 0.05$ . En el caso particular de *M. abscessus*, ésta micobacteria estimuló niveles altos de fluorescencia en la captación de fase fluida por parte de la célula, provocando que la diferencia entre medias de los tratamientos fuese muy grande, por lo que estos datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA de una sola vía pero aplicando el modelo pareado múltiple de comparación de medias por el método de Dunn, con un intervalo de confianza de  $p < 0.001$ .

En los casos donde se presentó lectura importante en un solo tiempo, los datos se procesaron para esa única lectura con la prueba T-Student, bajo el modelo de Student-Newman-Keuls, con un intervalo de confianza de  $p < 0.05$ . En todos los casos, se utilizó el programa SigmaStat versión 3.1.

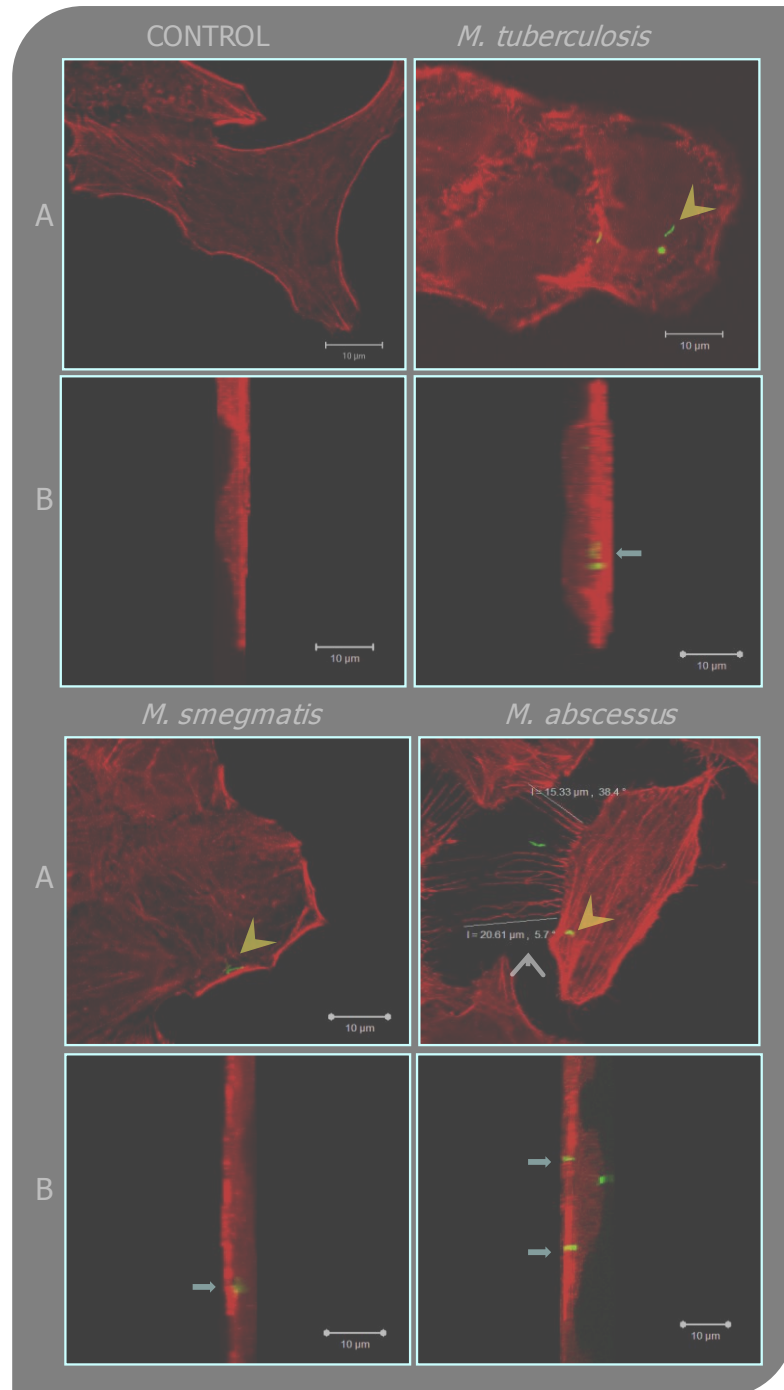
### III. RESULTADOS

#### Interiorización de diferentes especies de micobacterias en células A549.

Para evidenciar la interiorización de las diferentes micobacterias en las células A549, se realizaron ensayos de microscopía confocal, como previamente se describió. Las imágenes mostraron que las tres especies de micobacterias al estar en contacto con las células A549 por una hora, lograron interiorizarse al citoplasma celular y estimularon pérdida de la distribución longitudinal de los filamentos de actina.

En general, la célula infectada mostró un importante rearrreglo del citoesqueleto en los bordes y zona apical, donde se muestra un acúmulo de filamentos de actina en estructuras que corresponden a prolongaciones membranales de longitud variada (lamelipodos y vellosidades) (figura 11). La infección micobacteriana también provocó un aumento de volumen celular en la zona apical, alrededor de la región perinuclear, cambiando su morfología plana y adherente por un aspecto esférico, acompañado de bordes irregulares de la membrana citoplasmática, que no presentan las células testigo (figura 11, fila B).

Estos cambios en el citoesqueleto fueron discretos con *M. smegmatis*, en tanto que con *M. tuberculosis* los cambios fueron más evidentes. *M. abscessus*, presentó una mayor capacidad de infección al observarse un incremento en el número de micobacterias dentro de la célula, localizadas a diferentes niveles del citoplasma, solo apreciables en la imagen 3D (figura 11). La infección por esta micobacteria indujo la formación de lamelipodios de gran longitud ( $>10\mu\text{m}$ ), además se presentaron fibras de estrés ubicadas en la zona adherente entre la célula y el soporte del cubreobjeto (figura 11).



**Figura 11. Células A549 infectadas por una hora con diferentes especies de micobacterias.** Los filamentos de actina se tiñeron con faloidina acoplada a rodamina. Las células control muestran filamentos de actina distribuidos de forma longitudinal. En la fila **(A)** se observa la presencia de micobacterias teñidas con FITC dentro de la célula (cabezas de flecha). La flecha angosta de color blanco en la célula infectada con *M. abscessus*, muestra filamentos de actina formando lamelipodios de gran longitud; la línea que acompaña estas prolongaciones muestra la medida en micras. En la fila **(B)** se muestran las imágenes laterales de la proyección 3D que corresponden a las células mostradas en la fila **(A)**, en estas se aprecia el aumento de volumen en la zona apical de las células, así como la localización y el número de bacterias en el interior del citoplasma (flechas blancas).

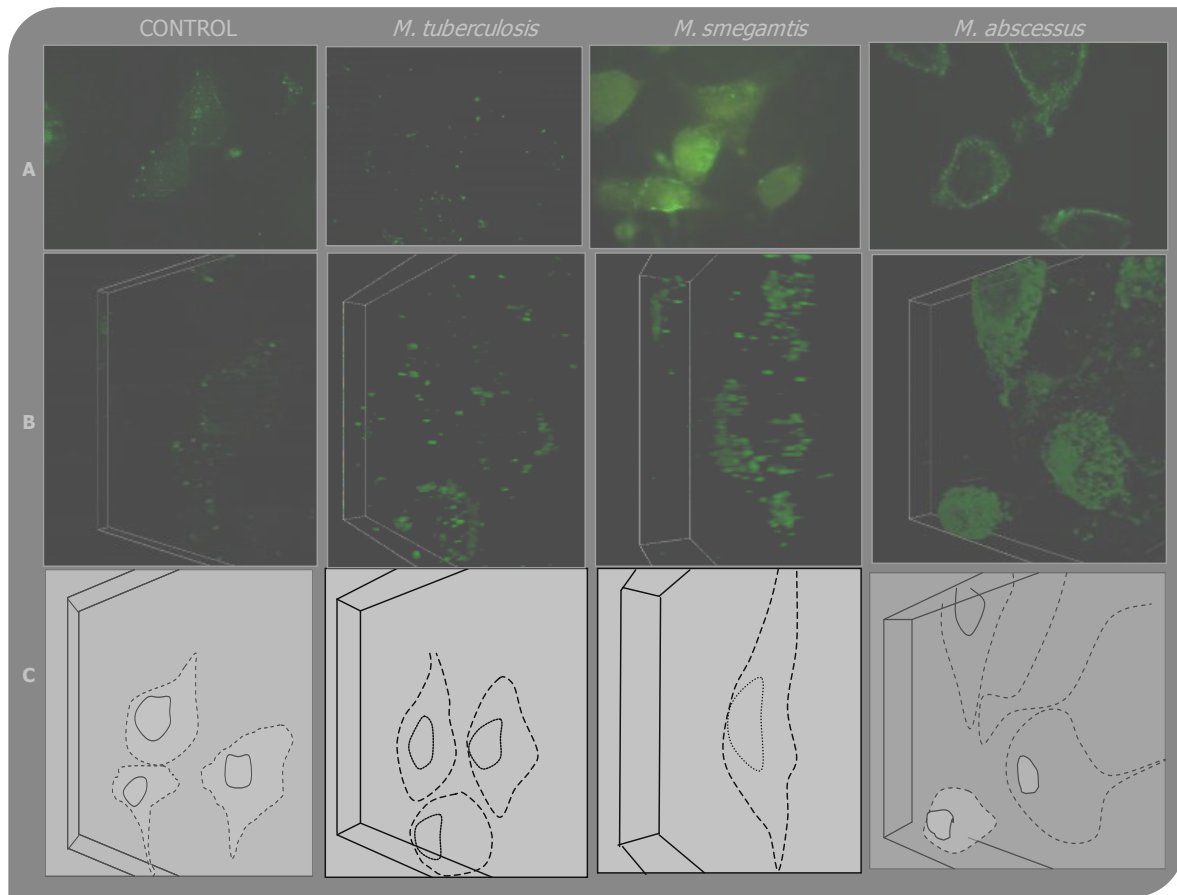


### **Formación de macropinosomas en células A549 estimuladas con diferentes micobacterias.**

Para comprobar visualmente la presencia y distribución de macropinosomas formados por la infección con diferentes micobacterias, se realizaron análisis por microscopía de fluorescencia con el sistema APOTOM.

Las células se estimularon en presencia de las tres micobacterias de diferente patogenicidad durante una hora y el efecto provocado por cada especie micobacteriana fue la formación de una cantidad diferente de macropinosomas que capturaron fase fluida.

*M. tuberculosis* H37Rv, estimuló una mayor formación de macropinosomas comparado con las células sin infectar pero en menor proporción que el inducido por las otras especies de micobacteria, las vacuolas se localizaron únicamente cerca de la membrana citoplásmica (figura 12). Por otro lado, *M. smegmatis*, estimuló un mayor incremento en la formación de macropinosomas que *M. tuberculosis*, las que se ubicaron y distribuyeron en todo el citoplasma de la célula (figura 12). Finalmente, *M. abscessus* fue la especie que estimuló intensamente la captación de fase fluida mediante la formación de un gran número de macropinosomas que saturaron el espacio intracelular (figura 12).



**Figura 12. Formación de macropinosomas en células A549 inducidos por diferentes micobacterias.** Los macropinosomas fueron teñidos con Dextran-FITC. **(A)** Se aprecia la presencia de diferentes grados de fluorescencia en células estimuladas por diferentes micobacterias. **(B)** Imágenes en 3D, el perfil de la célula permite observar con claridad los macropinosomas y su localización intracelular. **(C)** Esquema de las células en tres dimensiones de la sección B.

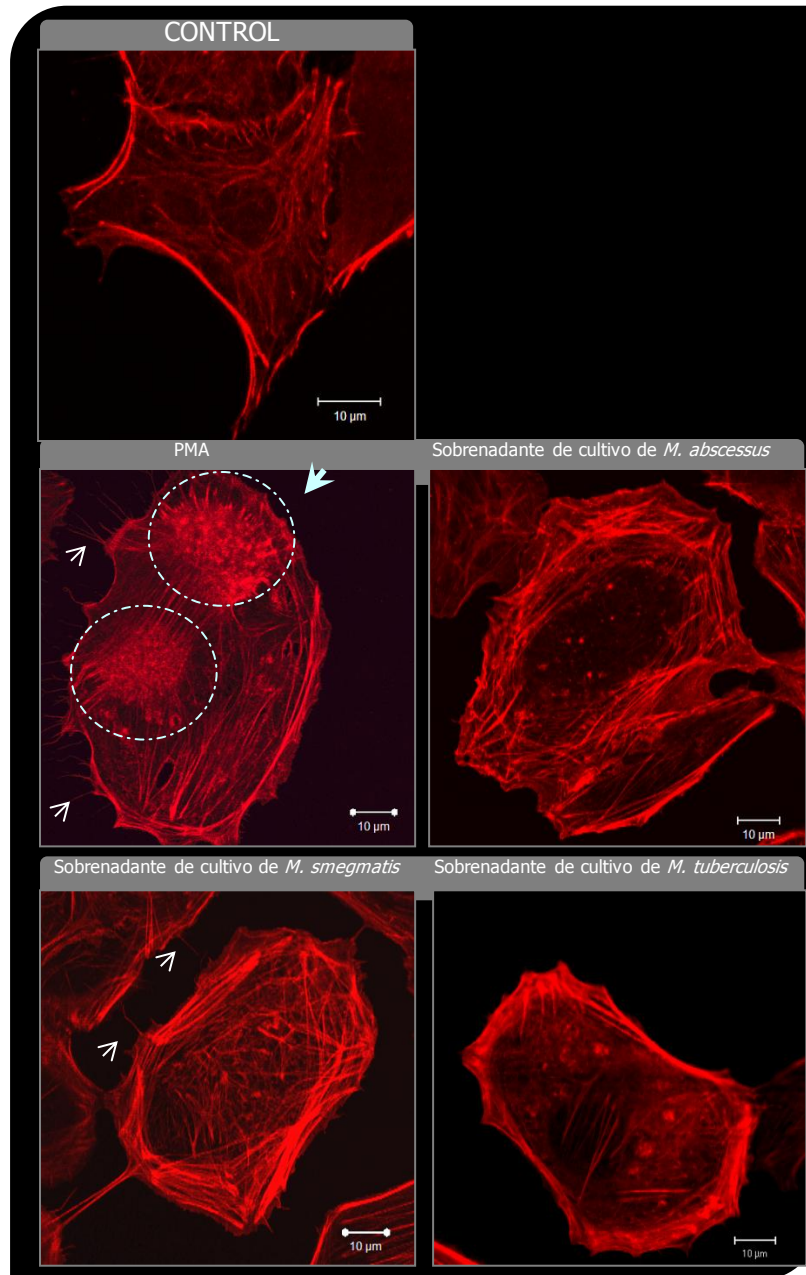
**Los productos de secreción micobacterianos estimularon el rearrreglo del citoesqueleto.**

En el modelo de neumocitos humanos tipo II se utilizaron sobrenadantes de cultivo de las diferentes micobacterias para evaluar sus efectos en la distribución de los filamentos de actina.

Como control del fenómeno, se incluyó al PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) por ser un potente estimulador de la macropinocitosis. Al emplearlo en las células A549, se observó que los filamentos de actina se polarizaron en zonas muy localizadas en la célula, formando extensiones citoplasmáticas (figura 13).

Los efectos inducidos por los sobrenadantes de cultivo de las diferentes micobacterias fue muy similar al observado durante la infección con las micobacterias viables: aumento de

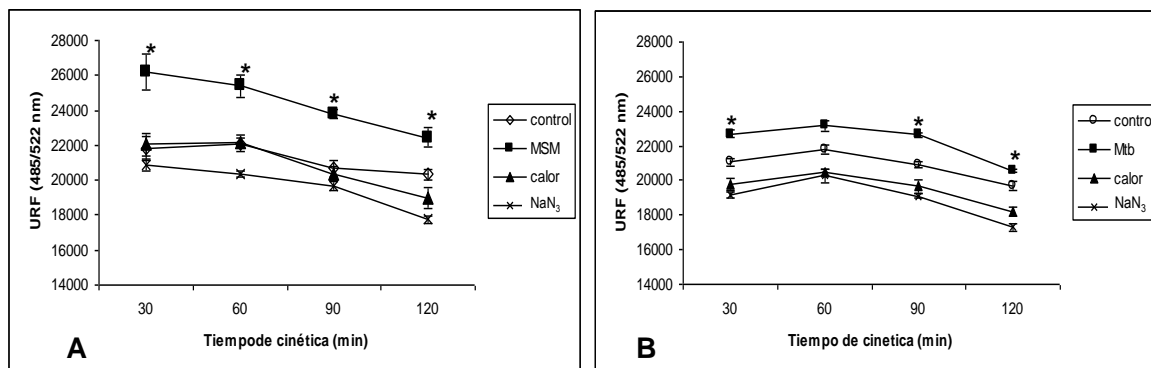
volumen celular que dan un aspecto esférico a las células, formación de lamelipodios de corta longitud y concentración de los filamentos de actina en fibras citoplásmicas y (figura 13).



**Figura 13. Neumocitos humanos tipo II estimulados con sobrenadantes de cultivo de diferentes micobacterias.** Las células fueron teñidas con faloidina acoplada a rodamina. Como estimulante de la macropinocitosis se utilizó el PMA, el cual provocó la polarización de actina y formación de extensiones citoplasmáticas (círculos con línea punteada). Las flechas de línea delgada muestran la presencia de lamelipodios en la membrana celular.

### Participación de componentes de la pared micobacteriana en la interiorización a la célula no fagocítica.

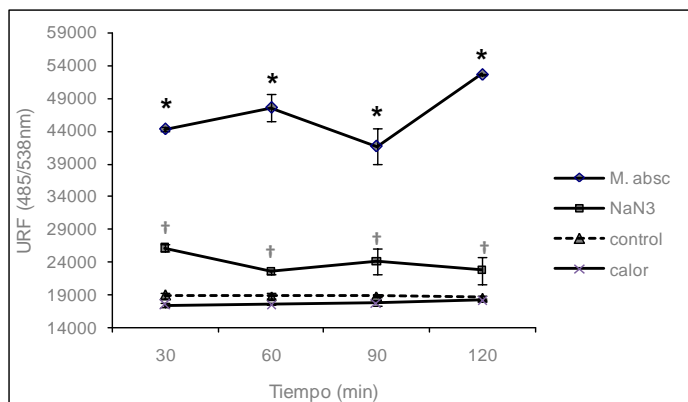
Una vez que se observó que las micobacterias estimularon en diferentes grados la formación de macropinosomas en células no fagocíticas A549, se decidió establecer la participación de componentes de la pared celular de las micobacterias en la inducción de la macropinocitosis. Para este objetivo, se inactivaron las micobacterias *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *M. abscessus* por un método físico de esterilización (calor húmedo) y por un método químico (azida de sodio).



**Figura 14. Captación de fase fluida de células A549 estimuladas con las micobacterias Msm y Mtb viables e inactivadas.** (A) Cuando se inactiva *M. smegmatis*, por ambos métodos, no estimula la captación de fase fluida. (B) *M. tuberculosis*, estimula la captación de fase fluida en mayor grado que cuando la bacteria es inactivada por los métodos descritos. La lectura de fluorescencia en cada tiempo representa el promedio de tres experimentos independientes e incluyen desviación estándar. \*Diferencia estadística significativa  $P < 0.05$  por la prueba de ANOVA. URF: Unidades relativas de fluorescencia. NaN<sub>3</sub>: azida de sodio.

Cuando se estimularon las células con la especie metabólicamente activa *M. smegmatis*, aumentó la captación de fase fluida en los neumocitos y se registró un mayor nivel de fluorescencia en comparación con la fase fluida estimulada por la bacteria inactiva por cualquiera de los dos métodos descritos, con las que no se logró estimular la endocitosis del Dextran-FITC (figura 14-A).

Por otra parte, *M. tuberculosis*, aunque estimula la captación de fase fluida en menor grado que *M. smegmatis*, establece una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) a cuando se inactivó por calor o con azida de sodio, donde no es capaz de estimular la endocitosis y la formación de vacuolas (figura 14-B).



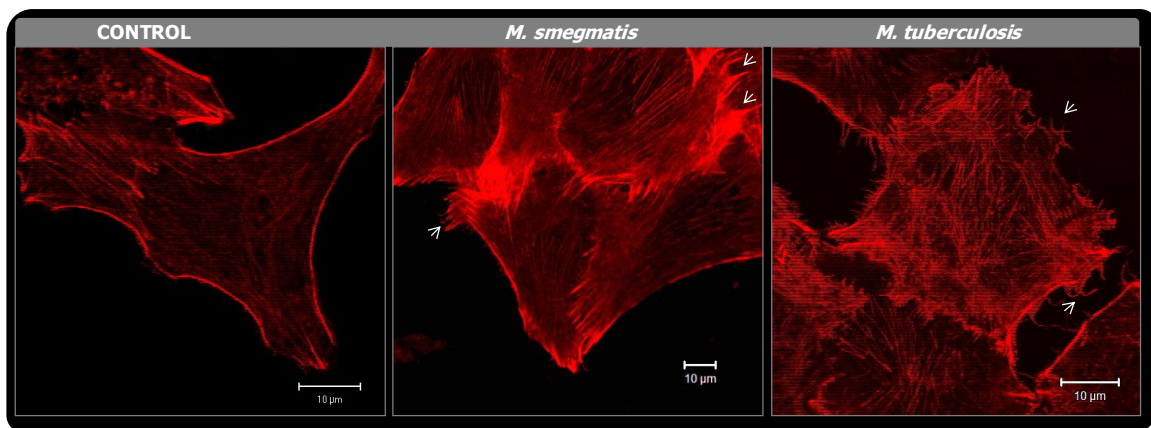
**Figura 15. Captación de fase fluida de células A549 estimuladas con *M. abscessus* viable e inactivada.** \*La bacteria viva estimuló la interiorización de una gran cantidad de Dextran-FITC de manera significativa ( $p < 0.001$ ), aunque el análisis estadístico no marcó diferencia con el grupo de células estimuladas con la bacteria inactivada con  $\text{NaN}_3$ . †Las bacterias muerta con  $\text{NaN}_3$  estimularon mayor captación de fase fluida que cuando se inactivó por calor húmedo ( $p < 0.001$ ), sin embargo, ambas bacterias inactivadas no mostraron diferencia estadística con el grupo de células control. La lectura de fluorescencia en cada tiempo representa el promedio de tres experimentos independientes e incluyen desviación estándar. URF: Unidades relativas de fluorescencia.  $\text{NaN}_3$ : azida de sodio.

*M. abscessus* en su estado metabólico activo, fue la micobacteria que al igual que en la formación de macropinosomas, estimuló el mayor grado de interiorización del Dextran-FITC en las células A549 desde los primeros 30 minutos del experimento, este nivel de captación de fase fluida continuó en aumento a las dos horas en que se tomó la última lectura (figura 15). Aunque la bacteria inactivada por cualquiera de los dos métodos estimuló un bajo nivel de captación de fase fluida, con valores cercanos a las que se registraron con las células control, la micobacteria muerta con azida de sodio logró estimular una mayor interiorización de Dextran-FITC que las bacterias muertas por calor húmedo de manera significativa ( $p < 0.001$ ), por lo que los valores de fluorescencia con la bacteria viable y la inactivada con azida de sodio no mostraron diferencia estadística ( $p < 0.001$ ) (figura 15).

### **Cambios inducidos por productos de células infectadas por micobacterias en células A549.**

A partir del sobrenadante de células A549 infectadas con Mtb y Msm, se estimuló un segundo grupo de monocapas no infectadas y se analizaron los cambios en el citoesqueleto.

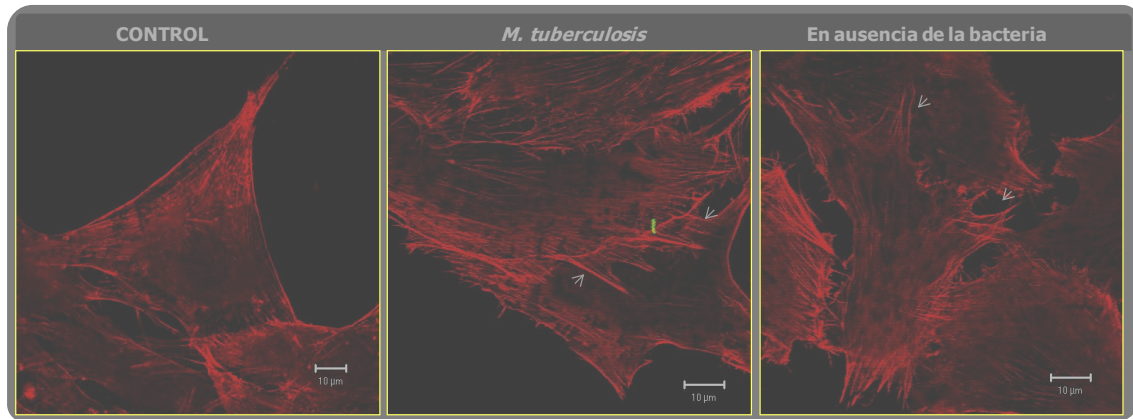
El contacto de los sobrenadantes en el segundo grupo de células, causaron los mismos cambios en el rearrreglo del citoesqueleto que cuando se infectaron con las micobacterias. En el caso de las células estimuladas con el sobrenadante de células infectadas por *M. smegmatis*, se observó que éstas presentaron abundantes filopodios alrededor de la membrana citoplásmica (figura 16). Los cambios inducidos por el sobrenadante de las células infectadas fueron más notorios para la infección por *M. tuberculosis*, este sobrenadante causó cambios en forma generalizada, las células estimuladas cambiaron su morfología aumentando su volumen en la región perinuclear y presentando abundantes prolongaciones citoplásmicas (figura 16).



**Figura 16. Células A549 estimuladas con sobrenadantes de células previamente infectadas con micobacterias por tres horas.** Las células infectadas con *M. smegmatis* muestran acúmulo del citoesqueleto en la membrana celular formando filopodios (flechas delgadas). *M. tuberculosis* provoca cambios morfológicos generalizados en la célula provocando abundante presencia de lamelipodios (flechas delgadas).

Al igual que con las células A549 infectadas con las diferentes bacterias (ver figura 11), el fenómeno de macropinocitosis a nivel del citoesqueleto en ausencia de bacteria interiorizada, también se presentó en la línea celular de osteoblastos humanos MG63. Cuando esta línea se infectó con *M. tuberculosis* por tres horas, las células mostraron un reducido número de bacteria interiorizada, aunque con cambios característicos de macropinocitosis presentes en el cien por ciento de las células (figura 17).





**Figura 17. Osteoblastos humanos MG63 infectados con *M. tuberculosis* por 3 horas.** En la imagen central se aprecia la bacteria teñida con FITC y la célula con abundante presencia de lamelipodios (flechas). La imagen de la izquierda corresponde a un campo distinto del mismo experimento, donde se muestra la ausencia de micobacterias, aunque presencia de efecto “ruffling” y presencia de lamelipodios en la membrana celular (flechas).

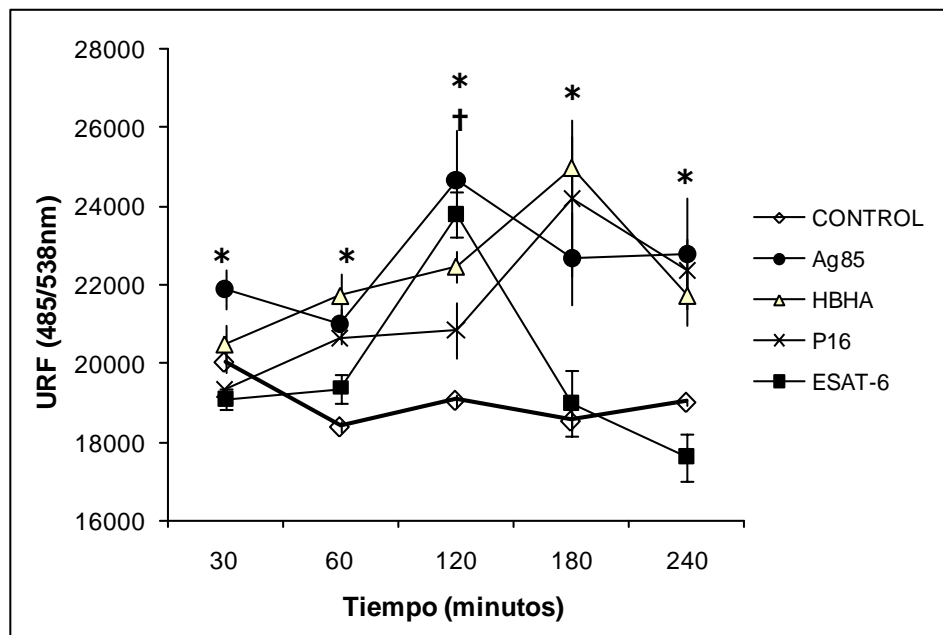
### **Ensayos de captación de fase fluida con proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*.**

Para determinar si componentes proteicos estimulan la captación de fase fluida como una medida de la macropinocitosis, se incluyeron proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* que forman parte de la pared celular y otras que se liberan por secreción como estímulo en los ensayos de captación de fase fluida.

Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas recombinantes Ag85, HBHA y P16, representan el grupo de proteínas que estimularon la captación de fase fluida dentro de los primeros 60 min. El Ag85 indujo la interiorización del Dextran-FITC desde los primeros 30 minutos de estímulo e incrementó la captación de fase fluida de manera sostenida hasta las cuatro horas, donde finalizó el experimento (figura 18). La proteína HBHA inició el estímulo en la interiorización de la solución Dextran-FITC 30 min después de que lo hace el Ag85, aunque también incrementó la captación hasta alcanzar su máximo estímulo a los 180 min, posteriormente declinó la intensidad de fluorescencia pero sin que ésta última lectura permaneciera dentro del nivel de fluorescencia más alto provocado por este grupo de proteínas. La proteína antigénica P16 inició una discreta captación de fase fluida a los 60 min, su mayor efecto lo alcanzó a los 180 min, desde donde comenzó a decaer la lectura de fluorescencia en la misma forma que HBHA, la última lectura se ubicó en un nivel alto de fluorescencia con respecto al control (figura 18). Este primer grupo de proteínas, estimularon la captación de fase fluida con un comportamiento estadísticamente

significativo con respecto al control ( $p < 0.05$ ) y no registraron diferencia estadística entre las mismas ( $p < 0.05$ ) al aplicarse la prueba de ANOVA.

La proteína ESAT-6 fue la única proteína que estimuló la captación de la fase fluida con un único pero importante nivel de fluorescencia a los 120 min (figura 18). Este comportamiento no registró diferencia estadística significativa cuando se comparó al grupo de células tratadas con el resto de las proteínas tuberculosas (ANOVA,  $p < 0.05$ ), mientras que con las células control, solo el tiempo con la lectura más alta (120 min) logró marcar una diferencia estadística.



**Figura 18. Proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* como estímulo sobre la captación fase fluida en células A549.**

\*El grupo de proteínas Ag85, HBHA y P16, mostraron niveles de fluorescencia estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste a las células control por la prueba de ANOVA.

† La proteína ESAT-6 mostró diferencia estadística significativa con las células control al tiempo de los 120 min., por la prueba de T-Student pareada.

Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes e incluye la desviación estándar. URF: Unidades relativas de fluorescencia.

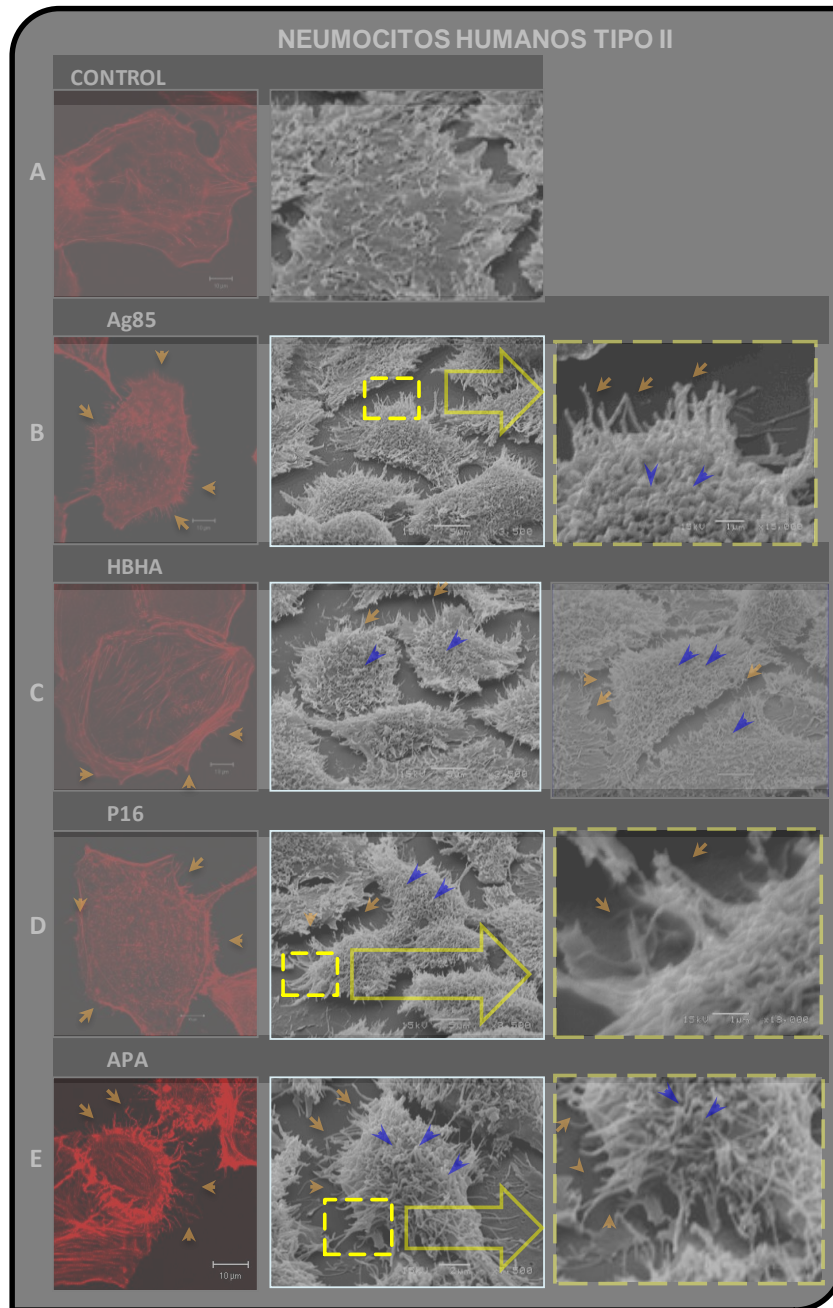


**Efecto de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* a nivel de la membrana en células A549.**

Una vez que se comprobó que las proteínas recombinantes de Mtb lograron estimular la captación de fase fluida, se evaluó su capacidad de provocar cambios a nivel de la membrana que fueran sugerentes a lo que sucede en la macropinocitosis (formación de lamelipodios y actividad de “ruffling”).

Los análisis por microscopía de barrido mostraron que las diferentes proteínas estimularon la formación de lamelipodios de diferente longitud, cubriendo toda la zona apical de las células (figura 19). Estas prolongaciones se extendieron hasta formar ondulaciones, como se observó en las micrografías de la célula a mayor aumento, lo que denotó actividad de “ruffling” (figura 19). Además de estas estructuras, se presentaron pequeñas prolongaciones membranales en forma de filopodios que ocuparon los espacios ausentes de lamelipodios. Nuevamente, la célula mostró un aumento de volúmen en la zona perinuclear y pérdida de adherencia en los extremos de la membrana celular por la formación de prolongaciones membranales.

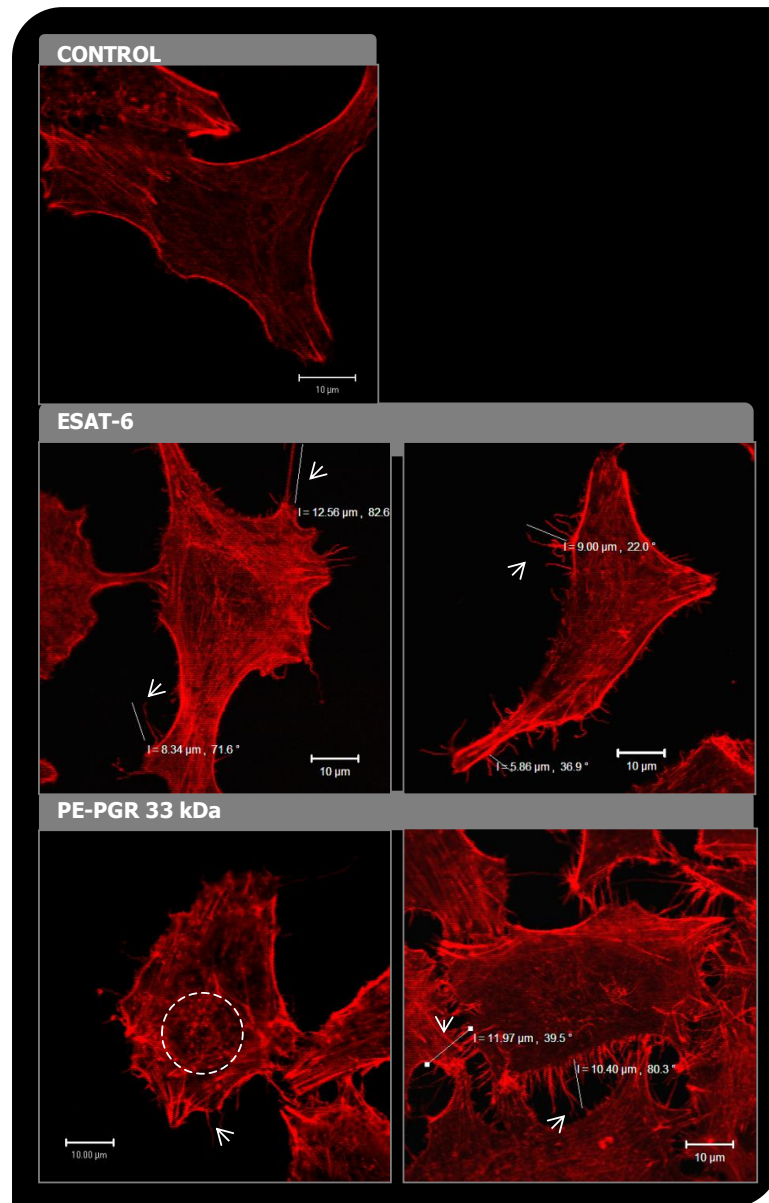
El análisis se completó utilizando el método de microscopía confocal, tiñendo los filamentos de actina con faloidina acoplada a rodamina. En estos ensayos se observó que los filamentos de actina dieron lugar a las prolongaciones membranales de la célula (lamelipodios), cubriendo toda la superficie apical de las células (figura 19, columna de imágenes a la izquierda). Los cambios del citoesqueleto correlacionaron con los cambios morfológicos que se observaron en la membrana celular por microscopía de barrido.



**Figura 19. Micrografías de células A549 estimuladas con diferentes proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*, analizadas por microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de fluorescencia. (A)** Célula control, adherente, plana, con presencia de algunas vellosidades en la parte apical; izquierda: se aprecian filamentos de actina que forman el citoesqueleto. **(B)** Células estimuladas con antígeno de 85 kDa, las flechas indican formación de lamelipodios de diferente longitud. **(C)** Células estimuladas con hemaglutinina, también presentó efecto en la formación de lamelipodios. **(D)** Células estimuladas con proteína alfa-cristalina de 16 kDa. La formación de lamelipodios de gran longitud acompañada de “ruffling”. **(E)** Células estimuladas por 3 horas con la glicoproteína antigénica abundante en alanina-prolina. Esta proteína también logró la formación de lamelipodios.

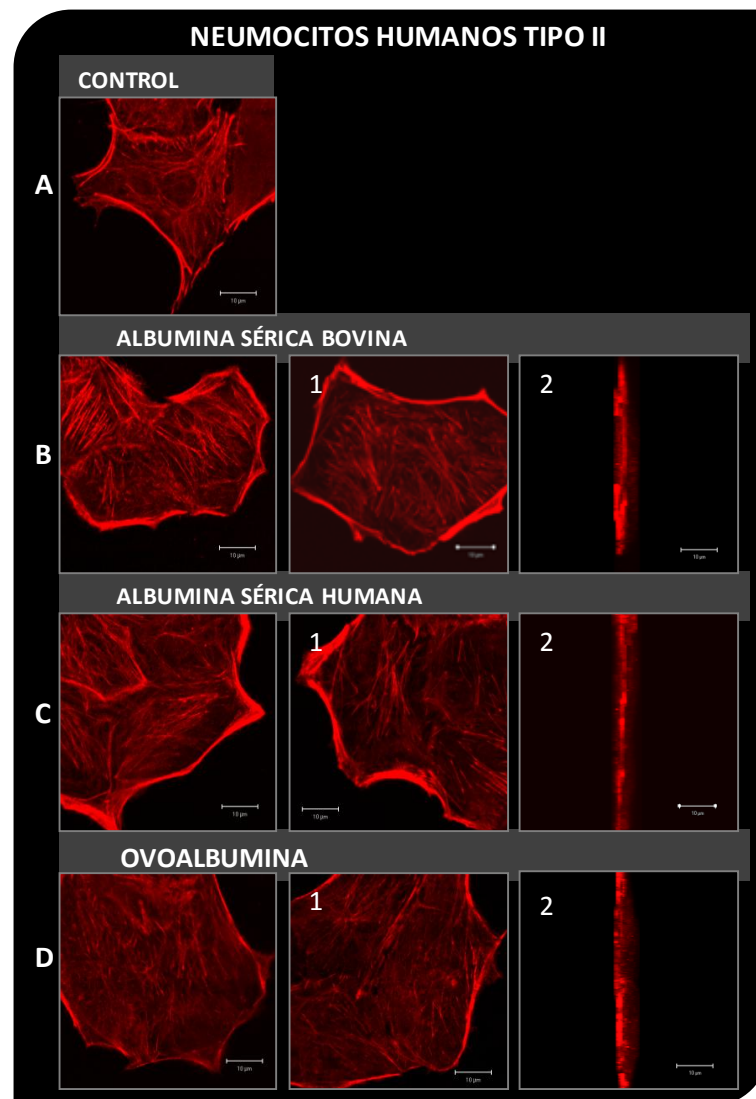
En cada fila, la primera fotografía de la izquierda corresponde al análisis de los filamentos de actina marcados con faloidina acoplada a rodamina mediante MCF. Las siguientes micrografías de la derecha corresponden al análisis de la morfología de la membrana celular por SEM. Las flechas naranjas indican la formación de lamelipodios, las flechas azules indican la presencia de microespículas que cubren la membrana apical de la célula y que rodean a los lamelipodios.

Las proteínas ESAT-6 y PE-PGR 32kDa, estimularon la formación de lamelipodios de gran longitud (5-10 $\mu$ m) (figura 20, líneas blancas). Los filamentos de actina se presentaron acumulados en las prolongaciones membranales y se distribuyeron de forma desorganizada en el citoplasma de las células. En el caso de la proteína PGGRS, las células estimuladas presentaron centros de nucleación de actina en la zona apical de la célula (micrografía de la izquierda correspondiente a esta proteína) (figura 20).



**Figura 20. Micrografías de células A549 estimuladas con proteínas recombinantes de Mtb, ESAT-6 y PE-PGR-33kDa durante 2 hrs.** Las células se tiñeron con faloidina acoplada a rodamina. Las flechas blancas señalan zonas del citoplasma donde se formaron grandes prolongaciones membranales (lamelipodios). El círculo de línea punteada indica la zona en la parte apical de las células donde se presentaron centros de nucleación de actina.

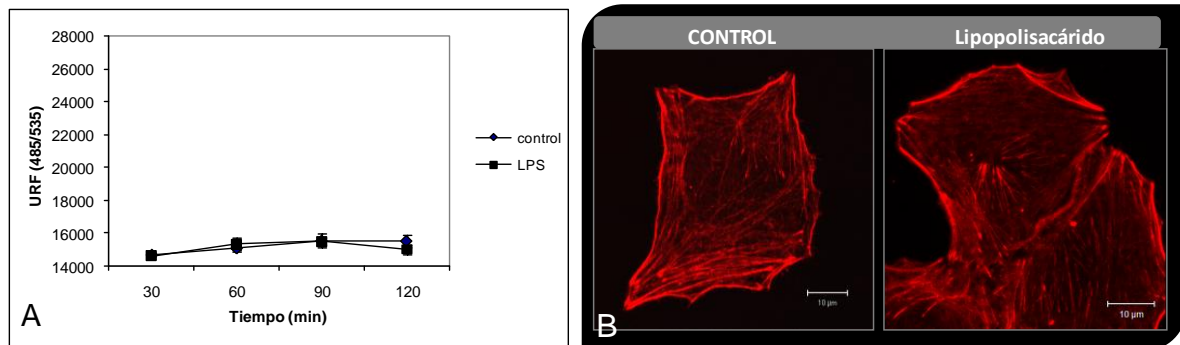
Para comprobar que los efectos observados con las proteínas recombinantes fueran específicos, se incluyeron como testigos proteínas no relacionadas a bacterias, albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina y ovoalbúmina. Estas proteínas se colocaron en contacto con las células bajo las mismas condiciones que las proteínas recombinantes de Mtb. Los resultados muestran que estas proteínas no provocaron cambios en el rearrreglo del citoesqueleto, los filamentos de actina se mantuvieron distribuidos longitudinalmente en el citoplasma y no estimularon la formación de prolongaciones membranales en los tiempos estudiados (figura 21).



**Figura 21. Micrográficas de células A549 estimuladas con diferentes proteínas no relacionadas a bacterias.** Las células se analizaron por MCF, los filamentos de actina presentan la marca fluorescente de rodamina. Las proteínas no causaron cambios en la distribución del citoesqueleto. **(2)** Imágenes que corresponden a la vista lateral de la imagen 1, donde se aprecia que la célula conserva su morfología adherente, plana y con la red de filamentos de actina distribuidas longitudinalmente en todo el citoplasma.

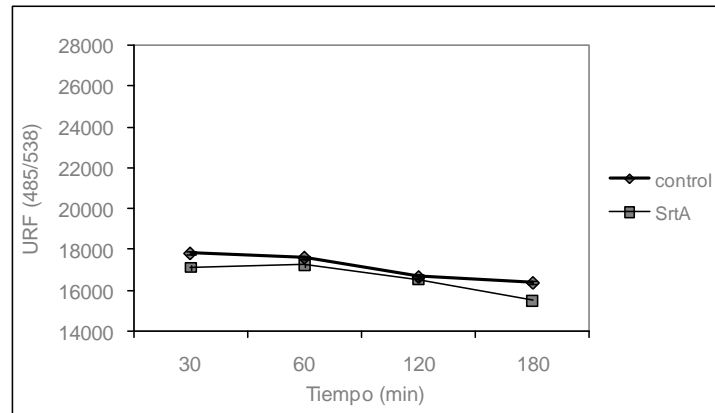
Por otra parte, se comprobó si la probable presencia de endotoxina bacteriana, presente durante el proceso de obtención de proteínas recombinantes, podría estimular los cambios observados en el citoesqueleto y captación de fase fluida, por lo que se incluyeron ensayos con lipopolisacárido.

El lipopolisacárido no estimuló la captación de fase fluida durante las dos horas en que estuvo en contacto con las células (figura 22-A). En las pruebas de microscopía de fluorescencia, el citoesqueleto no mostró cambios macropinocíticos a los observados con las proteínas recombinantes bacterianas. Los filamentos de actina permanecen en posición longitudinal y en los extremos del citoplasma se aprecian bordes regulares que le otorgan el aspecto cuboidal a las células, de manera similar al control (figura 22-B).



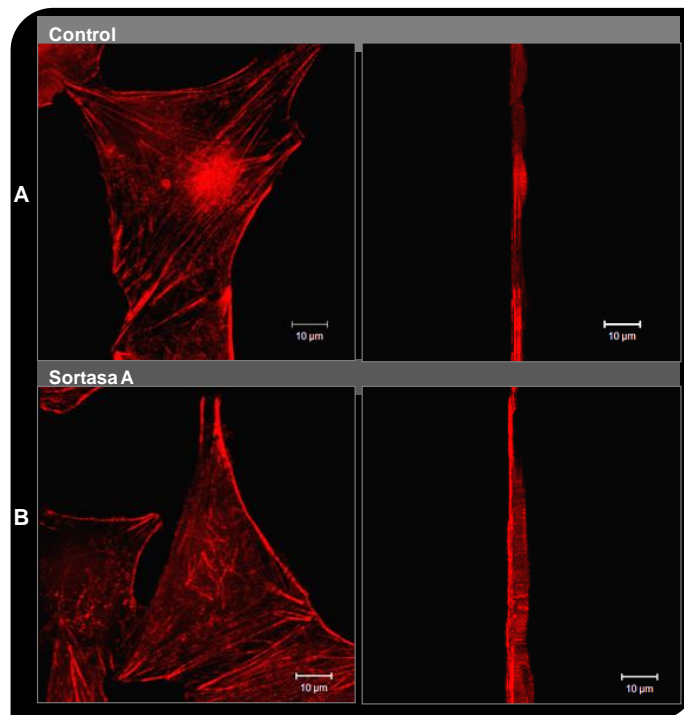
**Figura 22. Efecto de LPS en células A549 sobre la captación de fase fluida y citoesqueleto. A)** El lipopolisacárido por si solo no estimula la interiorización de fase fluida en las células durante todo el experimento. **B)** El citoesqueleto de las células en contacto con el LPS, permanecieron sin cambios, la célula muestra filamentos de actina distribuidos longitudinalmente y bordes del citoplasma regulares.

Además, se incluyó la proteína sortasa A de *S. aureus* como testigo de proteína recombinante no relacionada a *M. tuberculosis*, cuyo método de síntesis se basó en la misma metodología que las proteína de Mtb, incluyendo el uso de la misma cepa de *E. coli* para la transformación con el plásmido correspondiente. En los ensayos de captación de fase fluida, ésta proteína no estimuló la interiorización del Dextran-FITC en las células A549 en los mismos tiempos a los que se probaron las diferentes proteínas recombinantes de Mtb (figura 23).



**Figura 23. Captación de fase fluida de células A549 estimuladas con la proteína recombinante SrtA de *S. aureus*.** Esta proteína no estimuló la captación de fase fluida. La lectura en cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes. URF: Unidades relativas de fluorescencia.

Esta proteína se colocó en contacto con las células durante dos horas, en las mismas condiciones que las proteínas recombinantes de Mtb, sin causar ninguna alteración tanto en la morfología celular como en la distribución de los filamentos de actina (figura 24).



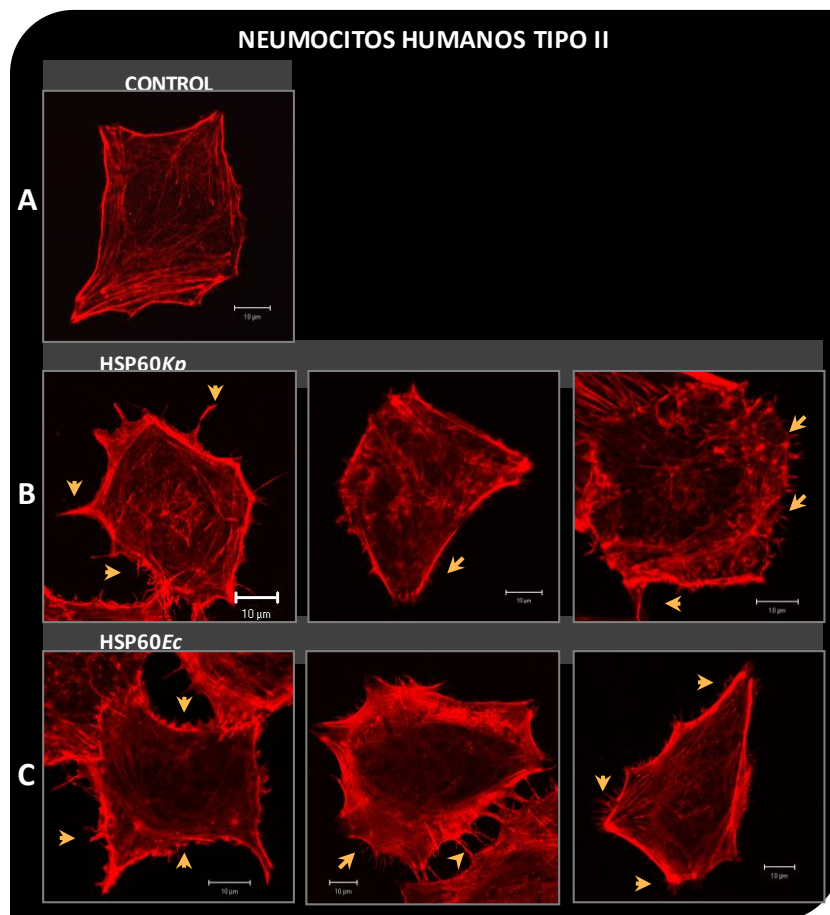
**Figura 24. Células A549 estimuladas durante 2 horas con la proteína recombinante sortasa A de *S. aureus*.** Las células se tiñeron con faloidina acoplada a rodamina. **A)** Imagen de la izq., muestra la célula control con la clásica morfología cuboidal, con bordes regulares, los filamentos de actina se distribuyen longitudinalmente; imagen de la derecha, toma lateral de la célula donde se aprecia el carácter adherente y plano de estas células. **B)** Células estimuladas con la proteína sortasa A, donde se observa la ausencia de alteraciones morfológicas y solo se presenta un ligero aumento de volumen del citoplasma en la región perinuclear (imagen derecha).



### Efecto de proteínas recombinantes de choque térmico de bacterias Gram negativas en células A549.

Se analizó la posibilidad de que los efectos provocados por las proteínas recombinantes de Mtb en el citoesqueleto de las células A549, también pudiesen ser estimulados por otras proteínas de bacterias patógenas generadas por recombinación.

Las células fueron puestas en contacto con dos proteínas recombinantes de choque térmico de 60 kDa de las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae*. La microscopía confocal de los filamentos de actina, revelaron un rearrreglo del citoesqueleto formando prolongaciones membranales de diferente longitud a nivel de la membrana plasmática y la morfología celular se vió alterada al aumentar su volumen en la zona perinuclear, todos estos efectos fueron muy similares a los observados con las proteínas recombinantes de Mtb (figura 25).



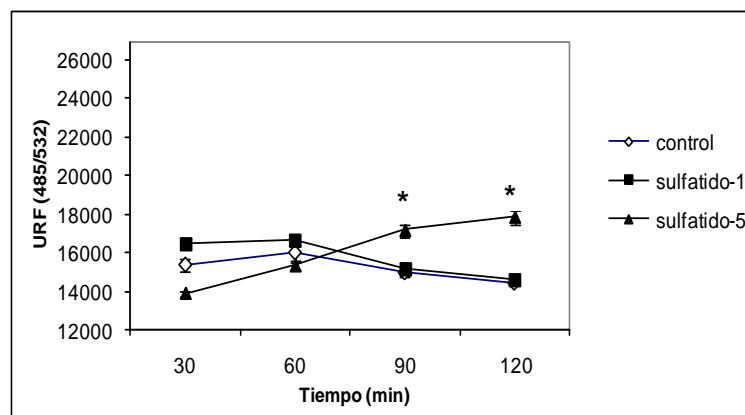
**Figura 25. Micrográficas de células A549 estimuladas con proteínas recombinantes de choque térmico de *E. coli* y *K. pneumoniae* por dos horas.** Las células muestran filamentos de actina marcados con rodamina, el análisis se realizó por MCF. Ambas proteínas provocaron cambios en el rearrreglo del citoesqueleto, los filamentos de actina se concentran en las prolongaciones membranales que forman lamelipodios y "ruffling" (flechas amarillas). HSP60kp: Heat Shock Protein 60 kDa de *K. pneumoniae*; HSP60Ec: Heat Shock Protein 60 kDa de *E. coli*.

**Efecto de componentes lipídicos de *M. tuberculosis* como estímulo en células A549.**

Entre los componentes estructurales de Mtb, además de las proteínas, los lípidos son otros compuestos con probable participación en la interiorización de la micobacteria a la célula no fagocítica, por lo que se incluyó al sulfátido, un glicolípidio abundante en la pared micobacteriana y al ácido micólico, ambos extraídos de *M. tuberculosis* H37Rv.

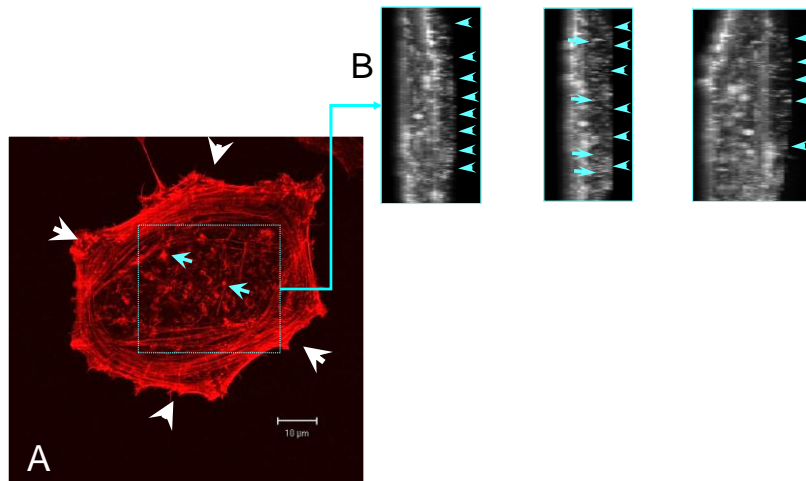
El glicolípidio micobacteriano no logró estimular la captación de fase fluida cuando se empleó a la concentración de 1µg/mL, durante todo el tiempo de la cinética (figura 26). Sin embargo, a una concentración mayor (5µg/mL), el sulfátido provocó la captación de fase fluida a partir de los 90 min y culminó con el mayor estímulo a las dos horas, estas dos últimas lecturas fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (figura 26).

A nivel del citoesqueleto, los cambios generados a las dos horas de estímulo, tuvieron efectos importantes en la formación de filopodios en la zona apical de la célula, la presencia de algunos lamelipodios en los bordes del citoplasma y un aumento de volúmen en la zona perinuclear (figura 27). Sin embargo, la morfología de la célula sufrió menos cambios con el sulfátido que cuando se estimularon con las proteínas recombinantes de Mtb.



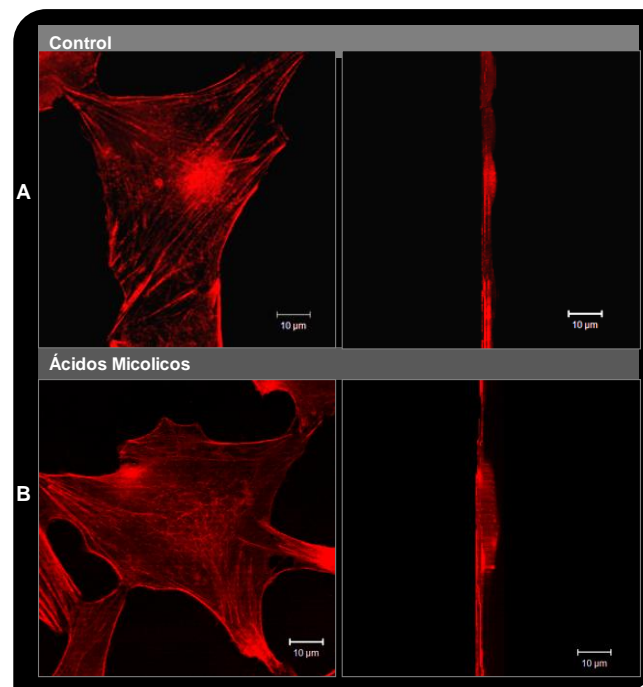
**Figura 26. Captación de fase fluida en células A549 estimuladas con sulfátido de Mtb.** El sulfátido estimula la captación de fase fluida solo a la concentración de 5 µg/mL desde los 90 min de estímulo y hasta los 120 min., con una diferencia estadística significativo con respecto a las células control (\* $p < 0.001$ , prueba de ANOVA). La concentración del lípido a 1µg/mL no tuvo efecto en esta prueba. Sulfátido-1: 1µg/mL; Sulfátido-5: 5µg/mL URF: Unidades relativas de fluorescencia.





**Figura 27. Micrografías de células A549 estimuladas con sulfátido de *M. tuberculosis*.** (A) Las células se estimularon por 2 horas y se marcaron con faloidina rodaminada. Las flechas blancas indican el rearrreglo del citoesqueleto en acúmulos de actina que forman prolongaciones de membrana (lamelipodios). Las flechas azules muestran gran cantidad de microespinas en la zona apical. (B) Proyección lateral 3D de (A), las flechas azules indican abundantes microespinas en la zona apical.

Sin embargo, cuando se colocaron los ácidos micólicos de Mtb en las células, éstos no tuvieron efectos sobre la morfología celular o distribución de los filamentos de actina, las células mantuvieron su aspecto plano, cuboidal y de bordes regulares como las control (figura 28).

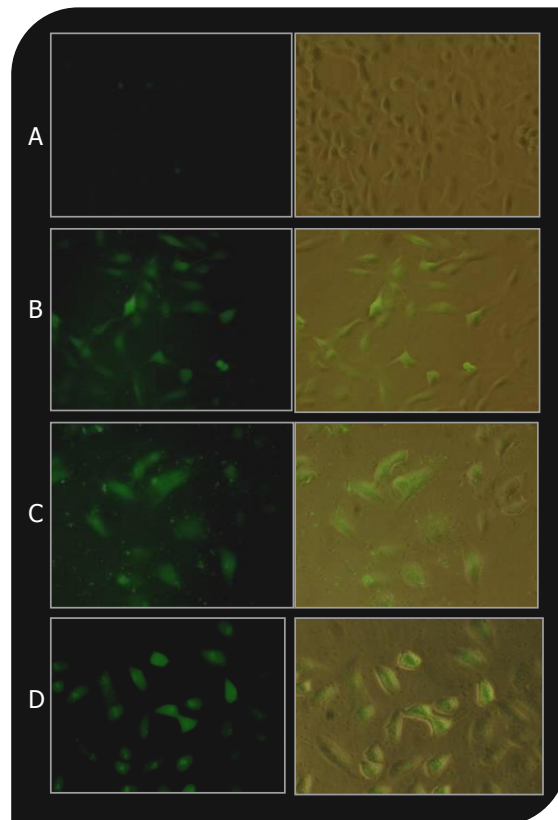


**Figura 28. Células A549 estimuladas con ácidos micólicos de Mtb durante dos horas.** A) Células control, planas, adherentes, bordes regulares. B) Células estimuladas con ácidos micólicos, no presentan alteraciones morfológicas o en la distribución de los filamentos de actina.

**Producción de óxido nítrico inducido por micobacterias, productos solubles y lípidos micobacterianos en células A549.**

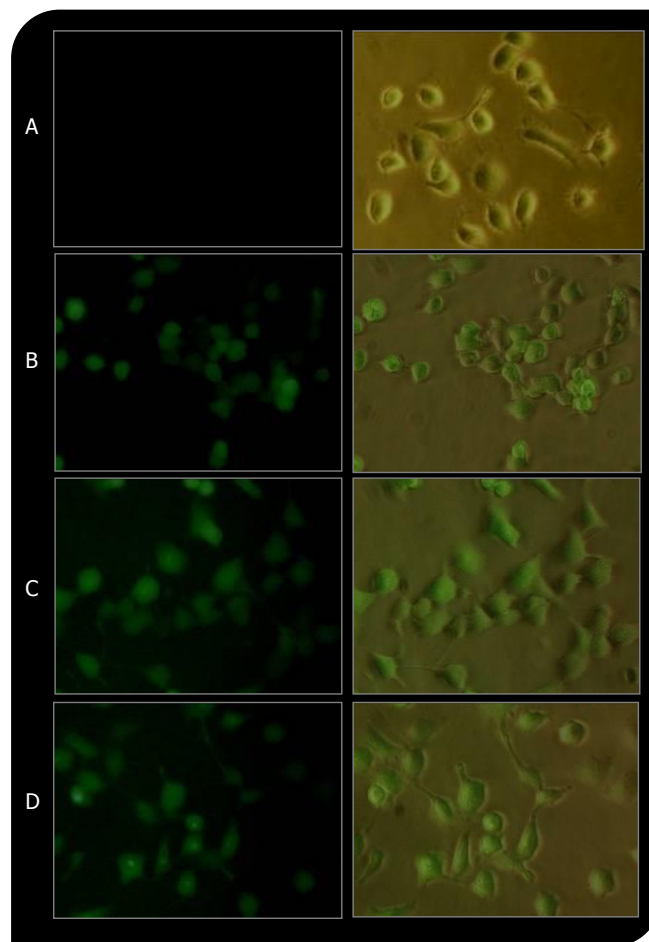
Los neumocitos humanos fueron preincubados con DAF, esta molécula al contacto con el óxido nítrico cambia su estructura química y puede detectarse por la emisión de fluorescencia. Los ensayos se realizaron *in vivo* e incluyeron a las diferentes micobacterias como probable estímulo en la producción de óxido nítrico.

Las tres especies de micobacteria, *M. smegmatis*, *M. abscessus* y *M. tuberculosis* estimularon en las células, emisión de fluorescencia observable desde los primeros 15 minutos, la cual alcanzó su mayor nivel durante la primera hora de tratamiento (figura 29), indicando la producción de NO en este tiempo. Este efecto inductor se prolongó hasta las 4 horas con la especie *M. abscessus*, que en este tiempo indujo la mayor emisión de fluorescencia en las células infectadas. Las células infectadas con *M. tuberculosis*, después de la primera hora disminuyeron los niveles de fluorescencia y no se observó marca al final del experimento.



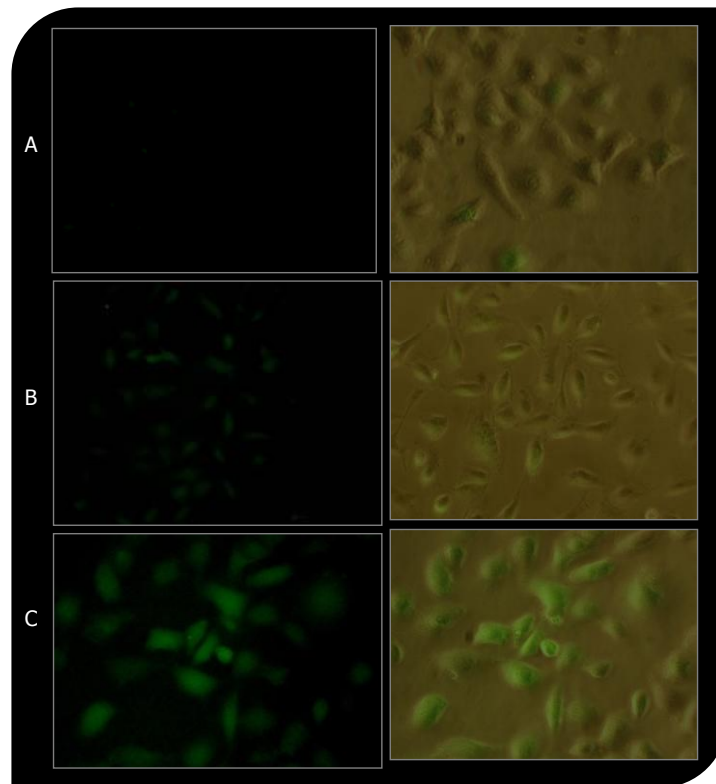
**Figura 29. Imágenes de fluorescencia de células A549 que indican la presencia NO después del estímulo con diferentes micobacterias por una hora. A la izquierda, imagen de fluorescencia y derecha sobreposición de imagen A con campo claro. (A) control. (B) *M. smegmatis*. (C) *M. abscessus*. (D) *M. tuberculosis*. Imágenes tomadas en aumento de 400X.**

Los sobrenadantes de cultivo de las micobacterias *M. smegmatis*, *M. abscessus* y *M. tuberculosis*, estimularon rápidamente la emisión de fluorescencia en las células A549, desde los primeros 15 minutos, indicando la producción de óxido nítrico. A partir de este tiempo, el nivel de emisión de fluorescencia fue ascendente en todos los tratamientos con sobrenadantes y se alcanzó la producción máxima en la primera hora de estímulo (figura 30). Después de este tiempo, la fluorescencia disminuyó drásticamente y solo se observó un bajo nivel de fluorescencia en las células estimuladas con sobrenadante de Mtb a las cuatro horas, el resto de los tratamientos no presentaron emisión de fluorescencia a este tiempo, indicando que ya no había niveles detectables de NO por el DAF.



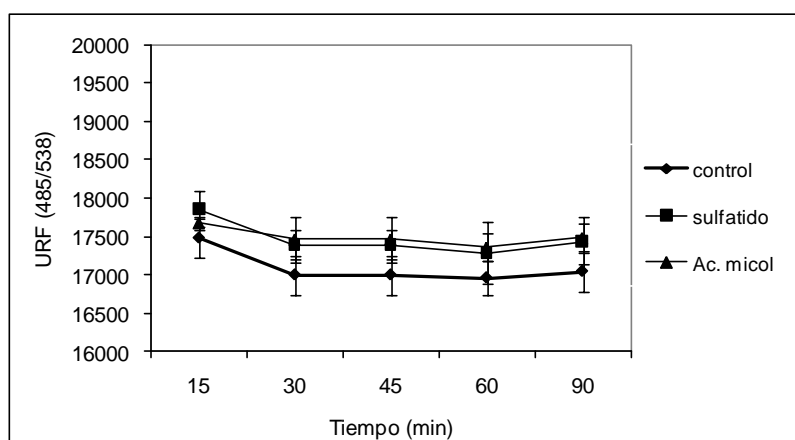
**Figura 30.** Imágenes de fluorescencia de células A549 que indican la presencia de NO después del estímulo con sobrenadantes de cultivo micobacteriano por una hora. A la izquierda, imagen de fluorescencia y derecha sobreposición de imagen A con campo claro. (A) control. (B) *M. smegmatis*. (C) *M. abscessus*. (D) *M. tuberculosis*.

Entre los componentes de origen lipídico que conforman la pared de *M. tuberculosis*, se incluyeron a los ácidos micólicos y sulfátido (glicolípido) para los ensayos de producción de NO. En las células estimuladas con los ácidos micólicos no se observó fluorescencia que indicara la producción de óxido nítrico en todo el tiempo de la cinética (figura 31). El sulfátido por su parte, logró estimular un importante nivel de emisión de fluorescencia a los 5 minutos, indicando la producción de NO (figura 31). Este nivel de fluorescencia disminuyó rápidamente a los 15 minutos, la última lectura visible de fluorescencia se detectó a los 30 minutos y a la hora el estímulo con sulfátido ya no produjo marca fluorescente.



**Figura 31. Imágenes de fluorescencia de células A549 que indican la producción de NO después del estímulo con sulfátido y ácidos micólicos de Mtb a los 5 min. A la izquierda, imagen de fluorescencia y derecha sobreposición de imagen fluorescente con campo claro. (A) Células control, sin estímulo. (B) Células estimuladas con ácidos micólicos de Mtb. (C) Células estimuladas con sulfátido de Mtb. Imágenes capturadas a un aumento de 400X.**

El estímulo de estos lípidos micobacterianos sobre la producción de NO por las células A549 también se analizó por fluorimetría. Con este método también se comprobó que aunque las células tratadas con sulfátido y ácido micólico de Mtb mostraron un ligero aumento en la emisión de fluorescencia con respecto a las células control, estos datos no fueron estadísticamente significativos, lo que indica que estos componentes micobacterianos no estimulan niveles importantes en la producción de óxido nítrico (figura 32).

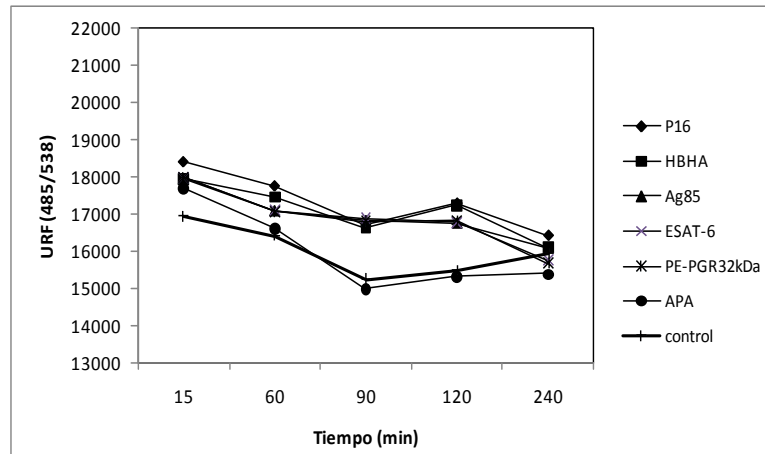


**Figura 32. Emisión de fluorescencia que indica la producción de NO en células A549 estimuladas con lípidos micobacterianos.** Las células no emitieron fluorescencia cuando se estimularon con el sulfátido y ácidos micólicos de Mtb. Estadísticamente no hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y las células control, cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

### Efecto de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* en la producción de óxido nítrico en células A549.

Para evidenciar la participación de las proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* en la producción de óxido nítrico, las monocapas de células A549 se estimularon con las diferentes proteínas y la producción de óxido nítrico se determinó fluorométricamente usando DAF como indicador.

El grupo de proteínas P16, HbHa, Ag85, ESAT-6 y PE-PGR32kDa mostraron la tendencia de estimular una mayor intensidad de fluorescencia que las células control desde los primeros 15 minutos, indicando la producción de NO en las células. La proteína APA mostró un solo estímulo a los 15 minutos, posteriormente las células bajaron los niveles de fluorescencia hasta alcanzar los niveles de las células control (figura 33). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las diferentes proteínas y el control ( $p < 0.05$ ).



**Figura 33. Emisión de fluorescencia que indica la producción de NO en células A549 estimuladas con diferentes proteínas recombinantes de Mtb.** Todas las proteínas, con excepción de APA, estimularon un ligero aumento en el nivel de fluorescencia comparado a las células control. La proteína APA, sólo estimuló un aumento de fluorescencia a los 15 min. El análisis estadístico por ANOVA no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos y con las células control. Cada tratamiento es el promedio de tres experimentos independientes.

## IV. DISCUSIÓN

Los estudios de cómo las micobacterias logran infectar las células no fagocíticas, son escasos en relación al número de trabajos que se han realizado en el macrófago y las células dendríticas. En los últimos años, este comportamiento ha cambiado a partir de que se ha observado que esta estirpe celular no solo es susceptible a la infección por micobacterias, sino que además la interiorización de las mismas depende de que activen la macropinocitosis, un proceso endocítico diferente a la fagocitosis. La importancia de este fenómeno podría tener implicaciones en la respuesta del sistema inmune innato que activan las células no fagocíticas, con probable colaboración al sistema adaptativo.

En este trabajo, se observó que la especie *M. tuberculosis* como cepa virulenta de referencia, la especie *M. smegmatis* de baja patogenicidad, así como el aislado clínico humano de una micobacteria no tuberculosa *M. abscessus*, poseen la capacidad de interiorizarse a la hora de contacto en las células A549, de carácter no fagocítico. El grado de patogenicidad de las diferentes micobacterias no fue determinante para que sucediera la infección en los neumocitos humanos tipo II. Estos resultados muestran semejanza con los modelos utilizados con otras especies de micobacterias que son interiorizadas por las células no fagocíticas. En experimentos *in vitro*, *M. avium* induce su interiorización en células epiteliales humanas HT-29 de origen gastrointestinal (Sangari y col., 2000). En el modelo de rumiantes, se ha empleado la especie *M. avium subesp., paratuberculosis*, la cual invade células epiteliales bovinas MDBK en los primeros 15 minutos de contacto (Patel y col., 2006). Cuando se analizó una mutante de esta misma especie, carente de una oxidoreductasa, no se evitó la interiorización en las células epiteliales y sólo se vió afectada en el tiempo de inducción, la cual sucedió a los 60 min (Alonso-Hearn y col., 2008).

Entre los primeros eventos que se observaron durante la infección de las células con las diferentes micobacterias, fue un importante rearrreglo del citoesqueleto, que incluyó una redistribución de los filamentos de actina formando lamelipodios y un incremento en la actividad de “ruffling”, lo que confirma que las micobacterias de diferente patogenicidad estimulan la aparición de eventos característicos de la macropinocitosis en la célula no fagocítica A549, con el fin de que la célula las interiorise por esta vía, como lo describió anteriormente García-Pérez y col., (2003) para el caso de *M. tuberculosis*.

Aunque la interiorización de las tres especies de micobacteria en la célula no fagocítica parece ser un evento que no está relacionado a su nivel de patogenicidad, los cambios que suceden durante el contacto y la permanencia dentro de la célula, si mostraron diferencias en relación a la virulencia de la especie micobacteriana involucrada.

La especie *M. smegmatis* se interiorizó en las células A549 causando pocos cambios en los filamentos de actina, lo que permitió a la célula mantener su estructura morfológica. Sin embargo la formación de macropinosomas en el citoplasma fue mayor que con la especie Mtb H37Rv. Esta diferencia en el número de macropinosomas concuerda con los ensayos realizados por García-Nieto (2005), donde se registró que *M. smegmatis* estimuló en estas células niveles importantes de captación de fase fluida, lo que fue posible observar en nuestros experimentos por la presencia del fluorocromo dentro de los macropinosomas formados por la infección. El autor también comprobó que el destino de estos macropinosomas se dirige a la acidificación cuando los niveles de fluorescencia disminuyeron en esta prueba, la cual se confirmó por análisis de maduración del macropinosoma, donde *M. smegmatis* colocalizó con la proteína Rab7, indicando que esta especie no logra evitar la acidificación de la vacuola. Esta unión macropinosoma-lisosoma parece jugar un papel importante para que los neumocitos humanos tipo II logren controlar la infección en los ensayos de sobrevivencia intracelular, donde eliminan eficientemente la micobacteria a partir de las 24 horas y sucede una drástica reducción en las UFC a las 96 horas (García-Pérez y col., 2008).

Nuestros resultados muestran que *M. smegmatis* es un modelo de micobacteria de baja patogenicidad con un mediano nivel de infección en la célula no fagocítica comparada a las otras dos especies de micobacterias. Al parecer el mecanismo de macropinocitosis activado para su interiorización es convenientemente aprovechado por la célula al detectar oportunamente la presencia de la micobacteria en vacuolas, que desvían su tráfico endocítico del reciclado endosomal a la unión con lisosomas y junto con los mecanismos innatos de la célula, logran eliminar a las micobacterias. Se ha observado que el reconocimiento de las bacterias por receptores tipo Toll, activan vías de señalización que regulan la fagocitosis a diferentes niveles, incluyendo la internalización y maduración del fagosoma (Blander y col., 2004). Es probable que en el modelo de células no fagocíticas, la eliminación de especies de baja patogenicidad, como sucede con *M. smegmatis*, también participen los TLR's dirigiendo los macropinosomas a su maduración.

En el caso de *M. tuberculosis H37Rv*, ésta estimula la macropinocitosis para interiorizarse en las células A549, causando un mayor rearrreglo del citoesqueleto que el observado con



*M. smegmatis*, lo que probablemente signifique una regulación negativa en la formación excesiva de macropinosomas una vez que logra entrar en la célula, sugerido por la baja cantidad de macropinosomas observados en el citoplasma, cuando se compara con la especie *M. smegmatis*. La conveniencia de estimular un bajo nivel de macropinosomas sería mantener su estancia evitando que la célula diriga el tráfico endocítico a la unión con lisosomas, lo cual se ha comprobado al observar que esta especie evita el reclutamiento de la proteína Rab7 permaneciendo dentro de una vacuola inmadura (García-Nieto, 2005). *M. tuberculosis H37Rv* representa el modelo de micobacteria patógena que estimula la macropinocitosis para interiorizarse a la célula no fagocítica y establecerse manteniendo al mismo tiempo su viabilidad y el de la célula huésped.

En los últimos años, un grupo de micobacterias no tuberculosas (MNT) relacionadas (*M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. szulgai* y *M. mucogenicum*) han sido un problema de contaminación postquirúrgica frecuente al realizar la técnica de corrección visual por láser (Thomas y col., 2005). En los Estados Unidos se reportó que la incidencia provocada por MNT en este procedimiento fue del 48% en el 2001 y aunque se logró reducir el problema al 6% de los casos en el 2004, el riesgo de contaminación por MNT continúa siendo un problema, además de la generación potencial de resistencia farmacológica, debido al uso de fluoroquinolonas de última generación (Donnenfeld, 2007). Estos casos representan la situación en que micobacterias de baja patogenicidad encuentran la oportunidad de infectar tejidos extrapulmonares y causar daños importantes una vez que se interiorizan en la célula no fagocítica. La especie *M. abscessus* empleada en este trabajo, provino de una endoftalmitis postquirúrgica y mostró la mayor capacidad de infección en la célula A549, comparada incluso con la cepa virulenta de referencia Mtb H37Rv. Esta característica probablemente se deba, entre otros factores, a una mayor expresión de adhesinas en su pared celular, que mejoran la unión con la célula y se logre una mayor interiorización de micobacterias. En el tiempo de la infección de las células A549, *M. abscessus* también indujo cambios morfológicos característicos de la macropinocitosis a nivel del citoesqueleto y una gran formación de macropinosomas ubicados en el citoplasma. Una vez dentro, se multiplica incontroladamente y en 72 hrs, causa la muerte del 100% de las células (Hernández, 2005). Al parecer, esta micobacteria infecta las células y no requiere mantener la viabilidad de su huésped debido a su carácter evolutivo de sobrevivir en el medio ambiente. El peligro de estas MNT es que una vez que accedan en el ser humano, se adaptan a la célula generando una gran capacidad de infección y resistencia a un amplio número de antibióticos. La forma en que esta micobacteria desarrolla este nuevo

fenotipo en la célula no fagocítica es desconocido, sin embargo se han iniciado estudios dirigidos a explicar este fenómeno debido a la creciente incidencia de este patógeno en infecciones postquirúrgicas y en la enfermedad pulmonar crónica, esta última se ha convertido en una enfermedad emergente en los EU (Orway y col., 2008).

El comportamiento de *M. abscessus* en nuestros experimentos *in vitro* ha mostrado semejanza con el trabajo de Byrd y col., (1999), quienes también analizaron un aislado clínico de la misma especie micobacteriana, obtenido de un granuloma ileal de un paciente con enfermedad de Crohn. Este aislado presentó dos variantes, una rugosa y otra lisa, la primera persistió y se multiplicó hasta los 28 días a nivel del pulmón y bazo en el modelo de ratón. En los modelos de cultivo celular también logró infectar y multiplicarse en monocitos y fibroblastos humanos. La variante lisa fue eficientemente eliminada tanto en el modelo de infección murino como en los cultivos celulares.

Por otra parte, en los ensayos de infección con las diferentes micobacterias, se observó que dentro de la primera hora, solo algunas de las células que conformaron la monocapa interiorizaron bacilos, pero los cambios en el citoesqueleto (formación de prolongaciones membranales y cambios morfológicos importantes) se presentaron de manera generalizada tanto en las células infectadas como las que no presentaron bacilos en el interior de su citoplasma. Como probable generador de estos cambios se incluyeron los sobrenadantes de cultivo de las micobacterias, en todos los casos las células mostraron un cambio en la distribución de los filamentos de actina, acompañado de una baja formación de prolongaciones membranales y un aumento de volumen celular. Estos productos secretados por las micobacterias parecen estar importantemente involucrados en la interiorización a la célula no fagocítica, como se describió con el sobrenadante de cultivo de *M. tuberculosis H37Rv*, que además de estimular cambios macropinocíticos a nivel del citoesqueleto, otorga a levaduras inactivadas por calor, la capacidad de ser interiorizadas por las células A549 (García-Pérez y col., 2003). Sin embargo, los productos que secretan las micobacterias probablemente no sean los únicos en provocar estos cambios en la estructura de la célula durante la infección, por lo que se estimularon células con productos de secreción presentes en el sobrenadante de células infectadas y nuevamente se presentaron cambios en la distribución de los filamentos de actina, que incluyeron la formación de prolongaciones membranales y un aumento de volumen celular, sin embargo, los mayores efectos se observaron con los productos celulares secretados bajo el estímulo de la infección con la especie patógena *Mtb H37Rv*.

Estos resultados sugieren que, además de los productos solubles excretados por las micobacterias, pudiesen generarse al mismo tiempo productos que excreta la célula no fagocítica para activar a la célula que aún no ha tenido contacto con el bacilo, permitiéndole preparar sus mecanismos de defensa innatos. La respuesta secretora de la célula cuando es infectada por micobacterias se ha reportado recientemente con los neutrófilos, que al ser infectados con Mtb se provoca su apoptosis acompañada de la expresión de cantidades importantes de proteínas de choque térmico de 72 kDa y de 60 kDa (Hsp72 y Hsp60) (Pearsson y col., 2008). Estas proteínas parecen actuar como segundos mensajeros para activar al macrófago, cuando fagocita al neutrófilo en estado apoptótico provocado por la infección. Cuando emplearon estas proteínas en forma recombinante junto con la presencia de Mtb, mostraron un efecto sinérgico en la activación del macrófago, Hsp60 aumentó la liberación de TNF- $\alpha$  en un 20-40%, pero cuando se empleó la proteína Hsp70 mejoró la síntesis de la citocina en un 50-100%. Interesantemente, se comprobó que la actividad de las proteínas de choque térmico producidas por el neutrófilo, requieren la presencia de la micobacteria, ya que por sí solas no lograron activar la producción de las citocinas. Los neutrófilos infectados con Mtb, no solo presentaron la proteína Hsp70 a nivel intracelular, también la liberaron en el medio de cultivo. El sobrenadante con la presencia de esta proteína tuvo actividad en el macrófago, solo cuando se acompañó de Mtb, lo que estimuló una expresión importante de TNF- $\alpha$  (Pearsson y col., 2008).

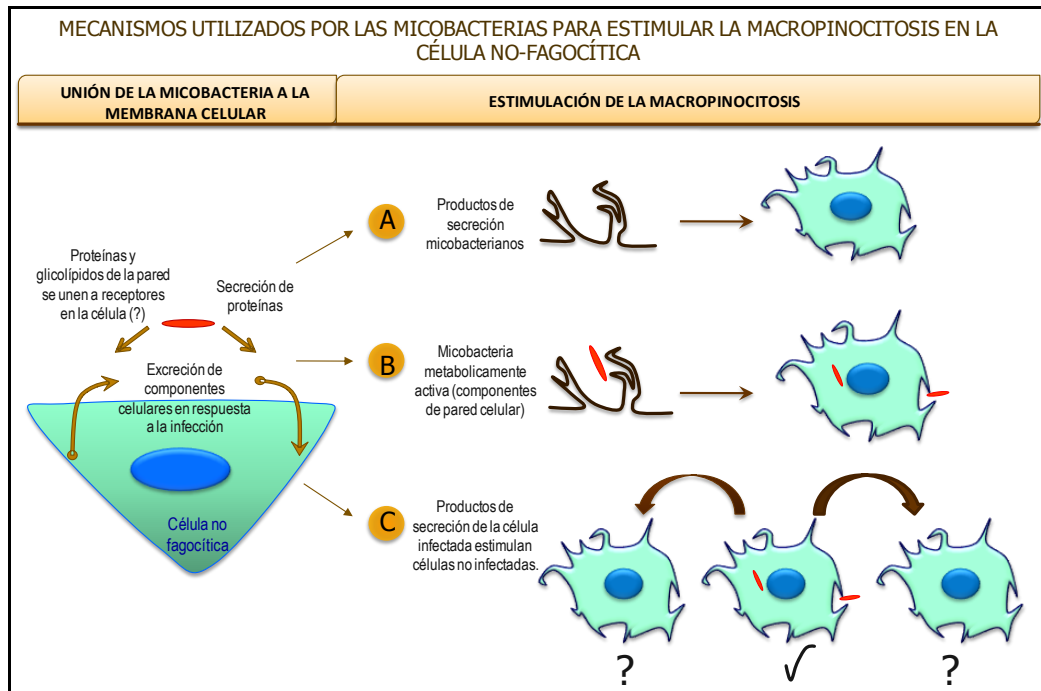
Estas observaciones, sugieren que la célula A549 también pudiese producir proteínas de choque térmico como consecuencia de la infección por micobacterias, su efecto a nivel de la membrana celular probablemente activa la macropinocitosis en las células que no han presentado contacto con la micobacteria. La utilidad de estas proteínas se ha observado en procesos inflamatorios en el ser humano, como en la artritis reumatoide, donde Hsp60 se libera al medio extracelular y actúa como un Ag de "daño" en las células autólogas, activando la respuesta inmune innata (Chen y col., 1999). La proteína Hsp72 también ha mostrado activar la señal de "daño" para APC y células fagocíticas en los casos en que se presenta estrés celular e infección bacteriana (Williams y col., 2008). Recientemente se ha comprobado con la proteína HSP70, que sus efectos inmunoreguladores en la célula presentadora de antígeno son dependientes de la unión a TLR2 y TLR4, lo que favorece la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión, además de la liberación de citocinas y quimiocinas (Asea, 2008).

La estructura de las micobacterias es característica al contar con una pared celular abundante en componentes protéicos, lípidos y glucanos que podrían estar involucrados directamente en estimular la macropinocitosis y favorecer su entrada en la célula no fagocítica. La participación de la pared micobacteriana se evaluó inactivando a las micobacterias por dos métodos. El método físico sometió el cultivo bacteriano a calor húmedo por presión y se seleccionó por su efectividad en la inactivación del cien por ciento de las micobacterias, aunque debido a que también podría provocar cambios en los componentes de la pared, se complementó el estudio con un segundo método de inactivación basado en el uso de azida de sodio a una concentración que fuese efectiva, con la ventaja de que este método deja íntegra las características de la pared micobacteriana. En ambos métodos, la micobacteria inactiva no logró estimular la captación de fase fluida en las células A549 cuando se comparó el estímulo en la interiorización del Dextrán-FITC con las especies de micobacteria metabólicamente activas para el caso de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. El caso de *M. abscessus*, mostró que la bacteria inactivada por calor también es incapaz de estimular la captación de fase fluida, sin embargo, cuando se emplea la azida de sodio, esta micobacteria aún conserva la capacidad de estimular un cierto grado de interiorización del Dextran-FITC y aunque los valores de fluorescencia no fueron estadísticamente significativos comparados a los de las células control, si fueron suficientemente altos para que el programa estadístico marcara nula diferencia con las células metabólicamente activas ( $p < 0.001$ ), lo cual indica que para esta especie en particular, algún o algunos componentes de la pared se conservan íntegros durante la inactivación por este método químico, lo que probablemente le permite interactuar con la membrana de las células A549 favoreciendo la captación de fase fluida. Interesantemente, la fluorimetría en placa mostró que esta especie de micobacteria estimula los niveles más altos de captación de fase fluida por parte de las células desde los primeros 30 minutos, la cual se mantiene constante y a diferencia de *M. smegmatis*, micobacteria de rápido crecimiento que no logra sostener la captación de fase fluida a partir de los 60 min., el estímulo continuó aumentando a las dos horas.

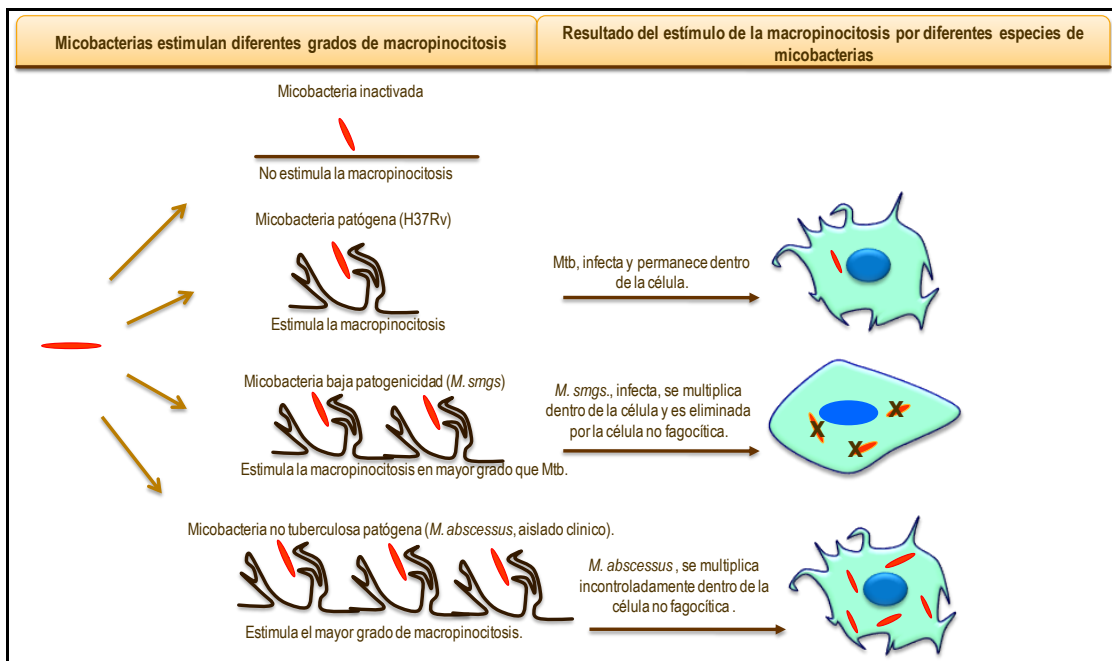
*M. abscessus* representa una micobacteria oportunista que al infectar al ser humano, al parecer logra adaptarse adquiriendo un fenotipo que podría involucrar cambios metabólicos y estructurales, pues la especie empleada en nuestro trabajo forma colonias lisas, mientras que la micobacteria empleada por Byrd y col., (1999) que presentó la misma capacidad de infección y multiplicación intracelular fue de aspecto rugoso, en tanto que una mutante lisa que se aisló del mismo paciente por este grupo de investigación fue

incapaz de permanecer y multiplicarse en los modelos de infección. El análisis químico mostró que la variante rugosa fue carente de lipopolisacáridos. La diferencia en la cantidad y distribución de ciertos componentes de la pared micobacteriana en las especies y variantes de micobacterias podría explicar en parte, que *M. abscessus* inactivada con azida de sodio conserva la capacidad de estimular la captación de fase fluida por la presencia de algún componente que no es tan abundante en el caso de las otras especies micobacterianas de referencia.

Los eventos que observamos cuando se emplean las micobacterias, sus productos de secreción y los factores solubles de células infectadas proponen el modelo de infección que se muestra en la figura 34 y 35.



**Figura 34. Tres diferentes vías por el que la infección micobacteriana estimula la macropinocitosis en la célula no fagocítica. (A) Macropinocitosis estimulada por la bacteria metabólicamente activa. (B) Productos de secreción micobacteriano, estimulan la macropinocitosis. (C) La macropinocitosis se activa por productos secretados por la bacteria y la célula infectada.**



**Figura 35. Estímulo de la macropinocitosis por micobacterias de diferente virulencia en células no fagocíticas. Un mayor estímulo de la macropinocitosis aumenta la probabilidad de que la micobacteria entre en la célula no fagocítica. Solo la micobacteria virulenta se multiplica intracelularmente.**

Después de analizar el efecto de diferentes especies de micobacterias y los productos que secretan en los medios de cultivo en la activación de la macropinocitosis en la célula no fagocítica, se prosiguió a identificar algunos de los componentes protéicos y lipídicos que de manera individual pudiesen estar involucrados en el fenómeno de la macropinocitosis. Se incluyó una gama de proteína recombinantes de *M. tuberculosis* que se clasificaron de acuerdo a si se localizan en la pared micobacteriana o si se secretan durante la infección. Para el primer grupo, se incluyó la proteína hemaglutina de unión a heparina (HBHA) y la proteína PE-PGRS33.

La proteína HBHA constituye un antígeno micobacteriano de 28kDa que se ha identificado en las especies *M. bovis*, *M. tuberculosis* (Menozzi y col., 1996), *M. leprae* (Cole y col., 2001), *M. avium* (Reddy y col., 2001) y está ausente en *M. smegmatis* (Pethe y col., 2001a). Se ha incluido como factor de virulencia en Mtb al expresarse de manera importante durante la infección de células epiteliales de pulmón, donde participa como una adhesina, además contribuye a la diseminación extrapulmonar de la micobacteria (Pethe y col., 2001b). En nuestro modelo, se emplearon células epiteliales de pulmón donde probablemente la proteína expresó su papel de adhesina para estimular de manera importante cambios celulares característicos de la macropinocitosis a nivel del citoesqueleto. En los ensayos de fluorimetría en placa mostró que en el tiempo, su efecto en la célula se presenta desde la primera hora al interiorizar el Dextran-FITC de manera significativa, a partir de este tiempo mantiene su estímulo con niveles altos de fluorescencia en la célula hasta los 240 minutos, indicando que los macropinosomas evitan la acidificación durante este tiempo, pues la fluorescencia del Dextran-FITC es pH dependiente. El tamaño del Dextran-FITC de 70kDa permitió excluir otras vías endocíticas diferentes a la macropinocitosis, ya que a diferencia de esta última, el tamaño de las vacuolas que se forman con las otras vías endocíticas es menor y no lograrían interiorizar la molécula. Actualmente, la proteína HBHA se ha utilizado de forma recombinante en la inmunización intranasal en el modelo de ratón donde ha logrado estimular la respuestas Th1 y proteger de la infección con *M. bovis* BCG a nivel pulmonar (Kohama y col., 2008).

La proteína PE-PGRS de 33 kDa pertenece a una familia que se localiza en membrana y pared celular de la micobacteria. El nombre deriva de una región constante de Prolina-Ácido glutámico (PE), que en la mayoría de los casos se encuentra en el extremo amino terminal de estas proteínas abundantes en glicina y alanina. Se conocen aproximadamente 100 miembros de esta familia PE. La familia más grande de PE está presente en la especie



Mtb H37Rv, que consta de 67 miembros y conforman la subfamilia PE-PGRS debido a que poseen un dominio PE seguido por una extensión en el extremo carboxilo terminal de múltiples repeticiones en tándem de Gly-Gly-Ala o Gly-Gly-Asn que a su vez son codificados por regiones genómicas PGRS (secuencias polimórficas repetitivas ricas en G-C) (Banu y col., 2002). No se ha determinado la función precisa de estas proteínas, pero se ha especulado que podrían tener un papel inmunológico importante y que muy probablemente representan la fuente principal de variación antigénica. Entre los primeros miembros que se han identificado y estudiado sus funciones se incluye la proteína PE-PGRS de 55 kDa (Rv1759c), la cual se produce durante la infección y la enfermedad, provocando una respuesta variable de anticuerpos, además de ser un ligando para el receptor de fibronectina (Abou-Zeid y col., 1991; Espitia y col., 1999).

En este trabajo se usó la proteína PE-PGRS de 33 kDa, obtenida de Mtb H37Rv, por ser el miembro de esta familia más ampliamente estudiado. En el macrófago se ha observado que la mutante BCG carente del gen, disminuye su capacidad de infección (Brennan y col., 2001), en tanto que la sobreexpresión en la especie *M. smegamatis* induce muerte por necrosis en la célula fagocítica (Dheenadhayalan y col., 2006). A diferencia de lo que ocurre en el macrófago, en nuestro modelo de célula no fagocítica A549, la proteína no afectó la viabilidad de las células en todos los diferentes ensayos. En cambio estimuló la formación de extensas y múltiples prolongaciones membranales, además de un importante rearrreglo del citoesqueleto, características que corresponden a la macropinocitosis. Al parecer posee una participación importante para que la micobacteria entre en la célula no fagocítica, ya que los efectos fueron más notorios que con la proteína HBHA, aunque ambas se localizan en la membrana de la micobacteria.

Se incluyó un segundo grupo de proteínas recombinantes de Mtb H37Rv, que se han identificado cuando la micobacteria las secreta en el medio de cultivo o por su presencia en el suero de pacientes infectados, e incluyeron a las proteínas Ag85B, alfa-cristalina (P16), ESAT-6 y la proteína antigénica rica en alanina y prolina (APA).

El Ag85 es un complejo conformado por tres proteínas principales: Ag85A, Ag85B y Ag85C, cuya frecuencia de secreción sigue el orden de 3:2:1 respectivamente. Su expresión se ha observado cuando la micobacteria está en etapa de replicación, su papel en el metabolismo de la bacteria, es participar como micoliltransferasas durante la etapa final de síntesis de la pared celular. En el huésped infectado, inducen respuesta inmune humoral y celular. La participación de estas proteínas en el huésped es poco conocida, aunque se sabe que se regulan positivamente en respuesta a la multiplicación bacteriana



dentro del macrófago por ensayos *in vitro*. Este complejo protéico, posee la habilidad de unirse al receptor de fibronectina, la importancia de esta unión se ha observado en la infección por estafilococos y estreptococos, donde mejora la virulencia de estos patógenos. En nuestro modelo con la célula A549, la proteína Ag85B al parecer, estimuló la activación de la macropinocitosis de manera importante, de esta forma la célula logró interiorizar la molécula de Dextran-FITC por captación de fase fluida y registrar niveles importantes de fluorescencia intracelular desde el inicio del experimento, los que no decayeron durante las 4 horas que duró el ensayo, indicando que los macropinosomas no se acidifican y por lo tanto la fluorescencia de la molécula de Dextran-FITC se mantiene activa. A nivel de la membrana celular, la proteína activó cambios morfológicos característicos de la macropinocitosis, como fue la aparición de lamelipodios de gran longitud, aumento de volumen celular y rearrreglo del citoesqueleto, aspecto parecido a cuando se emplea la bacteria metabólicamente activa.

El antígeno de 14kDa, alfa-cristalina (P16), es una proteína de choque térmico, que se presenta en un gran porcentaje de pacientes con TB y es inducida bajo condiciones de anoxia. Se ha postulado que esta proteína es un elemento importante en la latencia o persistencia de Mtb, debido a que su sobreexpresión inhibe el crecimiento de Mtb. La inducción de la proteína bajo condiciones de anoxia, requiere la participación de la proteína DosR, la que controla la respuesta a estrés oxidativo y a bajas condiciones de oxígeno. Cuando la cepa *M. bovis* BCG se cultiva en condiciones microaerófilas se sobreexpresa el gen *hspX* que transcribe la proteína P16. Esta proteína, al igual que el Ag85B, estimuló en el modelo de células A549 niveles significativos en la captación de fase fluida por parte de la célula, los que se mantuvieron constantes, indicando que también esta proteína logra inhibir la acidificación de los macropinosomas. En la membrana celular provocó la formación de lamelipodios y actividad de “ruffling”.

La proteína secretora ESAT-6, logra ser reconocida por células T en pacientes y modelos animales durante la fase temprana de la TB activa (Ravn y col., 1999). La genómica comparativa, muestra que ESAT-6 solo se localiza en las especies patógenas *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Behr y col., 1999; Gordon y col., 1999). La expresión de esta proteína por *M. tuberculosis* se asocia a una baja respuesta de la inmunidad innata en el individuo infectado, debido a que desensibiliza la activación de TLR-2 al inhibir el ensamble de las moléculas que participan en la cascada de señalización (Pathak y col., 2007). Sin embargo la inactivación del gen que codifica ESAT-6 en Mtb, mejorara la respuesta inmune innata al aumentar la expresión de IL-12, TNF y óxido nítrico (Stanley y col., 2003). Actualmente

ESAT-6 es un fuerte candidato en la investigación del desarrollo de vacunas (Xu y col., 2008), así como en el diagnóstico en individuos que han sido infectados por Mtb (Hughes y col., 2005).

Esta proteína de forma recombinante, estimuló una gran actividad de macropinocitosis en las células A549 durante el ensayo de captación de fase fluida, aunque de manera rápida y por un breve tiempo, ya que las células mostraron un nivel de fluorescencia significativo únicamente a las dos horas en que estuvo en contacto con las células y 60 min después, el nivel de fluorescencia cayó rápidamente igualando al registrado en las células control, lo que indica que esta proteína posee un potente efecto en estimular la macropinocitosis, aunque es de corta duración y al parecer, no logra evitar que los macropinosomas se acidifiquen, debido a que disminuye drásticamente el nivel de fluorescencia en las células. A nivel del citoesqueleto, también estimuló la aparición de lamelipodios y un rearrreglo del citoesqueleto, característico de la macropinocitosis.

La proteína APA de 45kDa, es uno de los principales antígenos glicosilados secretados por Mtb, su estructura química muestra abundancia de los aminoácidos alanina-prolina, de donde deriva su nombre. Recientemente se ha descubierto, que en el humano posee una gran afinidad de unión con la proteína surfactante pulmonar tipo A (PSP-A), la que a su vez constituye una lectina tipo C (Ragas y col., 2007). Se ha especulado que la micobacteria la secreta para inactivar los principales receptores de reconocimiento de patógenos, provocando entre otras cosas una regulación negativa en la producción del perfil de citocinas Th1, particularmente la IL-12 e IFN- $\gamma$  (Ragas y col., 2007), como se ha observado en otros glicoconjugados de Mtb, por ejemplo la lipoarabinomanana manosilada (Nigou y col., 2001). Si la proteína APA se une a esta lectina, a otros receptores de unión a glicoproteínas o TLR's, un efecto adicional es la activación de la macropinocitosis en la célula A549, nuestros resultados mostraron la formación de largas prolongaciones membranales (lamelipodios) y un importante rearrreglo del citoesqueleto.

Se verificó que el efecto de las diferentes proteínas recombinantes no fuese ocasionado por la presencia de probable contaminación de endotoxina, por lo que se realizaron ensayos en los que se empleó el LPS de *E. coli* como estímulo en las células A549. En el ensayo de captación de fase fluida y morfología del citoesqueleto, las células permanecieron sin cambios, lo que confirma que el efecto de las proteínas no tiene la influencia de probable presencia de endotoxina. Diferentes trabajos han mostrado la baja respuesta de las células A549 al LPS, por ejemplo se ha observado que el LPS no estimula la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  (Hansen y col., 1997) en estas células. Tsutsumi-Ishii y col.

(2003), por otra parte demostraron que el LPS por si solo no estimula la producción de  $\beta$ -defensina 2 usando estas mismas células. Este grupo de investigación descubrió que esta línea celular posee el receptor CD14, pero son carentes de la molécula TLR-4. Esta característica hace a las células A549, un modelo idóneo para estudiar la macropinocitosis con moléculas recombinantes sintetizadas a partir de la cepa *E. coli*, pues los niveles de contaminación de endotoxina no intervienen en la función de la molécula de interés.

Al mismo tiempo se emplearon proteínas no relacionadas a bacterias, como probables activadoras de la macropinocitosis, sin embargo tanto la ASB, ASH y Ovoalbúmina no tuvieron efecto alguno en la morfología de la célula A549, lo que confirma que las proteínas recombinantes de Mtb activan la macropinocitosis por una relación directa a su carácter de virulencia o antigenicidad.

Esta relación entre la molécula que representa un factor de virulencia y la activación de la macropinocitosis pudo ser verificada al emplear proteínas de choque térmico de las especies *E. coli* y *K. pneumoniae*, las que han demostrado ser altamente inmunogénicas, capaces de inducir la producción de anticuerpos y activación de células T (Ortega, 2007). Con ambas proteínas recombinantes, la célula A549 fue estimulada a presentar la formación de lamelipodios, aumento de volumen celular y rearrreglo del citoesqueleto. Cuando se empleó la proteína recombinante sortasa A de *S. aureus*, producida en la misma clona de *E. coli* que las proteínas de Mtb, no se presentó efecto alguno en la captación de fase fluida y morfología celular. Lo anterior pudiese explicarse por la naturaleza de esta proteína, la cual aunque es importante para la virulencia de esta especie bacteriana (transpeptidasa responsable de anclar diversos factores, como la proteína A al peptidoglicano del estafilococo) (Marraffini y col., 2006), en su forma aislada no tiene ningún efecto en la integridad y viabilidad de la célula A549. La proteína Sortasa A, representa un buen testigo negativo de los efectos de macropinocitosis, confirmando que el efecto de las proteínas recombinantes de Mtb H37Rv son específicos y relacionados a su virulencia para activar la macropinocitosis en las células A549.

Entre las más recientes investigaciones, se estudian péptidos que penetran en la célula como vectores que potencialmente pueden liberar diferentes moléculas bioactivas a nivel intracitoplasmático, por ejemplo: proteínas, ácidos oligonucléicos, fármacos y liposomas (Futaki y col., 2007). Entre los péptidos que poseen esta función y que más se han estudiado, se encuentra el péptido Tatp derivado del virus del HIV, el cual es abundante en residuos de arginina, región que juega un papel crítico en la internalización. El tratamiento de células con estos péptidos abundantes en arginina, inducen la activación de proteínas

Rac que dirigen a una reorganización de los filamentos de actina y la aparición de macropinocitosis. Se ha descubierto que estos péptidos tienen una gran afinidad por proteoglicanos en la célula, los cuales se constituyen receptores para estos péptidos, al parecer su unión activa la macropinocitosis para que estos péptidos logren interiorizarse (Futaki y col., 2007). Las proteínas de Mtb utilizadas en este trabajo, presentan regiones repetidas de ciertos aminoácidos, los que probablemente intervengan en la unión a probables receptores inespecíficos como es el caso de los proteoglicanos, receptor de manosa y TLR's que entre otras funciones pudiesen activar la macropinocitosis, como lo hacen los péptidos de entrada a la célula, abundantes en arginina.

El siguiente grupo de moléculas localizadas en la superficie de las micobacterias, cuya participación está involucrada de manera importante en la virulencia y reconocimiento del patógeno por parte del sistema inmune, son los lípidos micobacterianos. Interesantemente tanto el sulfátido, como los ácidos micólicos empleados en nuestro modelo de célula no fagocítica A549, presentaron un bajo estímulo en la activación de la macropinocitosis.

El sulfátido, pertenece al grupo de glicolípidos micobacterianos. En los primeros experimentos con el sulfátido aislado de Mtb H37Rv se observó su potente efecto inhibitor sobre la unión fagosoma-lisosoma en cultivos de macrófagos peritoneales de ratón (Goren y col., 1976). En la célula A549, el sulfátido logró provocar la formación de pequeñas prolongaciones membranales localizadas en la zona apical de las células y un aumento en el volumen celular. En los ensayos de captación de fase fluida, el sulfátido no estimuló la interiorización del Dextrán-FITC por parte de las células cuando se empleó a la misma concentración que las proteínas de Mtb. Sin embargo, al aumentar la concentración, logró estimular niveles de fluorescencia estadísticamente significativos a partir de los 90 minutos y hasta las dos horas, aunque en general estos niveles fueron mucho más bajos a los registrados con las proteínas de Mtb. Estos resultados indican que los efectos del sulfátido sobre la macropinocitosis parecen ser dosis-dependiente y que no es tan eficiente en la activación de esta vía endocítica como lo son las proteínas de Mtb.

Por su parte, los ácidos micólicos conforman el principal constituyente protector que envuelve a Mtb, son ácidos grasos  $\beta$ -hidroxil, con un  $\alpha$ -alquil en el extremo de la cadena. La pared celular de Mtb contiene tres clases de ácidos micólicos:  $\alpha$ -, ceto- y metoximicolatos (Riley 2006). Cuando se emplea a Mtb carente de cetomicolatos, ésta disminuye su habilidad de multiplicarse dentro de las células THP-1 (Yuan y col., 1998). Cuando Mtb es carente de ceto y metoximicolatos, se observa atenuación de la infección en el modelo de ratón (Dubnau y col., 2000). El contacto de estos ácidos micólicos no tuvo

efecto en la morfología de las células A549, el citoesqueleto permaneció sin cambios y se apreciaron bordes regulares en la célula, lo que indica que dentro de los compuestos lipídicos probados en este trabajo, los ácidos micólicos carecen de efecto macropinocítico en la célula A549.

Debemos considerar que la micobacteria requiere un estado metabólicamente activo para estimular la macropinocitosis y que los diferentes componentes estructurales o de secreción son estratégicamente utilizados por la micobacteria, al parecer dependiendo del estado de infección en el que se encuentre.

Como parte de la respuesta innata por parte de la célula A549 ante la infección con las diferentes micobacterias y al estímulo con los componentes micobacterianos utilizados, se analizó la producción de NO. El NO es una molécula de vida corta, de rápida difusión y de gran importancia biológica, juega un papel importante en la transducción de señales, neurotransmisión y como un mecanismo de defensa innato por parte del huésped.

Existen reportes que entran en conflicto para determinar si monocitos y macrófagos humanos, son capaces de eliminar a *M. tuberculosis* de manera dependiente de iNOS, sin embargo al estimular monocitos de pacientes con TB activa, con citocinas proinflamatorias, éstos maduraron a macrófagos y produjeron niveles importantes de NO, con lo que se disminuyó significativamente las UFC de *M. tuberculosis* en estas células (Bose y col., 1995 y 1999).

En nuestro modelo de células A549, las diferentes micobacterias estimularon la producción de NO desde los primeros 15 minutos, sin embargo solo *M. abscessus* logró mantener niveles importantes de NO hasta las cuatro horas. En el caso de *M. smegmatis*, probablemente la célula no requiera de una gran producción de NO, ya que es muy probable que junto con otros mecanismos de la inmunidad innata, logren eliminar esta especie de micobacteria. *M. tuberculosis* por su parte, parece que evade la respuesta de la célula A549 al inhibir la producción de NO en la primera hora de infección. La célula infectada por *M. abscessus*, al parecer logra detectar su presencia y activa una gran producción de ON, sin embargo no es suficiente para evitar la infección y la multiplicación de este patógeno, que logra mantenerse y multiplicarse dentro de estas células.

Los sobrenadantes de cultivo de las diferentes micobacterias también lograron estimular la producción de NO en las células A549. A diferencia de cuando se emplearon las diferentes micobacterias, el sobrenadante de Mtb, logró mantener el nivel de fluorescencia de manera prolongada hasta las cuatro horas, este fenómeno pudo deberse a que sus componentes de secreción varían cuantitativa o cualitativamente de las otras dos especies de

micobacterias estudiadas, logrando un mayor efecto sobre la producción de NO en las células A549. *M. abscessus* probablemente depende más de sus componentes de pared que de secreción, para activar la producción de NO, ya que el sobrenadante de cultivo fue incapaz de mantener la fluorescencia de las células después de la primera hora.

Las diferentes proteínas recombinantes de Mtb H37Rv mostraron en general, que son incapaces de estimular la producción de NO en las células A549. Aunque en el periodo de los 90 a los 120 min, se registró un leve aumento en los niveles de fluorescencia con todas las proteínas, con respecto a las células control, estos valores no fueron estadísticamente significativos.

Los lípidos micobacterianos también fueron deficientes en estimular la producción de NO. En trabajos anteriores, particularmente con los ácidos micólicos, se ha observado que en los monocitos y macrófagos, además de inhibir su activación, también evitan la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) (Pabst y col., 1988). Nuestros resultados muestran que también inhibe la producción de NO en las células no fagocíticas A549.

Al parecer, las células A549 poseen una capacidad limitada en la producción de NO debido a que solo cuentan con la maquinaria para producir el óxido nítrico inducible, además de que su efecto y eficiencia microbicida sobre Mtb, depende del acompañamiento de citocinas proinflamatorias, como lo demostró Roy y col. (2004), al utilizar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL- $1\beta$ , durante la infección de las células A549 con Mtb y observó que la producción de NO aumentó en concentraciones suficientes para disminuir las UFC de las células infectadas.

## V. CONCLUSIONES

- Independientemente de su virulencia, diferentes especies de micobacterias inducen su interiorización en la célula no fagocítica a través de la macropinocitosis.
- Los cambios provocados a nivel del citoesqueleto y formación de macropinosomas son eventos que son modulados de acuerdo a la patogenicidad de la especie micobacteriana.
- Si la especie de micobacteria estimula un grado mayor de macropinocitosis, incrementa la oportunidad de entrar en la célula no fagocítica, posteriormente las micobacterias se multiplican, pero sólo aquellas de mayor virulencia lograrán permanecer en las células, de lo contrario, son eficientemente eliminadas por las células A549, como lo harían los macrófagos.
- La inducción de la macropinocitosis por componentes de la pared celular micobacteriana, al parecer, es un proceso que requiere que las micobacterias se encuentran en estado metabólicamente activo.
- *M. abscessus*, aún inactivada, conserva un cierto nivel de estímulo sobre la macropinocitosis en la célula fagocítica, lo cual sugiere que esta micobacteria podría poseer componentes de la pared que difieren cuantitativa o cualitativamente de las otras especies estudiadas.
- Las diferentes micobacterias estudiadas secretan componentes, presentes en los sobrenadantes de cultivo, que logran estimular la macropinocitosis en las células A549. Sin embargo, es probable que de manera simultánea, en respuesta a la infección, la célula no fagocítica secrete algunos productos inductores de la macropinocitosis cuyo nivel de acción se encuentra en células que aún no han sido infectadas por el bacilo.
- Diferentes proteínas que conforman la pared celular así como aquellas que son secretadas por *M. tuberculosis* H37Rv, estimulan la macropinocitosis en la célula A549. Su relación antigénica e inmunogénica parece tener una relación directa en la activación de esta vía endocítica. Es probable que receptores inespecíficos que

logran la unión a estas proteínas, desencadenen la señalización que active a las proteínas Rac, involucradas en la inducción de la macropinocitosis. Entre estos receptores, se sospecha de TLR's, al receptor de manosa, integrinas y proteoglicanos entre otros.

- Las proteínas recombinantes de Mtb estudiadas, presentaron una alta especificidad como inductores de la macropinocitosis en las células A549, ya que tanto la endotoxina de *E. coli*, proteínas no relacionadas a bacterias, así como la proteína recombinante SortA de *S. aureus*, no estimularon la macropinocitosis en estas células.
- Interesantemente, además de las proteínas recombinantes de Mtb, dos proteínas de choque térmico de las especies *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente, también lograron estimular la macropinocitosis en las células A549. Es probable que su carácter inmunogénico relacionado a su virulencia, participe en la inducción de la macropinocitosis en la célula no fagocítica.
- Los lípidos micobacterianos mostraron un bajo nivel de estímulo sobre la macropinocitosis en las células no fagocíticas. El sulfátido, utilizado a la misma concentración que las proteínas de Mtb no generó cambios celulares, sin embargo, al aumentar cinco veces su concentración indujo cambios macropinocíticos en la célula A549, indicando un efecto dosis-dependiente, en cambio los ácidos micólicos carecen de actividad inductora sobre la macropinocitosis.
- La célula A549 posee una limitada respuesta en la producción de NO ante la infección por micobacterias, componentes protéicos y lipídicos de Mtb H37Rv. Sin embargo, *M. abscessus* logró la producción de los niveles más altos de este metabolito reactivo del nitrógeno.



## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alonso-Hearn M, Patel D, Danelishvili L, Meunier-Goddik L, Bermudez LE.** 2008. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MAP3464 gene encodes an oxidoreductase involved in invasion of bovine epithelial cells through the activation of host cell Cdc42. *Infect Immun.* 76: 170–178.
2. **Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI.** 1994. Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med.* 179: 601–608.
3. **Amyere M, Payraastre B, Krause U, Van Der Smissen P, Veithen A, Courtoy PJ.** 2000. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C *Mol Biol Cell.* 11: 3453–3467.
4. **Arnold C.** 2007. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect.* 13: 120–128.
5. **Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW.** 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science.* 261: 1454-1457.
6. **Asea A.** 2008. Heat shock proteins and Toll-Like Receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 183:111-127.
7. **Banu S, Honoré N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prévost MC, Cole ST.** 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens?. *Mol Microbiol.* 44: 9-19.
8. **Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM.** 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science.* 284: 1520-1523.
9. **Bermudez LE, Goodman J.** 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates whiting type II alveolar cells. *Infect Immun.* 4: 1400-1406.
10. **Bermudez LE, Petrofsky M, Sangari F.** 2004. Intracellular phenotype of *Mycobacterium avium* enters macrophages primarily by a macropinocytosis-like mechanism and survives in a compartment that differs from that with extracellular phenotype. *Cell Biol Int.* 28: 411-419.
11. **Blander JM, Medzhitov R.** 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 304: 1014-1018.
12. **Bloom BR, Murray CJL.** 1992. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science.* 247: 1055–1064.
13. **Bose M, Farnia P, Sharma S, Chattopadhyya D, Saha K.** 1999. Nitric oxide dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human mononuclear phagocytes from patients with active tuberculosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 12: 69–79.

14. **Bose M, Farnia P.** 1995. Proinflammatory cytokines can significantly induce human mononuclear phagocytes to produce nitric oxide by a cell maturation dependent process. *Immunol Lett.* 48: 59–64.
15. **Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, Jacobs WR Jr.** 2001. Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun.* 69: 7326-7333.
16. **Brosch R, Gordon S, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST.** 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 3684-3689.
17. **Byrd TF, Lyons CR.** 1999. Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun.* 67:4700-4707.
18. **Cardelli J.** 2001. Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic.* 2:311–320.
19. **Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H.** 1999. Human 60-kDa Heat-Shock Protein: A danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 162: 3212-3219.
20. **Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F.** 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* 271: 698–702.
21. **Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG.** 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 409: 1007-11.
22. **Conner S, Schmid S.** 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422: 37-44.
23. **Cox D, Greenberg S.** 2001. Phagocytic signaling strategies: Fcγ receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol.* 13: 339–345.
24. **Cywes C, Hoppe HC, Daffé M, Ehlers MRW.** 1997. Nonpionic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun.* 65:4258–66.
25. **Danelishvili L, Cirillo SLG, Cirillo JD, Bermudez LE.** 2007. Virulent mycobacteria and the many aspects of macrophage uptake. *Future Microbiol.* 2: 461-464.
26. **Danelishvili L, Wu M, Stang B, Harriff M, Cirillo SL, Cirillo JD, Bildfell R, Arbogast B, Bermudez LE.** 2007. Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. *Proc Natl Acad Sci.* 104: 11038-11043.

27. **Dheenadhayalan V, Delogu G, Brennan MJ.** 2006. Expression of the PE\_PGRS33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes Infect.* 8: 262-72.
28. **Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R.** 2005. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb Pathog.* 39: 97-107.
29. **Doffinger R, Patel SY, Kumararatne DS.** 2006. Host genetic factors and mycobacterial infections: lessons from single gene disorders affecting innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 8: 1141-1150.
30. **Doherty TM, Arditi M.** 2004. TB, or not TB: that is the question - does TLR signaling hold the answer?. *J Clin Invest.* 114:1699–1703.
31. **Donnenfeld ED.** 2007. Preventing post-LASIK keratitis. *Cataract & refractive surgery today.* 80-81.
32. **Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG, Zink AR.** 2004. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis.* 4: 584–92.
33. **Dubnau E, Chan J, Raynaud C, Mohan VP, Lanéelle MA, Yu K, Quéward A, Smith I, Daffé M, .** 2000. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol.* 36:630–637.
34. **Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC.** 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA.* 282: 677-686.
35. **El-Etr SH, Subbian S, Cirillo SL, Cirillo JD.** 2004. Identification of two *Mycobacterium marinum* loci that affect interaction with macrophages. *Infect Immun.* 72: 6902-6913.
36. **Ernst JD.** 2000. Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell Microbiol.* 2: 379-386.
37. **Falkinham JO 3rd.** 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 9:177–215.
38. **Fine PE.** 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* 346:1339–1345.
39. **Folch J, Lees M, Sloane SGH.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem.* 26: 497.
40. **Forero M, Puentes A, Cortés J, Castillo F, Vera R, Rodríguez LE, Valbuena J, Ocampo M, Curtidor H, Rosas J, García J, Barrera G, Alfonso R, Patarroyo MA, Patarroyo ME.** 2005. Identifying putative *Mycobacterium tuberculosis* Rv2004c protein sequences that bind specifically to U937 macrophages and A549 epithelial cells. *Protein Sci.* 14: 2767-80.
41. **Futaki S, Nakase I, Tadokoro A, Takeuchi T, Jones AT.** 2007. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem Soc Trans.* 35: 784-787.

42. **García Nieto S.** 2005. Efecto de la infección micobacteriana sobre la maduración del macropinosoma de células no fagocíticas. Tesis de Maestría. México D.F. IPN-ENCB.
43. **García-del Portillo AAF.** 2004. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol.* 7:181–191.
44. **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.
45. **García-Pérez BE, Mondragón R, Luna-Herrera J.** 2003. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microb Pathog.* 35: 49-55.
46. **Gillespie SH.** 2007. Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. *Biochem Soc Trans.* 35: 1317-1320.
47. **Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST.** 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol.* 32: 643-55.
48. **Goren MB, Hart PD, Young MR, Armstrong JA.** 1976. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Nat Acad Sci USA.* 73: 2510-2514.
49. **Goren MB.** 1970. Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. I. Purification and properties. *Biochim Biophys Acta.* 210: 116.
50. **Gutierrez MC, Brisses S, Brosche R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V.** 2005. Ancient origin and genes mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathog.* 1:e5.
51. **Hansen LA, Poulsen OM, Nexø BA.** 1997. Inflammatory potential of organic dust components and chemicals measured by IL-8 secretion from human epithelial cell line A549 in vitro. *Ann Agric Environ Med.* 4: 27–33.
52. **Hernández González JC.** 2005. Diferenciación e identificación rápida de *Mycobacterium bovis* y complejo tuberculosis en aislados clínicos humanos por una técnica de PCR múltiple. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México D.F.
53. **Hernandez-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: 2133-2138.
54. **Horwitz MA, Harth G.** 2003. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 71:1672-1679.
55. **Hughes AJ, Hutchinson P, Gooding T, Freezer NJ, Holdsworth SR, Johnson PD.** 2005. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry. *Clin Exp Immunol.* 142: 132–9.

56. **Ilangumaran S, Arni S, Poincelet M, Theler JM, Brennan PJ, Nasir-ud-Din, Hoessli DC.** 1995. Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into lysosylphosphatidylinositol-rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes. *J Immunol.* 155: 1334–42.
57. **Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LEM.** 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev.* 6: 266-310.
58. **Jones AT.** 2007. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and a role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med.* 11: 670-684.
59. **Kaufmann HES.** 2006. Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. *Immunity.* 24: 351-357.
60. **Kaufmann SH, Winau F.** 2005. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. *Nat Immunol.* 6: 1063–1066.
61. **Ketterer M, Shao J, Hornick D, Buscher B, Bandi V, Apicella M.** 1999. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun.* 67: 4161-4170.
62. **Kohama H, Umemura M, Okamoto Y, Yahagia A, Goga H, Harakuni T, Matsuzakia G, Arakawa T.** 2008. Mucosal immunization with recombinant heparin-binding haemagglutinin adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) in infected mice. *Vaccine.* 26: 924-932.
63. **Kuwae A, Yoshida S, Tamano K, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa Ch.** 2001. *Shigella* invasion of macrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane. *J Biol Chem.* 276: 32230-32239.
64. **Kwon OJ, Kim JH, Kim HC, Suh GH, Park JW, Chung MP, Kim H, Ree CH.** 1998. Nitric oxide expression in airway epithelial cells in response to tubercle bacilli stimulation. *Respirology.* 3: 119-124.
65. **Lillo M, Orengo S, Cernoch P, Harris RL.** 1990. Pulmonary and disseminated infection due to *Mycobacterium kansasii*: A decade of experience. *Rev Infect Dis.* 12: 760-767.
66. **Lin M, Rikihisa Y.** 2003. Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycoposphoinositol-anchored proteins. *Cell Microbiol.* 5: 809–820.
67. **Luna-Herrera J.** 1991. Lípidos del *Mycobacterium lepraemurium*: Aspectos químicos y biológicos. Tesis Doctoral. ENCB-IPN. México D.F.
68. **Marraffini LA, DeDent AC, Schneewind O.** 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 170: 192–221.
69. **Meier O, Boucke K, Vig Hammer S, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF.** 2002. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol.* 158: 1119-1131.
70. **Mellman I, Steinman RM.** 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 106: 255-258.

71. **Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ, Locht C.** 1996. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med.* 184: 993-1001.
72. **Mock JR, Vakevainen M, Deng K, Latimer JL, Young JA, van Oers NSC, Greenberg S, Hansen EJ.** 2005. *Haemophilus ducreyi* targets Src family protein tyrosine kinases to inhibit phagocytic signaling. *Infect Immun.* 73: 7808-7816.
73. **Neville K, Bromberg A, Bromberg R, Bonk S, Hanna BA, Rom WN.** 1994. The third epidemic: multidrug-resistant tuberculosis. *Chest.* 105: 45-48.
74. **Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G.** 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: Evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* 166: 7477-7485.
75. **Ojcius D, Bravo de Alba Y, Kanellopoulos J.** 1998. Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells. *J Immunol.* 160: 1297-1303.
76. **Olsen AW, Hansen PR, Holm A, Andersen P.** 2000. Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with a single immunodominant epitope from the ESAT 6 antigen. *Eur J Immunol.* 30:1724-1732.
77. **Ordway D, Henao-Tamayo M, Smith E, Shanley C, Harton M, Troudt J, Bai X, Basaraba RJ, Orme IM, Chan ED.** 2008. Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. *J Leukoc Biol.* 38: 1-10.
78. **Ortega OY.** 2007. Participación de las proteínas de choque térmico de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en la apoptosis inducida con dexametasona en células mononucleares. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México D.F.
79. **Pabst MJ, Gross JM, Brozna JP, Goren MB.** 1988. Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 140: 634-40.
80. **Palmero DJ.** In *Tuberculosis 2007 from basic science to patient care.* Chapter 17: Tuberculosis and HIV/AIDS. [www.tuberculosis-textbook.com](http://www.tuberculosis-textbook.com)
81. **Pasula R, Wright JR, Kachel DL, Martin WJ.** 1999. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* 103: 483-490.
82. **Patarroyo MA, Curtidor H, Plaza DF, Ocampo M, Reyes C, Saboya O, Barrera G, Patarroyo ME.** 2008. Peptides derived from the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1490 surface protein implicated in inhibition of epithelial cell entry: potential vaccine candidates?. *Vaccine.* 26: 4387-95.
83. **Patel DL, Yamazaki DY, Alonso M, Paustian ML, Bannantine JP, Meunier-Goddik L, Bermudez LE.** 2006. The ability of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells. *Infect Immun.* 74:2849-2855.



84. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Kaisho T, Kundu M, Basu J. 2007. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol.* 8: 610-618.
85. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 3:473–483.
86. Persson YAZ, Blomgran-Julinder R, Rahman S, Zheng L, Stendahl O. 2008. *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils trigger a pro-inflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, acting in synergy with the bacteria. *Microbes Infect.* 10: 233-240.
87. Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Locht C, Menozzi FD. 2001a. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature.* 412: 190-194.
88. Pethe K, Puech V, Daffé M, Josenhans C, Drobecq H, Locht C, Menozzi FD. 2001b. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin binding haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 39: 89-99.
89. Pieters J. 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.* 3: 249–255.
90. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124: 715-727.
91. Puri V, Watanabe R, Singh RD, Dominguez M, Brown JC, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. 2001. Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J Cell Biol.* 154:535–48.
92. Pym AS, Brodin P, Majlessi L. 2003. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med.* 9:533-539.
93. Racoosin EL, Swanson JA. 1989. Macrophage colony stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J Exp Med.* 170: 1635–1648.
94. Ragas A, Roussel L, Puzo G, Rivière M. 2007. The *Mycobacterium tuberculosis* cell-surface glycoprotein Apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A. *J Biol Chem.* 282: 5133–5142.
95. Ravn P, Demissie A, Eguale T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy HA, Mustafa AS, Jensen AK, Holm A, Rosenkrands I, Oftung F, Olobo J, von Reyn F, Andersen P. 1999. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 179: 637–45.
96. Reddy VM, Kumar B. 2000. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis.* 181: 1189-93.

97. **Richterová, Z., D. Liebl, M. Horák, Z. Palková, J. Štokrová, P. Hozák, J. Korb, J. Forstová.** 2001. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol.* 75:10880–10891.
98. **Riley LW.** 2006. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest.* 116: 1475-1478.
99. **Robbins RA, Barnes PJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Geller DA, Polak JM.** 1994. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 203: 209-218.
100. **Rosenberger CM, Brumell JH, Finlay BB.** 2000. Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol.* 10:R823–R825.
101. **Roy S, Sharma S, Sharma M, aggarwal R, Bose M.** 2004. Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* 112: 471–480.
102. **Salo WI, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA.** 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2091-2094.
103. **Sandvig K, Olsnes S, Brown JE, Petersen OW, van Deurs B.** 1989. Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol.* 108:1331–1343.
104. **Sandvig K, van Deurs B.** 2002. Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18: 1–24.
105. **Sangari FJ, Goodman JR, Bermudez LE.** 2000. Ultrastructural study of *Mycobacterium avium* infection of HT-29 human intestinal epithelial cells. *J Med Microbiol.* 49: 139-147.
106. **Sharma SK, Mohan A.** 2004. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res.* 120: 316-353.
107. **Skretting G, Torgersen ML, van Deurs B, Sandvig K.** 1999. Endocytic mechanisms responsible for uptake of GPI-linked diphtheria toxin receptor. *J Cell Sci.* 112:3899–909.
108. **Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, Cox JS.** 2003. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 13001-6.
109. **Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO, Bates JH.** 1995. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *Am J Respir Crit Care Med.* 151: 1267–1268.
110. **Swanson JA.** 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 639-49.
111. **Thomas J, Velotta E.** 2005. Nontuberculous (atypical) mycobacterial keratitis after LASIK. Current status and clinical implications. *Cornea.* 24:245-255.



112. **Tjärnlund A, Guirado E, Julián E, Cardona P-J, Fernández C.** 2006. Determinant role for Toll-like receptor signalling in acute mycobacterial infection in the respiratory tract. *Microbes Infect.* 8:1790-1800.
113. **Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K.** 2001. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci.* 114:3737–47.
114. **Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I.** 2003. Modulation of human-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J Immunol.* 170: 4226-4236.
115. **Velasco-Velázquez MA, Barrera D, González-Arenas A, Rosales C, Agramonte-Hevia J.** 2003. Macrophage—*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microb Pathog.* 35: 125–131.
116. **Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T.** 2002a. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol.* 4: 341–355.
117. **Watarai M, Makino S, Shirahata T.** 2002b. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *Microbiology.* 148:1439–1446.
118. **Watarai, M, Derre I, Kirby J, Gowney JD, Dietrich WF, Isberg RR.** 2001. *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med.* 194: 1081–1095.
119. **Weineisen M, Sjöbring U, Fällman M, Andersson T.** 2004. Streptococcal M5 protein prevents neutrophil phagocytosis by interfering with CD11b/CD18 receptor-mediated association and signaling. *J Immunol.* 172: 3798–3807.
120. **Wiegand E, Balasubramanian V, Smith DW.** 1989. Immunity to tuberculosis from the perspective of pathogenesis. *Infect Immun.* 57: 3671–3676.
121. **Williams JHH, Ireland E.** 2008. Sensing danger—Hsp72 and HMGB1 as candidate signals. *J Leukoc Biol.* 83: 489–492.
122. **World Health Organization.** 1995. WHO Statment on BCG revaccination for the prevention of tuberculosis. *Bull World Health Organ.* 73:805-806.
123. **Yuan Y, YaQi Z, Crane DD, Barry CE 3rd.** 1998. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 29:1449–1458.
124. **Zenni M, Giardina P, Harvey H, Shao J, Ketterer M, Lubaroff D, Williams R, Apicella MA.** 2000. Macropinocytosis as a mechanism of entry into primary human urethral epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* 68: 1696–1699.