

# Proteínas del filtrado del cultivo de *Mycobacterium bovis* promueven apoptosis independientemente de la activación de las caspasas en macrófagos bovinos

Itzel Nalleli Jiménez Vázquez<sup>1</sup>

 0009-0005-7375-158X

Clara Espitia Pinzón<sup>2</sup>

 0000-0001-7731-4049

Erasmó Negrete Abascal<sup>3</sup>

 0000-0003-4362-8044

Alejandro Benítez Guzmán<sup>1</sup>

 0000-0003-1671-6401

Julio Morán<sup>4</sup>

José Ángel Gutiérrez Pabello<sup>1</sup>

 0000-0001-5801-5887

<sup>1</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia/ Departamento de Microbiología e Inmunología, CDMX, México.

<sup>2</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas/ Departamento de Inmunología, CDMX, México.

<sup>3</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala/ Unidad de morfología y función, Estado de México, México.

<sup>4</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular/ Neuropatología molecular, CDMX, México.

**\*Autor para correspondencia:**

Correo electrónico:

[jagp@unam.mx](mailto:jagp@unam.mx)

Recibido: 2023-03-27

Aceptado: 2023-07-26

Publicado: 2023-09-06

Información y declaraciones adicionales en la página 11

© Derechos de autor 2023

Itzel Nalleli Jiménez Vázquez et al.

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

## Resumen

La apoptosis es un proceso que ocurre de manera normal en los tejidos. Se caracteriza por cambios morfológicos en la célula. Las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* inducen este fenómeno; en el modelo bovino, se demostró que tanto *Mycobacterium bovis* como sus extractos proteicos, inducen apoptosis independientemente de la activación de las caspasas, sin embargo, la identidad de las proteínas en los extractos proteicos se desconoce. En este estudio reportamos que, a través de cromatografía de exclusión por peso molecular, se obtuvieron fracciones proteicas con la capacidad de inducir fragmentación del DNA en macrófagos de bovinos independientemente de la activación de la caspasa 3. Asimismo, mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) se identificó la presencia de tres candidatos responsables de la actividad biológica: MPB70, MPB83 y chaperonina de 60 kDa.

**Palabras clave:** *Mycobacterium bovis*; Apoptosis; Fracciones proteicas; Macrófagos bovinos; Caspasa 3.

## Cómo citar este artículo:

Jimenez Vasquez IN, Espitia Pinzón C, Negrete Abascal E, Benítez Guzmán A, Morán J, Gutiérrez Pabello JÁ. Las proteínas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis* promueven apoptosis independiente de la activación de las caspasas en macrófagos bovinos. Veterinaria México OA. 2023;10. doi: 10.22201/fmvz.24486760e.2023.1195.

## Contribución del estudio

Las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y sus proteínas inducen apoptosis en diferentes células. *Mycobacterium bovis* y sus extractos proteicos (filtrado de cultivo y extracto soluble) tienen la capacidad de inducir este fenómeno de manera independiente a la activación de la caspasa 3. Sin embargo, se desconoce la identidad de las proteínas en los extractos proteicos. En este estudio se logró identificar por primera vez la presencia de tres candidatos (MPB70, MPB83 y chaperonina de 60 kDa) responsables de inducir apoptosis en macrófagos de origen bovino.

## Introducción

La apoptosis es un proceso de muerte celular regulado, ocurre normalmente durante el desarrollo y crecimiento de los tejidos.<sup>(1)</sup> Morfológicamente, las células que mueren por apoptosis se caracterizan por encogimiento celular, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación nuclear (cariorraxis) y cambios como la exposición de la fosfatidilserina hacia el lado externo de la membrana celular, así como la formación de cuerpos apoptóticos —vesículas que contienen elementos celulares—.<sup>(1-3)</sup> *Mycobacterium bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina, esta bacteria forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Las micobacterias poseen una pared celular muy compleja compuesta en su mayoría por lípidos como los ácidos micólicos, glicolípidos fenólicos, ManLAM, entre otros; sin embargo, también contienen lipoproteínas.<sup>(4)</sup> Estas moléculas potencialmente son factores de virulencia que permiten la evasión del sistema inmune y la supervivencia de estos microorganismos.

Las micobacterias patógenas utilizan diferentes mecanismos para sobrevivir intracelularmente, por ejemplo, inhiben la acidificación del fagosoma, la fusión del fagosoma con el lisosoma;<sup>(5)</sup> inducen apoptosis,<sup>(6)</sup> etc. Las especies del género *Mycobacterium* como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG* y *M. avium* son capaces de inducir muerte celular en macrófagos. Diferentes investigaciones han demostrado que la inducción de apoptosis en macrófagos de origen humano o murino dependerá de la virulencia de la cepa con la que se infecten dichas células. Asimismo, se ha identificado que las proteínas LpqH (lipoproteína de 19 kDa),<sup>(7, 8)</sup> ESAT-6,<sup>(9)</sup> lipoproteína de 38 kDa,<sup>(10)</sup> PE\_PGRS33,<sup>(11)</sup> MPT83<sup>(12)</sup> de *M. tuberculosis* nativas o recombinantes, producidas en *M. smegmatis* y *E. coli* tienen la capacidad de inducir apoptosis en macrófagos de origen humano (WBC 264- 9C, HEK 293, MDM, THP-1) y murino (RAW262.7, BMDM). Este mecanismo es una defensa del hospedador contra el microorganismo, también el microorganismo lo puede manipular como una forma de evadir la respuesta montada y así diseminarse e infectar otras células.<sup>(13)</sup>

En el modelo bovino, se logró identificar por primera vez que *M. bovis* tiene la capacidad de inducir condensación de la cromatina y fragmentación del DNA en macrófagos bovinos dependiendo de la multiplicidad de la infección, así como del tiempo de infección.<sup>(6)</sup> También se demostró que tanto la bacteria como los extractos proteicos<sup>(14, 15)</sup> tienen la capacidad de inducir la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA en un proceso independiente de la activación de las caspasas con la participación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF),<sup>(14)</sup> y

la Endonucleasa G (Endo G) como molécula ejecutora de este fenómeno.<sup>(16)</sup> Sin embargo, no se conoce la identidad de las proteínas que se involucran en la muerte celular. Por lo tanto, en este trabajo se propuso reconocer la identidad de algunas proteínas en las fracciones del filtrado de cultivo (CFE, por sus siglas en inglés), capaces de inducir apoptosis en macrófagos bovinos.

Los resultados de este estudio demostraron que una fracción proteica de 15-20 kDa (fracción de interés FI) derivada del CFE de *M. bovis* indujo la fragmentación del DNA en macrófagos. El análisis de la FI mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) pudo identificar la presencia de MPB70, MPB83 y chaperonina de 60 kDa. Esto sugiere que estas proteínas podrían participar en la inducción de apoptosis.

## Materiales y métodos

### Declaración ética

Los procedimientos realizados en los animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (CICUAE-FMVZ-UNAM) número JAGP- 2002.

### Cultivo *M bovis* AN5

Se cultivó *Mycobacterium bovis* AN5 en medio Sauton durante ocho semanas en condiciones estáticas a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el cultivo se procesó para la obtención de proteínas del filtrado del cultivo (CFE).

### Obtención de proteínas de *M. bovis* en medio Sauton

Como se describió anteriormente,<sup>(15)</sup> el CFE se obtuvo al filtrar el medio de cultivo utilizando primero papel filtro de poro grueso para separarlo de la biomasa; posteriormente se usaron membranas con poros de 1.2 µm, 0.45 µm y de 0.22 µm (Millipore, Bedford, MA). Una vez que el CFE estuvo libre de bacterias, se precipitó con sulfato de amonio a una saturación del 70 % en agitación a 4 °C durante 12 h; transcurrido este tiempo, se centrifugó a 10 300 × g, 20 min y se colectaron los precipitados de proteínas. Posteriormente las proteínas se dializaron con una membrana de diálisis MWCO 3 500 (Spectra/Por) contra agua destilada durante tres días (se realizaban dos cambios de agua al día); para después dializar contra PBS 1X durante toda la noche. El CFE se almacenó a -20 °C. Para conocer la concentración de proteína en el CFE, la proteína se cuantificó con ácido bicinónico (BCA) y se elaboraron geles SDS PAGE al 12 % teñidos con azul de Coomassie para visualizar las proteínas obtenidas cargando 15 µg de proteína por carril.

### Cromatografía líquida de proteínas mediante exclusión por peso molecular

Mediante cromatografía de exclusión molecular, se fraccionó el CFE usando una columna Hi Load 16/600 Superdex 75PG (G&E) acoplada a un equipo ÄKTA Pure (GE Healthcare) con el buffer recomendado por el fabricante (NaPO<sub>4</sub> 0.05 mol,

NaCl 0.15 mol, pH 7.2), con un flujo de 0.8 mL/ minuto, y se colectaron fracciones de 1.5 mL. La concentración de proteína se determinó para cada fracción con la técnica BCA, y el patrón de proteínas se visualizó en geles de poliacrilamida al 12 %, teñidos con azul de Coomassie.

### ***Obtención de macrófagos derivados de monocitos bovinos***

La obtención de monocitos se realizó de acuerdo con el método descrito previamente (6, 14, 15) a partir de sangre periférica de bovinos sanos en un hato libre de tuberculosis bovina. Brevemente, mediante punción yugular, se colectaron 60 mL con 3.5 mL de anticoagulante ACD por cada 30 mL de sangre. Una vez en el laboratorio, la sangre se centrifugó durante 30 min a  $1\ 000 \times g$  a temperatura ambiente (TA). Se separó la capa leucoplaquetaria y se diluyó 1:1 con PBS-Citrato (PBS-C), posteriormente se depositó sobre un gradiente de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); se centrifugó a  $1\ 000 \times g$ , 20 min, TA.

La capa leucoplaquetaria libre de eritrocitos se colectó y se lavó con PBS-C tres veces a  $500 \times g$ , 10 min a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) adicionado con L-glutamina 2 mmol, piruvato de sodio 1 mmol y aminoácidos no esenciales 0.1 mmol (cRPMI) (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) sin suero, dejando incubar por 2 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> para favorecer el pegado celular, transcurrido este tiempo, se cambió de medio añadiendo cRPMI 1640 con 12 % de suero autólogo. Para su diferenciación a macrófagos, las células fueron cultivadas en placas de ultrabaja adherencia durante 12 días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> realizando cambios de medio cada tres días.

### ***Incubación de macrófagos con la fracción de interés***

Se incubaron  $1 \times 10^6$  macrófagos en placas de ultrabaja adherencia durante 16 horas con 100 µg/mL de la FI, 25 µg/mL de camptotecina (Sigma Aldrich, MO) como testigo positivo y células sin estimular como testigo negativo, bajo las mismas condiciones de cultivo. Al finalizar el tiempo de incubación, las células se cosecharon y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 1 % durante 15 min a 4 °C. Posteriormente se almacenaron en etanol al 70 % a -20 °C hasta cuando se midió la fragmentación del DNA. Para el ensayo de actividad de caspasa 3, las células se procesaron al finalizar el tiempo de incubación.

### ***Fragmentación del DNA***

La detección de la fragmentación del DNA se realizó por medio de la técnica de TUNEL (por su nombre en inglés, Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling), la cual se llevó a cabo utilizando el paquete comercial APO-BrdU TUNEL assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA), de acuerdo con lo especificado por el fabricante. Las células contenidas en etanol al 70 % a -20 °C, se lavaron dos veces y después se incubaron con la solución de marcaje de DNA (buffer de reacción, enzima TdT, BrdUTP, agua destilada) durante 1 h a 37 °C, agitando cada 15 min para que las células se mantuvieran en suspensión. Posteriormente, se lavaron y centrifugaron a  $300 \times g$ , 5 min, dos veces. Se adicionó el anticuerpo

anti-BrdU marcado con fluoresceína y se incubaron por 30 min en obscuridad. El marcaje de las células se detectó por medio de citometría de flujo, en un citómetro ATTUNE NxT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) donde se contaron como mínimo 10 000 eventos.

### *Ensayo de actividad de la caspasa 3*

Se realizó un ensayo de actividad de caspasa 3 con la FI. En placas de ultrabaja adherencia, se incubaron  $1 \times 10^6$  macrófagos con 100  $\mu\text{g/mL}$  de la FI, 25  $\mu\text{g/mL}$  de camptotecina (Sigma Aldrich, MO) como testigo positivo y células sin estimular como testigo negativo, durante 16 h a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Trascurridas las 16 h, las células se lavaron con 1 mL de PBS 1X y se añadieron 115  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (10 mmol Tris-HCl, 10 mmol  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 130 mmol NaCl y tritón  $\times 100$  al 1 %), se incubaron por 15 min a 4 °C; posteriormente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  buffer de reacción (40 mmol HEPES, 1 mol DDT, 10 mmol AcDEVD-AM) y se incubaron durante 5 min a TA. Finalmente, se determinó la fluorescencia en un rango de 380/430-460 nm durante 20 min en un lector de microplacas de detección múltiple Synergy HT Bio Tek.

### *Electroforesis de doble dimensión*

La FI se desaló con buffer de fosfatos + CHAPS para someterse a isoelectroenfoque. A la muestra se le añadió deoxicolato de sodio (DOC) 0.02 %, se mezcló en vórtex y se dejó incubar 15 min a TA. Posteriormente se añadió ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, se incubó 1 h a TA. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó por 10 min a  $18\,000 \times g$  a 4 °C; se decantó el sobrenadante y se añadió acetona previamente enfriada a -20 °C, se mezcló en vórtex y se mantuvo en hielo por 15 min, agitando cada 5 min. La muestra se centrifugó por 10 min a  $18\,000 \times g$  a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, los remanentes de acetona se absorbieron con papel filtro y se dejó secar el *pellet* por no más de 5 min para facilitar la resuspensión. El *pellet* se resuspendió en 150  $\mu\text{L}$  de buffer de rehidratación con 1.5  $\mu\text{L}$  de ditiotreitil (DTT) 50X y 1  $\mu\text{L}$  de anfolitas durante 1.5 h a 37 °C en agitación constante.

La rehidratación de las tiras (ReadyStrip IPG Strips, Biorad, pH 4-7 de 7 cm) se llevó a cabo de forma pasiva por 16 h con 125  $\mu\text{L}$  de buffer de rehidratación. El isoelectroenfoque se realizó a 20 °C de acuerdo con el siguiente programa: 100 V-169 150 V/h, 300 V-200 V/h, por gradiente 1000 V, 300 V/h, 5 000 V 4 500 V/h, por pasos 500 V-2 000 V/h en un equipo IPGphor III (GE). Una vez focalizadas las tiras, se almacenaron a -70°C hasta su uso. Para la segunda dimensión, las tiras se equilibraron con buffer de equilibrio (BE), agregando 20  $\mu\text{L}$  de DTT 10X por cada 2 mL de buffer. Cada tira se equilibró con 2 mL de BE por 20 min a TA en agitación constante (1 mL BE/10 min, se decantó y añadió 1 mL BE/10 min). Previo a la rehidratación de las tiras, se prepararon geles de  $10 \times 10.5$  cm con un espesor de 1.5 mm a una concentración del 12 %; finalmente los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

## LC-MS

Se realizó cromatografía líquida -espectrometría de masas para identificar las proteínas en la FI. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo de líquidos Eksigent nanoLC 425 acoplado al espectrómetro de masas AB Sciex TripleTOF 5 600+. La búsqueda con base en los datos se realizó con el software ProteinPilot 5.0.1 de AB Sciex.

## Análisis estadístico

Los efectos de fragmentación del DNA y la actividad de caspasa 3 se midieron a través de la prueba de ANOVA utilizando el programa Graph Pad Prism 6.

## Resultados

### Fraccionamiento de las proteínas de *M. bovis* AN5 por cromatografía líquida

El CFE fue fraccionado a través de cromatografía de exclusión por peso molecular, se obtuvieron cinco picos detectables a una absorbancia de 280 nm (Figura 1A). Las fracciones proteicas obtenidas en el pico cuatro mostraron un perfil electroforético similar, por lo que se decidió realizar un *pool* de las fracciones cuyo peso molecular se encontraba entre 15 y 20 kDa correspondiente a las fracciones 51–60 FI. Los perfiles proteicos del CFE se determinaron por SDS PAGE al 12 % y teñidos con azul de Coomassie (Figura 1B).

### Fragmentación del DNA y ensayo de actividad de caspasa 3

La fragmentación del DNA de los macrófagos bovinos después de 16 h de incubación con la FI fue evaluada por la técnica de TUNEL. El porcentaje de fragmentación del DNA de los macrófagos incubados con la FI fue del  $48.63 \pm 9.03$  %, mientras que el del control negativo fue  $7.30 \pm 1.63$  % (Figura 2A). La muerte celular de los macrófagos sucedió en ausencia de la activación de la caspasa 3 (Figura 2B).

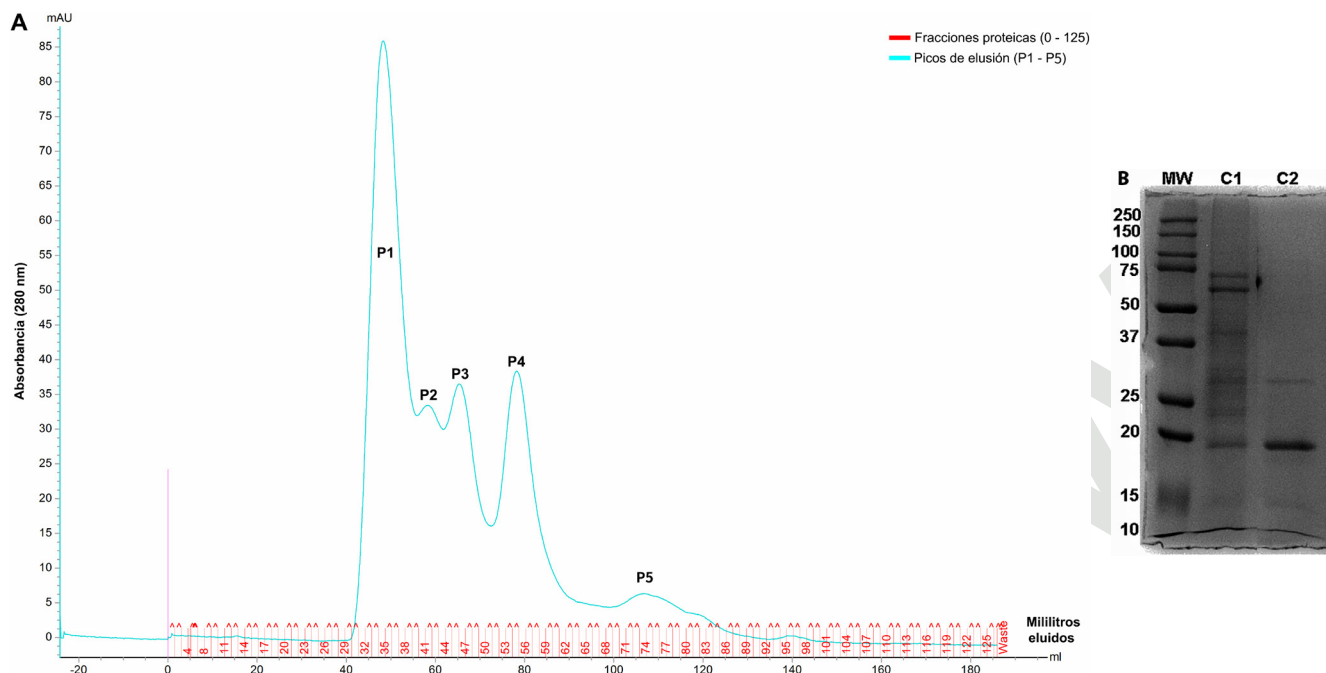
### 2D PAGE y LC MS

El análisis mediante 2D PAGE nos permitió observar 25 puntos de proteína que se distribuyen en un peso molecular de 12-23 kDa, de los cuales la mayor parte de las proteínas tienen un punto isoelectrico entre 4.1 y 4.9 (Figura 3). El Cuadro 1 muestra las proteínas que se identificaron en la banda secuenciada.

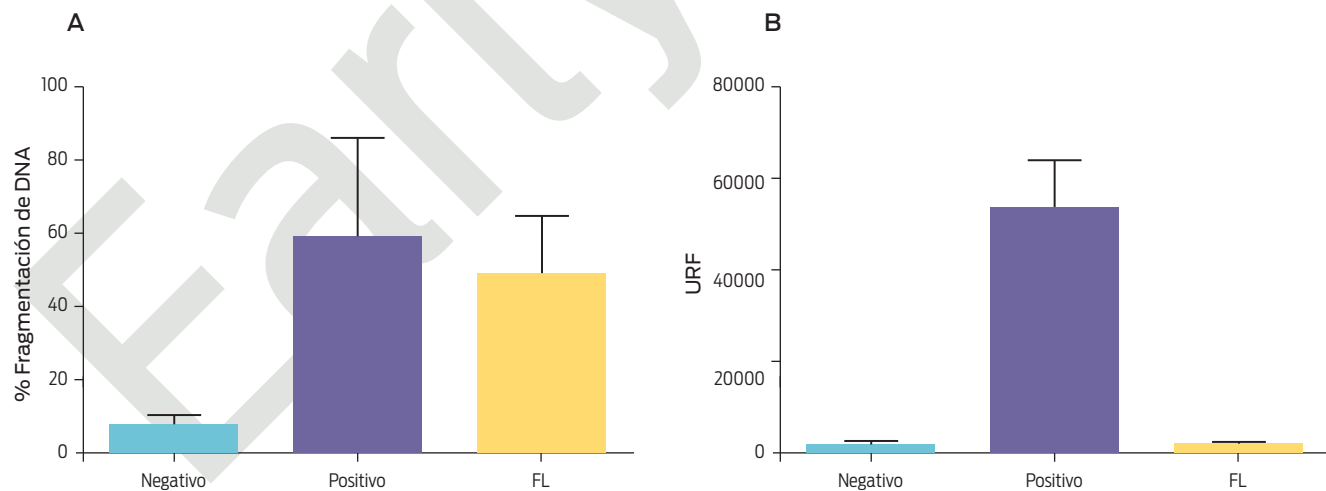
## Discusión

En esta investigación, mediante FPLC de exclusión por peso molecular, se realizó el fraccionamiento del filtrado de cultivo (CFE) de *Mycobacterium bovis* y se demostró que un grupo de proteínas cuyo peso molecular se encuentra entre 15 y 20 kDa (FI) inducen la fragmentación del DNA de forma independiente a la activación de caspasa 3. Mediante LC-MS se logró identificar la presencia de MPB70,

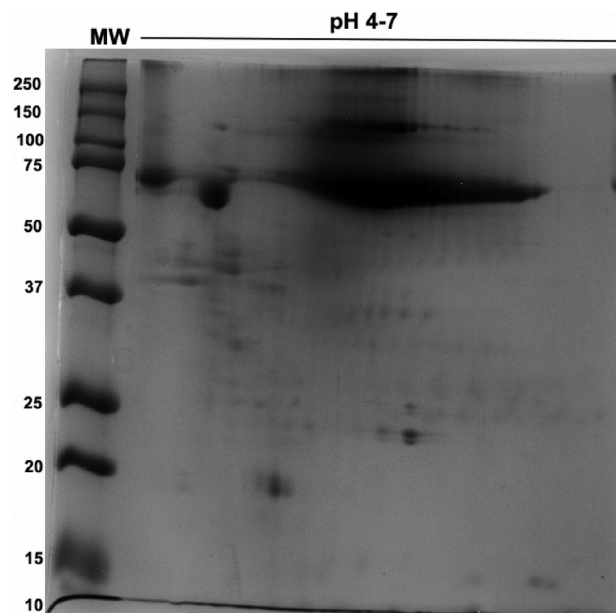




**Figura 1.** A. Cromatograma de proteínas del CFE de *M. bovis* AN5, exclusión por peso molecular. B. SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de Coomassie. MW marcador de peso molecular, C1 CFE total, C2 fracción de interés. Se analizaron 15 µg de proteína para CFE total y FI.



**Figura 2.** (A) Porcentaje de fragmentación del DNA y (B) actividad de la caspasa 3 en macrófagos bovinos ( $10^6$ ) estimulados con 100 µg/mL de la FI, testigo positivo camptotecina (20 µg/mL), testigo negativo, células sin tratamiento. Los resultados se expresan con (A) media y error estándar de tres experimentos independientes ( $P = 0.1272$ ) y (B) unidades relativas de fluorescencia (URF) de tres experimentos independientes ( $P = 0.0001$ ) comparados con el control negativo.



**Figura 3.** 2D PAGE fracción de interés 15-20 kDa del CFE de *M. bovis*. 12 % gel, pH 4–7M; la flecha muestra la localización de las proteínas identificadas por LC-MS.

**Cuadro 1.** Proteínas identificadas de la fracción proteica P1 del CFE de *M. bovis* por LC-MS

Proteína	Gen	ID	Función/localización	Identidad H37Rv	kDa	PI	Longitud (aa)
MPB70	mpb70	Mb2900	Proteína de secreción. Lipoproteína de superficie celular	100	19.07	4.54	193
MPB83	mpb83	Mb2898	Miembro de la familia mpt70/mpt83. Proteína de secreción. Induce la expresión de MMP9 mediante la estimulación de TLR1/TLR2 en humanos	100	22.07	4.73	220
Chaperonina de 60 kDa	groEl1	Mb3451c	Plegamiento de proteínas junto con su co-chaperonina GroES. Permite la encapsulación de sustratos de proteínas no nativas y acelera el plegamiento de las Proteínas	100	56.72	4.74	539

ID: Identificador  
 PI: Punto isoelectrico



MPB83 y chaperonina de 60 kDa. La caracterización del proteoma y del secretoma de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, así como del PPD y filtrados de cultivo bajo diferentes condiciones de cultivo, ha permitido identificar la presencia de proteínas altamente antigénicas con capacidad de estimular linfocitos T. También se ha demostrado que el perfil proteico cambia, reflejándose en la virulencia y el desenlace de la enfermedad en el hospedador.<sup>(17–25)</sup> El empleo de 2D PAGE y MC-LS ha permitido que estas proteínas sean empleadas en el desarrollo de técnicas diagnósticas más sensibles y específicas, así como para el desarrollo de vacunas.<sup>(18, 23, 26, 27)</sup>

Nuestros resultados se basan en el uso de estas técnicas para proponer posibles candidatos proteicos que, además de ser antigénicos, inducen la muerte celular de macrófagos bovinos. Alito et al., (2003)<sup>(28)</sup> a través de cromatografía de intercambio aniónico obtuvieron de 3 a 4 picos de elusión con proteínas de diferentes pesos moleculares cuyo efecto fue medido en los linfocitos T. Nuestro método de fraccionamiento se basó únicamente en la separación por peso molecular, lo que nos permitió obtener una banda de interés cuyo peso molecular se encontró entre 15 y 20 kDa (FI).

Diversas investigaciones han demostrado que las bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* son capaces de inducir muerte celular a través de diferentes vías como ferroptosis,<sup>(29)</sup> apoptosis dependiente de caspasas,<sup>(10)</sup> apoptosis independiente de caspasas,<sup>(30)</sup> estrés del retículo endoplásmico,<sup>(31)</sup> así como necroptosis<sup>(32)</sup> en macrófagos de origen humano y de ratón. Vega-Manríquez et al. (2007)<sup>(14)</sup> demostraron que tras la incubación de macrófagos bovinos durante 16 y 24 h con CFE no se activaron las caspasas 8, 9 y 3, y al utilizar el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK, el resultado se confirmó. En la presente investigación, se demostró que la FI no activó a la caspasa 3, lo que coincide con lo reportado previamente en el modelo bovino.

Esta información es significativa ya que algunas especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* activan las caspasas cuando inducen apoptosis en macrófagos de diferentes orígenes.<sup>(33)</sup> Este resultado sugiere que *Mycobacterium bovis* trata de interferir con la apoptosis inhibiendo la activación de las caspasas. Sin embargo, los macrófagos bovinos activan una vía alterna de apoptosis independiente a la de la activación de las caspasas. Finalmente, la inducción de apoptosis ayuda al control de crecimiento intracelular de la micobacteria.<sup>(16)</sup> MPB70 y MPB83 se han estudiado ampliamente respecto a su localización y a la respuesta inmune que desencadenan en los animales, son dos proteínas homologas con el 60 % de identidad a nivel de aminoácidos (MPB83 respecto de MPB70),<sup>(34)</sup> pero las codifican diferentes genes.

Estas proteínas presentan el dominio FAS 1 o IgH3, que se ha descrito como un dominio de adhesión, por lo que se ha sugerido que la interacción de este dominio con proteínas que posean receptores para este dominio podría explicar el tropismo de la micobacteria hacia ciertos tejidos.<sup>(35)</sup> Ju-Ock Nam et al., 2008<sup>(36)</sup> desarrollaron un polipéptido que posee un dominio FAS 1, el cual demostró la capacidad de inducir apoptosis en células endoteliales; por lo que además de la idea de que las micobacterias tienen cierto tropismo hacia algunos tejidos debido a la presencia del receptor, este tropismo podría estar participando en la señalización de muerte celular de los macrófagos.

La chaperonina de 60 kDa puede fungir como chaperona para el plegamiento de enzimas involucradas en la síntesis de los ácidos micólicos.<sup>(37)</sup> Este agregado proteico se sobre expresa bajo diferentes condiciones de estrés, incluso cuando los microorganismos se encuentran infectando un hospedero.<sup>(38)</sup> La inducción de apoptosis en PBMC por la chaperonina de 60 kDa se ha reportado en infecciones con *Mycoplasma gallisepticum* debido a su interacción con anexina 2.<sup>(39)</sup> En el caso de *Mycobacterium bovis*, sería el primer reporte de inducción de muerte celular en macrófagos por esta proteína. Esta proteína se considera dentro de la familia de proteínas de choque térmico. Ahora bien, la proteína recombinante Hsp70 de *M. tuberculosis* induce  $32.7 \pm 11.63$  % de fragmentación del DNA en macrófagos bovinos.<sup>(15)</sup>

Las proteínas de choque térmico han sido asociadas en la inducción de apoptosis a través de la generación de ROS en la mitocondria y existe evidencia que la chaperonina de 60 kDa junto con la chaperonina de 10 kDa se involucran en la señalización de la activación de la caspasa 3, así como en la asociación de estas moléculas con Bax, cuyo resultado es la activación de la apoptosis. En nuestro modelo, mostramos que quizá la chaperonina de 60 kDa activa el fenómeno a través de un mecanismo diferente en los macrófagos bovinos.<sup>(40)</sup> Dentro de los limitantes del estudio tenemos que nuestros resultados no pueden precisar si la fragmentación del DNA se debe a la acción de las proteínas individuales o a la actividad del consorcio proteico. También es importante considerar el tiempo de cultivo, porque los perfiles de proteínas entre cultivos jóvenes y viejos es diferente, por lo que es necesario verificar si estas proteínas se encuentran a menores tiempos de cultivo *in vitro* y si juegan algún papel en la interacción patógeno-hospedador *in vivo*.

## Declaración de financiamiento

Este trabajo fue realizado con recursos del proyecto PAPIIT IN220415 de la Universidad Nacional Autónoma de México y proyecto CONACYT CB-167488. Otorgado a José Ángel Gutiérrez Pabello. Las instituciones que financiaron los proyectos no desempeñaron ningún papel en el diseño y desarrollo del trabajo, así como en la preparación del manuscrito.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés respecto a este manuscrito.

## Contribuciones de los autores

Diseño experimental: J.A. Gutiérrez Pabello, A. Benítez Guzmán

Trabajo de laboratorio: I.N. Jiménez Vázquez

Análisis de datos: I.N. Jiménez Vázquez, E. Negrete Abascal, J.A. Gutiérrez Pabello

Reactivos aportados/ materiales/ herramientas de análisis: C. Espitia Pinzón, J. Moran, J.A. Gutiérrez Pabello

Redacción del manuscrito: I.N. Jiménez Vázquez, J.A. Gutiérrez Pabello

## Referencias

1. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
2. Galluzzi L, Vitale I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018;25:486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
3. Cascales Angosto M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2003;69(1):36-64.
4. Dulberger CL, Rubin EJ, Boutte CC. The mycobacterial cell envelope—a moving target. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18:47-59. doi: 10.1038/s41579-019-0273-7.
5. Waters WR, Hope JC, Hamilton CA, Palmer MV, Mcnair J, Skuce RA, et al. Immunopathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection of cattle. In: H. Mukundan, MA Chambers, WR Waters, MH Larsen, editors. *Tuberculosis, Leprosy and Mycobacterial Diseases of Man and Animals: The many Hosts of Mycobacteria*. Oxfordshire, UK, Boston, MA, MACABI: 2015. Pp.136-167.
6. Gutierrez-Pabello JA, McMurray DN; Admas LG. Upregulation of Thymosin  $\beta$ -10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infection and Immunity*. 2002;70(4):2121-2127. doi: 10.1128/IAI.70.4.2121-2127.2002.
7. Liu L, Liu J, Niu G, Xu Q, Chen Q. *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa lipoprotein induces toll-like receptor 2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression and promotes inflammatory response in human macrophages. *Molecular Medicine Reports*. 2015;11(4):2921-2926. doi: 10.3892/mmr.2014.3070.
8. Sánchez A, Espinosa P, García T, Mancilla R. The 19 kDa *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein (LpqH) induces macrophage apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways: a role for the mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;1-11. doi: 10.1155/2012/950503.

9. Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology*. 2007;9(6):1547-1555. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00892.x.
10. Sanchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009;69(1):20-28. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02193.x.
11. Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, et al. Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* in mediated by toll-like receptor 2- dependent release of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;282(2):1039-1050. doi: 10.1074/jbc.M604379200.
12. Wang L, Zuo M, Chen H, Liu S, Wu X, Cui Z, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein MPT83 induces apoptosis of infected macrophages by activating the TLR2/p38/COX-2 signaling pathway. *The Journal of Immunology*. 2017;198(12):4772-780. doi: 10.4049/jimmunol.1700030.
13. Aguilo JI, Alonso H, Uranga S, Marinova D, Arbués A, de Martino A, et al. ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology*. 2013;15(12):1994-2005. doi: 10.1111/CMI.12169.
14. Vega-Manriquez X, Lopez-Vidal Y, Moran J, Adams LG, Gutiérrez-Pabello JA. Apoptosis-inducing factor participation in bovine macrophage *Mycobacterium bovis*-induced caspase-independent cell death. *Infection and Immunity*. 2007;75(3):1223-1228. doi: 10.1128/IAI.01047-06.
15. Rivera Maciel A, Flores Villalva S, Jiménez Vázquez I, Catalan Bárcenas O, Espitia Pinzón C, Moran J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* derived proteins induced caspase-independent apoptosis in bovine macrophages. *Veterinaria México OA*. 2019;6(1):1-12. doi:10.22201/fmvz.24486760e.2019.1.560.
16. Benítez-Guzmán A, Arriaga-Pizano L, Morán J, Gutiérrez-Pabello JA. Endonuclease G takes part in AIF-mediated caspase-independent apoptosis in *Mycobacterium bovis*-infected bovine macrophages. *Veterinary Research*. 2018;49:69. doi: 10.1186/s13567-018-0567-1.
17. Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. 1991;59(1):372-382. doi:0019-9567/91/010372-11\$02.00.
18. Nagai S, Matsumoto J, Nagasuga T. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 1981;31(3):1152-1160. doi:0019-9567/81/031152-09\$02.00/0.
19. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity*. 1996;64(1):16-22. doi:0019-9567/96/\$04.00+0.
20. Harboe M, Wiker HG, Ulvund G, Lund-Pedersen B, Andersen AB, Hewinson RG, et al. MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells. *Infection and Immunity*. 1998;66(1):289-296. doi:0019-9567/98/\$04.00+0.
21. Rosenkrands I, King A, Weldingh K, Moniatte M, Moertz E, Andersen P. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis*. 2000;21:3740-3756. doi:0173-0835/00/1717-3740 \$17.50+.50/0.

22. Sabio Y, García J, Bigi MM, Klepp LI, García EA, Blanco FC, Bigi F. Does *Mycobacterium bovis* persist in cattle in a non-replicative latent state as *Mycobacterium tuberculosis* in human beings? *Veterinary Microbiology*. 2020;247. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108758.
23. Assal N, Rennie B, Walrond L, Cyr T, Rohonczy L, Lin M. Proteome characterization of the culture supernatant of *Mycobacterium bovis* in different growth stages. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2021;28:1-4. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108758.
24. Rojas M, Barrera LF, Puzo G, Garcia LF. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. *The Journal of Immunology*. 1997;159(3):1352–1361. doi: 159:1352-1361.
25. Albrethsen J, Agner J, Piersma SR, Højrup P, Pham TV, Weldingh K, et al. Proteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013;12(5):1180–1191. doi: 10.1074/MCP.M112.018846.
26. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, Santangelo M de la P, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013;4(1):3–66. doi: 10.4161/viru.22329.
27. Roperto S, Varano M, Russo V, Lucà R, Cagiola M, Gaspari M, et al. Proteomic analysis of protein purified derivative of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Translational Medicine*. 2017;15:68. doi: 10.1186/s12967-017-1172-1.
28. Alito A, McNair J, Girvin RM, Zumarraga M, Bigi F, Pollock JM, et al. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36(11):1523–1531. doi: 10.1590/S0100-879X2003001100011.
29. Amaral EP, Costa DL, Namasivayam S, Riteau N, Kamenyeva O, Mittereder L, et al. A major role for ferroptosis in *Mycobacterium tuberculosis*-induced cell death and tissue necrosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2019;216(3):556–70. doi: 10.1084/jem.20181776.
30. Bai X, Kinney WH, Su WL, Bai A, Ovrutsky AR, Honda JR, et al. Caspase-3-independent apoptotic pathways contribute to interleukin-32 $\gamma$ -mediated control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in THP-1 cells. *BioMedCentral Microbiology*. 2015;15(1):1–9. doi: 10.1186/s12866-015-0366-z.
31. Cui Y, Zhao D, Sreevatsan S, Liu C, Yang W, Song Z, et al. *Mycobacterium bovis* Induces endoplasmic reticulum stress mediated-apoptosis by activating IRF3 in a murine macrophage cell line. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016;6:1–12. doi: 10.3389/fcimb.2016.00182/full.
32. Yanti B, Mulyadi M, Amin M, Harapan H, Mertaniasih NM, Soetjpto S. The role of *Mycobacterium tuberculosis* complex species on apoptosis and necroptosis state of macrophages derived from active pulmonary tuberculosis patients. *BioMed Central Research Notes*. 2020;13:415. doi: 10.1186/s13104-020-05256-2.
33. Mohareer K, Asalla S, Banerjee S. Cell death at the cross roads of host-pathogen interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*. 2018;113:99–121. doi: 10.1016/j.tube.2018.09.007.
34. Michell SL, Whelan AO, Wheeler PR, Panico M, Easton RL, Etienne AT, et al. The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* contains O-linked mannose

- and (1 → 3)-mannobiose moieties. The Journal of Biological Chemistry. 2003;278(18):16423–16432. doi: 10.1074/jbc.M207959200.
35. Wiker HG. MPB70 and MPB83 - Major antigens of *Mycobacterium bovis*. Scandinavian Journal of Immunology. 2009;69(6):492–499. doi: 10.1111/J.1365-3083.2009.02256.X.
  36. Ju-Ock N, Jung-Eun K, Ha-Won J. Patent Application Publication. Pub. No.: US 2008/027.4955A1. 2008;1(19).
  37. Colaco CA, Macdougall A. Mycobacterial chaperonins: the tail wags the dog. FEMS Microbiology Letters. 2014;350:20-24. doi: 10.1111/1574-6968.12276.
  38. Qamra R, Mande SC. Crystal structure of the 65-kilodalton heat shock protein, chaperonin 60.2 of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology. 2004;186(23):8105–8113. doi: 10.1128/JB.186.23.8105-8113.2004.
  39. Ying Yua, Lin Zhanga, Ying Chenb, Yuan Lia, Zhenzhong Wangc, Ganwu Lia, d, Gang Wang JX. GroEL Protein (Heat Shock Protein 60) of *Mycoplasma gallisepticum* Induces apoptosis in host cells by interacting with annexin A2. Infection and Immunity. 2019;87(9). doi: 10.1128/IAI.00248-19.
  40. Ikwegbue PC, Masamba P, Oyinloye BE, Kappo AP. Roles of heat shock proteins in apoptosis, oxidative stress, human inflammatory diseases, and cancer. Pharmaceuticals. 2018;11(1):1–18. doi: 10.3390/ph11010002.