

Inducción de apoptosis por especies del género *Mycobacterium*

Xochitl Vega-Manriquez,* Yolanda López-Vidal,** José Ángel Gutiérrez-Pabello*

RESUMEN. La interacción entre hospedero y patógeno es un mecanismo dinámico donde el microorganismo utiliza diferentes estrategias para sobrevivir y multiplicarse en el individuo. El mecanismo de apoptosis ha sido considerado como parte de la respuesta inmune innata que el organismo utiliza para destruir agentes causantes de enfermedad, sin embargo también se ha observado que algunas bacterias tienen la capacidad de modular la apoptosis para persistir dentro de las células del hospedero. En la presente revisión se discute el proceso de apoptosis durante la interacción *Mycobacterium*-células del hospedero con el objetivo de identificar el posible papel de la muerte celular programada en la patogenia de las enfermedades causadas por las especies del género *Mycobacterium*.

Palabras clave: *Mycobacterium*, apoptosis, muerte celular.

ABSTRACT. Host-pathogen interactions are dynamic processes where microorganisms use different strategies to survive and multiply in the host. Apoptosis is a biological mechanism that has been considered to be an innate immune tool that plays a role in decreasing bacterial viability and preventing dissemination of the pathogens, however it could be modulated by the pathogens to obtain an opposite effect. In this review, the apoptosis process during the *Mycobacterium*-host cell interaction is discussed in order to identify the possible role of programmed cell death in the pathogenesis of diseases originated by species of the *Mycobacterium* genus.

Key words: *Mycobacterium*, apoptosis, cell death.

Abreviaciones

AIF, apoptosis inducing factor; Apaf-1, apoptotic protease activating factor-1; ASK, apoptosis signal regulation kinase; ATP, adenosine triphosphate; Bad; Bcl-2 antagonist of cell death; Bak, Bcl-2 antagonist/killer; Bax, Bcl-2 associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bid, BH3 interacting domain death agonist/killer; Bim Bcl-2 interacting mediator of cell death, CAD, caspase-activated DNA nuclease; Card, caspase recruitment domain; CD40, cluster determinant 40; CTL citotoxic T-linfocites; DIABLO, direct IAP binding protein with low pI; DD, death domain; DED, death effector domain; DNA, deoxynucleic acid; DISC, death induced signal complex; DR, death receptors; FADD, Fas-associating protein with death domain; Fas, CD95, ligand FAS; FLICE, FADD-like ICE; IAP, inhibitor of apoptosis protein; ICAD, inhibitor of caspase-activated DNA nuclease; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NO-, nitric oxide; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PI-3K/Akt, phosphatidylinositol 3-kinase Akt; PTK, protein tyrosine kinase, RIP, receptor-interacting protein; RNA, ribonucleic acid; ROI, reactive oxygen intermediate; TCR, T-cell receptor; TLR, Toll-like receptors; TNF, tumor necrosis factor; TNFR, TNF receptor; TRADD, TNFR1 associated death domain protein; TRAIL, TNF receptor apoptosis induced ligand.

APOPTOSIS

Descrita por primera vez por Kerr y col en 1972, la apoptosis se define como el proceso de muerte celular programada cuyo objetivo es eliminar las células dañadas o innecesarias en beneficio del organismo.⁵³ El mecanismo de apoptosis cumple una función fisiológica básica durante el desarrollo embrionario, en el crecimiento y mantenimiento de la homeostasis. En este contexto las células defectuosas, los linfocitos autorreactivos, y aquellas células con un potente mecanismo destructivo como los neutrófilos son eliminados.⁹⁹ La alteración de este mecanismo de muerte celular conduce a eventos patológicos primarios que desencadenan padecimientos como el cáncer,³³ enfermedades autoinmunes, degenerativas, inmunodeficiencias e infertilidad.⁵³

La apoptosis se puede inducir a través de dos vías principales; la extrínseca y la intrínseca, anteriormente llamadas apoptosis tipo I y tipo II respectivamente. La vía extrínseca se caracteriza por la participación de las caspasas como componente principal. Esta ruta es activada a través de receptores de superficie como los de la superfamilia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que incluye a TNFR1 (DR1), TNFR2, Fas (DR2), DR3-6 y CD40,⁹ también conocidos como receptores de muerte (DR). Estos receptores se pueden activar por diferentes estímulos fisiológicos incluyendo al TNF- α , el ligando de FAS (FasL) y el ligando de inducción de apoptosis asociado al TNF- α (TRAIL).⁹ Estructuralmente presentan en su porción cito-

* Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

** Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

plasmática un dominio de muerte (DD), que permite la interacción con otras proteínas para activar las cascadas de señales intracelulares. Una vez activados los DD se trimerizan y en el caso de Fas permite el reclutamiento de la proteína adaptadora asociada al DD de Fas (FADD),^{11,16} la cual a través de su dominio efector de muerte (DED) permite la activación de procaspasa-8^{12,62} y caspasa 10.⁹⁷ Al complejo formado por la interacción de estas proteínas se le conoce como complejo de señal de inducción de muerte (DISC) (Fig. 1).^{12,62,46,71} Caspasa 8 a su vez activa a caspasa 3, que finalmente induce la muerte celular.^{55,83} Como parte de esta vía también se ha descrito la proteína que interactúa con el receptor (RIP), que se asocia con el complejo formado por Fas-FADD y cuya sobreexpresión produce cambios morfológicos característicos de apoptosis aunque su papel en el proceso no está bien definido.⁸⁸ Otra cascada de señales de la vía extrínseca se ejecuta a través del complejo TNF/TNFR1 donde participa la proteína asociada al dominio de muerte del TNFR1 (TRADD) la cual contiene un DD,³⁷ que a su vez recluta a FADD para formar el DISC³⁸ (Fig. 1). El TNF- α también puede estimular la activación de RIP que es reclutada a través del complejo de señales que estimula TNFR1 y que le permite unirse a TRADD;^{39,51} una vez formado el DISC se activa caspasa 2 por medio de su dominio Card y directamente activa a caspasa 3 y 7,⁹ (Fig. 1).

Las caspasas son miembros de la familia de cisteinproteasas que realizan su actividad catalítica sobre residuos de aspartato. Estas moléculas son sintetizadas como zimógenos, por lo que requieren un proceso de activación para realizar su efecto biológico.³ Con base en su orden de activación las caspasas se clasifican en iniciadoras 2, 8, 9 y 10 y efectoras 3, 6 y 7.⁸⁶ Las caspasas iniciadoras se activan por autocatálisis y este proceso continúa en cascada hasta activar a las caspasas efectoras. Las caspasas 3, 6 y 7 son responsables de la hidrólisis de importantes sustratos celulares involucrados en cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis,⁶⁷ por ejemplo caspasa 6 participa en el corte⁷⁵ de las láminas nucleares A y C,^{13,91} mientras que caspasa 3 presenta una actividad catalítica sobre diferentes factores que incluyen la polimerasa poli/ADP-ribosa (PARP),⁹³ el NF- κ B, la proteínasina C (PKC),⁸⁹ el inhibidor de apoptosis Bcl-2¹⁵ y el inhibidor de desoxirribonucleasa (ICAD), cuyo producto (CAD) es responsable de la degradación de DNA.²⁵

La segunda ruta de apoptosis o vía intrínseca, involucra la participación de miembros de la familia Bcl2 en la mitocondria. La familia de proteínas Bcl-2 participa en la regulación de la integridad de la membrana externa de la mitocondria y se les considera además reguladores de la apoptosis.^{64,92} Los miembros de esta familia se pueden dividir en; a) inhibidores de apoptosis: Bcl-x_L, Bcl-2, Bcl-w,

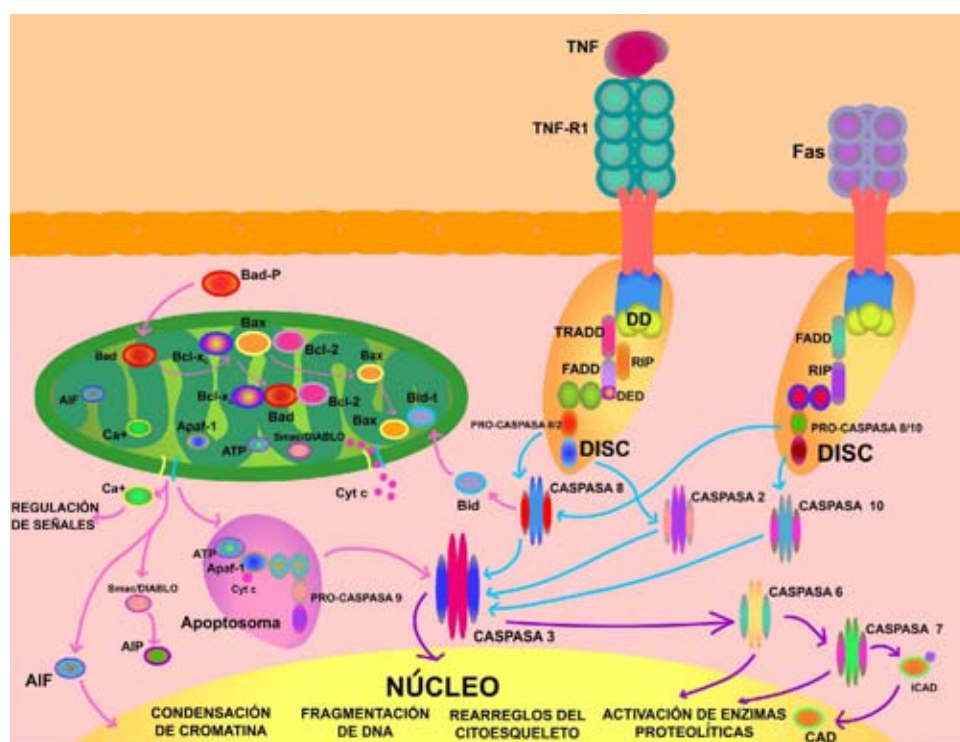


Figura 1. Activación de señales intracelulares en la apoptosis. En la vía extrínseca participan los receptores TNF- α y Fas, y la familia de las caspasas. La mitocondria interviene directamente en la vía intrínseca junto con la familia Bcl-2. Las dos vías convergen en la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7, lo que desencadena una serie de eventos que dan como resultado la apoptosis de la célula.

Mcl-1, A-1, adenovirus E1B 19X y virus Epstein-Barr BHRF; y b) en promotores de la apoptosis: Bax, Bak, Bid, Bad, Bcl-x_s, Bok/Mtd, Bik Bim, Hrk y Blk. Estas proteínas tienen la característica de formar homodímeros o heterodímeros entre ellas y de esta forma se activan o inactivan.⁴⁴ La participación de la familia Bcl-2 en la apoptosis permite que se altere el potencial de membrana de la mitocondria y que se lleve a cabo la liberación de diversas proteínas almacenadas en el espacio intermembranal, como el citocromo c, Ca²⁺, el factor de activación de Apoptosis (Apaf-1), y AIF entre otras. El citocromo c interactúa con Apaf-1 en presencia de dATP/ATP. Apaf-1 se une al Card de procaspasa 9 para formar un complejo proteico conocido como apoptosoma cuya función es activar a caspasa 9, la cual finalmente promueve la actividad de las caspasas efectoras ³⁵⁰ y ⁷⁶⁸ (Fig. 1). Otro factor importante en esta vía es la translocación de AIF directamente al núcleo, induciendo la fragmentación del DNA por un camino independiente de caspasas.⁴⁰ Por otra parte, la proteína Smac/DIABLO que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria, también participa al liberarse durante la pérdida del potencial de membrana para unirse a inhibidores de la apoptosis (AIPs) promoviendo de esta forma la liberación de las caspasas y la muerte celular.^{21,95}

Aunque existe una clara diferencia entre las dos vías de inducción del proceso apoptótico, esto no quiere decir que son eventos independientes, prueba de ello es la muerte celular inducida por el receptor de Fas donde se activa caspasa 8,^{12,62} la cual a su vez activa a Bid y Bax que se translocan hacia la mitocondria.^{49,264} Dentro de la mitocondria Bid y Bax sufren un cambio en su estructura²⁰ que permite la formación de canales tetraméricos por donde se da la salida del citocromo c.⁴¹

La apoptosis también se induce por factores propios del hospedero como las citocinas proinflamatorias, la acción de perforina/granzima en eventos donde se observa la participación de células T citotóxicas (CTL), así como por la participación directa de los microorganismos. En los últimos años se ha reportado que tanto bacterias como virus son capaces de inducir o inhibir el proceso apoptótico en las células del hospedero. Baculovirus y poxvirus expresan proteínas que protegen contra apoptosis al interferir con la activación de las caspasas,⁸ mientras que los herpesvirus inhiben la apoptosis al expresar proteínas virales semejantes a los miembros de la familia Bcl-2. Por otra parte, los adenovirus y papilomavirus han sido asociados con la inducción de apoptosis mediante un mecanismo que toma lugar mediante la unión de una variedad de reguladores celulares como el p53, que es una proteína implicada en la organización del ciclo celular y que comúnmente está mutada en células cancerosas.⁸

Los agentes bacterianos también promueven la apoptosis.¹⁴ La muerte celular de monocitos humanos se ha atri-

buido a la secreción de productos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella enteritidis*.⁷ De igual forma se ha probado que proteínas bacterianas como las toxinas A-B y algunos superantígenos de *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp inducen apoptosis en diferentes tipos celulares.^{14,36} Por otra parte, la invasión celular parece ser esencial en otros casos donde se han involucrado receptores de superficie como el CD14.⁶⁰

Es evidente que los agentes causantes de enfermedad son capaces de inducir o inhibir el proceso apoptótico de las células del sistema inmune del hospedero, sugiriendo que la apoptosis puede jugar un papel importante en la patogenia de las enfermedades infecciosas.^{8,14} La presente revisión pretende analizar el papel del género *Mycobacterium* en la inducción de apoptosis como resultado de su interacción con las células del hospedero.

El género *Mycobacterium* se divide en micobacterias no tuberculosas asociadas a enfermedad en humanos, micobacterias no tuberculosas raramente asociadas a enfermedad en humanos, *M. leprae* y el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. caprae*.⁴ Las especies bacterianas representantes del complejo tuberculosis producen una enfermedad infectocontagiosa del mismo nombre de curso crónico con el desarrollo de una lesión característica llamada granuloma.⁶¹ *M. tuberculosis* es una bacteria capaz de sobrevivir y replicarse dentro del fagosoma de los macrófagos, algunos de los mecanismos utilizados por estos microorganismos para lograr este objetivo incluyen la inhibición de la acidificación del fagosoma por la exclusión de la ATPasa vacuolar,⁹⁰ la inhibición de la fusión del fagolisosoma⁹⁶ y la proteína de cubrimiento conteniendo aspartato y triptofano (TACO),²⁷ y asimismo se ha postulado la modulación del proceso de apoptosis.^{29,42}

En los primeros reportes que relacionan al género *Mycobacterium* con apoptosis se observó que este fenómeno estaba asociado con la disminución de la viabilidad bacteriana, ya que al infectar monocitos de origen humano con *M. bovis* BCG o *M. avium-intracellulare* se demostró la inducción de apoptosis conjuntamente con la disminución de la viabilidad del bacilo al utilizar ATP4 o H₂O₂ como agente inductor de muerte celular respectivamente.^{48,58} Esta pérdida de la viabilidad se ha relacionado con la actividad de los receptores purinérgicos P2X7, sin embargo este efecto parece restringirse solamente a condiciones *in vitro*, ya que al realizar ensayos *in vivo* en ratones P2X7^{-/-} infectados con *M. tuberculosis* no se observó un efecto importante en el control de la enfermedad ni en la inducción de apoptosis.⁶³ Por otra parte, Placido y col. en 1997 demostraron que la infección

de macrófagos (MΦ) alveolares y MΦ derivados de monocitos de humanos, por *M. tuberculosis* desencadena el proceso de apoptosis, el cual depende de la viabilidad de la bacteria y de la dosis infectante. Los resultados de estos primeros estudios demostraron la participación de las micobacterias como inductores de apoptosis, sin embargo es importante mencionar que existen evidencias de que algunos componentes de *M. tuberculosis* también contribuyen a la inhibición de apoptosis, tal es el caso de las investigaciones que demuestran que la mutación de la enzima superóxido dismutasa en H37Rv predispone a un aumento en la inducción de apoptosis y mayor destrucción de la bacteria.²⁴

El efecto de la resistencia del hospedero en la inducción de apoptosis también ha sido explorado por varios investigadores, en particular se ha observado que individuos con diferentes grados de resistencia a la infección por micobacterias enfrentan el proceso de apoptosis con resultados heterogéneos. Por ejemplo, los macrófagos murinos que presentan el alelo resistente del Nramp1 (B10R, Nramp^{+/+}), mostraron mayor apoptosis que los macrófagos susceptibles (B10S, Nramp^{-/-}) así como un incremento en la producción de óxido nítrico y TNF-α, además de tener un mejor control de *Mycobacterium tuberculosis*.^{5,78,79} Adicionalmente Pan H., *et al.* demostraron que los macrófagos con fondo genético resistente (sst1R) murieron por apoptosis como resultado de la infección por *M. tuberculosis*, mientras que las células del genotipo susceptible (sst1S) murieron por necrosis. Los resultados de estos experimentos muestran que los macrófagos de individuos genéticamente resistentes son inducidos a morir por apoptosis en mayor escala que células de individuos susceptibles, lo cual sugiere que el proceso de apoptosis podría contribuir a la eliminación de la infección en individuos resistentes mientras que la diseminación bacteriana podría ser el resultado en individuos susceptibles.

Una vez que la micobacteria entra a la célula hospedera se sugiere que utiliza diferentes mecanismos para bloquear el mecanismo de apoptosis para permanecer dentro del nicho celular y de esta manera evadir al sistema inmune, sin embargo también se ha mencionado que podría estar induciendo apoptosis en linfocitos, lo que resultaría en una disminución en esta línea de defensa y todo en conjunto contribuiría a generar una enfermedad crónica en el individuo dando a la apoptosis un significado clínico relevante.

Al unificar estos resultados en un concepto, nos permite proponer que el proceso de apoptosis es un mecanismo inespecífico de defensa que en combinación con otros factores contribuye a la eliminación o a la diseminación de las bacterias dependiendo de las circunstancias.

APOPTOSIS LIGADA A RECEPTORES CELULARES DE SUPERFICIE

Una de las respuestas del hospedero a la infección por *M. tuberculosis* es producir TNF-α, que es una citosina crítica para la respuesta inmune contra la bacteria, así como para la inducción de apoptosis²⁸ (Fig. 2). La importancia de esta proteína en el proceso de muerte celular se evidenció cuando anticuerpos contra esta citosina inhibieron parcialmente la apoptosis inducida por *M. tuberculosis* H37Rv.²³ Además se observó que la forma soluble del receptor para TNF-α (sTNFR2) presentaba un papel crítico al dar lugar a la formación del complejo soluble ligando-receptor, inhibiendo la unión del TNF al receptor membranal y por consecuencia la apoptosis⁶ (Fig. 2). Por otra parte, diferentes estudios sugieren que la participación de TNF-α en conjunto con otros factores es determinante en la modulación del proceso apoptótico, por ejemplo Fratazzi y col en 1997 reportaron la participación de IL-10 y TNF-α durante la apoptosis de MΦ infectados con *M. avium* serovariedad 4, demostrando que el crecimiento bacteriano era inhibido en un 90% como consecuencia de agregar MΦ activados a la monocapa ya infectada. Por otro parte Keane y col en 1997 demostraron que adicional a TNF-α, la virulencia de la cepa fue importante ya que observaron un 17 y 47% de células apoptóticas al utilizar cepas virulenta (H37Rv) y avirulenta (H37Ra) respectivamente, evidenciando un incremento de estos porcentajes en presencia de la citosina (Fig. 2). Contrario a estas observaciones Keane y col. en 2000, reportaron que este tipo de asociación no replicaba los resultados cuando se utilizaban MΦ alveolares de origen humano además de observar una gran variación en los resultados dependiendo del tiempo de incubación utilizando (24 h y 5 días). Por su parte Rojas y col. en 1998 identificaron la participación de TNF-α y óxido nítrico (ON) en la muerte celular inducida por *M. tuberculosis*, en donde se observó la activación de la vía JAK2/STAT1-α⁸¹ (Fig. 2). *M. leprae* también se ha reportado como un agente inductor de muerte celular asociado a la presencia de TNF-α en conjunto con los genes proapoptóticos Bax y Bak.³⁵ Los resultados de estos estudios resaltan la importancia de TNF-α como inductor de la muerte celular (Fig. 2).

Los receptores Toll-like (TLR) conforman una familia muy amplia de receptores transmembranales que se encuentran en diferentes tipos de células de mamíferos, y que una vez estimulados, generan diferentes señales que activan al factor nuclear NF-κB mismo que regula la transcripción de genes de supervivencia o de muerte.⁷³ *M. tuberculosis* presenta ligandos que activan a las células vía TLR2 y TLR4, desencadenando apoptosis² (Fig. 2). Diferentes evidencias experimentales conectan la activación a

través de TLR con el proceso apoptótico, por ejemplo Means y col en 2001 bloquearon el TLR-4 en MΦ RAW 264.7 utilizando el lípido-like E5531 disminuyendo de esta forma el número de células apoptóticas como consecuencia de la infección por *M. tuberculosis*, de igual forma la producción de TNF- α asociado a MyD88 se vio disminuida. Por otra parte, el bloqueo de TLR-2 también redujo el porcentaje de apoptosis de células THP-1 tratadas con la glicoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* (Fig. 2). Los TLR participan en la activación de señales que se dan durante la inmunidad innata,⁷³ por lo que las células infectadas con micobacterias se pueden valer de la activación de los TLR y de las señales que activan para inducir apoptosis para eliminar a las células y con ello a las micobacterias, contrarrestando de esta forma la enfermedad en el hospedero.

Otro receptor involucrado en la activación de apoptosis en células infectadas con *M. tuberculosis* es el receptor Fas, el cual en MΦs de humanos es activado después de incubarla a la célula con Fas-L recombinante, y además se le relaciona con la disminución de la viabilidad de las bacterias.⁶⁵ Por otra parte, en el modelo murino *M. tuberculosis* induce apoptosis sin que exista un incremento del RNA mensajero de Fas, lo que sugiere que el evento puede estar ocurriendo a través de un camino independiente de Fas-Fas ligandos.⁹⁸ La activación de apoptosis

por el receptor Fas u otros receptores se puede considerar como un importante mecanismo de defensa ya que puede contribuir a la eliminación de la bacteria dentro de la célula. Sin embargo, algunos estudios⁵⁹ cuestionan este concepto al señalar que los MΦ infectados con *M. tuberculosis* expresan Fas-L en gran cantidad, y que esto da como consecuencia la eliminación de células específicas de defensa contra la tuberculosis como las CTL. En este caso, el efecto final le permitiría ventajas a la micobacteria para permanecer viable dentro de la célula infectada sin interactuar con las células CTL.

En etapas tempranas de la infección se ha asociado la presencia de CD14 con el proceso apoptótico en MΦ infectados con *M. tuberculosis*. Estos receptores ven disminuida su expresión como efecto de la infección.⁸² De igual manera se ha observado una disminución de los receptores CD16 en conjunto con la exposición en la superficie de la célula del marcador de apoptosis fosfatidilserina en neutrófilos apoptóticos de pacientes con tuberculosis activa.¹ Es evidente que los actores moleculares en este evento están determinados por el receptor que esté involucrado.

En la patogénesis de la tuberculosis es interesante observar que la interacción del patógeno con las células del hospedero incluye la estimulación de receptores específicos que activan las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Por lo que la vía de señales y las moléculas

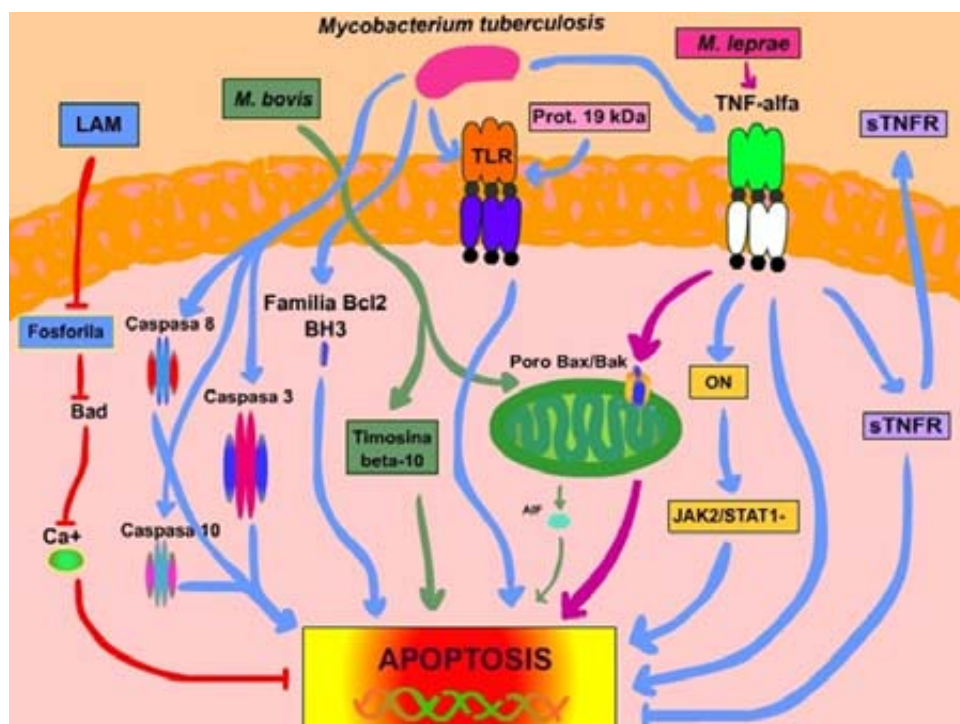


Figura 2. Inducción de apoptosis por Mycobacterium. Diferentes vías de señales que activan o bloquean apoptosis en la célula hospedera cuando es infectada con Mycobacterium o sus componentes, con flechas azules vías de *M. tuberculosis*, flechas moradas *M. leprae* y flechas verdes *M. bovis*.

por las cuales se lleve a cabo este evento depende en gran medida del receptor al cual se une la bacteria y las moléculas que dicho receptor va a activar. Cabe mencionar que algunos receptores son específicos del tipo celular, por lo que las señales intracelulares y las proteínas que se activan en el evento de apoptosis serán diferentes, ya que va a depender del modelo biológico que se estudie y de la cepa bacteriana.

PARTICIPACIÓN DE LA FAMILIA DE LAS CASPASAS

La apoptosis está íntimamente relacionada con la actividad de las caspasas. Existen investigaciones donde se ha observado la inducción de apoptosis por parte de micobacterias. Uno de estos reportes menciona la activación de caspasa 3 la cual se activa en forma independiente de la fosfolipasa A2 y del TNF- α en M Φ de humanos infectados con *M. tuberculosis*²² (Fig. 2). Por otra parte, la activación de caspasa 1 se relaciona, con un aumento en la producción de TNF- α e IL-1 β durante la infección con *M. tuberculosis* pero sin la participación de caspasas 3 ó 4 en monocitos de humano.¹⁸ Adicionalmente en el modelo murino se evidenció la activación de caspasa 8 en M Φ J774A-1 infectados con *M. avium* identificándose además la participación de ASK y de la proteína con actividad mitogénica (p38 MAP) cinasa.¹⁰ La participación de las caspasas 8, 9 y 10 también se ha reportado en células TH1 infectadas con las cepas avirulentas *M. tuberculosis* H37Ra (Fig. 2) y *M. bovis* BCG, sin embargo este resultado no fue confirmado al usar una cepa virulenta de *M. bovis*.⁷⁷ Existen otros modelos biológicos donde se ha observado la activación de caspasas relacionado a *M. tuberculosis*, en uno de ellos donde se utilizaron neutrófilos, caspasa 3 participa con un aumento en la expresión de Bax y en forma dependiente de radicales de oxígeno.⁷⁰ Como se observa existe una diferencia en la activación de caspasas en los distintos modelos biológicos reportados para el estudio del evento apoptosis-*Mycobacterium*, para discutir esta diferencia es importante mencionar que las caspasas 1, 3 y 8 presentan una estructura variable,⁸⁶ por ejemplo el asa L4 es más corta en las caspasas 1, 8 y 9, al compararlas con las caspasas 3 y 7 y esto da como resultado una unión débil con el sustrato,⁸⁶ lo que va ligado con su función biológica, asimismo las diferencias en sus estructuras le confieren ser activadas por distintas señales derivadas de diferentes estímulos.

FAMILIA BCL-2

La familia de proteínas Bcl-2 participa en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis. La infección por diferentes especies del género *Mycobacterium* modifican la

participación de estas proteínas, por ejemplo la concentración del RNAm de Bcl-2 y la oxidasa de citocromo c disminuyen, mientras que la de Bax aumenta favoreciendo la apoptosis de macrófagos peritoneales murinos en presencia de *M. tuberculosis*.⁷⁴ De igual forma Bcl-2 disminuye en monocitos de origen humano infectados con *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Ra inactivada por calor, mientras que las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bcl-x_s, no presentan diferencias en su expresión. Por otra parte, utilizando inmunohistoquímica en M Φ de ratones infectados con *M. tuberculosis* se observa una sobreexpresión de Bcl-2 y la disminución en la expresión de Bax⁵⁷ (Fig. 2). La participación de la proteína antiapoptótica Mcl-1 también se ha hecho evidente. Células THP-1 infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv presentan una sobre-expresión de 5.8 veces más que las células infectadas con la cepa avirulenta H37Ra, H37Rv muerta o tratadas con perlas de látex. La asociación de este evento con apoptosis se demostró al inhibir la expresión de Mcl-1 mediante el uso de RNA antisentido en células infectadas con la cepa H37Rv observándose un incremento en la proporción de células con características apoptóticas. Los resultados de estos experimentos sugieren que las cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* inducen una sobreexpresión de Mcl-1, la cual participa en la inhibición de apoptosis.⁸⁷ La familia de proteínas Bcl-2 está constituida por miembros que favorecen o inhiben el proceso de muerte celular.⁷⁶ Consistentemente se ha comprobado que las micobacterias modulan la expresión de estas proteínas promoviendo el proceso apoptótico aunque al parecer la virulencia de la cepa juega un papel determinante en la decisión final de la célula.

PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA

La pérdida del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) de la mitocondria es un evento asociado a la muerte celular. *M. tuberculosis* desencadena la pérdida del $\Delta\Psi_m$ con salida de Ca²⁺ al citoplasma y sin la participación del óxido nítrico en macrófagos de origen murino.⁸⁰ Sin embargo, en macrófagos humanos de igual forma infectados por *M. tuberculosis* se observó que el aumento de Ca²⁺ en el citoplasma estabiliza la permeabilidad de la membrana mitocondrial, bloquea la necrosis, disminuye la salida de citocromo c y la activación de caspasas además de tener una buena acción antimicobacteriana. En contraste, la disminución del Ca²⁺ citoplasmático revierte la mayoría de los efectos anteriormente descritos y se asocia con una muerte por necrosis permitiendo de esta forma una mejor replicación de la bacteria.²² Por otra parte, la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* debido a diferentes anti-micobacterianos como; isoniazida, rifampicina, es-

treptomicina y etambutol, se ha asociado a la modulación de la muerte celular porque alteran la transición de la permeabilidad de la mitocondria y la concentración de Ca^{2+} en el MΦ.³⁰ Al parecer la mitocondria tiene una función fundamental en la inducción de muerte celular, sin embargo la presentación de necrosis o apoptosis inducida por las micobacterias parece ser un evento multifactorial donde la concentración de Ca^{2+} citoplasmático en la célula es un elemento determinante.⁶⁶

TIMOSINA β-10

Uno de los resultados de la infección por *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos es una apoptosis dependiente del tiempo y de la multiplicidad de la infección. Por otra parte, también se observó una sobreexpresión del gene timosina β-10 atribuible directamente a la presencia de *M. bovis* viable ya que células estimuladas con partículas de látex o incubadas en presencia del microorganismo inactivado por calor, no mostraron ningún cambio o mostraron una reducción notable en la expresión del gene respectivamente. Al tratar de asociar estas dos observaciones, se estudió el efecto de la presencia del gene en células RAW 264.7, evidenciándose un incremento en el porcentaje de apoptosis de 66.5% comparado con un 4.7% de las células control negativo. Estos datos sugieren que la sobreexpresión del gene timosina β-10 en macrófagos de bovino infectados con *M. bovis* está asociada al evento de apoptosis³² (Fig. 2), sin embargo se necesita un mayor número de evidencias experimentales para conocer claramente la función de esta proteína en el proceso de muerte celular inducido por *M. bovis*.

COMPONENTES DE MYCOBACTERIUM MODULADORES DE APOPTOSIS

Derivado de diferentes estudios se ha hipotetizado que no sólo la bacteria completa es capaz de inducir muerte celular, sino que algunos de sus componentes en forma independiente también son responsables de este fenómeno. Por ejemplo, al incubar MΦ de bovino con el extracto libre de células de *M. bovis* se observó la pérdida del $\Delta\Psi_m$, lo que permite que se libere AIF del espacio intermembranal, transloque a núcleo y desencadene la muerte celular del MΦ sin que se activen las caspasas⁹⁴ (Fig. 2), también se reportó que el lisado de *M. avium* induce apoptosis en MΦ y monocitos de humanos vía radicales libres de oxígeno.³⁴ Por otra parte, el lipoarabinomanana (LAM), tiene un efecto antiapoptótico (Fig. 2), ya que previene la salida de Ca^{2+} y el daño mitocondrial,⁸⁰ así mismo promueve la supervivencia celular al bloquear la apoptosis, estimulando la fosforilación de Bad, miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, mediante una vía dependiente de la cinasa 3 fosfatidilinosi-

tol/cinasa treonina serina (PI-3K/Akt).⁵⁴ Otro componente de *M. tuberculosis* que se ha demostrado su potencial como inductor de apoptosis en células CHO/CD14/TLR-2 mediante la interacción con receptores Toll-like 2 es el lipomanana (LM).¹⁹ De igual forma, el lipomanana de *Mycobacterium kansasii* induce un incremento significativo de apoptosis en células THP-1 por lo que se sugiere que los residuos de manosa son necesarios para la inducción de dicho evento.³¹ Dentro del campo de las proteínas se ha identificado a la lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* cepa H37Rv como un inductor de la apoptosis en macrófagos y monocitos en etapa temprana de la infección.^{17,52} En la modulación de la apoptosis durante la infección con micobacterias se observa que la virulencia de la cepa está involucrada,^{42,78,77} por lo que es posible postular que existen diferentes compuestos, que son cepa y especie dependientes, y que participan en el proceso de muerte celular.

APOPTOSIS EN LINFOCITOS

En los linfocitos también se ha observado la inducción de apoptosis por micobacterias. Por ejemplo en ratones susceptibles a *M. bovis* BCG, se observa un defecto en la proliferación de linfocitos T cuando son activados a través del uso de mitógenos o anticuerpos anti-CD3, siendo apoptosis el resultado de la estimulación celular. Los autores de este trabajo postulan que la apoptosis de los linfocitos T pueden ser una de las posibles explicaciones que fundamentan la ineficiencia de la respuesta inmune en la infección por micobacterias y proponen que la inmunodepresión de los ratones puede estar mediada por el aporte de $\text{TNF-}\alpha$ por parte de los MΦ activados, ya que esta citosina se incrementa en ratones susceptibles.⁴⁷ Otros estudios han mostrado resultados similares ya que cuando se infectaron linfocitos T con *M. tuberculosis* se induce apoptosis ligada a un aumento del $\text{TNF-}\alpha$ y a la presencia de IL-4, esta última promueve la expresión del CD30 el cual sensibiliza a los linfocitos para sufrir apoptosis mediada por el $\text{TNF-}\alpha$.⁸⁵ El evento descrito en las anteriores investigaciones puede contribuir al conocimiento de la patogenia de la tuberculosis ya que se sugiere que la bacteria contribuye a la inducción de apoptosis en linfocitos cuando son infectados y de esta manera puede favorecer el desarrollo de la enfermedad al disminuir las defensas del hospedero y esta hipótesis ya se ha descrito en otros eventos infecciosos.

APOPTOSIS COMO UN MECANISMO FACILITADOR EN LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS

Recientemente se ha descrito en la literatura el proceso de apoptosis como un mecanismo que permite una mejor

presentación de antígenos. Resultados del laboratorio del Dr. Kaufmann⁸⁴ han permitido demostrar que la infección por *Mycobacterium tuberculosis* además de inducir apoptosis en macrófagos promueve la formación de vesículas apoptóticas que acarrean antígenos micobacterianos a células dendríticas no infectadas. La fagocitosis de estas vesículas promueve la presentación cruzada de antígenos a linfocitos T de pacientes previamente sensibilizados a través de las moléculas MHC-I y CD1b. Estas evidencias experimentales, fortalecen el concepto que postula al proceso de apoptosis como parte de la respuesta inmune del hospedero que trata de contener la infección micobacteriana de diferentes formas. En este caso el blanco de acción es la activación de los linfocitos T CD8 específicos para antígenos micobacterianos de origen proteico y lipídico.

CONCLUSIONES

Una vez que un microorganismo infecta a un hospedero se desencadenan una serie de eventos celulares, entre los cuales podemos encontrar: supervivencia, arresto del ciclo celular, necrosis o apoptosis. El evento de apoptosis se lleva a cabo a través de varias vías de señales donde se activan diferentes moléculas efectoras de la muerte celular, tales como proteínas de la familia de las caspasas y Bcl-2, así como diferentes receptores y la mitocondria; este lenguaje de señales que se generan hacia el interior de la célula es dinámico porque dependiendo del origen de las células del hospedero, así como de los determinantes virulentos de la bacteria, el tipo de moléculas que se van a activar puede variar.

En la patogenia de la infección por especies de *Mycobacterium* se reconoce que la modulación del proceso de apoptosis puede jugar dos papeles diametralmente opuestos; por una parte promueve la supervivencia bacteriana en individuos cuyos mecanismos microbicidas son ineficientes o por inhibición de la apoptosis debido principalmente a los factores de virulencia del patógeno. Sin embargo, en individuos con una respuesta inmune adecuada la inducción de apoptosis parece limitar la viabilidad y el crecimiento bacteriano. Esta dualidad en el resultado final de la interacción hospedero-patógeno parece estar definida por la virulencia bacteriana y el grado de resistencia a las micobacterias, por parte de las células de la respuesta inmune. Por otra parte, el proceso de apoptosis también se ha identificado como un mecanismo facilitador de la respuesta inmune.

AGRADECIMIENTOS

Extendemos nuestros sinceros agradecimientos a Juan Manuel Martínez Villalobos por su ayuda en la elaboración de las figuras.

REFERENCIAS

1. Alemán, M., A. García, M. A. Saab, *et al.* 2002. *Mycobacterium tuberculosis*-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 27: 583-92.
2. Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, *et al.* 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285: 736-9.
3. Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D.W. Nicholson, *et al.* 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.
4. Aranaz, A., D. Cousins, A. Mateos, *et al.* 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Interna. J. Sist. Evolut. Mycobiol.* 53: 1785-1789.
5. Arias M., M. Rojas, J. Zabaleta, *et al.* 1997. Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg(r) and Bcg(s) macrophages correlates with nitric oxide production. *J. Infect. Dis.* 176: 1552-1558.
6. Balcewicz-Sablinska, M. K., J. Keane, H. Kornfeld, *et al.* 1998. Pathogenic *Mycobacterium bovis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF- α , resulting in inactivation of TNF- α . *J. Immun.* 161: 2636-2641.
7. Baran, J. K., W. Guzik, M. Hryniewicz, *et al.* 1996. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.* 64: 4242-4248.
8. Barry, M., & G. McFadden. 1998. Apoptosis regulators from DNA viruses. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 422-430.
9. Bhardwaj, A. & B. B. Aggarwal. 2003. Receptor-mediated choreography of life and death. *J. Clin. Immunol.* 23: 317-332.
10. Bhattacharyya, A., S. Pathak, C. Basak, *et al.* 2003. Execution of macrophage apoptosis by *Mycobacterium avium* through apoptosis signal-regulating kinase 1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling and caspase 8 activation. *J. Biol. Chem.* 278: 26517-26525.
11. Boldi, M. P., E. E. Varfolomeev, Z. Pancer, *et al.* 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270: 7795-7798.
12. Boldi, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev, *et al.* 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815.
13. Caulin, C., G. S. Salvesen & R. G. Oshima. 1997. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell. Biol.* 138:1397.
14. Chen, Y. & A. Zychlinsky. 1994. Apoptosis induced by bacterial pathogens. *Microb. Pathog.* 17:203-212.
15. Cheng, E. H., D. G. Kirsch, R. J. Clem, *et al.* 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278: 1966-1968.
16. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, M. Tewari, *et al.* 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512.
17. Ciaranella, A., A. Martino, R. Cicconi, *et al.* 2000. Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection. *Cell. Death and Different.* 7: 1270-1272.
18. Ciaranella, A., A. Cavone, M. B. Santucci, *et al.* 2002. Proinflammatory cytokines in the course of *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/macrophages. *J. Infect. Dis.* 186: 1277-82.

19. Dao, D. N., L. Kremer, Y. Guérardel, *et al.* 2004. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect. Immun.* 4: 2067-2074.
20. Desagher, S., A. Osen-Sand, A. Nichols, *et al.* 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* 144: 891-901.
21. Du, C., M. Fang, Y. Li, *et al.* 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.
22. Duan, L., H. Gan, D. Golan, *et al.* 2002. Critical role of mitochondrial damage in determining outcome of macrophage infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 169: 5181-5187.
23. Dürrbaum-Landmann I., J. Gercken, D. Flad, *et al.* 1996. Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect. Immun.* 64: 5384-5389.
24. Edwards, K.M., M.H. Cynamon, R.K. Voladri, *et al.* 2001. Iron-cofactors superoxide dismutase inhibits host responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 2213-2219.
25. Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, *et al.* 2000. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.
26. Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson, *et al.* 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20: 929.
27. Ferrari, G., H. Langen, M. Naito, *et al.* 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97: 435-47.
28. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, *et al.* 1995. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 6: 561-572.
29. Fratazzi, C., R. D. Arbeit, C. Carini, *et al.* 1997. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevent the *Mycobacterium* from spreading and induces micobacterial growth inhibition by freshly added, infected macrophages. *J. Immunol.* 158: 4320-4327.
30. Gil, D., L. F. García & M. Rojas. 2003. Modulation of macrophages apoptosis by antibacterial therapy physiological role of apoptosis in the control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxicol. Appl. Pharma.* 190: 111-119.
31. Guérardel, Y., E. Maes, V. Briken, *et al.* 2003. Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*: novel structural features and apoptosis-inducing properties. *Biol. Chem.* 278: 36637-51.
32. Gutiérrez-Pabello, J. A., D. N. McMurray & L. G. Adams. 2002. Upregulation of thymosin b-10 by of *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infect. Immun.* 70: 2121-2127.
33. Hanahan, D. & R. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
34. Hayashi, T., A. Catanzaro & S. 1997. Rao Apoptosis of human monocytes and macrophages by *Mycobacterium avium* sonicate. *Infect. Immun.* 65:5262-5271.
35. Hernández, M. O., I. Never, J. S. Sales, *et al.* 2003. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor- α . *Immunol.* 109: 156-164.
36. Hilbi, H., A. Zychlinsky & P. J. Sansonetti. 1997. Macrophage apoptosis in microbial infections. *Parasitology* 115:S79-87.
37. Hsu, H., J. Xiong & D. V. Goeddel. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81: 495-504.
38. Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan, *et al.* 1996. Tradd-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathway. *Cell* 84: 299-308.
39. Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, *et al.* 1996-b. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4: 387-396.
40. Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, *et al.* 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-554.
41. Jürgensmeier, J. M., Z. Xie, Q. Deveraux, *et al.* 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4997-5002.
42. Keane, J., Balcewick-Sablinska, M. K., H. G. Remold, *et al.* 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophages apoptosis. *Infect. Immune.* 65: 298-304.
43. Keane, J., H. G. Remold & H. Kornfeld. 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J. Immunol.* 164:2016-20.
44. Kelekar, A. & C. B. Thompson. 1998. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 8:324-30
45. Kerr, J. F., A. H. Wyllie & A. R. 1972. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
46. Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, *et al.* 1995. Cytoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO* 14:5579.
47. Kremer, L., J. Estaquier, I. Wolowczuk, *et al.* 2000 Ineffective cellular immune response associated with T-cell apoptosis in susceptible *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immun.* 68: 4264-4273.
48. Laochumroonvorapong, P., S. Paul, K. B. Elkon, *et al.* 1996. H₂O₂ induces monocyte apoptosis and reduces viability of *Mycobacterium avium-M. intracellulare* within cultured human monocytes. *Infect. Immun.* 64: 452-459.
49. Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, *et al.* 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.
50. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, *et al.* 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-89.
51. Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez, *et al.* 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13: 2514.
52. López, M., L. M. Sly, Y. Luu, *et al.* 2003. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophages apoptosis through Toll-Like receptor-2. *J. Immunol.* 170: 2409-2416.
53. MacFarlane, M. & A. C. Williams. 2004. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports* 7: 674-678.
54. Maiti, D., A. Bhattacharyya & J. Basu. 2001. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophages survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 329-333.
55. Martin, D. A., R. M. Siegel, L. Zheng, *et al.* 1998. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J. Biol. Chem.* 273: 4345-9.
56. Means, K. T., B. W. Jones, A. B. Schromm, *et al.* 2001. Differential effects of a Toll-Like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophages responses. *J. Immunol.* 166: 4074-4082.

57. Mogga, S. J., T. Mustafa, L. Sviland, *et al.* 2002. Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand. J. Immunol.* 56: 383-391.
58. Molloy, A., P. Laochumroonvorapong, G. Kaplan. 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J. Exp. Med.* 180: 1499-1509.
59. Mustafa, T., G. Bjune, R. Jonsson, *et al.* 2001. Increased expression of Fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in Mycobacterial infection. *Scand. J. Immunol.* 54: 630-639.
60. Muro, M., T. Koseki, S. Akifusa, *et al.* 1997. Role of CD14 molecules in internalization of *Actinobacillus actinomycetem-comitans* by macrophages and subsequent induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 65: 1147-1151.
61. Murray P. R., E. J. Barron, M. A. Pfaller, *et al.* 2003. *Mycobacterium*: General characteristics, isolation, and staining procedures. In G. E. Pfyffer, B. A. Brown-Elliott & R. J. Wallace (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology. Washington D.C.
62. Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, *et al.* 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-827.
63. Myers A.J., B. Eilertson, S.A. Fulton, *et al.* 2005. The purinergic P2X7 receptor is not required for control of pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 73: 3192-3195.
64. Nguyen, M., D. G. Millar, V. W. Yong, *et al.* 1993. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 268: 25265-8.
65. Oddo, M., T. Renno, A. Attinger, *et al.* 1998. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 160: 5448-54.
66. Orrenius, S., B. Zhivotovsky & P. Nicotera. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:552-65
67. Orth, K., K. O'Rourke, G. S. Salvesen, *et al.* 1996. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J. Biol. Chem.* 271: 20977.
68. Orth, K., A. M. Chinnaiyan, M. Garg, *et al.* 1996. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J. Biol. Chem.* 271: 16443.
69. Pan, H., B.S. Yan, M. Rojas, *et al.* 2005. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature.* 434: 767-772.
70. Perskvist, N., M. Long, O. Stendahl, *et al.* 2002. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J. Immunol.* 12: 6358-6365.
71. Peter, M. E. & P. H. Krammer. 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 545
72. Placido, R., G. Mancino, A. Amándola, *et al.* 1997. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Pathol.* 181: 31-38.
73. Quesniaux, V., C. Fremond, M. Jacobs, *et al.* 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes. Infect.* 6:946-59.
74. Ragno, S., I. Estrada-García, R. Butler, *et al.* 1998. Regulation of macrophage gene expression by *Mycobacterium tuberculosis*: down-regulation of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Infect. Immun.* 66: 3952-3958.
75. Rao, L., D. Perez & E. White. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135:1441.
76. Reed, J. C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* 124:1-6.
77. Riendeau, C. J. & H. Kornfeld. 2003. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. *Infect. Immun.* 71: 254-259.
78. Rojas, M., L. F. Barrera & L. F. Garcia. 1998. Induction of apoptosis in murine macrophages by *Mycobacterium tuberculosis* is reactive oxygen intermediates-independent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 436-42.
79. Rojas, M., M. Olivier, P. Gros P, *et al.* 1999. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J. Immunol.* 162: 6122-6131.
80. Rojas, M., L. F. García, J. Nigou, *et al.* 2000. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophages apoptosis by altering Ca²⁺-dependent cell signaling. *J. Infect. Dis.* 182:240-51.
81. Rojas, M., M. Olivier & L. F. Garcia. 2002. Activation of JAK2/STAT1-alpha-dependent signaling events during *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis. *Cell Immunol.* 217: 58-66.
82. Santucci, M. B., M. Amicosante, R. Cicconi, *et al.* 2000. *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/Macrophages: early membrane modifications and intracellular mycobacterial viability. *J. Infect. Dis.* 181: 1506-9.
83. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, *et al.* 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675.
84. Schaible, U. E., F. Winau, P. A. Sieling, *et al.* 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and in tuberculosis. *Nature Medicine.* 8:1039-1045.
85. Seah, G., & G. A. Rook. 2001. IL-4 influences apoptosis of *Mycobacterium*-reactive lymphocytes in the presence of TNF-alpha. *J. Immunol.* 167:1230-1237.
86. Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9: 459-470.
87. Sly, L. M., M. Hingley-Wilson, N. E. Reiner, *et al.* 2003. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J. Immunol.* 170: 430-437.
88. Stanger, B. Z., P. Leder, T. H. Lee, *et al.* 1995. A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81: 513-523.
89. Strohm, C. & K. Schulze-Osthoff. 1998. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrate. *Cell Death Differ.* 5: 997-1000.
90. Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, *et al.* 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium phagosomes* produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678-81.
91. Takahashi, A., E. S. Alnemri & Y. A. Lazebnik. 1996. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: Multiple interleukin 1b-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8395.
92. Tanaka, S., K. Saito & J. C. Reed. 1993. Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J. Biol. Chem.* 268: 10920-6.
93. Tewari, M., L. T. Quan, K. O'Rourke, *et al.* 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-in-

- hibitante proteasa que cliva el sustrato de la muerte polímero de (ADP-ribose) polimerasa. *Cell* 81: 801-809.
94. Vega-Manriquez, X., Y. López-Vidal, J. Moran, *et al.* 2007. Apoptosis-inducing factor participation in bovine macrophage *Mycobacterium bovis*-induced caspase independent cell death. *Infect. Immun.* 75: 1223-1228.
95. Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, *et al.* 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
96. Via, L. E., D. Deretic, R. J. Ulmer, *et al.* 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. Biol. Chem.* 272: 13326-31.
97. Vincenz, C., & V. M. Dixit. 1997. Fas-associated death domain protein interleukin-1 β -converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J. Biol. Chem.* 272:6578-6583.
98. Watson, V. E., L. L. Hill, L. B. Owen-Schaub, *et al.* 2000. Apoptosis in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice exhibiting varied immunopathology. *J. Pathol.* 190:211-220.
99. Winau, F., S. H. Kaufmann, U. E. Schaible. 2004. Apoptosis paves the detour path for CD8T cell activation against intracellular bacteria. *Cell Microbiol.* 6: 599-607.

Correspondencia:

Dr. José Ángel Gutiérrez-Pabello

Departamento de Microbiología e Inmunología,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México, D.F. 04510. Tel. (55) 56225896.
Fax: (55) 56225971.
Correo electrónico: jagp@servidor.unam.mx