

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco**

División: Ciencias Biológicas y de la salud.
Departamento de sistemas biológicos.

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto genérico: obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

Etapas: Diseño y desarrollo de productos biológicos por métodos biotecnológicos o de ingeniería genética.

PROYECTO:

Estudio del proceso autofágico de queratinocitos infectados por actinomicetos

Asesores:

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

No. Económico: 37622

M. en C. Alejandro Palma Ramos

No. Económico: 15941

**Alumna: Duarte Villalpando Mariana
Matricula: 2132033626**

Fecha de inicio: 3 septiembre del 2018 Fecha de término: 3 marzo del 2019

I. INTRODUCCIÓN

El micetoma es una enfermedad crónica, subcutánea y granulomatosa causada por diferentes especies de hongos (eumicetos) o por bacterias filamentosas aerobias (actinomicetos). Algunos de los agentes que pueden causar micetoma son: *Nocardia brasiliensis* que se caracteriza por ser bacilos grampositivos de morfología filamentosa; y *Actinomadura madurae* que son bacterias grampositivas, no alcohol resistente y se caracterizan por presentar una gran cantidad de pseudo-hifas vegetativas ramificadas. Los miembros de estos géneros se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, razón por la cual generalmente los campesinos son afectados por estos microorganismos, ya que presentan lesiones en las extremidades inferiores por traumatismos en la piel.

Debido a que la piel es una barrera física entre el medio interno y externo, al presentar una lesión, facilita la entrada de estos microorganismos, sin embargo, la piel puede activar diferentes mecanismos de defensa a través de los queratinocitos (entre otras células de la respuesta inmune), cuya función principal consiste en producir queratina, sin embargo, también sintetizan diversas moléculas como citocinas pro y anti-inflamatorias, prostaglandinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos, etc, por lo tanto son capaces de activar mecanismos del sistema inmune, como el proceso inflamatorio, razón por la cual los queratinocitos representan la primera línea de defensa contra patógenos.

Por todo lo anterior, en este trabajo de investigación, se estudió la participación de los queratinocitos en el control de la infección de dos cepas de actinomicetos (*N. brasiliensis* y *A. madurae*); ya que se ha demostrado que algunos microorganismos pueden ser eliminados del hospedero por el sistema autofágico o estos microorganismos pueden utilizar este sistema para evadir otros mecanismos del sistema inmune innato y por lo tanto ocasionar que la infección persista.

II. JUSTIFICACIÓN

El laboratorio de Inmunología del Departamento de Sistemas Biológicos trabaja con una línea de investigación acerca de la respuesta inmune de la piel en respuesta a infecciones, principalmente las generadas por actinomicetos. El papel que actualmente tienen los queratinocitos en el control de las infecciones es poco conocido, sin embargo, dada la gran cantidad de moléculas de la respuesta innata que producen es de interés su estudio en las diversas patologías donde participan, como en el actinomicetoma. Además de las múltiples moléculas que producen en respuesta a infecciones, también activan diversos mecanismos adicionales que contribuyen con la resolución de los procesos infecciosos, en este trabajo se pretende estudiar en queratinocitos humanos, algunas moléculas relacionadas con el proceso autofágico, ya que este proceso se ha reportado en otras estirpes celulares como participante de la eliminación de bacterias.

III. OBJETIVOS

• OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de marcadores de autofagia en queratinocitos humanos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae*.

• OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar un modelo de infección con actinomicetos en queratinocitos humanos.
- Evaluar la expresión de marcadores de autofagia en queratinocitos humanos vía la activación de receptores Toll.
- Evaluar la expresión de marcadores de autofagia durante la infección de queratinocitos humanos con actinomicetos.

IV. MARCO TEÓRICO

A) Micetoma

Conocido como pie de Madura o maduromicosis, el micetoma es un término griego que significa “tumor por hongos” y en humanos se caracteriza por infecciones crónicas, granulomatosas de la dermis y del tejido subcutáneo, que pueden extenderse a músculo y hueso produciendo tumefacción del área afectada. Existen tres clases de micetoma: botriomicosis producido por bacterias como *Staphylococcus aureus*; eumicótico, producido por hongos y actinomicetoma, producido por bacterias del grupo de los actinomicetos, de este último tipo de micetoma, los agentes causales encontrados con mayor incidencia son *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae* (Villa et al, 2008). El actinomicetoma es una enfermedad ocupacional que se presenta habitualmente en personas de mediana edad de países tropicales que caminan descalzos, en América Latina México y Brasil son los países con mayor número de casos reportados. La inoculación suele ser traumática tras un contacto directo con espinas o plantas contaminadas, y en ocasiones puede pasar desapercibida. La localización de la infección es más frecuente en los miembros inferiores (60–75%), sobre todo el pie, seguido por el tronco, la espalda y los miembros superiores debido al hábito de transportar diversos objetos (Hernández, P., 2010).

B) Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas, saprofitas, no ácido alcohol resistente, aerobias que se caracterizan por formar filamentos ramificados semejantes a los hongos. Son abundantes y cosmopolitas en el ambiente, lagos, ríos, suelo y estiércol de animales; son aerobios y se ubican en la superficie del suelo, aunque también viven en los horizontes inferiores, en especial en suelos alcalinos (Dávila, M. et al, 2013).

C) Epidemiología en México

El micetoma es una infección subcutánea crónica de gran importancia en México, tanto por su frecuencia como por la gravedad de algunos casos. La población más afectada son los habitantes de áreas rurales (López et al, 2013). Algunos datos reportados en México desde las últimas dos décadas hasta el 2012 indican que los micetomas causados por actinomicetos representan el 97.2% de los casos reportados (Desgarenes, P. et al, 2014; López et al, 2013) y en estos casos las especies encontradas con mayor frecuencia fueron:

Nocardia brasiliensis con el 86% de los casos reportados, seguida de *Actinomadura madurae* con el 10% y el resto por otras especies. (Desgarenes, P. et al, 2014).

D) Características de las especies causantes de actinomicetoma en México

Nocardia brasiliensis

Son bacilos Grampositivos de morfología filamentososa o de hebras finas, generalmente ramificadas o formas bacilares y cocoides (González, P. et al, 2006).

El género *Nocardia* está compuesto por más de 50 especies, la mitad de las cuales son reconocidas como patógenos de humanos y/o animales. Las especies de importancia médica son: *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. pseudobrasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*. Son consideradas saprófitas, ampliamente diseminadas en la naturaleza. Desde este reservorio natural, son aerosolizadas y transportadas por el viento siendo el mecanismo de transmisión más frecuente la inhalación y la inoculación traumática en piel y mucosa ocular (González, P. et al, 2006).

Actinomadura madurae

El género *Actinomadura* representa un grupo de microorganismos pertenecientes al orden de los actinomicetales, entre los cuales destacan como patógenos de este género *A. madurae* y *A. pelleteri*, siendo la primera la que representa el agente etiológico más comúnmente aislado (Serrano, J. et al, 2001).

Los microorganismos pertenecientes al género *Actinomadura* se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, no alcohol-ácido- resistentes, aeróbicos y no móviles, que pueden llegar a formar esporas (Serrano, J. et al, 2001).

E) Inmunidad innata de la piel

La piel es un órgano indispensable para la vida animal. Consta de tres capas bien diferenciadas: epidermis, dermis e hipodermis, cada una de las cuales desempeñan una serie de funciones, interrelacionándose entre sí (Buendía, E., 2018), por lo tanto, una de sus principales funciones es la protección contra agentes nocivos.

Esta función cutánea la proporciona el sistema inmunitario cutáneo (SIC) y se basa en la actividad de varios tipos de células, las células residentes de la piel (queratinocitos, células dendríticas, mastocitos, células endoteliales, etc.) y las células reclutadas (linfocitos T, células dendríticas, etc.). De este modo, cuando el SIC detecta una señal de peligro, se activarán dos tipos de respuesta: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa. Es importante tener en cuenta que estos dos fenómenos están vinculados de modo preciso, ya que la activación de la inmunidad innata condiciona la activación de la inmunidad adaptativa. Así, la inmunidad innata constituye la primera línea de defensa, pero también es esencial para la inducción de las respuestas inmunitarias adaptativas. La inmunidad adaptativa, por su parte, se dirige contra los agentes patógenos a través células efectoras específicas de antígeno y de células de memoria que protegen contra la reinfección por el mismo microorganismo. De este modo, la

activación de los diversos elementos del SIC puede desembocar en una respuesta inmunitaria protectora contra los agentes patógenos nocivos o en el mantenimiento de la tolerancia (Rozieres, A. et al, 2013).

La capa más superficial y en contacto con el exterior es la epidermis, epitelio poliestratificado, compuesta por queratinocitos, que se forman por división celular en una capa basal germinativa. Desde ahí van ascendiendo formando varias capas bien definidas. Su diferenciación es progresiva mediante queratinización, hasta constituir una capa externa totalmente queratinizada llamada capa córnea (Buendía, E., 2018).

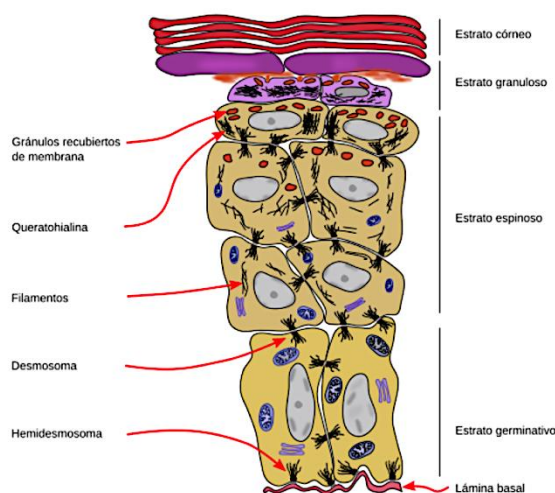


Figura 1. Esquema que muestra el proceso de maduración de los queratinocitos, desde el estrato germinativo hasta el estrato córneo (Eckert, R. et al, 1989)

Los queratinocitos no solo tienen un papel estructural en la piel, sino también roles importantes en la inmunidad innata y adquirida en vitíligo y melanoma. En este contexto, los queratinocitos, así como otros tipos celulares del sistema inmune utilizan receptores que reconocen agentes microbianos o moléculas expresadas por ellos que son conservados a lo largo de la evolución. Estos productos que son denominados 'patrones moleculares asociados a patógenos' (PAMP), como lipopolisacáridos, flagelina, lipopéptidos, peptidoglucanos, ARN doble cadena, secuencias de ADNCpG, etc, se unen a diferentes receptores reconocedores de patrones (PRR) y disparan la respuesta inmune innata (Valdivia, S., 2014).

Estos queratinocitos poseen una gran capacidad para producir numerosos factores solubles tales como citocinas y quimiocinas (a través de la activación del inflamasoma) péptidos antimicrobianos como: β -defensinas, catelicidinas, RNasa7 que son capaces de iniciar la respuesta inflamatoria en el caso de traumatismo físico y/o químico (tóxico). En este sentido, los queratinocitos son sensibles a las señales exógenas y endógenas y pueden secretar un gran número de citocinas proinflamatorias que incluyen a la IL-1, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-6,

factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-15, que se dirigen especialmente a células dendríticas y linfocitos T, lo que permite modular la activación de estos. Es importante tener en cuenta que estas células también pueden influir en el control de la respuesta inflamatoria con la secreción de citocinas antiinflamatorias de tipo IL-1RA (antagonista del receptor de IL-1) o IL-10, además los queratinocitos desempeñan en paralelo una función importante en la modulación del reclutamiento celular dependiente de las quimiocinas.

Los queratinocitos, en condiciones inflamatorias, presentan un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión que provoca la retención de los leucocitos en la epidermis. Una de las moléculas de membrana mejor descritas es la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), cuya expresión puede inducirse tanto in vitro como in vivo por el IFN- γ también por la IL-17 y el TNF- α . El IFN- γ y la IL-7 son producidos principalmente por los linfocitos T, mientras que el TNF- α lo producen varias células, tales como los monocitos, las células dendríticas, los linfocitos T, los mastocitos y los queratinocitos. La ICAM-1 que expresan los queratinocitos constituye un mecanismo importante para retener los linfocitos T en la epidermis y una señal coestimuladora eficaz para activar los linfocitos CD4+ y CD8+. Además, es importante tener en cuenta que la activación por el IFN- γ induce la sobreexpresión de las moléculas MHC de clase I por los queratinocitos, que se convierten así en blanco de reacciones citotóxicas mediadas por linfocitos T CD8+ citotóxicos (Rozieres, A. et al, 2013).

F) Autofagia

La autofagia es un proceso homeostático y de degradación celular en el cual una porción del citosol y organelos son secuestrados en una vesícula simple o de doble membrana y liberados en el interior de un organelo degradativo, vacuola/lisosoma, para la ruptura y eventual reciclaje de las macromoléculas resultantes (Peña, S., 2013).

La autofagia comienza cuando el material intracelular que va a ser degradado es englobado por una doble membrana que crece hasta cerrarse por completo para formar un orgánulo llamado fagosoma. El proceso continúa con la fusión de este fagosoma con el lisosoma, un orgánulo que contiene las enzimas hidrolíticas que van a degradar el material celular. Posteriormente en el autofagosoma, los productos finales de esta degradación, como los aminoácidos, los ácidos grasos, los azúcares y los nucleótidos, salen al citoplasma, a través de transportadores que están en la membrana del lisosoma, donde pueden ser ya reciclados y utilizados en nuevos procesos celulares (Boya, P., 2017).

Cuando las células son sometidas a condiciones de estrés tales como hipoxia, privación de nutrientes, altas temperaturas, infección por patógenos y estrés oxidativo se activan una serie de proteínas reguladoras de la autofagia (mTORC1, AMPK, PKA, etc.) que a su vez regulan la actividad del complejo quinasa ULK, compuesto por las proteínas ULK1/2, ATG13 y FIP200. La principal proteína de este

complejo, la quinasa ULK1 activa por fosforilación a la proteína Beclin1 (también conocida como ATG6) que forma parte del complejo iniciador de la nucleación del fagóforo, el cual genera 3-fosfatidil inositol fosfato (PIP3), esencial para el reclutamiento de otras proteínas ATG sobre las dobles membranas lipídicas provenientes del retículo endoplásmico, el complejo de Golgi y las mitocondrias. La expansión de la doble membrana lipídica para la posterior formación del autofagosoma se produce por la interacción del fagóforo con el complejo proteico ATG5/ATG12, el cual se forma por la acción de ATG7 y ATG10. Finalmente, la unión de ATG16 al complejo ATG5/ATG12 produce su multimerización y formación de un gran complejo que permite la inserción de la proteína LC3-II (también conocida como ATG8) en la membrana del fagóforo. La proteína LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) se sintetiza inicialmente de forma no procesada como pro-LC3), la cual rápidamente es escindida por la acción de ATG4, generándose la forma activa LC3-I en el citosol. Posteriormente, al LC3-I se incorpora lípidos por la acción de ATG7 y ATG3 que catalizan su unión a los residuos de fosfadiletanolamina presentes abundantemente en la membrana del fagóforo. Si bien hasta la fecha la función del LC3-II no se conoce, se sabe que esa unión al fagóforo es fundamental para el cierre de la vesícula posterior a la captación de la carga y dar origen al fagosoma. Una vez formado el fagosoma se libera el complejo ATG5/ATG12/ATG16 y el LC3-II se libera de la membrana externa por acción de autofagina. Este fagosoma desnudo se fusiona con los lisosomas por acción de las proteínas Rab7, Lamp1 y Lamp2, formándose el autofagosoma (Ramírez, S. et al, 2016).

Finalmente, la carga que se encuentra dentro del autofagosoma se degrada por enzimas lisosomales.

La autofagia actúa en diversos eventos durante la respuesta inmunitaria:

- 1)** Contra patógenos invasores, bacterias, virus y parásitos, degradando el agente patógeno vía autofagosoma que luego se fusiona con el lisosoma, o activando los mecanismos de señalización y/o alerta inflamatoria.
- 2)** En la “resolución” de la respuesta inflamatoria removiendo cuerpos apoptóticos.
- 3)** En la presentación de moléculas antigénicas por proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Autofagia en la inmunidad innata La inducción de autofagia constituye la primera línea de defensa durante infecciones por patógenos, dado que restringe las infecciones virales, así como la replicación de bacterias intracelulares (Peña, S., 2013).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

a) Estandarización de cultivo celular

Se probaron diferentes medios de cultivo celular (D-MEM, RPMI y F12) para evaluar el óptimo crecimiento de los queratinocitos HaCaT, suplementándolos con diferentes concentraciones de Suero Fetal Bovino (Gibco), hasta encontrar el medio idóneo con la concentración requerida.

b) Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT

La línea celular de queratinocitos HaCaT provino de la colección ATCC 12191. Las células se mantuvieron en un medio de cultivo (RPMI) suplementado con piruvato de sodio y alta glucosa (Life Technologies), al cual se le adicionó suero fetal bovino al 10%; y se le adicionó una mezcla de penicilina (+10000 UI/mL) y estreptomina (+10000 µg/mL) (ThermoScientific), todos los cultivos se incubaron en condiciones estándar de cultivo (37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%). Se realizó el cambio de medio cada tercer día y las células al alcanzar una densidad poblacional aproximada del 70%, se realizaron pases para tener un abasto de células suficiente para cada experimento. En todos los casos se utilizó la separación enzimática con tripsina al 0.25% (Gibco). Un stock de células fue almacenado en nitrógeno líquido para preservarlas.

c) Cultivo de cepas de actinomicetos

Este trabajo incluyó la utilización de cepas de referencia de *N. brasiliensis* ATCC 9296 y *A. madurae* ATCC 9425. Se realizaron resiembras de cada microorganismo en agar y/o medio líquido de BHI (Gibco) y se incubaron a 37°C.

d) Suspensiones bacterianas

Una vez crecidas las cepas, los cultivos se centrifugaron y el precipitado bacteriano se resuspendió en solución salina hasta ajustarla a una concentración de 300 x 10⁶ UFC/ml.

e) Infección celular

Para todos los casos donde se realizaron experimentos de infección celular se utilizó una MOI de infección (Multiplicidad de Infección, por sus siglas en inglés) de 10:1 (10 bacterias por cada célula) de ambas cepas de actinomicetos (*N. brasiliensis* y *A. madurae*). Se realizaron monocapas dependiendo de cada experimento; En todos los experimentos donde se necesitó infectar las células con los actinomicetos, los queratinocitos se infectaron por 2 h con cada cepa (de manera independiente), posterior al tiempo de infección las células se trataron con medio RPMI adicionado de 10% de SFB y 80 µg/mL de Amikacina (Sigma-Aldrich) para eliminar todas las bacterias extracelulares. Las células correspondientes a los tiempos de 4-72 h post infección se mantuvieron en medio de mantenimiento que será preparado con RPMI

adicionado de 2% de SFB y 15µg/mL de Amikacina para prevenir el crecimiento extracelular de las bacterias. Los tiempos post-infección que se evaluaron fueron: 4, 6, 24, 48 y 72 h.

f) Microscopia confocal

Se realizaon monocapas de células HaCaT con 150 mil células para cada tiempo de infección en placas de 24 pozos con cubreobjetos estériles, se trataron con los agonistas de TLR-2 y TLR-4 [Lipopolisacarido (LPS) y Peptidoglicana (PGN)], para estimular la formación de cuerpos autofágicos y de manera independiente se realizó la infección de estas células como se ha descrito en el apartado “e”. Pasado cada tiempo (cinética de 2-72h) las células fueron fijadas con paraformaldehido (Sigma-Aldrich) al 4% por 15 minutos y lavadas con PBS 1X (ThermoScientific).

Para la determinación de la expresión de marcadores de autofagia, las preparaciones se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos anti-LC3B (ABCAM), anti-APG5L/ATG5 (ABCAM) y anti-ATG4B (ABCAM) por una noche a 37°C; después de 3 lavados a cada preparación se les adicionó una solución de anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de conejo acoplada a isotiacianato de trimetil rodamina (Santa Cruz Biotechnologies) y se incubaron por 1 h. Finalmente, las preparaciones teñidas se montaron en portaobjetos usando Vectashield-DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)(VectorLabs) como medio de montaje, y se observaron las señales de fluorescencia en un sistema de escaneo confocal (LSM5 Pascal, Zeiss).

VI. RESULTADOS

- a) Estimulación de queratinocitos mediante agonistas de los receptores TLR-2 y TLR-4 .

Como resultado de la inducción de la expresión de proteínas reguladoras de autofagia en queratinocitos estimulados con distintas concentraciones de lipopolisacárido (LPS) y péptidocglicano (PGN) se obtuvieron las siguientes imágenes mediante microscopía confocal.

En las figuras 2 y 3 se muestran los ensayos realizados con LPS en distintas concentraciones (100 ng y 250 ng, respectivamente); en ellas se pueden observar que al emplear 100 ng de LPS la expresión de la proteína ATG5 comienza dos horas posteriores a la inducción; por otro lado, al utilizar 250 ng de LPS se observa que ATG5 se expresa seis horas posteriores a la inducción.

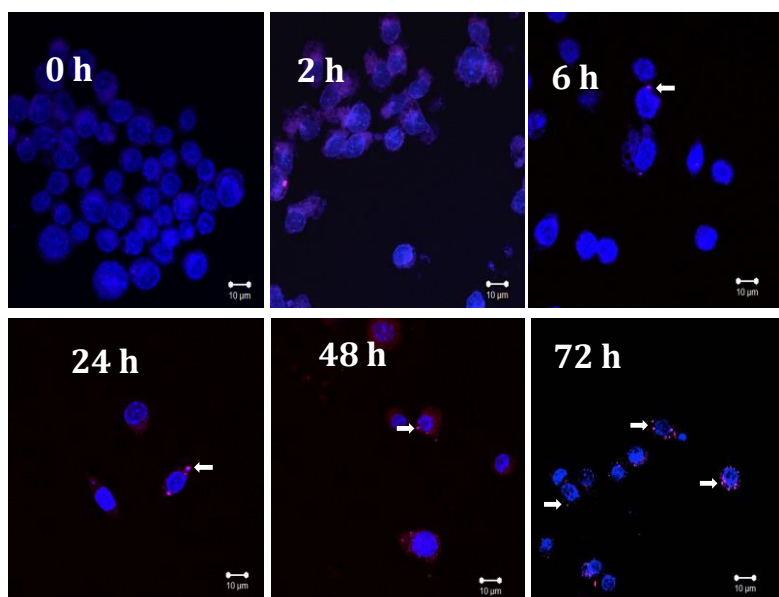


Figura 2. Expresión de ATG5 en queratinocitos estimulados con 100 ng de LPS. Núcleo marcado en azul (DAPI), ATG5 marcado en rojo (rhodamina).

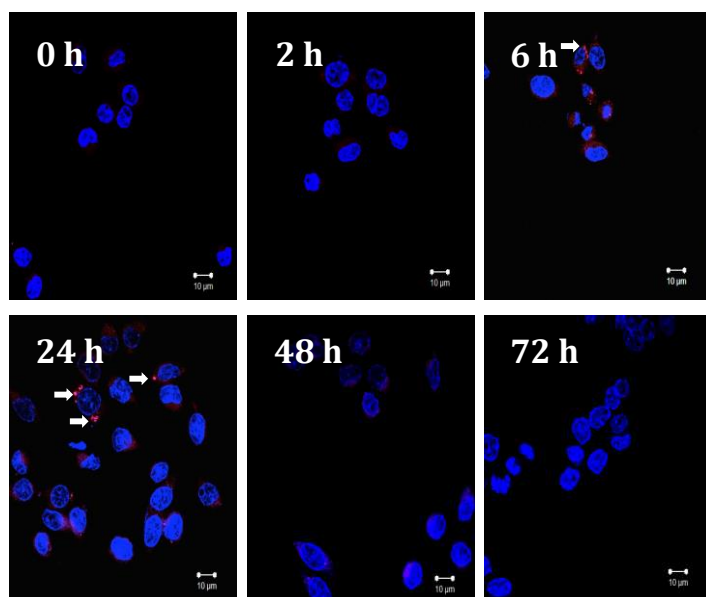


Figura 3. Expresión de ATG5 en queratinocitos estimulados con 250 ng de LPS. Núcleo marcado en azul (DAPI), ATG5 marcado en rojo (rhodamina).

En el caso de las figuras 4 y 5, las cuales corresponden a queratinocitos estimulados con LPS (100 ng y 250 ng, respectivamente), marcando la proteína LC3B, se observa que, en ambas concentraciones, LC3B se expresa 24 horas posteriores a la inducción, sin embargo, las muestras tratadas con 100 ng la proteína se expresa con mayor intensidad.

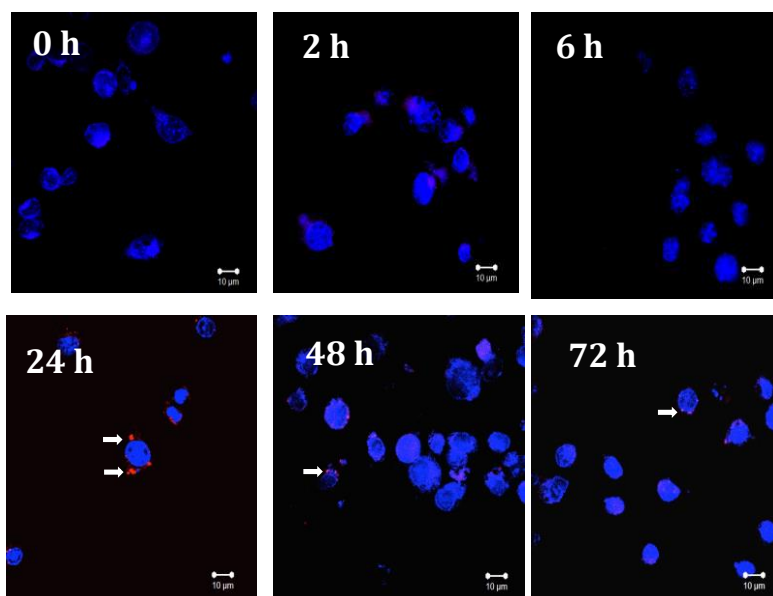


Figura 4. Expresión de LC3B en queratinocitos estimulados con 100 ng de LPS. Núcleo marcado en azul (DAPI), LC3B marcado en rojo (rhodamina).

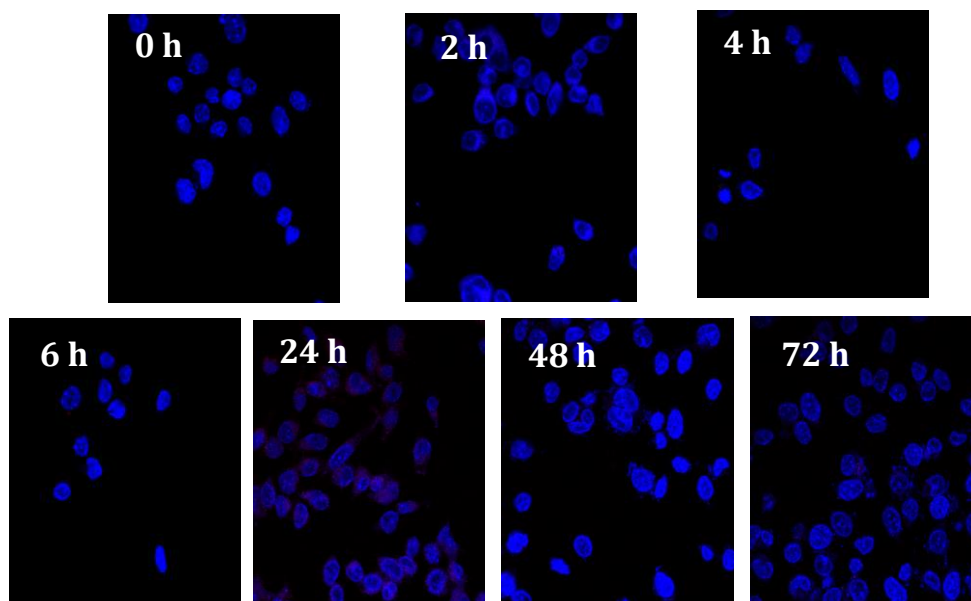


Figura 5. Expresión de LC3B en queratinocitos estimulados con 250 ng de LPS. Núcleo marcado en azul (DAPI), LC3B marcado en rojo (rhodamina).

En las figuras 6 y 7, se muestra la expresión de la proteína ATG5 estimulada con concentraciones de 5 y 10 μg de PGN, observándose que utilizando una concentración de 5 μg la expresión de ATG5 comienza a partir de las 24 horas posteriores a la inducción de autofagia, sin embargo, en la figura 6 se observa que al utilizar 10 μg de PGN la expresión de ATG5 comienza dos horas posteriores a la inducción.

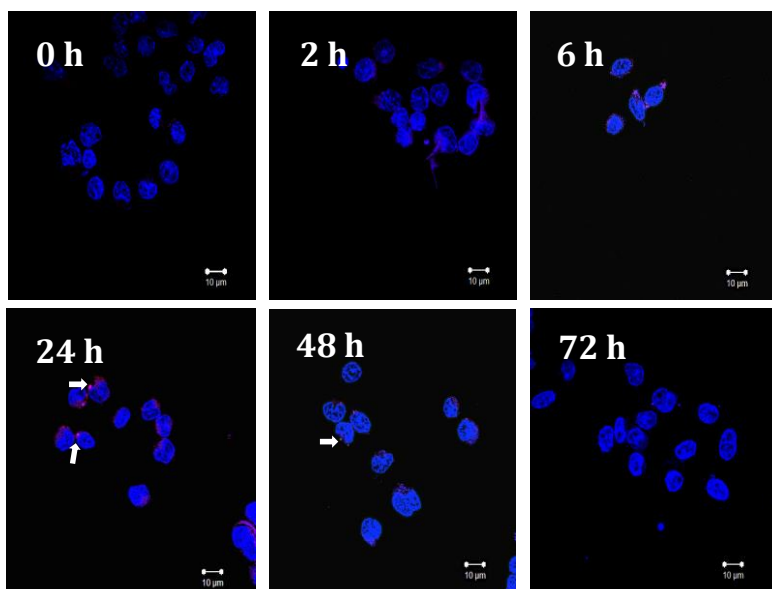


Figura 6. Expresión de ATG5 en queratinocitos estimulados con 5 μg de PGN. Núcleo marcado en azul (DAPI), ATG5 marcado en rojo (rhodamina).

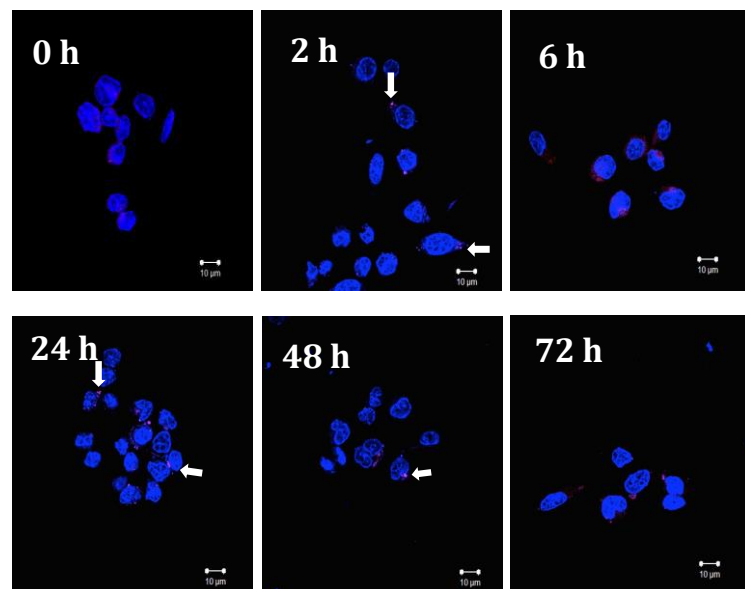


Figura 7. Expresión de ATG5 en queratinocitos estimulados con 10 μg de PGN. Núcleo marcado en azul (DAPI), ATG5 marcado en rojo (rhodamina).

Las figuras 8 y 9 corresponden a los queratinocitos tratados con PGN, en las que se puede observar que al emplear 5 μg de PGN la expresión de LC3B comienza 24 horas posteriores a la inducción; en cambio, utilizando 10 μg de PGN se observa que la proteína se expresa seis horas posteriores a la inducción.

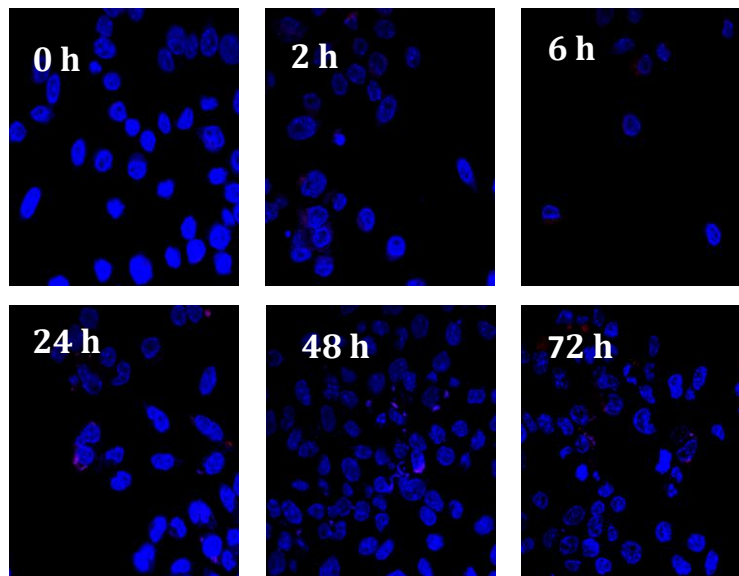


Figura 8. Expresión de LC3B en queratinocitos estimulados con 5 μg de PGN. Núcleo marcado en azul (DAPI), LC3B marcado en rojo (rhodamina).

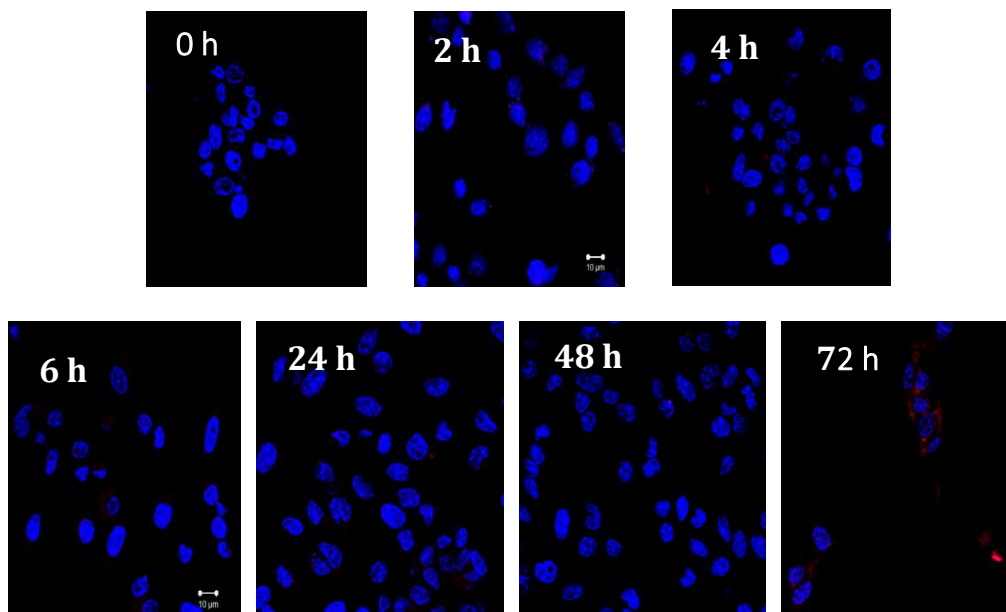


Figura 9. Expresión de LC3B en queratinocitos estimulados con 10 μg de PGN. Núcleo marcado en azul (DAPI), LC3B marcado en rojo (rhodamina).

b) Infección de queratinocitos con *N. brasiliensis* y *A. madurae*

En la figura 10 se observa que la expresión de ATG5 comienza dos horas posteriores a la infección con *N. brasiliensis*; asimismo, los queratinocitos infectados con *A. madurae* (figura 11) expresan ATG5 a las dos horas posteriores a la infección, aunque se expresan en mayor proporción a las 24 horas.

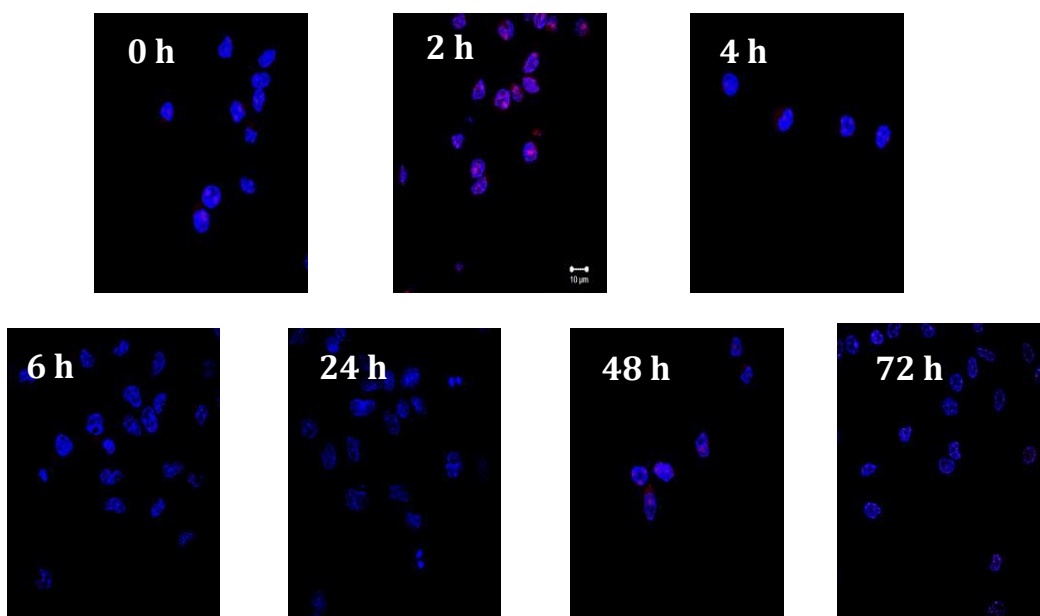


Figura 10. Expresión de ATG5 en queratinocitos infectados con *Nocardia brasiliensis*. Núcleo marcado en azul (DAPI), ATG5 marcado en rojo (rhodamina).

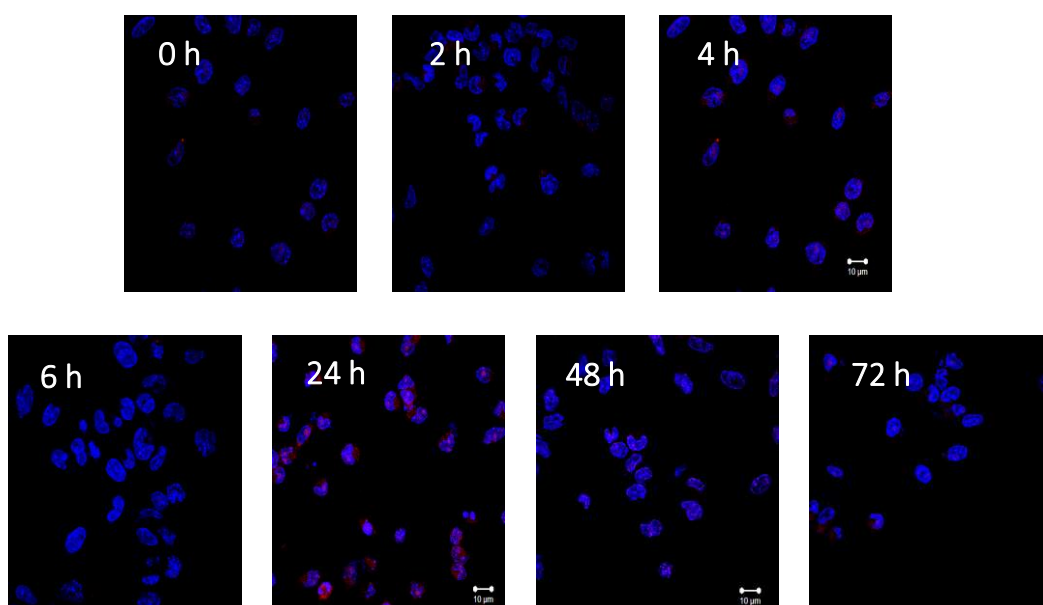


Figura 11. Expresión de ATG5 en queratinocitos infectados con *Actinomyces madurae*. Núcleo marcado en azul (DAPI), ATG5 marcado en rojo (rhodamina).

Como se observa en la figura 12, los queratinocitos expresan LC3B dos horas posteriores a la infección con *N. brasiliensis*. Asimismo, la figura 13 muestra que la expresión de la proteína LC3B de los queratinocitos infectados con *A. madurae* comienza también a partir de las dos horas de la infección.

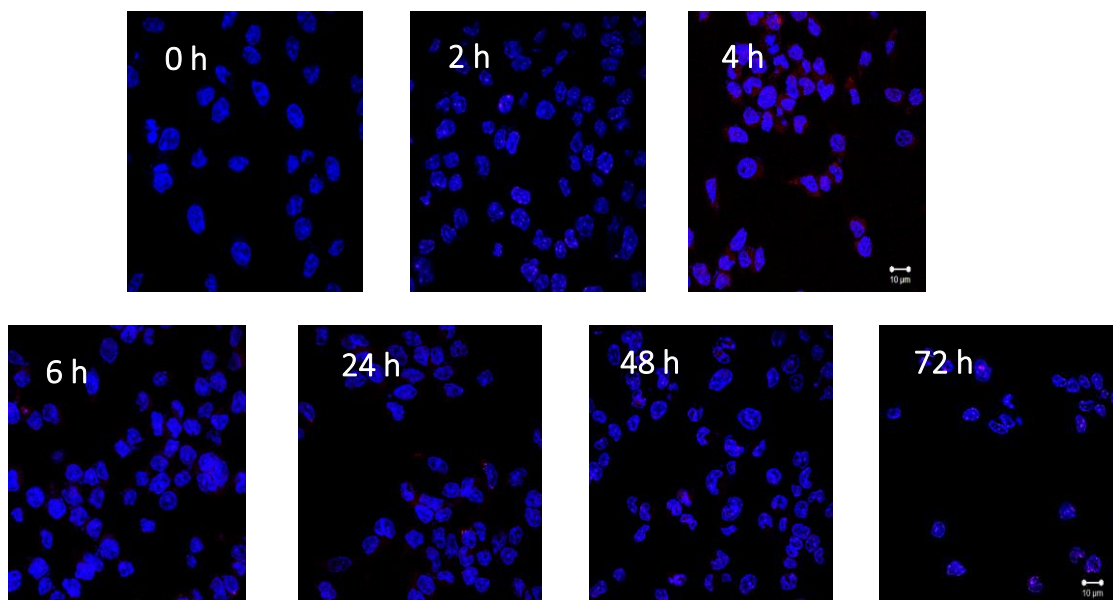


Figura 12. Expresión de LC3B en queratinocitos infectados con *Nocardia brasiliensis*. Núcleo marcado en azul (DAPI), LC3B marcado en rojo (rhodamina).

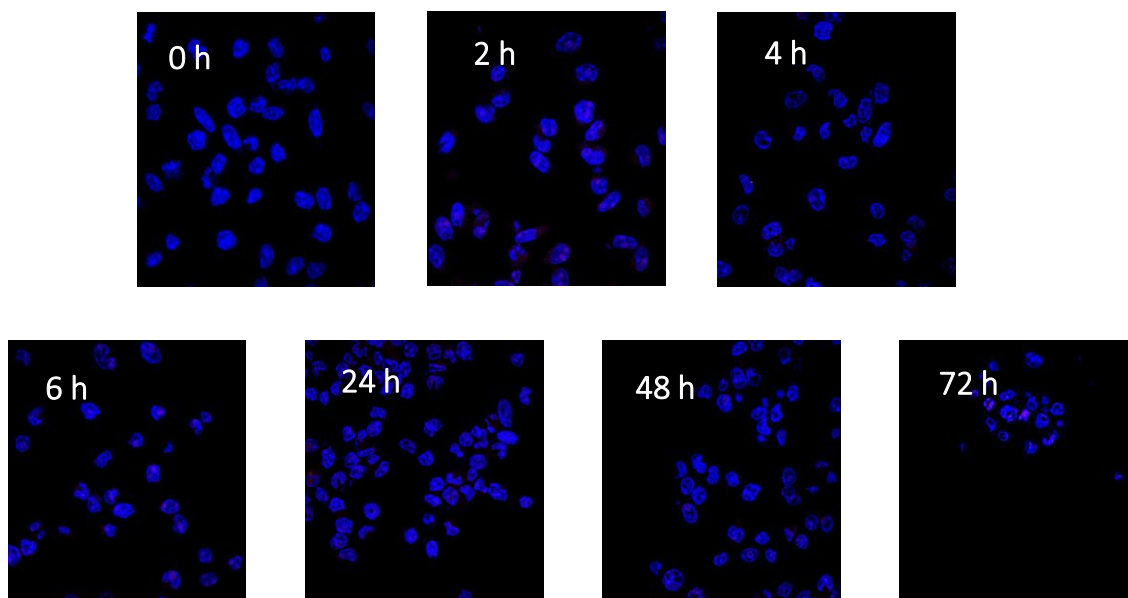


Figura 13. Expresión de LC3B en queratinocitos infectados con *Actinomyces madurae*. Núcleo marcado en azul (DAPI), LC3B marcado en rojo (rhodamina).

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se emplearon distintos medios de cultivo celular de acuerdo con la metodología descrita, concluyendo que el crecimiento óptimo de la línea celular de queratinocitos HaCaT se llevó a cabo empleando medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%.

Con base en lo observado al emplear 100 ng de LPS (figura 2 y 4), las proteínas ATG5 y LC3B, se expresan a partir de las dos y 24 horas posteriores a la inducción, lo cual se puede traducir a que los queratinocitos están activando el proceso de autofagia a través de receptores tipo Toll (TLRs). En comparación con lo observado en las muestras en las que se empleó 250 ng de LPS como inductor, en las cuales la expresión de ATG5 comienza 6 horas posteriores a la inducción (figura 3).

A su vez, en la figura 5, se observa que LC3B inducido con 250 ng de LPS, su expresión comienza a las 24 horas, como en el caso de la figura 4, sin embargo, al emplear una concentración de 100 ng de LPS se observa con mayor precisión la expresión de LC3B.

Al emplear PGN como inductor, se observa que la expresión de ATG5 y LC3B se encuentra favorecida al utilizar una concentración de 10 μ g, ya que en estas condiciones ATG5 se expresa a partir de las dos horas de la inducción, y en el caso de LC3B, a partir de las seis horas, en comparación con la concentración de 5 μ g de PGN, en donde ATG5 y LC3B se expresan a las seis y 24 horas, respectivamente.

Por lo anterior, se sugiere utilizar 100 ng de LPS para estudios posteriores.

Asimismo, se puede observar que la proteína ATG5 se expresa en las primeras horas de la inducción, en comparación con la proteína LC3B que se expresa alrededor de las 24 horas posteriores a la inducción, lo cual se puede atribuir a que la proteína ATG5 se une a las proteínas u organelos dañados para marcarlas y de esta manera dar inicio a la autofagia (Costas, A. et al, 2017), asimismo, la proteína LC3B es la proteína que se une al fagóforo para el posterior cierre de la vesícula para la captación de la carga y dar origen al autofagosoma (Ramírez, S. et al, 2016).

En el caso de la expresión de las proteínas LC3B (figura 4, figura 5, figura 8 y figura 9) se puede observar que se encuentran más separadas del núcleo, ya que como es la proteína que se expresa al final de la formación del fagóforo migra hacia el citoplasma para que el material pueda ser degradado, según lo reportó Megías, M. et al, 2019.

La macroautofagia es uno de los sistemas de defensa celular más antiguos y es la primera línea de defensa a infecciones por bacterias y otros microorganismos, según Megías, M., 2019. Como se puede observar en la figura 10, los queratinocitos infectados con *N. brasiliensis* expresan proteínas de autofagia en las primeras dos

horas de infección, en comparación con los queratinocitos infectados con *A. madurae* (figura 11) que su máxima expresión de ATG5 se observa 24 horas posteriores a la infección.

Asimismo, LC3B que es la proteína requerida para el cierre del fagóforo (última fase de la autofagia), se observa que los queratinocitos infectados con *A. madurae* (figura 13) tienen una mayor expresión de la misma en comparación con los queratinocitos infectados con *N. brasiliensis*, que se puede atribuir a que *N. brasiliensis* inicia una respuesta inmune más temprana que *A. madurae*, debido a su grado de patogenicidad ya que, se ha mencionado que alguno de los componentes de su pared celular inhiben la fusión del fagosoma con los lisosomas, y de esta manera, contribuyen a la supervivencia intracelular, según lo reportó Salinas, C. et al, 2002.

Por último, como se puede observar en la figura 3 y en la figura 7, la proteína ATG5 se expresa en el tiempo cero, lo cual se puede atribuir a lo que se conoce como autofagia basal, proceso por el cual la célula puede eliminar todos aquellos desechos celulares que se generan durante la vida de la misma y evita que se acumulen y puedan llegar a ser tóxicos, lo cual es clave para el mantenimiento del equilibrio celular (Yang, Z. et al, 2010).

VIII. CONCLUSIONES

Este trabajo sugiere que los queratinocitos humanos activan la autofagia via receptores tipo Toll cuando son estimulados con los agonistas PGN y LPS .

Como resultado de la inducción de la expresión de marcadores de autofagia en queratinocitos infectados por actinomicetos, se pudo observar la expresión de las proteínas autofágicas, lo cual es un indicio de la participación de la autofagia para el control de la infección, sin embargo, es necesario realizar más estudios para poder corroborarlo.

IX. ANEXOS

- Cronograma de actividades

	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
Estandarización de crecimiento celular y ensayos de infección	X	X					
Expresión de marcadores de autofagia vía TLRs			X	X	X		
Expresión de marcadores de autofagia en queratinocitos infectados por actinomicetos				X	X	X	
Análisis de resultados y reporte final							X

X. REFERENCIAS

- Boya, P. (2017) **Autofagia: cómo nuestras células se reciclan**. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Disponible en: <https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/acercate-nuestros-cientificos/1878-patricia-boya-enero-2017-autofagia-como-nuestras-celulas-se-reciclan-especial-premio-nobel-de-fisiologia-o-medicina-2016>.
- Buendía, E., Mazuecos, B., Camacho, M., (2018) **Anatomía y fisiología de la piel**. Manual de Dermatología. 2ª. Edición. Volumen I. Grupo Aula Médica. P.p. 4.
- Castrillón, L., Palma A., Padilla, C. (2008) **La función inmunológica de la piel**. Dermatología Revista de México Vol. 52 No. 5. Ciudad de México, México.
- Costas, A., Rubio, F. (2017) **Autofagia, una estrategia de supervivencia celular**. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, IDIM-CONICET. Facultad de medicina, Buenos Aires, Argentina.
- Dávila, M., Gallegos, G., Hernández, F., Ochoa, Y., Flores, A., (2013) **Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola**. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol. 4 No. 8. Saltillo, Coahuila.
- Desgarenes, P., Caballero, A., Martínez, G., (2014) **Micetoma por *Nocardia brasiliensis* en región abdominal**. Revista del Centro Dermatológico Pascua. Vol. 23 No. 1. Ciudad de México, México.
- Eckert R., Rorke E. (1989) **Molecular biology of keratinocyte differentiation**. Environmental health perspectives. Vol. 80.
- González, P., Cona, E. (2006) ***Nocardia asteroides***. Revista Chilena de Infectología Vol. 23, No. 4. Santiago, Chile.

- Hernández, P., Mayorga, J., Pérez, M. (2010) **Actinomicetoma por nocardia brasiliensis**. Anales de Pediatría, Asociación Española de Pediatría. Vol. 73 No. 4. Valencia, España.
- Hernández, P., Mayorga, J., Pérez, M. (2010) **Actinomicetoma por nocardia brasiliensis**. Anales de Pediatría, Asociación Española de Pediatría. Vol. 73 No. 4. Valencia, España.
- López, C. (2014). **Estudio de los mecanismos de regulación de la autofagia por glucosa**. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.
- López, M., Méndez, T., Bonifaz, A., Arenas, R., Mayorga, J., Welsh, O., Vera, C., Desgarenes, P., Contreras, P., Chávez, G., Estrada, R., Hernández, H., Gayosso, M. (2013). **Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3.933 casos**. Gaceta Médica de México Vol. 149:586 No. 92. México.
- Megías M, Molist P, Pombal M. (2019). **Atlas de histología vegetal y animal. La célula**. Recuperado: 09 de noviembre de 2019. Disponible en: <http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/1-introduccion.php>
- Navarrete, G. (2003). **Histología de la piel**. Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 46. No. 4. Ciudad de México, México
- Peña, S., Bautista, S. (2013) **Autofagia y respuesta inmunitaria**. Investigación clínica. Vol. 54 No. 3. Maracaibo, Venezuela.
- Ramírez, S., Aleman, L., Villa, M., Chávez, M., García, L., Lavandero, S. (2016) **Autofagia en el sistema cardiovascular, pasado, presente y futuro**. Revista Chilena de Cardiología. Vol. 35. No. 3. Santiago, Chile.
- Rozieres, A., Bensaid, B., Berard, F. (2013) **Sistema inmunitario cutáneo**. EMC dermatología. Vol. 47. No. 4. Elsevier Masson.
- Salinas, C., Castro, C., Licón T. (2002) **Mecanismos de patogenicidad de *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides***. Revista Medicina Universitaria. Vol. 4, No. 15. Nuevo León, México.
- Sánchez, L., Galarza, C., Matos, R. (2009) **Infecciones micóticas subcutáneas**. Dermatología Peruana, Vol. 19, No. 4. Perú.
- Serrano, J., Díaz, C., Uzcátegui, N. (2001) **El género Actinomadura. Aspectos de su taxonomía, microbiología patológica, clínica y terapéutica**. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología Vol. 21 No. 2. Caracas, Venezuela.
- Valdivia, S., Maya, P., Peña, F., (2014) **Las células guardianes residentes de la piel y su papel en la respuesta inmune. Parte I**. Dermatología Peruana. Vol. 24 No. 1. Perú.
- Yang, Z; Klionsky, D (2010) **Eaten alive: a history of macroautophagy**. Nature Cell Biology. No. 12. Michigan.
- Zhang, Z., Y. Wang y J. Ruan. (1998) **Reclasificación de Thermomonospora y Microtetraspora**. Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva. Vol. 48. No. 2. Gran Bretaña. Villa, E., Cardona, C. (2008) **Micetoma**. Revista CES Medicina. Vol. 22 No. 1. Medellín, Colombia.