



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LOS GLICOLÍPIDOS MICOBACTERIANOS DI-O-ACIL
TREHALOSA, TRI-O-ACIL TREHALOSA Y DIMICOLATO DE TREHALOSA
SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ALEJANDRO MAGALLANES PUEBLA

TUTOR:

**Dr. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**Dr. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. RICARDO LASCURAIN LEDEZMA
Facultad de Medicina**

Ciudad de México. junio, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl Mancilla Jiménez por permitirme trabajar en su laboratorio pero sobre todo, a Patricia Espinosa Cueto, su ayuda, consejos y sobre todo tu invaluable amistad fueron cruciales durante estos años de formación.

Al comité tutor, por sus consejos en cada tutorial. Dr. Enrique Ortega Soto y Dr. Ricardo Lascurain Ledezma, muchas gracias.

Al personal de la UNAM, por brindarme apoyo, consejos, reactivos y asesoría en la realización de este proyecto; Dra Luz María López Marín, Carlos Castellanos Barba, Gonzalo Acero Galindo, Georgina Díaz Herrera, Ivonne Mora Herrera, Cristina Parada Colin y Jacqueline Fernández Vargas, muchas gracias.

Al CONACyT, por brindarme el apoyo financiero mediante la beca No. 429313. Gracias por darnos a los jóvenes científicos la oportunidad de hacer lo que más nos gusta, y de encomendarnos la noble tarea de hacer de México un mejor país mediante la ciencia.

A mi familia, mi madre y mis hermanos quienes aceptan mi forma de pensar y siempre respetan mis decisiones. Espero cumplir con sus expectativas.

A mis amigos Jorge, Alonso, Adriana, Lupita y María José. Si puedo confiar ciegamente en alguien, es en ustedes.

A mi amigo Gonzalo, su frustrante partida se convirtió en una responsabilidad. Espero estar a la altura de su memoria y ser capaz de continuar el trabajo que siempre desempeñó día tras día: poner la técnica al servicio de la patria.

Finalmente, a los alumnos que han depositado su confianza en mí como su instructor. Son la mejor experiencia en mi formación y la razón más importante por la que obtengo este grado. Un título de posgrado es inútil sin un alumno al cual formar.

MUCHAS GRACIAS

Abreviaturas

7-AAD	7-actinomicina D
AhR	Receptor aril hidrocarburo
APC	Alofococianina
ARNT	Translocador nuclear de AhR
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
CCF	Cromatografía en capa fina
CCR	Receptor de quimiocinas C-C
CD	Célula dendrítica
DAT	Di-O-acil trehalosa
DC-SIGN	Molécula no-integrina de adhesión intracelular específica de células dendríticas
DMT	Dimicolato de trehalosa
Fig	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
GM-CSF	Factor estimulante de granulocitos y monocitos
h	Horas
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenasa
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMF	Índice medio de fluorescencia
IRF	Factor regulador de interferon
LAM	Lipoarabinomanana
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicóico
mAb	Anticuerpo monoclonal
ManLAM	Lipoarabinomananas cubiertas con manosa
MAPK	Cinasa activada por mitógeno
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIncle	Receptor inducible de monocitos tipo C lectina
MMT	Monomicolato de trehalosa
MO	Macrófago

Mtb	Mycobacterium tuberculosis
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NK	Célula natural killer
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patron molecular asociado a patógeno
PDIM	Dimicoserosatos de ftioserol
PE	Ficoeritrina
PGL	Glicolípidos fenólicos
PIM	Manosidos de fosfatidil inositol
Rf	Tiempo de retención
SFB	Suero fetal bovino
TAT	Tri-O-acil trehalosa
TB	Tuberculosis
Th	Linfocito T cooperador
TNF	Factor de necrosis tumoral
TLR	Receptor tipo Toll
TRAF	Factores asociados al receptor de TNF
XRE	Elementos de reacción a xenobióticos
λ	Número de onda

ÍNDICE

Índice de tablas y figuras	I
INTRODUCCIÓN	II
RESUMEN	1
I. MÁRCO TEÓRICO	
1. Generalidades de la tuberculosis	2
2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
3. Pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	5
4. Lípidos de la pared de <i>M. tuberculosis</i>	7
5. Patogenia de la tuberculosis	9
6. Respuesta inmune innata en la tuberculosis	11
7. Respuesta inmune adaptativa en la TB	13
8. Células dendríticas	16
9. Células dendríticas en la tolerancia inmunológica	20
10. Tolerancia mediada por la enzima Indoleamina 2,3 dioxigenasa y el receptor aril hidrocarburo	22
11. Modulación de la respuesta inmune por <i>M. tuberculosis</i>	25
II. HIPÓTESIS	28
III. OBJETIVOS	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Purificación de DAT y TAT a partir de <i>Mycobacterium fortuitum</i>	30
2. Obtención de CDs inmaduras a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6	32
3. Obtención de antígenos micobacterianos inductores de maduración de las CDs a partir de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	33
4. Ensayos para estudiar el efecto de DAT, TAT y DMT sobre la maduración de las CDs	34
5. Inducción de la maduración de las CDs con antígenos de BCG	34
6. Efecto de los glicolípidos sobre la maduración inducida por	35

	antígenos micobacterianos	
	7. Efecto de los glicolípidos sobre la maduración inducida por agonistas de receptores tipo Toll	35
	8. Análisis del perfil de citocinas generado en CDs tratadas con los glicolípidos	36
	9. Análisis del perfil tolerogénico de las CDs	36
	10. Análisis de la activación del receptor aril hidrocarburo	37
	11. Expresión y actividad enzimática de la Indoleamina 2, 3 dioxigenasa	37
	12. Inhibición química del AhR	38
	13. Análisis de la proliferación de linfocitos T	39
	14. Análisis estadístico	40
V.	RESULTADOS	
	1. Purificación de DAT y TAT a partir de <i>M. fortuitum</i>	41
	2. Obtención de antígenos micobacterianos inductores de maduración de las CDs a partir de <i>M. bovis</i> BCG	43
	3. Efecto de DAT, TAT y DMT sobre la maduración de las CDs	45
	4. Efecto de DMT, DAT y TAT sobre la maduración inducida por agonistas de TLR en las CDs	48
	5. Efecto de DAT sobre la producción de citocinas inducidas por BCG	50
	6. Generación de un perfil tolerogénico en las CDs inducido por DAT	52
	7. Efecto de DAT en la activación del AhR	53
	8. Efecto de DAT sobre la expresión y la actividad enzimática de laIDO	54
	9. Efecto de la inhibición química de AhR sobre DAT	55
	10. Efecto de DAT sobre la proliferación de linfocitos T	56
VI.	DISCUSIÓN	58
VII.	CONCLUSIONES	64
VIII.	PERSPECTIVAS	64
IX.	REFERENCIAS	65

Índice de tablas y figuras

Figura 1.	Tasa de incidencia de la TB	3
Tabla 1.	Diferencias en la delección de genes de las cepas de <i>M. bovis</i> BCG	4
Figura 2.	Morfología de Mtb	5
Figura 3.	Diferencias estructurales entre bacterias Gram positivas, Gram negativas y Micobacterias	6
Figura 4.	Microscopía de crió-electrones de la cubierta celular de las micobacterias	7
Figura 5.	Esquema de la pared de Mtb	8
Figura 6.	Estructura de los lípidos de Mtb	9
Figura 7.	Dinámica de la infección en la TB	10
Tabla 2	Efectos positivos y negativos de las citocinas producidas en la TB	15
Tabla 3.	Efectos positivos y negativos de las quimiocinas producidas en la TB	16
Figura 8.	Diferenciación de las CDs a partir de precursores de la médula ósea	17
Figura 9.	Localización de las CDs en pulmón	18
Figura 10.	Ruta metabólica del triptófano	22
Figura 11.	La vía de señalización del AhR	24
Figura 12.	Estructura y afinidad de ligandos del AhR	25
Figura 13.	Principales receptores de reconocimiento de Mtb y sus vías de señalización	26
Tabla 4.	Perfil de elución en la cromatografía en columna	31
Figura 14.	Purificación de DAT y TAT por cromatografía en columna	41
Figura 15.	Caracterización de DAT y TAT mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier	42
Figura 16.	Obtención de antígenos micobacterianos de paredes de <i>M. bovis</i> BCG	43
Figura 17.	Inducción de maduración de las CDs con paredes de BCG deslipidizadas	45
Figura 18.	Efecto de los glicolípidos micobacterianos sobre la maduración de las CDs	46
Figura 19.	Efecto de los glicolípidos micobacterianos sobre la maduración inducida con paredes de BCG	47
Figura 20.	Efecto del DMT sobre la maduración de CDs inducida por LPS	48
Figura 21.	Efecto del TAT sobre la maduración de CDs inducida por agonistas de TLR	49
Figura 22.	Efecto de DAT sobre la maduración inducida con agonistas de TLR-2 y TLR-4	50
Figura 23.	Efecto de DAT sobre la producción de citocinas en CDs	51
Figura 24.	Efecto de DAT sobre la expresión de moléculas inmunoreguladoras	52
Figura 25.	Efecto de DAT sobre la expresión del receptor AhR por microscopía de fluorescencia	53
Figura 26.	Efecto de DAT sobre la expresión y actividad enzimática deIDO	55
Figura 27.	Efecto de la inhibición química del AhR sobre el efecto de DAT en las CDs	55
Figura 28.	Efecto de DAT sobre la proliferación de linfocitos T	57

INTRODUCCIÓN

La TB es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A pesar de que existen tratamientos farmacéuticos y una vacuna para controlar la enfermedad anualmente se reportan cerca de 12 millones de personas infectadas, de las cuales 1.2 millones de personas mueren a causa de la enfermedad por lo que esta enfermedad sigue siendo un problema de salud a nivel mundial. En el control de la enfermedad, el sistema inmune juega un papel importante; inclusive, la mayoría de los individuos que se encuentran expuestos al bacilo no desarrollan la enfermedad debido a que los mecanismos de la respuesta inmune innata son suficientes para eliminar al bacilo, sin embargo, este ha desarrollado factores de virulencia que le permiten evadir la respuesta inmune llegando a permanecer en un estado latente durante años. Los factores de virulencia se encuentran localizados en la pared del bacilo siendo de interés como reguladores de la respuesta inmune los glicolípidos micobacterianos, de los cuales, los glicolípidos estudiados en este trabajo se encuentran presentes en las cepas virulentas de Mtb y en la cepa vacunal. Se ha demostrado que los glicolípidos de la cubierta celular son capaces de alterar la función de los macrófagos, células presentadoras de antígeno que tienen la función de eliminar al bacilo; específicamente en nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que DAT y TAT alteran la producción de iNOS y por lo tanto, la producción de ON, un mecanismo que es utilizado por el macrófago para la eliminación de patógenos. Otras células importantes en la respuesta inmune son las células dendríticas ya que estas se encargan del desarrollo de la respuesta inmune celular; también se ha reportado que existen glicolípidos como las lipoarabinomanas o los fosfatidil inositol manosidos que pueden alterar la función de estas células, principalmente

inducen la producción de citocinas anti-inflamatorias y afectan su maduración. Por otra parte la generación de un perfil tolerogénico en las CDs es un mecanismo, ligado al estado de maduración de las CDs, que es utilizado por algunos microorganismos incluyendo a Mtb. Por ello, en este trabajo se plantea que los glicolípidos estudiados, además de alterar la función inmunogénica de las CDs, también inducen un perfil tolerogénico en estas, teniendo como consecuencia la producción de moléculas inmunoregulatoras como la L-kinurenina, que participa, junto con la producción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10, en la generación de linfocitos T reguladores, los cuales tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inmune hacia el bacilo, lo que contribuye a la generación de un estado de latencia en este y por lo tanto a una posible reactivación de la enfermedad en eventos donde el sistema inmune se ve alterado. La identificación de factores de virulencia es de interés para generar vacunas que sean efectivas.

RESUMEN

La TB es una enfermedad infecciosa causada por Mtb, un bacilo que tiene la capacidad de inducir la una respuesta inmune en el individuo pero que cuenta con factores de virulencia como los glicolípidos en su cubierta celular que alteran esta misma respuesta.

Anteriormente, hemos demostrado que los glicolípidos micobacterianos como DAT y TAT pueden alterar la función de los macrófagos y por lo tanto proponemos que también pueden ejercer un efecto sobre las CDs, alterando su función inmunogénica. A este estudio se suma el DMT que es un glicolípido de gran abundancia en Mtb.

En este proyecto se purificó a DAT y a TAT de la cepa *Mycobacterium fortuitum* por cromatografía en columna y se evaluó el efecto de estos lípidos junto con DMT, sobre la maduración de las CDs diferenciadas de monocitos de ratón y se evaluó la expresión de moléculas presentadoras de antígeno, moléculas co-estimuladoras, producción e citocinas como IL-10, IL-12 y TNF- α . Posteriormente se evaluó la generación de un perfil tolerogénico mediante la producción de moléculas co-inhibitorias que dieran como resultado la proliferación de linfocitos T reguladores. Los resultados obtenidos muestran que de los tres glicolípidos evaluados, DAT tiene la capacidad de inducir un perfil tolerogénico en las CDs asociado a la activación del eje AhR/Indoleamina. Esto pone a DAT como un factor de virulencia que compromete la función de las CDs hacia un perfil tolerogénico, esto es de interés ya que propone un mecanismo de evasión de la respuesta inmune; el entendimiento de estos mecanismos puede plantear nuevas estrategias en la generación de una vacuna efectiva.

I. MARCO TEÓRICO

1. Generalidades de la tuberculosis

La TB es una enfermedad que representa un problema de salud a nivel mundial y es una de las primeras causas de muerte causadas por un agente infeccioso [1]. Desde que Robert Koch descubrió Mtb, agente causal de la TB, a finales del siglo XIX; se han hecho grandes avances en el estudio de la enfermedad desarrollándose métodos de diagnóstico y tratamiento más eficaces; sin embargo, la erradicación de la TB aun esta lejos de lograrse [2]. Un factor importante que complica los esfuerzos de erradicación de la enfermedad es la generación de cepas de Mtb resistentes a los medicamentos en uso, y la capacidad intrínseca del bacilo de permanecer en estado latente por tiempos muy prolongados [3]. La TB se encuentra ampliamente distribuida en el mundo teniendo mayor impacto en países en vías de desarrollo; esto se debe a condiciones de salubridad deficientes, alimentación inadecuada y a carencia de métodos de detección y tratamiento adecuados; por lo anterior se ha considerado a la TB como un indicador de pobreza (Fig. 1) [4]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca de dos tercios de la población mundial está infectada por Mtb. En 2018 hubo cerca de 10 millones de casos de TB y 1.3 millones de decesos [2].

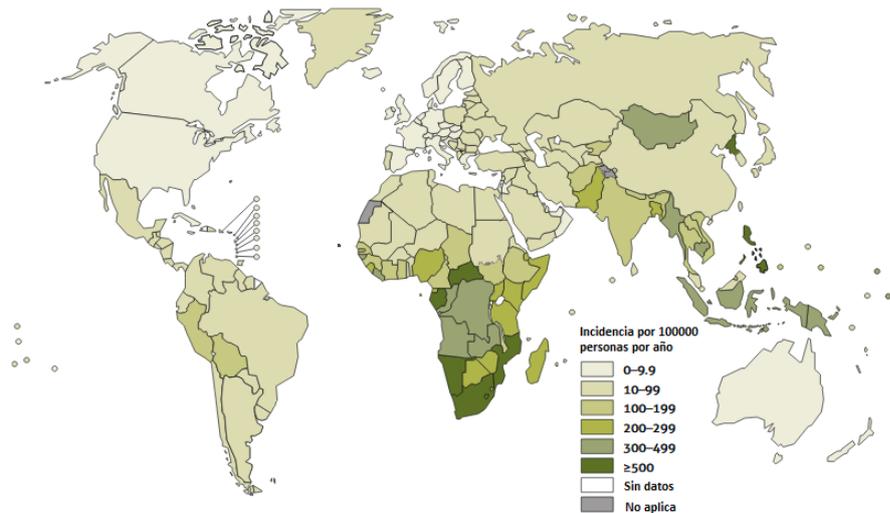


Figura 1. Tasa de incidencia de la TB. La TB es una enfermedad que se encuentra distribuida a nivel mundial, teniendo una mayor incidencia en países en vías de desarrollo, especialmente en países sudafricanos, las islas del pacífico y en menor medida en países de Asia central y Sudamérica. [Tomado de 2].

Para el tratamiento de la TB, se prescriben por tiempos muy prolongados medicamentos como el etambutol, isoniazida, pirazinamida y rifampicina; en el caso de la TB por micobacterias multidrogasresistentes se utilizan fluoroquinolonas, amikacina, caperomicina y kanamicina [5]. En la prevención de la TB se ha usado con éxito variable la vacunación con *Mycobacterium bovis* BCG, una cepa atenuada de *M. bovis* desarrollada en el Instituto Pasteur por León Charles Albert Calmette y Camile Guérin entre 1908 y 1919 después de realizar 230 pases en medio papa con bilis [6]. A partir de la cepa original, se han generado cepas que actualmente son utilizadas en la producción de vacunas, como la cepa Danesa 1331, Rusa BCG-I, Moreau RDJ, Glaxo 1077, Tokyo 172-1 y la Pasteur 1173 P2 [7]; siendo las últimas tres las más utilizadas [8]. Estas cepas presentan diferencias en la delección de diversas regiones de su genoma como lo muestra la tabla 1 [9]; sin embargo todas tienen en común la delección de la región RD-1 lo que evita la expresión de CFP-10 y ESAT-6, [10]; estas proteínas forman parte del sistema de secreción ESX-1 presente en las cepas

virulentas de Mtb [11]. La vacuna ha tenido éxito en la prevención de la TB en niños [12]; sin embargo no ha resultado eficiente en la profilaxis de la TB en el adulto [13]. Se ha propuesto que la variación en la efectividad de la vacuna se debe a que las propiedades bioquímicas e inmunogénicas de estas varían entre cepa y cepa [9]; también las condiciones de cultivo pueden alterar de manera importante la efectividad de la cepa; se ha observado que las bacterias crecidas en medio Sauton sobreviven más en macrófagos en comparación con las bacterias crecidas en medio Middlebrook 7H9, también pueden inducir una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias [14].

Tabla 1. Diferencias en la delección de genes de las cepas de *M. bovis* BCG [Tomado de 9].

Cepa (sinónimo)	Regiones eliminadas	Genealogía
Pasteur	RD1, RD2, RD14	
Phipps (Filadelfia)	RD1, RD2	
Frappier (Montreal)	RD1, RD2, RD8, RD Frappier	
Connaught (Toronto)	RD1, RD2, RD8	
Tice (Chicago)	RD1, RD2	
Danish 1331 (Dinamarca)	RD1, RD2 RDDenmark	
Birkhaug	RD1	
Sweden (Gothenburg)	RD1	
Moreau (Brazil)	RD1, RD16	

También se ha planteado que el poco éxito de la vacuna es atribuible a la presencia de glicolípidos que se encuentran en la pared de Mtb y que se han identificado como factores de virulencia que modulan la respuesta inmune [15].

2. *Mycobacterium tuberculosis*

El agente etiológico de la TB fue descubierto en 1882 por Robert Koch y un año después se pudo confirmar la existencia del bacilo gracias a la técnica de tinción desarrollada por Ziehl-Neelsen [16]. Por microscopía de campo claro se

pudo describir su morfología microscópica como la de un bacilo de 1-10 mm de longitud y 0.2-0.6 mm de ancho (Fig. 2) [17].

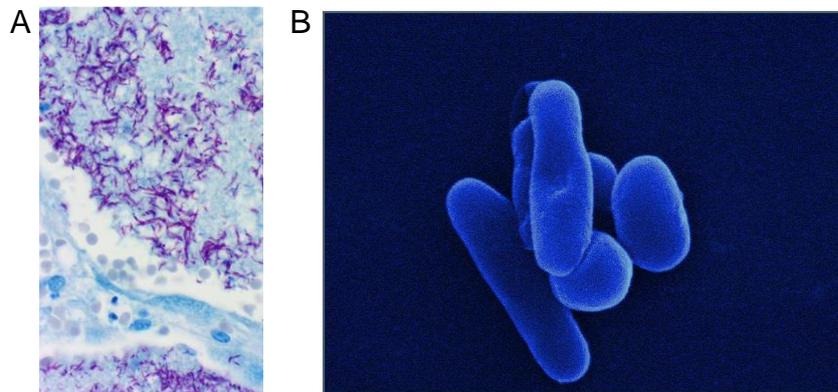


Figura 2. Morfología de Mtb. Corte de pulmón con bacilos teñidos por la técnica de Ziel-Neelsen (A). Por microscopía de electrones se demuestra la morfología de Mtb en la fase logarítmica de crecimiento (B) [Tomado de 17].

Mtb forma parte del complejo *M. tuberculosis*, que incluye a *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium canetti* [18]. Existen otras especies saprófitas como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium marinum* y *Mycobacterium kansasii*; que pueden causar enfermedades en individuos inmunosuprimidos [19]

3. La pared celular de *M. tuberculosis*

Una característica particular de Mtb es su pared celular. El bacilo pertenece a la familia de las Actinobacterias las cuales tienen una pared compuesta por una capa de peptidoglicana, ácidos micólicos y arabinogalactanas. La peptidoglicana está compuesta por moléculas de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico y cumple con las funciones de dar forma a la bacteria y protección en condiciones ambientales [20]. La capa de peptidoglicana se encuentra unida de manera covalente a la arabinogalactana, la cual sirve como sitio de anclaje para los ácidos micólicos; este conjunto es conocido como el núcleo de la pared celular. En la parte más superficial están lípidos libres que no están unidos de manera

covalente al núcleo de la pared celular [21]. Esta conformación le da a la pared de Mtb un parecido a la de las bacterias Gram negativas (Fig. 3) [22].

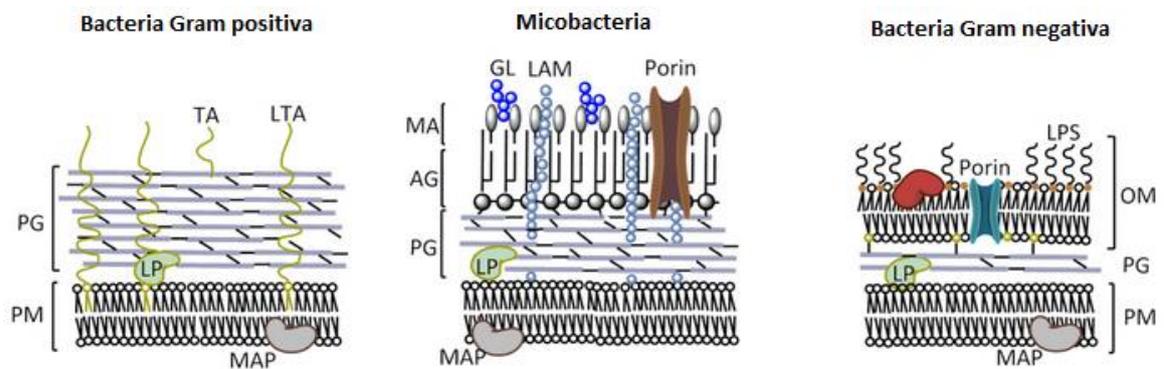


Figura 3. Diferencias estructurales entre bacterias Gram positivas, Gram negativas y Micobacterias. A pesar de que Mtb pertenece al grupo de las bacterias Gram-positivas, el arreglo entre la peptidoglicana, la arabinogalactana y los lípidos libres que posee su pared es parecido al arreglo que tienen las bacterias Gram negativas. AG, arabinogalactana; GL, glicolípido; LAM, lipoarabinomana; LP, lipoproteína; LPS, lipopolisacarido; LTA, ácido lipoteicoico; MA, ácido micólico; MAP, proteína asociada a membrana; OM, membrana externa; PG, peptidoglicana; PM, membrana plasmática; TA, ácido teicóico [Tomado de 22].

En 1982, Minnikin y col. describieron una segunda bicapa lipídica constituida por ácidos micólicos unidos covalentemente a la peptidoglicana en la parte interna y por lípidos libres en la parte externa [23]. Por medio de la microscopía de crio-electrones, Niederweiss y col confirmaron este modelo al presentar imágenes detalladas de la membrana externa la cual tiene un grosor de 8 nm y una morfología simétrica (Fig. 4) [24].

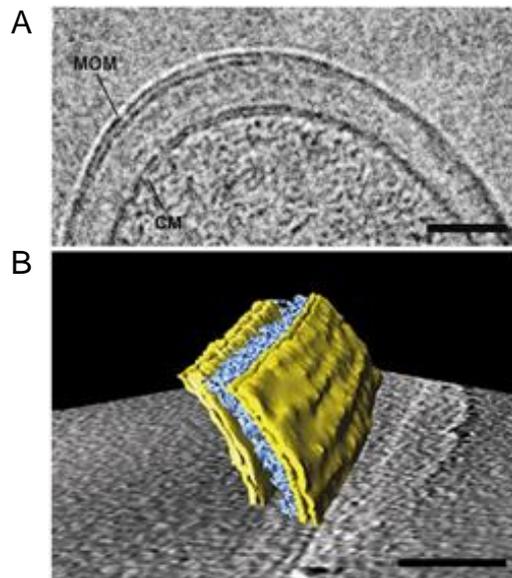


Figura 4. Microscopía de crío-electrones de de la cubierta celular de las micobacterias. Visualización de la membrana externa de *M. bovis* BCG en crío cortes en donde se puede observar la membrana externa (A) y por tomografía de electrones se construye el modelo tridimensional de la cubierta celular (B) [Tomado de 24].

4. Lípidos de la pared de *M. tuberculosis*

Los lípidos de la pared de Mtb constituyen el 40% del peso seco del bacilo [25]. La membrana plasmática está compuesta por glicerofosfolípidos como el fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina y formas manosalidas del fosfatidilinositol [26]. Estos lípidos constituyen una barrera semipermeable importante en el transporte de electrones, formación de ATP y en la biosíntesis de diversos componentes celulares [27].

Entre los lípidos libres están los manosidos de fosfatidil inositol (PIMs), dimicoserosatos de ftioserol (PDIMs), glicolípidos fenólicos (PGLs), lipoarabinomananas cubiertas con manosa (ManLAM) y varios tipos de acil trehalosas (Fig. 5) [28].

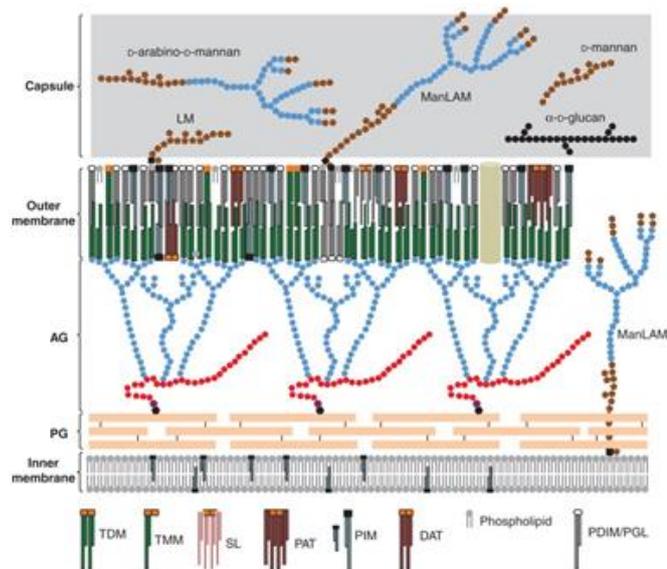


Figura 5. Esquema de la pared de Mtb. La parte mas interna es la membrana plasmática constituida principalmente por fosfolípidos. La segunda capa es el núcleo de la pared compuesta de peptidoglicana (PG) unida a la arabinogalactana (AG). La membrana externa está compuesta por lípidos como el monomicolato y dimicolato de trehalosa (TMM y TDM), di y poliacyl trehalosas (DAT y PAT), dimicoserosato de ftiocerol (PDIM), glicolípidos fenólicos (PGL) y sulfolípidos (SL) [Tomado de 26].

Se desconoce si Mtb requiere lípidos como el fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidiletanolamina para su crecimiento; sin embargo, se ha demostrado que requiere PIMs, lipoarabinomananas (LAM) y ManLAM [29]. Los PIMs juegan un papel importante en la permeabilidad de la célula, en la integridad de la membrana interna y en la regulación de la división celular [30]. Por otra parte, las LAMs y ManLAMs son importantes en la resistencia los antibióticos beta-lactámicos [31]. Las micobacterias poseen esteres de trehalosa como el monomicolato de trehalosa (MMT), el DMT, DAT, TAT, las poliacyltrehalosas, los sulfolípidos, los PDIMs, glicolípidos fenólicos y lipooligo polisacáridos (Fig. 6) [26]. Estos lípidos pueden ser solubilizados con solventes no polares, mientras que el núcleo de la cubierta permanece intacto gracias a sus enlaces covalentes con la peptidoglicana [32].

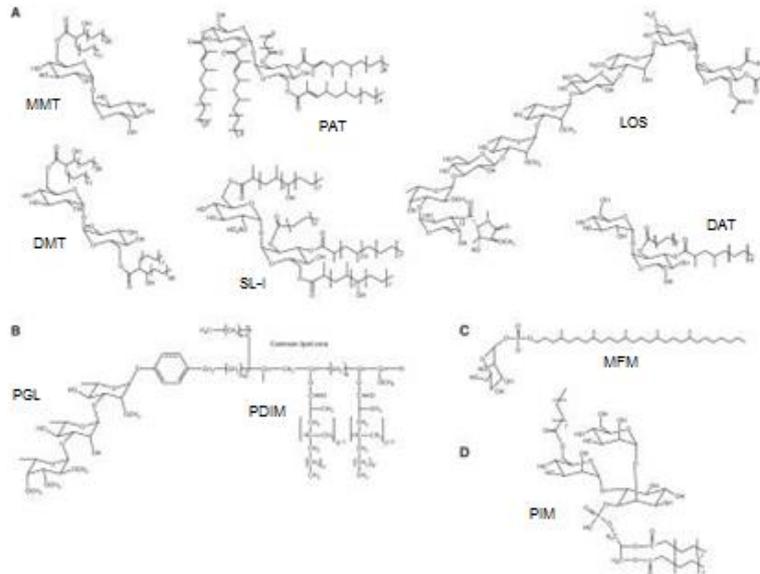


Figura 6. Estructura de los lípidos de Mtb. Estructura de las acil trehalosas: monomicolato de trehalosa (MMT), dimicolato de trehalosa (DMT), sulfolípidos (SL-I), di acil trehalosa (DAT), poliacyl trehalosas (PAT), lipooligosacáridos (LOS) de *Mtb canettii* (A). La trehalosa de DAT está esterificada con ácido palmítico y con ramas de ácidos micosanoicos. Estructura de los ftioserol dimicoserosatos (PDIM) y glicolípidos fenólicos (PGL) de *Mtb* (B). Estructura de manosil-β-1-fosfomicocétido (MFM) presente en *Mtb* H37Rv (C). Estructura de fosfatidilinositol dimanósido triacilado (PIM) producido por *Mtb* (D) [Tomado de 26].

5. Patogenia de la tuberculosis

Se considera que *Mtb* tiene una relación comensalista con su hospedero pues, en la mayoría de los casos, el sistema inmune del individuo es capaz de controlar la infección en estado latente produciéndose enfermedad en menos del 10% de las personas infectadas [33]. Dependiendo del estado de la infección, habrá variaciones en la sintomatología; la cual incluye tos crónica, expectoración, anorexia, pérdida de peso, fiebre, sudoración profusa y hemoptisis. También hay variaciones en el diagnóstico y el tratamiento a utilizar lo cual varía dependiendo de la carga bacteriana (Fig. 7) [34].

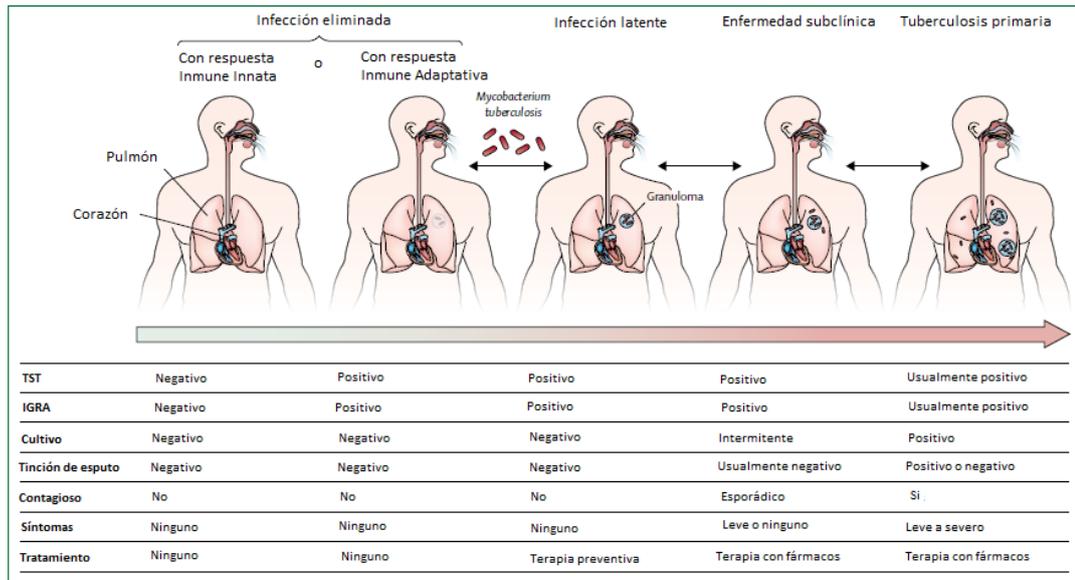


Figura 7. Dinámica de la infección en la TB. Dependiendo de la competencia del sistema inmune del individuo, la infección puede ser progresiva o permanecer en un estado de latencia. Para evaluar el estado de la infección micobacteriana se recurre a la prueba de la tuberculina y a la medición del interferón gamma en el suero. TST, Prueba de tuberculina; IGRA, prueba de liberación de IFN- γ [Tomada de 1].

La patogenia de la enfermedad es una relación compleja entre el bacilo y el hospedero. A pesar de que el sistema inmune es suficiente para controlar la infección, el bacilo cuenta con mecanismos para regular la respuesta inmune del hospedero [35].

El bacilo se transmite por vía aérea; se estima que una persona enferma es capaz de expulsar en un acceso de tos hasta 400 bacilos [36]. La infección se establece en tres etapas; en la primera las células epiteliales de los alveolos entran en contacto con el bacilo [37], sin embargo carecen de la capacidad para eliminarlo [38]. Estudios *in vitro* han demostrado la presencia de DNA del bacilo dentro del epitelio alveolar de individuos infectados [39], y se ha demostrado que tasa de crecimiento del bacilo en estas células es 50 veces superior a la observada en los MOs alveolares [40]. Una función importante de las células epiteliales es la liberación de quimiocinas como CCL-2, CXCL-10 y CCL-5, que contribuyen al reclutamiento de los linfocitos T CD4+ al sitio de infección [41].

La siguiente etapa de la infección consiste en el establecimiento de una respuesta inmune con formación de granulomas cuya función principal es contener la infección. El granuloma tuberculoso está constituido por una zona central necrótica, rodeada por MOs activados, células dendríticas y linfocitos T [42]. En individuos inmunocompetentes, los granulomas son pequeños y caracterizados por la presencia de linfocitos T CD4 productores de IFN- γ , mientras que en individuos inmunodeficientes los granulomas tienden a ser más grandes y están compuestos de MOs activados y la presencia de linfocitos es menor [43]. También es indispensable la participación de citocinas pro-inflamatorias ya que juegan un papel importante para la formación del granuloma [44].

La etapa final de la infección se caracteriza por producir un estado de latencia que ocurre en 2 tercios de la población a nivel mundial [1]. La reinfección se caracteriza por la reactivación de la enfermedad cuando hay factores de riesgo que pueden afectar el funcionamiento del sistema inmune [45]. Por ejemplo, la co-infección con el virus de inmunodeficiencia humana es un factor importante en la reactivación de la enfermedad al disminuir significativamente la cantidad de linfocitos T CD4 que son fundamentales en el control de la infección [46]. En estas circunstancias, el granuloma pierde su capacidad de contención y los bacilos pueden diseminarse, dando como resultado la reactivación de la infección y su diseminación sistémica [46].

6. Respuesta inmune innata en la tuberculosis

La respuesta inmune es efectiva para controlar la infección inicial por la Mtb siendo la respuesta innata importante en el reconocimiento y la eliminación del bacilo mientras que la respuesta inmune adaptativa participa en la protección a

largo plazo [47]. En la respuesta inmune innata participan neutrófilos, células NK, CDs y los macrófagos (MO) alveolares, las primeras células en reconocer al bacilo [48].

Los receptores con los que cuentan los MOs son los receptores de tipo Toll (TLRs), NOD (NLRs) y C-lectina (CLRs), los cuales sirven para reconocer componentes del bacilo como son los glicolípidos, lipoproteínas y carbohidratos [49]. El bacilo es internalizado dentro de fagosomas los cuales maduran para convertirse en fagolisosomas en donde, además de ser privado de nutrientes, está expuesto a los mecanismos microbicidas del MO que incluyen la disminución del pH y exposición a enzimas. Adicionalmente el MO libera quimiocinas que atraen a otras células del sistema inmune al sitio de la infección [50]. Otro mecanismo utilizado por el MO es la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, la acidificación del fagosoma y la autofagia del bacilo que ha sido fagocitado [51]. También se pueden generar MOs de dos tipos, los M1 y M2 [52]; los primeros tienen una función importante en el control de la TB y pueden ser inducidos por componentes bacterianos o citocinas, mientras que los M2 son supresores de las respuestas tipo Th1 y mantienen el equilibrio entre el control de la infección y el daño causado por la respuesta inmune [53].

Otras células importantes en la respuesta innata son los neutrófilos ya que son las primeras células que se infiltran en los pulmones siendo las más abundantes en los lavados broncoalveolares y en el esputo de pacientes con TB activa. Su reclutamiento es regulado por varias citocinas, quimiocinas y alarminas [54]. Estas células liberan elastasa, colagenasa y mieloperoxidasa las cuales afectan al bacilo y al tejido, por ello los neutrófilos son en parte responsables de la inmunopatología característica de la infección por Mtb. [55]. Se ha demostrado

una relación inversa entre el número de neutrófilos y la gravedad de la infección [56].

Otras células que participan en la respuesta innata son las células NK las cuales poseen gran capacidad citolítica, actúan en la fase temprana de la infección y no están restringidas al reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [57]. Las células NK pueden reconocer a los ácidos micólicos del bacilo por medio del receptor de citotoxicidad natural NKp44 [58]. Además producen perforina, granulicina y granzima; así mismo producen IFN- γ e IL-22, que promueven la fusión fagolisosomal en el MO, lo que inhibe la proliferación intracelular del bacilo. Además las células NK promueven la proliferación de los linfocitos T $\gamma\delta$ al producir CD54, TNF- α , GM-CSF e IL-12 [59].

7. Respuesta inmune adaptativa en la TB

La respuesta inmune adaptativa en contra de Mtb es mediada principalmente por los linfocitos T CD4 y T CD8, la cual puede requerir de 5 a 6 semanas para su establecimiento en humanos [60]. Los linfocitos CD4 producen las citocinas pro-inflamatorias IL-12 y TNF- α que, en sinergia con el IFN- γ , inducen intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno [61]; estas citocinas participan en la formación del granuloma promoviendo el reclutamiento de células inmunocompetentes al sitio de la infección [62].

Los linfocitos T CD4 se dividen en subtipos dependiendo de su perfil de citocinas: linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), Th17 y T reguladores (Treg) [63]. Las células Th1 producen IFN- γ , TNF- α e IL-2 y contribuyen a la activación de MOs y a la formación de granulomas, mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5, y IL-10, lo que contribuye al desarrollo de la

inmunidad mediada por anticuerpos la que no es efectiva en contra de la infección por Mtb [64]. En lo que respecta a los linfocitos Th17, se ha demostrado su presencia y una producción incrementada de IL-17 en pacientes con TB latente en comparación con pacientes con TB activa [65]. La interacción de Mtb con el receptor delectina-1 de las CDs promueve la proliferación de linfocitos Th17 [66].

Los linfocitos T CD8 juegan un papel importante en el control de la infección ya que, al ser un microorganismo intracelular, los antígenos de Mtb pueden ser presentados y reconocidos por los linfocitos T CD8 por medio del MHC-I [67]. Estas células pueden lisar a los MOs infectados por medio de perforinas [68] y granzimas que se encuentran localizadas en gránulos y que son liberados cuando hay reconocimiento vía TCR eliminando directamente al bacilo dentro de las células infectadas [69].

La producción de citocinas juega un papel importante en el control de la infección, en las tablas 2 y 3 se enlistan las principales citocinas y quimiocinas que se producen en la infección por Mtb [44].

Tabla 2. Efectos positivos y negativos de las citocinas producidas en la TB. [Tomado de 44].

Citocina	Receptor/Señal	Efecto en la TB
TNF- α	TNFR1, TNFR2 JNK, p38, NF κ B	Positivo: Inicio de la respuesta inmune innata mediada por citocinas y quimiocinas. Activación de fagocitos. Negativo: Causa daño en tejidos.
IFN- γ	IFNGR1, IFNGR2 JAK/STAT	Positivo: Coordina y mantiene la inflamación mononuclear. Producido por linfocitos T específicos a antígenos. Negativo: Potencialmente patogénico.
IFN- α /IFN- β	IFNAR1, IFNAR2, JAK, TYK, ISG, ISRE	Positivo: Contribuye al reclutamiento de fagocitos en el pulmón. Negativo: Su sobreexpresión contribuye al reclutamiento de fagocitos permisivos y a la regulación de los linfocitos T.
IL-6	IL-6R, gp130, JAK, STAT3, MAPK	Positivo: Potencia la inmunidad temprana, no es esencial a menos de que la infección sea elevada.
IL-1 α /IL-1 β	IL-1R1, IL-1RAcP, MyD88, IRAK4, NF κ B	Positivo: Induce IL-17 y promueve a PGE2 para limitar a los IFNs de tipo I
IL-18	IL-18Ralfa, IL-18Rbeta, MyD88, IRAK, NF κ B	Positivo: Puede aumentar la producción de IFN- γ . Regula la acumulación de neutrófilos/monocitos. Induce la producción de IFN- γ en linfocitos T
IL-12p40, p35	IL-12Rbeta1, IL-12beta2, JAK2, TYK2, STAT4	Positivo: Mediadores en la activación, polarización y supervivencia de los linfocitos T. Negativo: La sobreexpresión tiene efectos tóxicos.
IL-23	IL-23R, IL-12Rbeta1, JAK2, TYK2, STAT3	Positivo: Necesario para la producción de IL-17 e IL-22 durante la infección. Negativo: Contribuye a la patología en infecciones crónicas.
IL-27 EBI3, p28	IL-27Ralfa, gp130, JAK1/2, TYK2, STAT1/3	Positivo: Controla la inflamación y reduce la patología. Negativo: Regula la inmunidad protectora limitando la migración y la supervivencia de los linfocitos en el sitio de inflamación
IL-35 p35, EBI3	IL-12Rbeta2, gp130 STAT1/4	Positivo: Regula la disponibilidad de las subunidades de IL-12 e IL-27 Negativo: Función potencialmente regulador
IL-17A/F	IL-17RC, IL-17RA	Positivo: Induce y mantiene los gradientes de quimiocinas para la migración de linfocitos T Negativo: Produce patología vía S100A8/A9 y neutrófilos.
IL-22	IL-22R1, IL-10R2, TYK2, JAK1, STAT3	Positivo: Inducción de péptidos antimicrobianos, promueve la reparación epitelial e inhibe el crecimiento intracelular en MOs

Tabla 3. Efectos positivos y negativos de las quimiocinas producidas en la TB. [Tomado de 44]

Citocina	Receptor/Señal	Efecto en la TB
CCL-3, -4, -5	CCR1	Positivo: Aumenta durante la infección
CCL-2, -7, -12	CCR2	Positivo: Maximiza y organiza la acumulación de MOs y linfocitos T en el pulmón. Negativo: Puede reclutar fagocitos permisivos en el pulmón.
CCL-17, -22	CCR4	Positivo: Media la formación de granulomas en respuesta a antígenos micobacterianos. Negativo: Puede limitar la proliferación de linfocitos T via linfocitos Treg.
CCL-3, -4, -5	CCR5	Positivo: Puede mediar la acumulación de células dendríticas en el nódulo linfoide.
CCL-20	CCR6	Positivo: Expresión de CCR6 en linfocitos T específicos a antígenos de Mtb
CCL-19,-21	CCR7	Positivo: Induce la migración de CDs y la activación de linfocitos T específicos a Mtb
CXCL-1,-2,-3,-5,-6,-7,-8	CXCR1, CXCR2	Positivo: Induce la acumulación de neutrófilos Negativo: La ausencia de CXCR2 o CXCL5 reduce la acumulación de neutrófilos
CXCL-9, -10,-11	CXCR3	Positivo: Requerido para la formación del granuloma. Requerido en el reclutamiento temprano de linfocitos T al pulmón.
CXCL-13	CXCR3	Positivo: Requerido para la localización de los linfocitos T dentro de los granulomas.

8. Células dendríticas

Las CDs son células presentadoras de antígeno que tienen la capacidad de reconocer y fagocitar a Mtb [70]; también son células especializadas en la presentación de antígeno a los linfocitos T por lo que son un puente entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa [71]. Se caracterizan por su morfología y por la expresión de los marcadores CD11c y MHC-II; aunque no hay un marcador de superficie que identifique a todas las CDs debido a que son un grupo heterogéneo de células [72]. Hay dos grupos: las CDs clásicas (cCDs), también llamadas convencionales y las CDs plasmacitoides (pCDs) que tienen como

característica principal la producción de interferones de tipo I como el IFN- α [72]. Se originan a partir de precursores hematopoyéticos localizados en la médula ósea y su diferenciación requiere del factor Flt3L y del factor estimulante de colonias para granulocitos-monocitos (GM-CSF) (Fig. 8) [73].

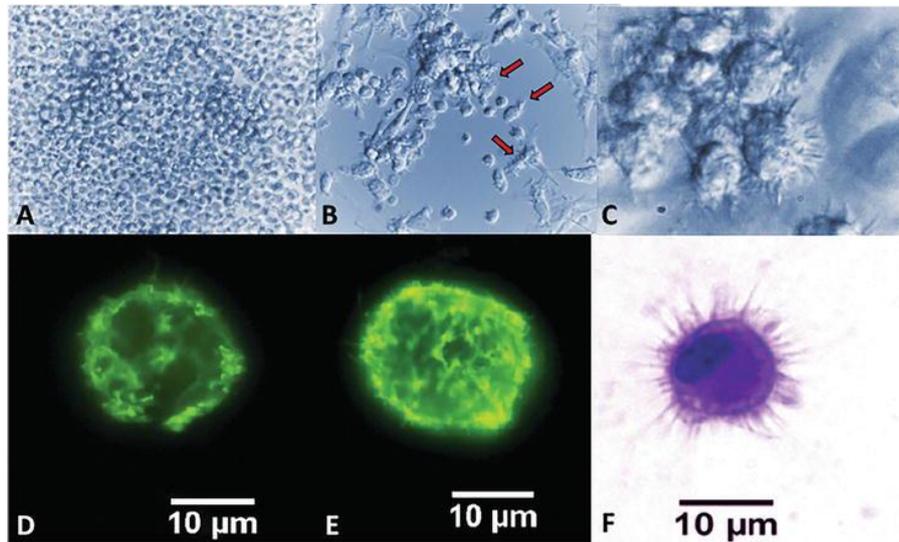


Figura 8. Diferenciación de las CDs a partir de precursores de la médula ósea. Cultivo de células de la médula ósea por 24 h con GM-CSF (A). Cultivo de precursores de médula ósea por 6 días con GM-CSF observándose células con baja adherencia (B) con la capacidad de formar grumos en donde se pueden ver células con proyecciones citoplasmáticas (C). Las CDs inmaduras son positivas para MHCII a los 6 días de cultivo (D). La expresión de esta molécula puede aumentar considerablemente al tratar las CDs con LPS durante 2 h (E). La tinción con azul de toluidina muestra una gran cantidad de proyecciones citoplasmáticas en la célula (F). [Tomado de 62].

Dependiendo del órgano en el que se encuentren, las CDs expresan diferentes marcadores de superficie [72]; en el pulmón expresan CD45⁺ CD103⁺ CD24⁺ CD36⁺ CD11c^{hi} MHC-II^{lo} [52]. Las CDs se encuentran en contacto con el epitelio respiratorio de la nariz, nasofaringe, tráquea, bronquiolos y en el intersticio alveolar. (Fig. 9) [74]. A través de las uniones epiteliales las CDs emiten proyecciones citoplasmáticas que alcanzan la luz alveolar para así entrar en contacto con bacilos localizados en el alveolo [75].

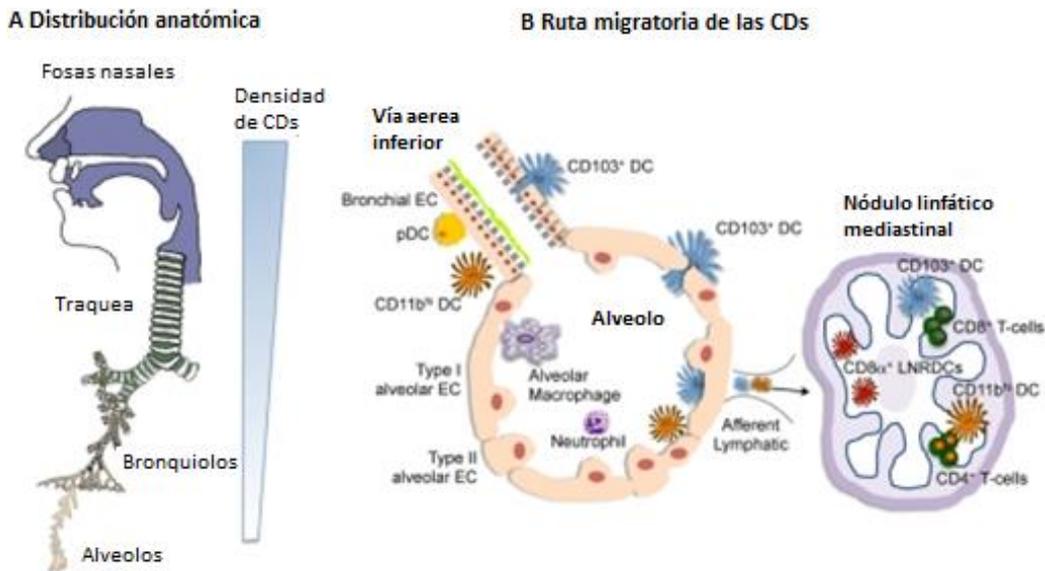


Figura 9. Localización de las CDs en pulmón. Las CDs se encuentran distribuidas en el tracto respiratorio. La densidad poblacional de las CDs disminuye en la parte terminal del tracto respiratorio (A). Hay 2 subtipos de CDs mieloides en la lamina propia: las CD103+ (azul) y las CDs CD11b^{hi} (naranja) además de las CDs plasmacitoides (amarillo) (B). [Tomado de 75].

En el pulmón, las CDs se encuentran en estado inmaduro y poseen receptores que le permiten reconocer y capturar antígenos que lleguen a la luz alveolar y que pueden inducir la maduración de las CDs [75]. Los receptores más importantes son TLRs, el DEC-205 y receptores de tipo C-lectina como el DC-SIGN y el receptor de manosa [76].

Para desarrollar una respuesta inmune efectiva en contra del bacilo las CDs reconocen estructuras asociadas al patógeno (PAMPs) por medio de receptores como TLR-2 y TLR-4 [77]. En la señalización mediada por TLRs están involucradas la cinasa activada por mitógeno (MAPK), el factor nuclear kappa-B (NF-κB) y los factores reguladores de interferón (IRF) [78]. La activación de NF-κB induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-12 e IL-6, lo que induce una respuesta del tipo Th1 [79].

Durante la maduración de las CDs se producen quimiocinas que juegan un papel importante en la respuesta inmune. La expresión de CCR-7, un receptor de quimiocinas, permite a las CDs que han capturado antígeno migrar hacia los

ganglios linfáticos en donde realizan la función de presentación de antígeno a los linfocitos T naive y generar una respuesta inmune adaptativa [80]. Además, las CDs incrementan la expresión de moléculas de presentación de antígeno las cuales son necesarias para llevar a cabo la presentación de estos por medio de la sinapsis inmunológica que consta de tres señales [79].

La primera señal es la presentación de antígenos que ingresan por vía endocítica que son procesados y presentados por el MHC-II a los linfocitos T CD4 [76]; mientras que la presentación de antígenos solubles intracelulares via el MHC-I favorece la respuesta celular mediada por linfocitos T CD8 [81].

La segunda señal es mediada por moléculas de co-estimulación como CD40, un receptor transmembranal que pertenece a la superfamilia de receptores de TNF y que tiene como ligando a CD154, también conocido como CD40L [82]. La señalización producida por la unión de CD40 con su ligando activa múltiples genes importantes en la función de las CDs. La porción citoplasmica de CD40 contiene señales de reclutamiento para proteínas de la familia de factores asociados al receptor de TNF (TRAFs). El reclutamiento de TRAFs resulta en la activación de genes involucrados en la producción de citocinas pro-inflamatorias, y en la expresión de otras moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 [83]. Estas moléculas pertenecen a la familia B7 que al unirse al CD28 en los linfocitos T, promueven la producción de citocinas como la IL-2, además de la activación de genes anti-apoptogénicos [84]. De la misma manera, estas moléculas se pueden unir a CTLA-4, un receptor inducible de las células T lo que resulta en la inhibición de las CDs [85]. CD80 y CD86 se unen a los mismos receptores; mientras que CD86 tiene mayor afinidad por CD28, CD80 la tiene por CTLA-4 [86]. Digiliou y col

demonstraron que la inhibición de CD86 resulta en una mayor activación de los linfocitos T [87].

La tercera señal es mediada por citocinas cuya función es orientar el tipo de respuesta celular que se producirá ya sea del tipo Th1, Th17 o Treg. Las CDs producen citocinas como TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ , IL-8, e IL-6 [88]. Por otro lado el reconocimiento del bacilo puede interferir con la función de las CDs ya que cuando es por medio de receptores tipo lectina puede inhibir su maduración [71]; por ejemplo, el reconocimiento por medio de DC-SIGN induce la producción de IL-10 al bloquear la activación de TNF κ B [89].

9. Células dendríticas en la tolerancia inmunológica.

Además de tener un papel importante en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa, las CDs también participan en su control adoptando un perfil tolerogénico (tCDs) necesario en la tolerancia central y periférica [80]. Estudios hechos en ratón demostraron que la disminución de la población de CDs predispone al desarrollo de enfermedades autoinmunes [90]. En la tolerancia central son eliminados los linfocitos con potencial autoreactivo por medio de la delección clonal; además participan en la diferenciación de linfocitos T reguladores [91]. Esto depende de la presentación de auto antígenos a los linfocitos por medio de las células epiteliales en el timo por las CDs residentes CD8 α ⁺SIRP α ⁻ por medio de células presentadoras de antígeno [92]. Estas células participan presentando supe antígenos endógenos por medio del MHC-II [93]. También puede haber presentación cruzada de antígenos derivados de sangre y antígenos específicos de las células epiteliales del timo [94]. Además de participar en la delección clonal, las CDs tímicas residentes y migratorias seleccionan linfocitos T

reguladores a partir de timocitos. Las CD_s residentes promueven la supervivencia de los linfocitos por medio de la expresión de CD70 que interacciona con CD27 [95].

En lo que respecta a la tolerancia periférica, las CD_s en ausencia de un estímulo inflamatorio pueden presentar auto antígenos a los linfocitos T induciendo anergia y/o apoptosis inducida por activación de Fas, Bim y TNF [96]. Estas células permanecen en un estado inmaduro, expresando marcadores de maduración en bajas cantidades adquiriendo un perfil tolerogénico [97].

La cualidad de mantenerse en un estado inmaduro depende de la dosis, la intensidad de la señal y el tiempo de exposición [98]. Un perfil tolerogénico puede también ser favorecido por citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , prostaglandina E2 y Vitamina D3 [99]. Las tCD_s pueden modular las respuestas efectoras mediadas por los linfocitos T a través de mecanismos como la producción de factores anti-inflamatorios capaces de atenuar los efectos de la respuesta inmune inducida o mediante la activación de linfocitos T reguladores [100].

Por otra parte, se puede inducir tolerancia por la activación prolongada de TLRs como es el caso de TLR-2, en donde se induce la producción de IL-10 y la inducción de linfocitos T reguladores (Treg) [101]. La estimulación persistente vía TLRs produce una respuesta reguladora a largo plazo, lo que ocurre en infecciones persistentes producidas por microorganismos capaces de evadir los mecanismos microbicidas del sistema inmune como es el caso de Mtb [102].

10. Tolerancia mediada por la enzima Indoleamina 2, 3 dioxigenasa y el receptor aril hidrocarburo.

Un mecanismo importante de regulación de la respuesta inmune ejercido por las tCDs es llevado a cabo por la enzima Indoleamina 2, 3 dioxigenasa (IDO) y el receptor aril hidrocarburo (AhR). La IDO es una enzima citosólica que regula la degradación de triptófano a N-formil kinurenina (Fig. 10) [103]. La enzima es codificada por el gen IDO1 localizado en el cromosoma 8 [104]. Hay dos isoformas de la enzima, IDO1 e IDO2, ambas tienen la misma función a diferente escala. En humanos la IDO es expresada por varias células entre las que se encuentran las células endoteliales, fibroblastos, MOs y CDs [105].

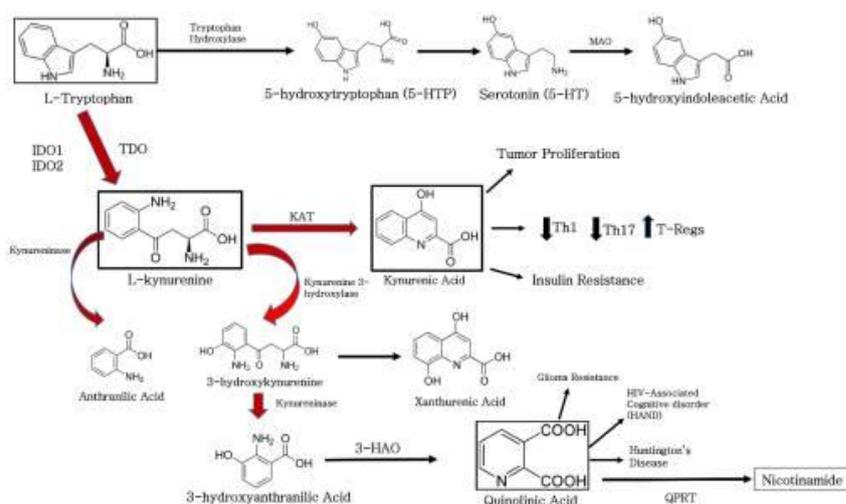


Figura 10. Ruta metabólica del triptófano. Del triptófano obtenido en la dieta, 99% es metabolizado vía IDO y la triptófano 2, 3 dioxigenasa (IDO) para formar productos como la kinurenina (Flechas rojas). Otras enzimas en la ruta metabólica como la kinurenina aminotransferasa (KAT), monoamino oxidasa (MAO), ácido quinólico fosforibosil transferasa (QRPT) y la ácido 3-hidroxi-antranílico oxidasa (HAO) promueven la supresión de la respuesta inhibiendo la función de los linfocitos T pro-inflamatorios e induciendo linfocitos Tregs. [Tomado de 103].

Inicialmente se describió a IDO como parte de un mecanismo para el control de las infecciones que privaba de triptófano a microbios intracelulares en células estimuladas con IFN- γ [106]. Actualmente se ha reconocido su importancia en la generación de tolerancia dirigida a proteger al hospedero de reacciones inmunes

post-infección.IDO participa en mecanismos de evasión de la respuesta inmune por células cancerosas, trasplantes y en la tolerancia materna hacia el feto [107]. La expresión de IDO está regulada por señales pro-inflamatorias como el IFN- α , IFN- γ y TNF- α [108]. La disminución del triptófano induce la activación de la cinasa GNC2 la cual se une al tRNA que no se encuentra cargado; esto disminuye la expresión de la cadena zeta en CD3 de linfocitos CD8 [109], inhibe la diferenciación de linfocitos Th17 [110] e incrementa la proliferación de linfocitos Tregs [107].

La kinurenina favorece la proliferación de los linfocitos Tregs interactuando con el receptor AhR [111]. Este receptor pertenece a la superfamilia de las proteínas con la conformación hélice-bucle-hélice que se encuentra localizado en el citoplasma acoplado a moléculas chaperonas como la proteína de choque térmico 90 (hsp90), p23 y la proteína de interacción con AhR (AIP) [112]. El AhR inicialmente fue descrito en el reconocimiento de contaminantes ambientales, en particular, hidrocarburos poliaromáticos halogenados (HPH) como las dibenzo-p-dioxinas, dibenzo-p-furanos y bifenilos policlorados utilizados en la industria. Entre ellos, el más importante es el 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) que posee propiedades teratogénicas y carcinogénicas; también puede alterar el sistema endocrino y causar hepatotoxicidad en diversos organismos [113].

Una vez que el AhR reconoce a su ligando, se trasloca al núcleo, dimeriza con el traslocador nuclear de AhR (ARNT) e induce la transcripción de genes al unirse al DNA promotor de la región que codifica elementos xenobióticos (XREs) [112]. El producto es la expresión de enzimas del metabolismo de fármacos de fase I y II, siendo citocromo P450 CYP1A1 y CYP1A2 las más importantes; también se promueve la expresión de proteínas relacionadas con la regulación del

crecimiento y diferenciación celular (Fig. 11) [112]. Otro producto es el represor del AhR, que es un componente regulador de la señalización del AhR que bloquea la expresión de genes mediada por XRE [112]. Es complicado el estudio de este receptor debido a que su activación está relacionada con otras vías de señalización, ya sea por citocinas, factores de crecimiento o activación por ligandos como los polifenoles [114].

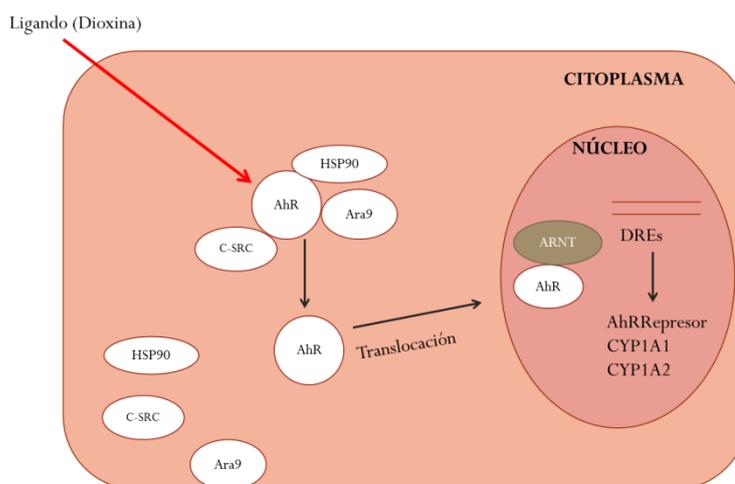


Figura 11. La vía de señalización del AhR. Cuando el ligando atraviesa la membrana plasmática (ej. difusión pasiva) se une al AhR localizado en el citoplasma lo que permite la traslocación del complejo ligando-receptor al núcleo; en el núcleo el AhR heterodimeriza con el ARNT (HIF-1). Este heterodimero reconoce a la secuencia específica en el ADN conocida como la región de respuesta a xenobióticos (XRE, 5'-TA/TGCGTG-3'). AhR-ARNT induce la transcripción de genes reclutando otros componentes como CBP/p300, SRC-1, p160/bHLH-PAS, NCoA2/GRIP1/TIF2 y p/CIP, junto con otros coactivadores como RIP140. Después de ser exportada fuera del núcleo, el AhR es degradado rápidamente en el compartimento citoplásmico por el proteasoma. [Modificado de 111].

Recientemente se han caracterizado varios ligandos sintéticos y naturales para el AhR. Estos pueden tener grandes variaciones en su estructura química y de la misma forma puede variar su afinidad que puede ir de 10^{-12} y 10^{-3} M (Fig. 12) [115]. Así mismo, se han descrito antagonistas del AhR con efectos diversos sobre el sistema inmune incluyendo la promoción de una respuesta de tipo Th1, Th2 y Th17 [116]. En la actualidad, existen diversos antagonistas como la α -naftoflavona [117] o la 6,2',4' Trimetoxiflavona [118]. La activación del AhR en las CDs tiene diversos efectos; por ejemplo, la activación de CDs derivadas de

médula ósea con TCDD altera su diferenciación con disminuyendo la expresión de CD11c, además de inducir la expresión de IDO [119].

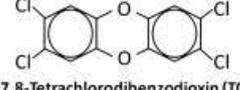
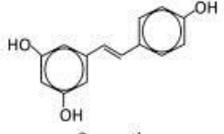
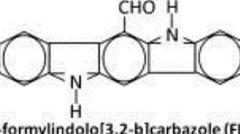
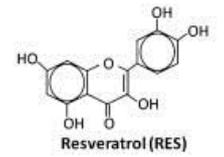
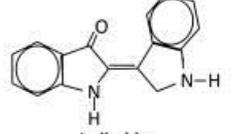
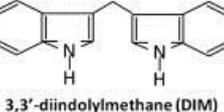
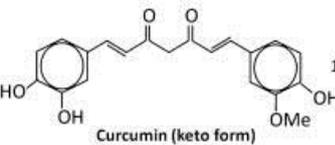
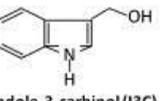
Structure & Name	Binding Affinity	Structure & Name	Binding Affinity
 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD)	1 pM – 10 nM ³⁹⁻⁴⁰	 Quercetin	1 – 20 μM ^{44, 46}
 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)	30 pM – 830 pM ^{10, 43}	 Resveratrol (RES)	1 – 50 μM ^{44, 47}
 Indirubin	1 – 100 nM ⁴²⁻⁴³	 3,3'-diindolylmethane (DIM)	80 nM – 100 μM ⁴⁸⁻⁵⁰
 Curcumin (keto form)	1 – 20 μM ⁴⁴⁻⁴⁵	 Indole-3-carbinol (I3C)	0.1 μM – 200 μM ⁵⁰⁻⁵¹

Figura 12. Estructura y afinidad de ligandos del AhR. Las afinidades de la unión se basan en los valores de la media de la concentración máxima efectiva (EC_{50}) determinada por la inducción o inhibición de la expresión de CYP1A1 [Tomado de 115].

11. Modulación de la respuesta inmune por *M. tuberculosis*

Una de las propiedades que tiene Mtb es su capacidad para evadir los mecanismos de la respuesta inmune y así establecerse de manera latente en el individuo infectado [120]. Muchos de estos mecanismos se desencadenan desde el momento en el que el bacilo es reconocido por las células de la respuesta inmune innata por medio de diversos receptores como los TLRs o los receptores de tipo C-lectina, teniendo como consecuencia diversos efectos en las células fagocíticas (Fig. 13). [121].

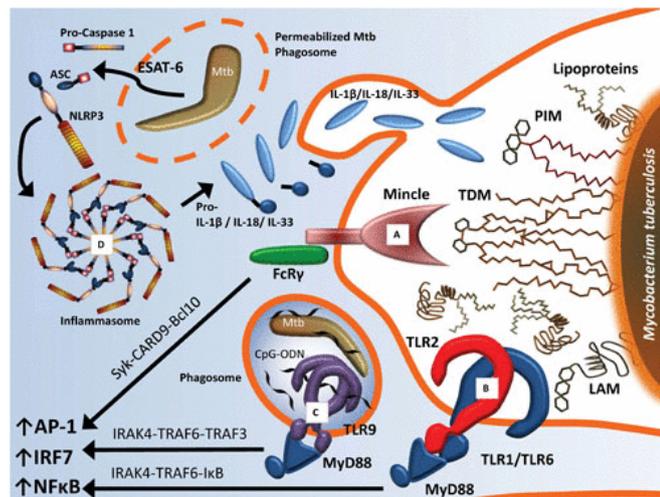


Figura 13. Principales receptores de reconocimiento de Mtb y sus vías de señalización. El primer estímulo que reciben las células del sistema inmune está mediado por el reconocimiento de los glicolípidos que se encuentran en la membrana externa del bacilo. El reconocimiento de moléculas como el factor cuerda por medio del receptor de tipo lectina MINCLE induce la transcripción de genes que promueven un perfil pro-inflamatorio (A). Heterodímeros de TLR-2 con TLR-1 o TLR-6 pueden reconocer lipoproteínas di- y tri-aciladas, lipomananas y lipoarabinomananas, resultando en la activación de NF-κB y la producción de citocinas (B). Fragmentos de ADN del bacilo resultan en la dimerización de TLR-9 dentro de endosomas, lo cual promueve la producción de interferones de tipo I por medio de la activación de IRF7 (C). La permeabilización de la membrana fagosomal, la cual es inducida por ESAT-6, activa a NLRP3 y recluta a ASC y la pro-caspasa-1 para formar el inflamosoma, el cual activa a caspasa-1 y genera las formas activas de IL-1 β , IL-18 e IL-33 que son secretadas (D) [Tomado de 120]

La pared de Mtb, y en particular los glicolípidos que se encuentran localizados en esta estructura, juegan un papel importante tanto en el reconocimiento del bacilo por el sistema inmune como en la estrategia del bacilo para evadir la respuesta inmune [122]. Las LAMs se consideran las moléculas más potentes en la modulación de la respuesta inmune, sobre todo las ManLAMs tienen la capacidad de inhibir la activación de los linfocitos T al reducir la fosforilación de ZAP-70, Lck y LAT en la señalización vía TCR [123]. Las LAMs también puede alterar la fusión fagolisosomal en los MOs [124] y al igual que ManLAM, al unirse a DC-SIGN puede alterar la maduración de las CDs haciendo que estas produzcan IL-10 [125].

Mtb cuenta con una variedad de glicolípidos que contienen trehalosas, que son disacáridos de glucosa no reductores (α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp). Se

encuentran libres en el citosol de la micobacteria o esterificados en una variedad de grupos grasos y sirven como una fuente de almacenamiento de energía y son protectores de estrés [126]. Entre las aciltrehalosas más importantes está el DMT, también conocido como factor cuerda debido a que este glicolípido es responsable del crecimiento del bacilo en forma de cordones [127]. Este lípido es reconocido por el receptor inducible de monocitos tipo C-lectina (Mincle) [128] y se ha descrito que interfiere con la maduración del fagolisosoma en MOs [129]; además de promover la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-12 [130]. Otras trehalosas de interés son DAT y TAT, que se localizan en la pared celular de cepas virulentas del complejo Mtb [131]. DAT y TAT son regulados por el sistema de dos componentes PhoP/PhoR los cuales sirven para mediar señales de transducción para funciones metabólicas o relacionadas con el crecimiento de Mtb [132]; se ha demostrado que la delección del gen *phoP* provoca la disminución de la virulencia sin afectar la viabilidad del bacilo [133]. DAT y TAT también inducen una respuesta inmune humoral, ya que en pacientes infectados con cepas virulentas de Mtb se han encontrado títulos altos de anticuerpos dirigidos contra estos glicolípidos [134]. También se ha demostrado que inhiben la proliferación de linfocitos T inducida por concanavalina A interfiriendo en la vía de señalización MAPK-ERK 1/2 [135]. También disminuyen la expresión de la sintasa de óxido nítrico y la producción de óxido nítrico en MOs [136].

II. HIPÓTESIS

Los glicolípidos micobacterianos DAT, TAT y DMT al ser reguladores de la función de células de la respuesta inmune, pueden modificar la función de las CDs.

III. OBJETIVOS

General

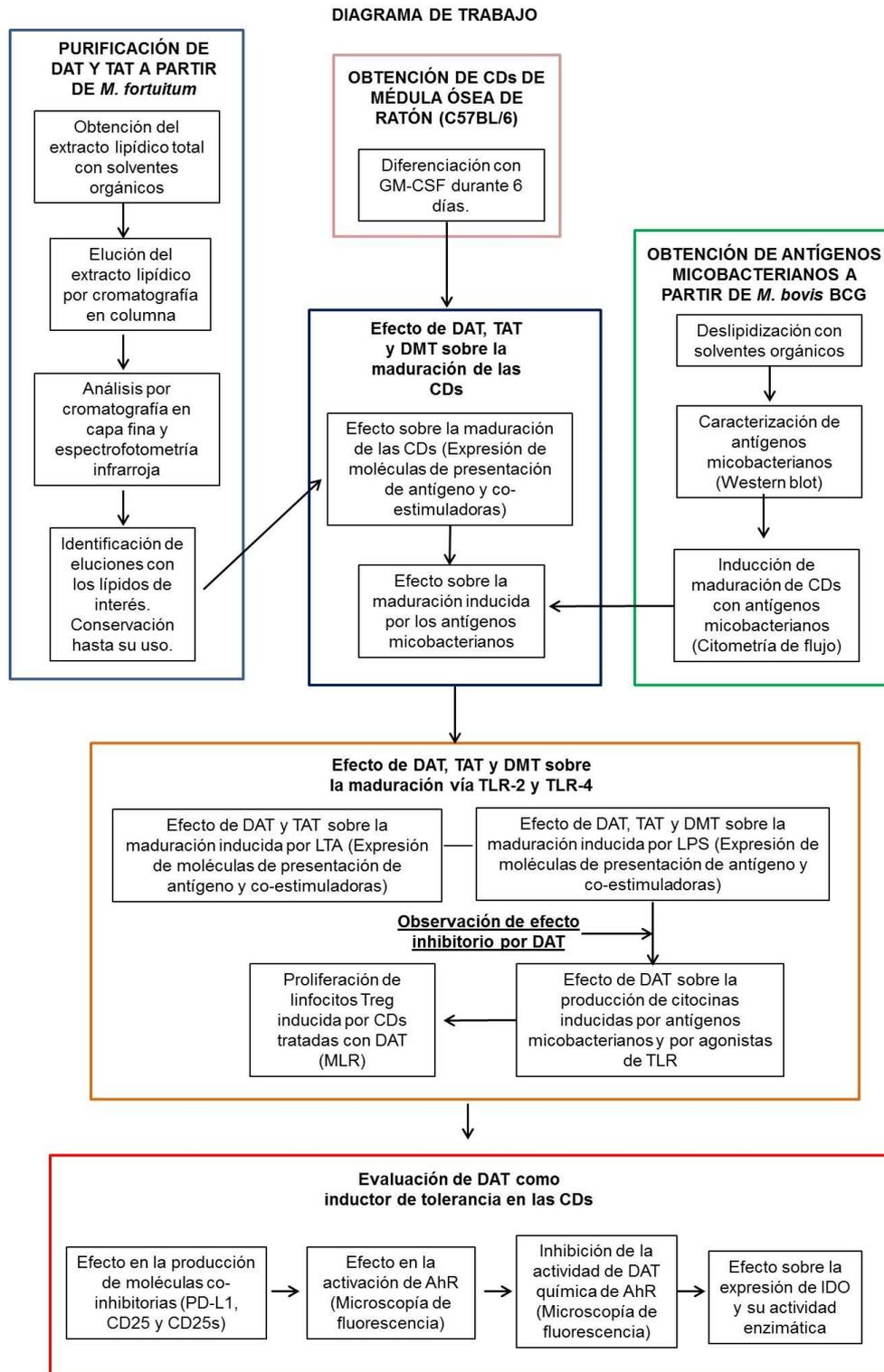
Evaluar el efecto de los glicolípidos micobacterianos DAT, TAT y DMT en CDs de ratón para determinar su posible efecto tolerogénico

Particulares

- Obtener antígenos micobacterianos inductores maduración a partir de paredes de *M.bovis* BCG desprovistas de lípidos
- Purificar los glicolípidos DAT y TAT a partir de *M. fortuitum*
- Estudiar el efecto de los glicolípidos sobre la función de CDs de ratón activadas con antígenos de *M. bovis* BCG y agonistas de TLR-2 y TLR-4 analizando:
 - Inducción de la maduración de las CDs a través de la expresión de moléculas de presentación de antígeno y co-estimuladoras
 - Evaluar la producción autócrina de citocinas
 - Evaluar la producción de moléculas inmunoreguladoras.
 - Caracterizar el fenotipo de linfocitos inducidos por las CDs tratadas con los glicolípidos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presenta el diagrama de flujo seguido con la estrategia metodológica que se empleó para cumplir los objetivos:



1. Purificación de DAT y TAT a partir de *Mycobacterium fortuitum*

Por razones de seguridad biológica y de rendimiento, se utilizó la cepa saprófita *M. fortuitum* ATCC 6841, la cual expresa DAT y TAT con una estructura e inmunogenicidad muy semejante al de Mtb [134]. La cepa fue cultivada en medio Sauton a 37°C durante dos semanas. Transcurrido ese tiempo, los cultivos fueron esterilizados con calor húmedo y se recuperó la biomasa utilizando un papel filtro. Los glicolípidos totales fueron extraídos incubando la biomasa con una mezcla de cloroformo/metanol (JT Baker Center Valley, PA, USA) (1:2, vol/vol) durante 1 hora a 50°C; posteriormente se recuperó la biomasa por filtración, el solvente se recuperó en un matraz y fue evaporado a 70°C. La biomasa recuperada se trató con cloroformo/metanol (2:1, vol/vol) durante 1 hora a 50°C y se recuperó el solvente por filtración para evaporarlo nuevamente. Se juntaron los extractos lipídicos obtenidos en las dos extracciones y se les sometió a un lavado de Folch con la finalidad de eliminar cualquier residuo acuoso, solubilizando los lípidos en una mezcla de cloroformo/metanol/agua (4:2:1 vol/vol/vol). La separación de la fase acuosa y la fase orgánica se realizó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se recuperó la fase orgánica que es en donde se encuentran los glicolípidos. Para purificar a DAT y TAT, el extracto lipídico se disolvió en cloroformo y se aplicó a una columna de vidrio empacada con Florisil (Biotecna Corp., Miami, FL, USA). La cantidad de Fluorisil empleado fue 30 veces el peso del lípido. Los lípidos fueron obtenidos de la columna eluyendo el extracto lipídico total con cloroformo y metanol a diferentes proporciones (Tabla 4); el fraccionamiento de los lípidos fue monitoreado mediante una cromatografía en capa fina (CCF) en placas de Silica-gel 60 F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany) y

como fase móvil se utilizó una mezcla de cloroformo/metanol/agua (60:16:2 vol/vol/vol).

Tabla 4. Perfil de elución en la cromatografía en columna. Por cada volumen se ocuparon 430 mL. En todos los casos los volúmenes hechos para cada elución se recuperaron en el mismo matraz.

Solventes	Proporción	Volumen
Cloroformo-Metanol	100:0	5
Cloroformo-Metanol	98:2	4
Cloroformo-Metanol	95:5	3
Cloroformo-Metanol	92.5:7.5	3
Cloroformo-Metanol	90:10	3
Cloroformo-Metanol	87.5:12.5	3
Cloroformo-Metanol	85:15	3
Cloroformo-Metanol	80:20	3

Los lípidos se visualizaron en la placa con antrona al 2% en H₂SO₄, seguido de calentamiento a 110°C. Las trehalosas aciladas aparecen como lípidos positivos a la reacción con antrona, expresado en manchas de color azul y con un tiempo de retención (Rf) de 0.33 para DAT y 0.66 para TAT [134]. Las fracciones con los lípidos de interés se juntaron y se filtraron en una segunda columna de vidrio empacada con Fluorisil, cuya cantidad fue nuevamente calculada de acuerdo al peso del lípido obtenido. La elución se realizó utilizando cloroformo/metanol a diferentes proporciones. Las fracciones enriquecidas con DAT y TAT fueron eluidas en una columna Sep-Pak (Waters Corp, Milford MA, USA). De estas eluciones se eligieron aquellas que presentaban una mancha única para analizarlas mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en un espectrómetro Vector 33 FTIR (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), equipado con un módulo de reflexión total atenuada. Cerca de 0.5 mg de la muestra se disolvieron en 200 µl de cloroformo/metanol (9:1 vol/vol) y se colocó en la celda. La medición del espectro de absorción se llevó a cabo en un intervalo de número de onda ($\tilde{\nu}$) de 4000-450cm⁻¹. La ausencia de endotoxinas en

las fracciones de DAT y TAT se determinó por la prueba del lisado de amebocitos de Lymulus (LAL) (Lonza Anaheim, CA, USA).

2. *Obtención de CDs inmaduras a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6*

El método de obtención de las CDs es el descrito por Inaba y col [137]. Para ello, se obtuvieron los fémures y tibias de ratones hembra de la cepa C57BL/6L. Se extrajo la médula ósea con una jeringa utilizando medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor a 56°C (Gibco BAL Products USA); las células se colocaron en cajas de cultivo con medio completo, 0.023 mM de bicarbonato de sodio, 10 mM HEPES, 50 µM 2-mercaptoetanol y 20 µg/ml sulfato de gentamicina y se cultivaron toda la noche a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente las células se recolectaron mediante un pipeteo suave y fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue desechado. Las células recuperadas se contaron en una cámara de Neubauer. Enseguida se colocaron 20x10⁶ células en cajas Petri con medio suplementado como se describió anteriormente; adicionalmente se agregó 1000 U/ml de GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) y las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Al tercer día se adicionó a las células 10 ml de medio suplementado con 2000 U/ml de GM-CSF y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Al sexto día se recuperaron las células raspando suavemente las placas y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Las células fueron contadas con la cámara de Neubauer para ser utilizadas en los experimentos. También se analizó la diferenciación de las células por citometría de flujo en un citómetro FACS Calibur (Beckton Dickinson, San Diego CA, USA), utilizando un mAb contra CD11c (PE, Biolegend, San Diego CA, USA) y MHC-II (APC, Tonbo biosciences, San Diego CA, USA). La viabilidad de

las CDs se verificó por medio de la exclusión de azul tripano y por citometría de flujo se determinó la apoptosis y necrosis utilizando mAbs anti-Anexina V (FITC) y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) (Biolegend, San Diego CA, USA).

3. *Obtención de antígenos micobacterianos inductores de maduración de las CDs a partir de Mycobacterium bovis BCG.*

Se ha demostrado que *M. bovis* BCG puede inducir la maduración de las CDs [138]. Por ello decidimos obtener antígenos micobacterianos de *M. bovis* BCG (antígenos de BCG) con la capacidad de inducir la maduración de las CDs. Debido a que *M. bovis* BCG posee glicolípidos que pueden afectar la maduración de las CDs [139]. Realizamos el mismo tratamiento de deslipidización utilizado con *M. fortuitum*. Se obtuvo la biomasa de *M. bovis* BCG y se eluyeron los glicolípidos con solventes no polares. Por CCF se confirmó la presencia de los glicolípidos en los extractos polares. Para obtener los glicolípidos micobacterianos, la biomasa sobrante fue tratada con un sonicador (Sonics Vibra Cell. Newton, CT, USA). Los antígenos fueron caracterizados por medio de un Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-BCG.

4. *Ensayos para estudiar el efecto del DAT, TAT y DMT sobre la maduración de las CDs*

Para estudiar el efecto de los glicolípidos sobre la maduración de las CDs, los lípidos fueron disueltos en hexano/etanol (1:1 vol/vol) y se agregaron 10 µg de los glicolípidos purificados por cromatografía en columna y de DMT (Sigma-Aldrich St. Louis MO. USA) en cajas de cultivo de 24 pozos y el solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente; esta concentración se tomó en base al antecedente de la estandarización de DAT realizada en el trabajo de maestría [140] Posteriormente, se agregó a los pozos un volumen de 500 µl de medio completo, al cual se le

adicionaron 5×10^5 CDs obtenidas a los 6 días de cultivo y se incubaron durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la expresión de moléculas de presentación de antígeno y moléculas coestimuladoras por citometría de flujo. La expresión de moléculas se estudió en células CD11c⁺. Los mAbs utilizados para marcar las moléculas fueron las siguientes:

mAb	Fluorocromo	Clona	Proveedor
CD11c	PE	N418	Tonbo biosciences
MHC-I	APC	A16.88.5.53	Ebioscience
MHC-II	APC	M5/114.15.2	Tonbo biosciences
CD40	PE/Cy5	3/23	Biolegend
CD80	PE/Cy5	2D10	Biolegend
CD86	APC	GL-1	Tonbo biosciences

5. *Inducción de la maduración de las CDs con antígenos de BCG*

Para inducir la maduración de las CDs con los antígenos deslipidizados de BCG, se estandarizó la cantidad de antígenos a utilizar de manera que estos indujeran la maduración de las CDs y no causaran apoptosis o necrosis en las células. Para ello, las CDs obtenidas al 6to día de cultivo fueron colocadas con medio RPMI completo a una concentración de 1×10^6 células/ml en cajas de 24 pozos. A las células se les agregó una concentración de 10, 20 y 50 µg y se incubaron durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Por citometría de flujo se evaluó la maduración utilizando a CD40 como marcador. Por otra parte se evaluó la viabilidad de las células utilizando Anexina V y 7-AAD. En análisis se realizó en células CD11c⁺.

6. *Efecto de los glicolípidos sobre la maduración inducida por antígenos micobacterianos*

Para evaluar el efecto de los glicolípidos sobre la maduración inducida por los antígenos de BCG, las CDs fueron pre-incubadas con 10 µg de los glicolípidos en cajas de 24 pozos durante 1 h a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se agregaron 10 µg de antígenos de BCG y las células se incubaron durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la expresión de moléculas de presentación de antígeno y moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo. La expresión de moléculas se estudió en células CD11c⁺.

7. *Efecto de los glicolípidos sobre la maduración inducida por agonistas de receptores tipo Toll*

En la infección por Mtb las CDs pueden madurar gracias a que el bacilo cuenta con antígenos que pueden ser reconocidos por los receptores tipo Toll; siendo en la TB TLR-2 y TLR-4 los más importantes en el reconocimiento del bacilo [141]. Para ello se utilizaron agonistas de estos receptores para inducir la maduración de las CDs. Como inductor de TLR-2 se utilizó al ácido lipoteicoico de *Staphylococcus aureus* (LTA) (Sigma-Aldrich. St. Louis MO. USA). Como inductor de TLR-4 se utilizó el lipopolisacárido de *Escherichia coli* B55:05 (LPS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Para evaluar el efecto de los glicolípidos sobre la maduración inducida por los agonistas de TLR, las CDs fueron incubadas durante 1 h con el glicolípidos, posteriormente a las células se les agregó 1 µg de los agonistas. Por citometría de flujo se evaluó la expresión de moléculas de presentación de antígeno y co-estimuladoras en células CD11c⁺.

8. *Análisis del perfil de citocinas generado en CDs tratadas con los glicolípidos*

Para caracterizar la producción de citocinas en las CDs tratadas con los glicolípidos, se analizaron los sobrenadantes de las CDs sin tratamiento y las que fueron incubadas con los glicolípidos, los antígenos de BCG, los agonistas de TLR y la combinación de los glicolípidos con los inductores de maduración. Debido a que la producción de citocinas es un fenómeno dinámico que cambia con el tiempo pasando de un perfil pro-inflamatorio a uno anti-inflamatorio [142], los sobrenadantes se tomaron a las 6 y 24 horas de incubación. Las citocinas se analizaron utilizando kits para TNF- α , IL-12 e IL-10 (Biolegend. San Diego CA, USA) y la determinación se hizo según las instrucciones del fabricante.

9. *Análisis del perfil tolerogénico de las CDs*

Para determinar el posible perfil tolerogénico que produce DAT en las CDs se evaluó la producción de PD-L1, una molécula expresada por las CDs y que tiene importancia en la regulación de la respuesta inmune induciendo apoptosis en los linfocitos al reconocer el ligando que estos tienen [143]. Para ello se midió la expresión de PD-L1 en las CDs tratadas con los lípidos por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (PE/Cy7, Biolegend San Diego CA, USA). Otra molécula reguladora estudiada fue el CD25 soluble (sCD25) y de membrana (mCD25). CD25 es la sub-unidad alfa del receptor de IL-2, una citocina de suma importancia en la proliferación de los linfocitos efectores o reguladores [144]. Se ha reportado que el CD25 expresado por las CDs tiene efectos inmunoreguladores, especialmente la forma soluble ya que esta puede competir por la IL-2 que se encuentra en el medio [145]. El análisis del mCD25 se hizo por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD25 (PE/Cy7, Tonbo

biosciences, San Diego CA, USA). En el caso del sCD25, se estudió utilizando el método de ELISA utilizando como anticuerpo de captura un anticuerpo anti-CD25 (Clona PC61.5, eBiosciences San Diego CA, USA) y a un anticuerpo anti-CD25 marcado con biotina como anticuerpo detección (Clona 7D4 eBiosciences San Diego CA, USA); también se utilizó un estándar de sCD25 (Biolegend. San Diego CA, USA) para hacer la curva estándar.

10. Análisis de la activación del receptor Aril hidrocarburo

El receptor Aril hidrocarburo es un receptor intracelular que se encuentra en el citosol y que al activarse se trasloca al núcleo dando como consecuencia la expresión de proteínas de la familia del citocromo P450 y laIDO [146]. Para determinar la activación del AhR se analizó la expresión y traslocación del receptor al núcleo por microscopía de fluorescencia. Para ello, las CDs fueron tratadas con DAT durante 24 h. Posteriormente las CDs se recuperaron y se fijaron con buffer de fijación/permeabilización (Biolegend San Diego CA, USA) durante 20 min en oscuridad. Posteriormente las células se centrifugaron, lavaron y fueron tratadas con buffer de permeabilización (Biolegend San Diego, CA USA). Las CDs se marcaron con anti-AhR (AlexaFluor 488 eBiosciences. San Diego CA, USA). Por cytospin, las CDs se montaron en laminillas con el medio de montaje VectaShield con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Abcam, Cambridge UK) Las laminillas se observaron con un microscopio de fluorescencia.

11. Análisis de la expresión y actividad enzimática de la Indoleamina 2, 3 dioxigenasa

Uno de los mecanismos de inducción de tolerancia en las CDs se encuentra mediado por la enzimaIDO, la cual tiene la función de convertir al L-triptófano en

L-kinurenina [147] En este trabajo se evaluó la expresión y la actividad enzimática de la IDO, para ello las CDs fueron tratadas con DAT y con los inductores de maduración durante 24 h en medio RPMI completo. Para medir la expresión, las CDs fueron recuperadas y lisadas con buffer RIPA; las proteínas obtenidas fueron incubadas con un anticuerpo anti-IDO (Clona mIDO-48 Biologend San Diego CA, USA) durante toda la noche. Para determinar la actividad enzimática, a las CDs tratadas se les retiró el medio RPMI y este fue remplazado por solución de Hanks (NaCl 0.137M, KCl 5.4M Glucosa1g, Na₂PO₄ 0.025mM, KH₂PO₄ 0.44mM, CaCl₂ 1.3mM, MgSO₄•7H₂O 1mM, NaHCO₃ 42mM) y se les agregó 100 mM de L-triptófano (Sigma-Aldrich St. Louis MO. USA), el cual funciona como sustrato de la IDO, y las CDs se incubaron nuevamente a 37°C. A los 15, 30, 60 y 120 min se recuperaron 50 µl del sobrenadante y estos se trataron con la misma cantidad de ácido tricloroacético y se centrifugaron a 8000 g durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se colocó en una placa de 96 pozos. A 50 µL de las muestras se les agregó la misma proporción de reactivo de Ehrlich (2%) en ácido acético glacial. Al tener un cambio de coloración a amarillo, la placa se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. Para preparar la curva estándar se utilizó un estándar de L-kinurenina (Sigma-Aldrich St. Louis MO. USA) a concentraciones de 30, 50, 80 y 100 mM.

12. *Inhibición del química del AhR*

Se ha descrito que el AhR es un receptor que cuenta con una gran variedad de ligandos que provocan su activación. Uno de los más importantes es la 2,3,7,8 Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) la cual es utilizada como activador del AhR. También se han descrito antagonistas que contrarrestan el efecto de la

TCDD, entre ellos se encuentran la alfa-naftoflavona (α -NF) y la 3,5,7 Trimetoxiflavona (TMF). Para saber si el AhR tiene una participación en el efecto tolerogénico que produce DAT, se hicieron experimentos de inhibición de este receptor con los antagonistas mencionados. Para ello se utilizaron las CDs fueron tratadas con 50 mM de los inhibidores α -NF y TMF durante 1 hora incubándolas a 37°C. La concentración indicada es la que está reportada en la literatura. Posteriormente las CDs fueron sembradas en cajas de 24 pozos de baja adherencia con medio RPMI en las mismas condiciones de incubación. Las células fueron tratadas con DAT (10 μ g), paredes de *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) (20 μ g) y LPS (1 μ g). El efecto de la inhibición se evaluó por citometría de flujo midiendo la expresión de CD40, cuya expresión se ve afectada por DAT.

13. Análisis de la proliferación de linfocitos T

Para evaluar la capacidad de las CDs tratadas con DAT para inducir la proliferación de linfocitos T reguladores, se realizó la reacción mixta de linfocitos (MLR) utilizando linfocitos obtenidos del bazo de ratones C57BL/6 que expresan la proteína verde fluorescente como gen reportero de la expresión de FoxP3, el marcador de linfocitos T reguladores. Los bazos fueron perfundidos en medio RPMI, y las células fueron tratadas con solución de lisis para eliminar los eritrocitos (EDTA 1 mM, KHCO₃ 0.01 M, NH₄Cl 1.7M en H₂O, pH=7.3) a temperatura ambiente con pipeteo constante. Posteriormente las células fueron contadas y marcadas con el anticuerpo anti-CD4 (PE) para purificar los linfocitos T; la incubación se llevo a cabo durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células también fueron marcadas con Dye eFluor 670 (eBiosciences, San Diego CA, USA) un marcador que permite evaluar la proliferación de células; el marcaje

se realizó durante 5 min. Las células se recuperaron por medio de un cell sorting en un citómetro FACS Aria (Beckton Dickinson, San Diego CA, USA). Las células recuperadas fueron aquellas que tuviesen la marca CD4⁺Dye670⁺. Los linfocitos purificados fueron incubados en una placa de 96 pozos en proporción 10:1 con las CDs, es decir: 2.5x10⁵ linfocitos con 2.5x10⁴ CDs tratadas con los glicolípidos, así como con la combinación de estos con los inductores de maduración de las CDs en 200 µl de medio RPMI 10% SFB, también se les agregó 60 unidades internacionales/mL de IL-2 y se incubaron 3, 5 y 7 días a 37°C con 5% de CO₂, pasado el tiempo de incubación se recuperaron los linfocitos y se incubaron con un anticuerpo anti-CD25 para determinar la proliferación de linfocitos T cooperadores (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻) y reguladores (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) respectivamente.

14. *Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism (versión 5.01, San Diego, CA, USA). Los valores de significancia fueron calculados mediante la prueba t Student pareada con un valor de P<0.05.

V. RESULTADOS

1. Purificación de DAT y TAT a partir de *M. fortuitum*

Para la obtención de los glicolípidos DAT y TAT, se utilizó a *M. fortuitum* ya que es una bacteria de rápido crecimiento y baja virulencia. Para obtener los glicolípidos, la biomasa de *M. fortuitum* fue deslipidizada con una mezcla de solventes orgánicos. A partir de ese extracto, se purificó DAT y TAT por cromatografía en columna utilizando una mezcla de solventes orgánicos para eluir los lípidos. El monitoreo de las eluciones obtenidas se realizó por TLC (Fig. 14A). Las eluciones enriquecidas con los lípidos de interés se identificaron en base a la reacción con la antrona que resulta en una mancha de color azul y al valor Rf obtenido, en este caso de 0.33 y 0.66 para DAT y TAT respectivamente. Las eluciones fueron tratadas en columnas Sep-pak para hacer la purificación de los lípidos DAT y TAT. Se trabajó con las eluciones en donde se encuentran las manchas únicas de color azul y con el valor Rf correspondiente para cada lípido (Fig. 14B y C).

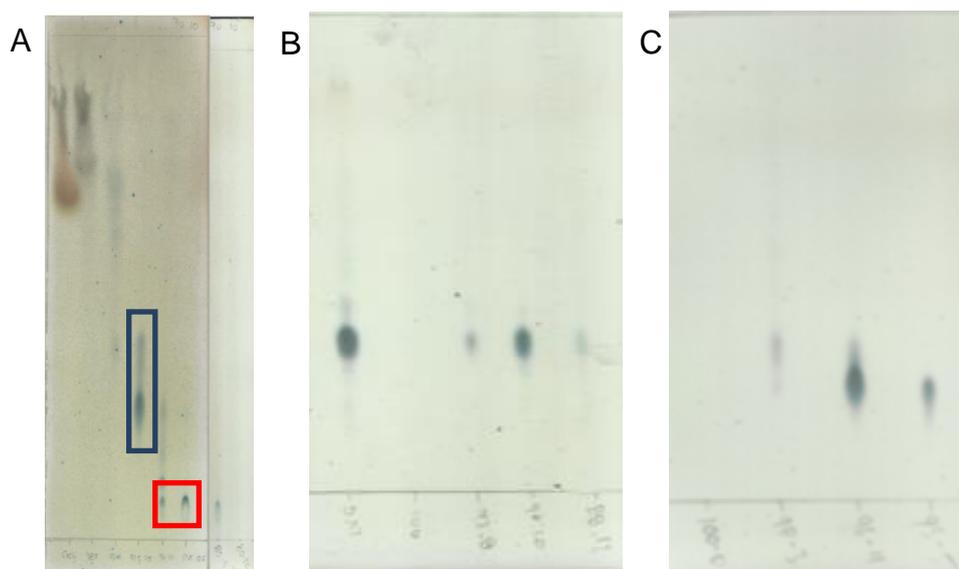


Figura 14. Purificación de DAT y TAT por cromatografía en columna. La purificación se hizo en una columna con Fluorisil como fase estacionaria y la mezcla de solventes orgánicos (cloroformo y metanol) con un aumento gradual en la polaridad donde se encontraron fracciones enriquecidas con TAT (marco azul) y DAT (marco rojo) (A). Los extractos enriquecidos con DAT (B) y TAT (C) fueron eluidos en columnas Sep-pak por separado para purificar estos lípidos

Finalmente, se caracterizó a DAT y a TAT mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Ambos espectros comparten bandas características de lípidos glicosilados. Las bandas características a 3320 y 3350 cm^{-1} indican la presencia de un enlace oxígeno-hidrógeno en los grupos hidroxilo (-OH) en los compuestos azucarados de DAT y TAT, respectivamente. Las bandas con un $\tilde{\nu}$ de 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} fueron asignadas a los grupos alifáticos metileno (-CH₂-) y metilo (-CH₃) respectivamente. El pico localizado al $\tilde{\nu}$ de 1647 cm^{-1} indica la presencia de grupos ester-carboxilo (-CO-O-). Finalmente, la banda característica de las trehalosas aciladas se encuentra en la región que va del valor de $\tilde{\nu}$ 1500 a 500 cm^{-1} (Fig. 15). Finalmente, los lotes obtenidos de DAT y TAT fueron analizados para descartar la presencia de endotoxinas mediante la prueba de LAL; el nivel de endotoxinas fue indetectable.

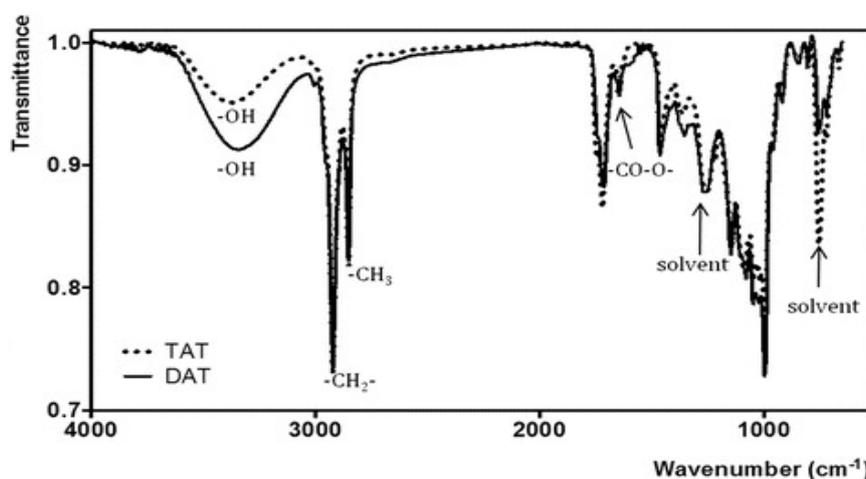


Figura 15. Caracterización de DAT y TAT mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. El espectro obtenido muestra bandas a una $\tilde{\nu}$ de 3320 y 3350 cm^{-1} , característicos de grupos hidroxilo (-OH); hay bandas de absorción a una $\tilde{\nu}$ de 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} que corresponden a los grupos alifáticos metileno (-CH₂-) y metilo (-CH₃). La banda con una $\tilde{\nu}$ de 1647 cm^{-1} indica la presencia de grupos ester-carboxilo (-CO-O-). En la región de con valores de $\tilde{\nu}$ de 1500 a 500 cm^{-1} se obtienen bandas características de las acil trehalosas.

2. Obtención de antígenos micobacterianos inductores de maduración de las CDs a partir de *M. bovis* BCG

Con el propósito de tener un inductor de maduración de las CDs que sirviera de control positivo, se utilizaron paredes de *M. bovis* BCG obtenidas por sonicación de los bacilos. Debido a que la pared de *M. bovis* BCG posee glicolípidos que pudieran tener un efecto sobre la maduración de las CDs, la biomasa fue deslipidizada de la misma manera que la biomasa de *M. fortuitum*. Al hacer el corrimiento del extracto lipídico y revelarlo con antrona se observó la presencia de diversos glicolípidos (Fig. 16A). Posteriormente, la estructura antigénica de las paredes se estudió por western-blot, con un anticuerpo policlonal anti-BCG. El análisis de las paredes que no fueron tratadas con las paredes (carril 1) muestra una menor presencia de antígenos en comparación de las paredes tratadas con los solventes (carril 2), por ello se decidió trabajar con estos sonicados en los siguientes experimentos (Fig. 16B).

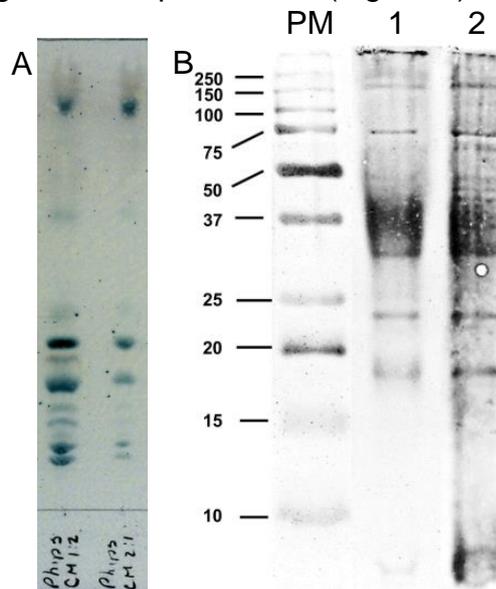


Figura 16. Obtención de antígenos micobacterianos de paredes de *M. bovis* BCG. Utilizando solventes orgánicos, los glicolípidos de la pared de *M. bovis* BCG fueron removidos. El análisis por TLC muestra la presencia de glicolípidos (A). Por Western-blot, se observa la presencia de antígenos micobacterianos en donde se observa una mayor presencia de antígenos en las paredes deslipidizadas (carril 2) (B).

Una vez obtenidos los antígenos micobacterianos, se estandarizó la cantidad a utilizar para inducir la maduración de las CDs. Como criterio de elección se evaluó el índice medio de fluorescencia (IMF) para evaluar la expresión de CD40 como indicador de maduración. Adicionalmente se analizó la capacidad de generar apoptosis y necrosis. Estos indicadores se evaluaron por citometría de flujo; para hacer el análisis se hizo una ventana en el dot plot de tamaño (FSC-H) vs granularidad (SSC-H) para excluir a los restos celulares. De esta población se hizo el análisis en la población CD11c⁺ (Fig. 17A) y se hizo el análisis de la intensidad de fluorescencia para CD40 (Fig. 17B) y el porcentaje de apoptosis (Anexina V) (Fig. 17C) y necrosis (7-AAD) (Fig. 17D). Se utilizó 1 µg de LPS para comparar la maduración de las CDs. El resultado obtenido muestra que una concentración de 10 µg de paredes indujeron la maduración de las células al mismo nivel que el LPS (Fig. 17E); así mismo los niveles de apoptosis y necrosis que provocan son los mismos que las células sin tratamiento (Fig. 17F, G). Esta concentración fue utilizada en los siguientes experimentos.

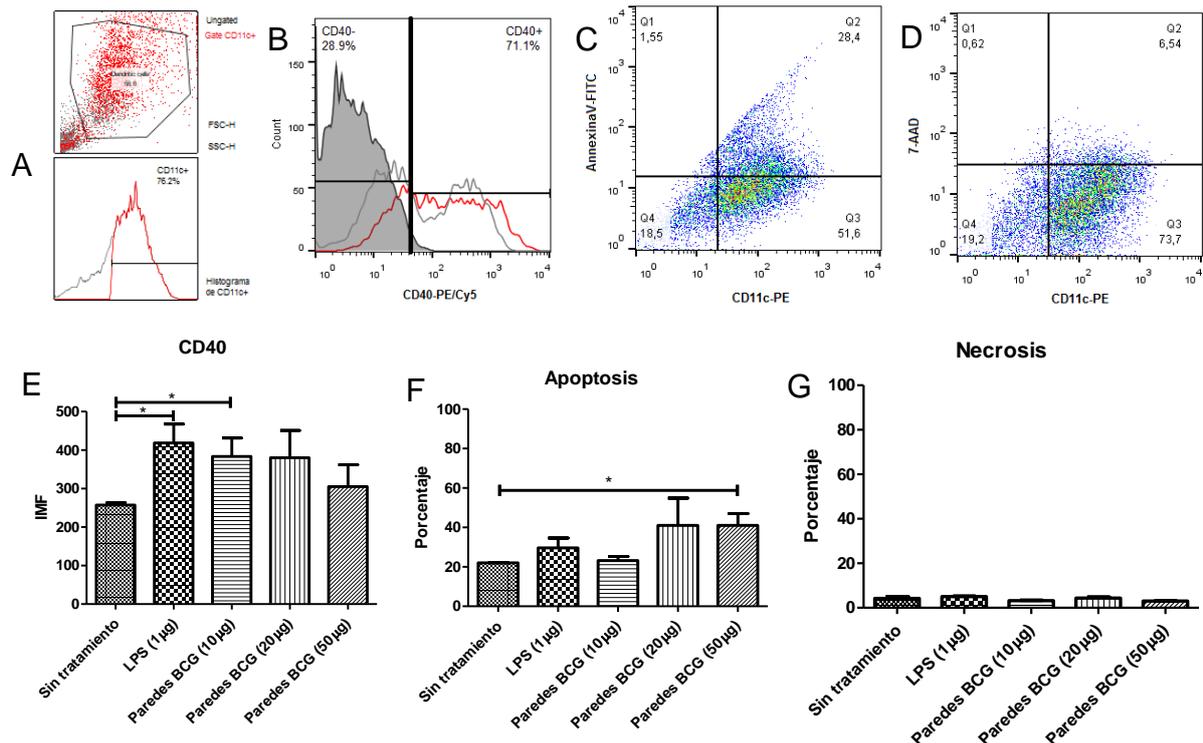


Figura 17. Inducción de maduración de las CDs con paredes de BCG deslipidizadas. Se estandarizó la concentración de paredes de BCG para inducir la maduración de las CDs y no inducir la muerte de las células por citometría de flujo (A-D). Se evaluó el índice medio de fluorescencia de CD40, siendo la línea roja el estímulo con 10 µg de antígenos y línea gris las CDs sin tratamiento (B, E), y los porcentajes de apoptosis y necrosis (F, G). Análisis por t Student no pareada $P < 0.05$. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes expresados como media \pm SEM.

3. Efecto de DAT, TAT y DMT sobre la maduración de las CDs

Se evaluó el efecto de los glicolípidos purificados y del DMT sobre la maduración de las CDs y se comparó con la maduración inducida por los antígenos de BCG. Para ello se hizo el análisis por citometría de flujo; la estrategia de análisis se realizó midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de MHC-I, MHC-II, CD40, CD80 y CD86 en células CD11c+ (Fig. 18A, B), y se determinó el incremento de esta con respecto a las CDs sin tratamiento. Los resultados obtenidos muestran que los glicolípidos no afectaron significativamente la expresión de MHC-I y MHC-II (Fig. 18C, E). En el caso de CD40 se observó que DMT incrementó significativamente su expresión ($***P < 0.0001$) (Fig. 18E). Aunque no hubo cambios para CD80 (Fig. 18F), TAT y DMT incrementaron

significativamente la expresión de CD86 (*P=0.0134 y **P=0.0047 respectivamente) (Fig. 18G).

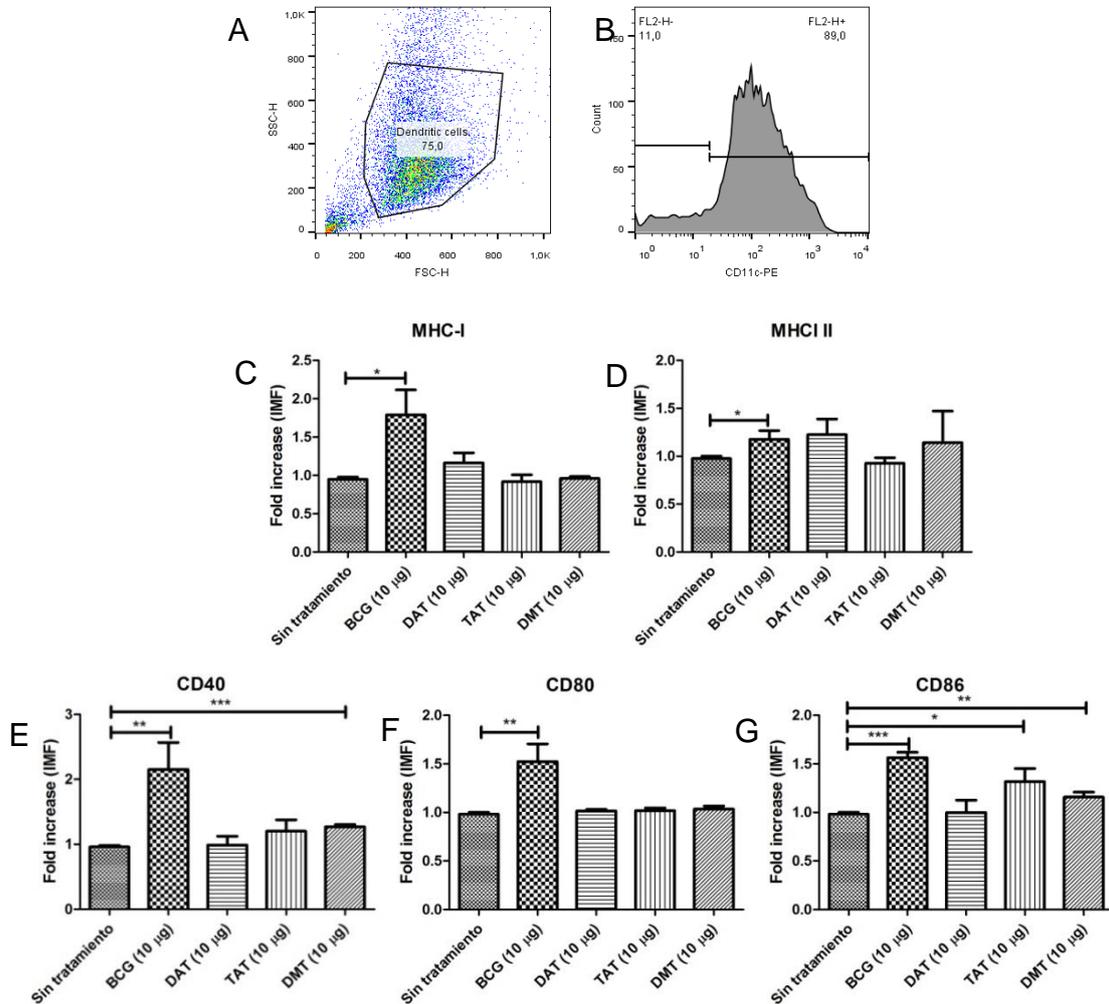


Figura 18. Efecto de los glicolípidos micobacterianos sobre la maduración de las CD. Para medir la expresión de moléculas de presentación de antígeno y co-estimuladoras, la estrategia de análisis utilizada fue a partir de la población “Dendritic cells” en el dot plot FSC-H/SSCH (A); de esta población se separaron las células CD11c⁺ (B). El análisis del incremento de la intensidad de fluorescencia sobre los niveles basales muestra que los tres glicolípidos no afectan la expresión de MHC-I, MHC-II (C y D); mientras que DMT incrementa la expresión de CD40 y CD86 (E, G). TAT también tuvo efecto en la expresión de CD86 (F). Análisis por t Student no pareada P<0.05. Los datos son el promedio de cuatro experimentos independientes expresados como media ± SEM.

Posteriormente se estudió el efecto que tienen los glicolípidos sobre la maduración inducida por BCG. Se observa que todos los glicolípidos disminuyeron la expresión de MHC-I, pero TAT la disminuyó de manera significativa (*P=0.0197) (Fig. 19A). En MHC-II no se observaron efectos (Fig. 19B). Para CD40, DAT y TAT disminuyeron la expresión de esta molécula aunque

no de manera significativa; sin embargo DMT incrementó notablemente la expresión de la misma (Fig. 19C). En el caso de CD80 TAT disminuyó significativamente la expresión de esta molécula (*P=0.0163) y DMT aumentó considerablemente la expresión de esta (Fig. 19D). Para CD86 sólo DMT tuvo un efecto sinérgico con las paredes de BCG incrementando significativamente la expresión de esta molécula (*P=0.0028) (Fig. 19E). Estos resultados muestran que tanto DAT y TAT pueden tener un efecto inhibitorio sobre los antígenos micobacterianos, mientras que DMT puede tener un efecto sinérgico en la producción de moléculas co-estimuladoras. Por otra parte, los antígenos micobacterianos son una mezcla de antígenos que tienen diversos efectos sobre la respuesta inmune tanto inmunosupresores como inmunogénicos.

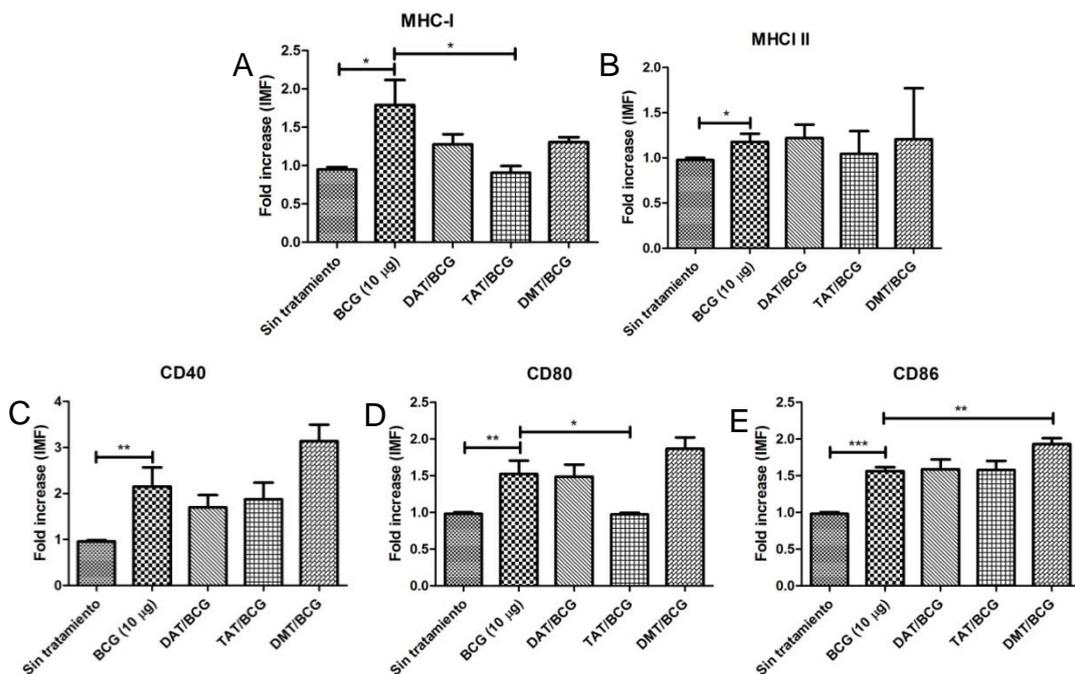


Figura 19. Efecto de los glicolípidos micobacterianos sobre la maduración inducida con paredes de BCG. Por citometría de flujo se analizó la expresión de moléculas de presentación de antígeno y co-estimuladoras en células CD11c⁺. El análisis del incremento de la intensidad de fluorescencia sobre el efecto inducido por los antígenos de BCG muestra que TAT disminuye significativamente la expresión de MHC-I (A), y CD80 (D); mientras que DMT incrementa notablemente CD40 y CD86 (C, D) y significativamente a CD86 (E). Análisis por t Student no pareada P<0.05. Los datos son el promedio de cuatro experimentos independientes expresados como media ± SEM.

4. Efecto de DMT, DAT y TAT sobre la maduración inducida por agonistas de TLR en las CDs

M. tuberculosis cuenta con antígenos que pueden activar a las CDs por medio de receptores tipo Toll, en particular a TLR-2 y TLR-4. Por citometría de flujo, se realizaron estudios del efecto de DAT, TAT y DMT sobre la maduración de la CDs inducida por LPS que es un activador de TLR-4, evaluando la expresión de las moléculas de presentación de antígeno y moléculas co-estimuladoras. En el caso de DMT, se observa que este glicolípido incrementó de manera discreta la expresión de MHC-I (Fig. 20A). Sin embargo no tuvo efecto en las otras moléculas inducidas por LPS.

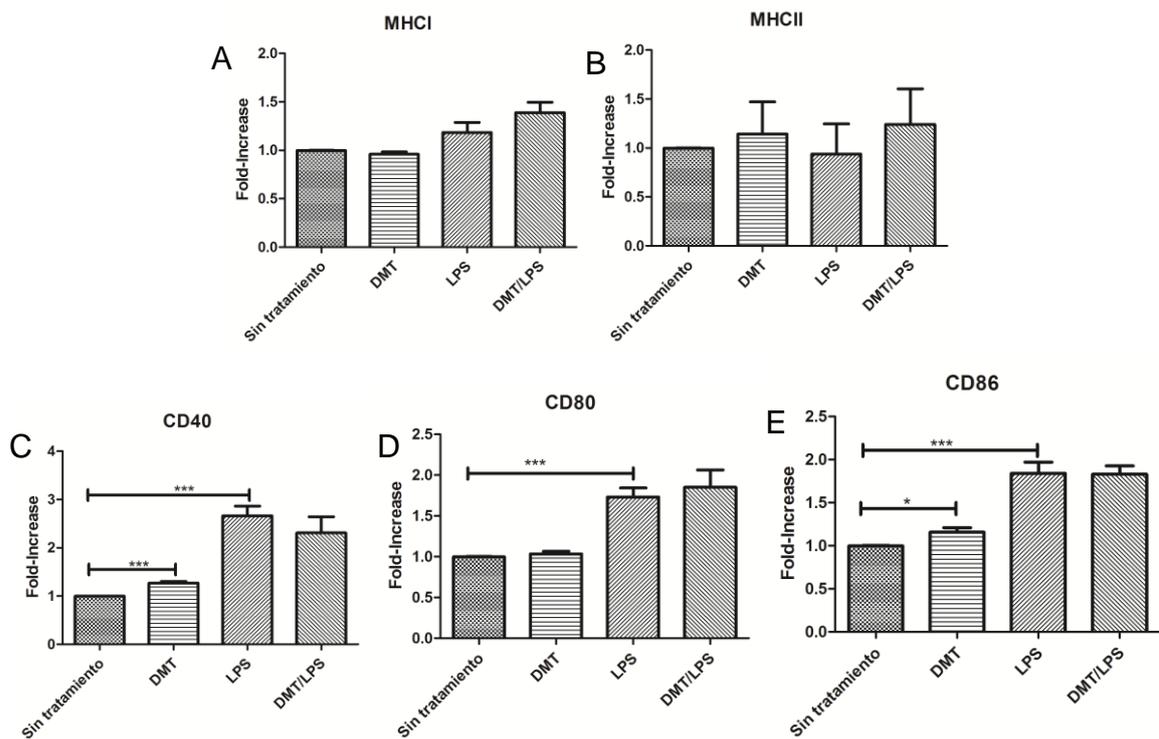


Figura 20. Efecto del DMT sobre la maduración de CDs inducida por LPS. Por citometría de flujo se analizó la expresión de moléculas de presentación de antígeno y co-estimuladoras en células CD11c⁺. El análisis del incremento de la intensidad de fluorescencia sobre el efecto inducido por LPS en donde se observa que DMT no tienen un efecto sobre la maduración de las CDs. Análisis por t Student no pareada $P < 0.05$. Los datos son el promedio de siete experimentos independientes expresados como media \pm SEM.

Además de evaluar el efecto sobre la maduración de LPS también se evaluó el efecto de DAT y TAT sobre la maduración inducida por el LTA que es un

activador de TLR-2. En cuanto a TAT se observó que solamente disminuyó la expresión de CD40 inducida por LPS (Fig. 21C).

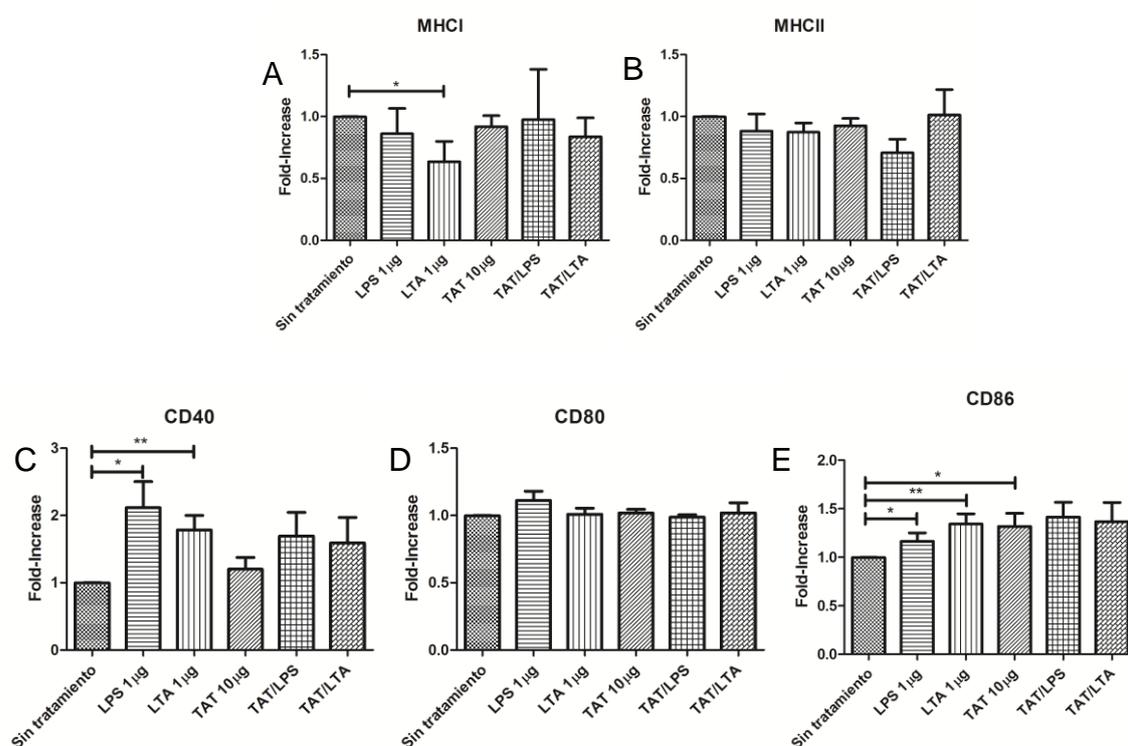


Figura 21. Efecto del TAT sobre la maduración de CDs inducida por agonistas de TLR. Por citometría de flujo se analizó la expresión de moléculas de presentación de antígeno y co-estimuladoras en células CD11c⁺. El análisis del incremento de la intensidad de fluorescencia sobre el efecto inducido por LPS en donde se observa que TAT no tiene efecto sobre la maduración de las CDs inducida por los agonistas de TLR. Análisis por t Student no pareada P<0.05. Los datos son el promedio de cuatro experimentos independientes expresados como media ± SEM.

Finalmente en lo que respecta a DAT se observa que este disminuyó de manera significativa la expresión inducida por LPS de moléculas como MHC-I, MHC-II, CD40, CD80 y CD86 (*P=0.0469, *P=0.0349, *P=0.0115, *P=0.0388 y *P=0.0142 respectivamente), de manera interesante, no se observó un efecto inhibitorio con LTA (Fig. 22A, C-E).

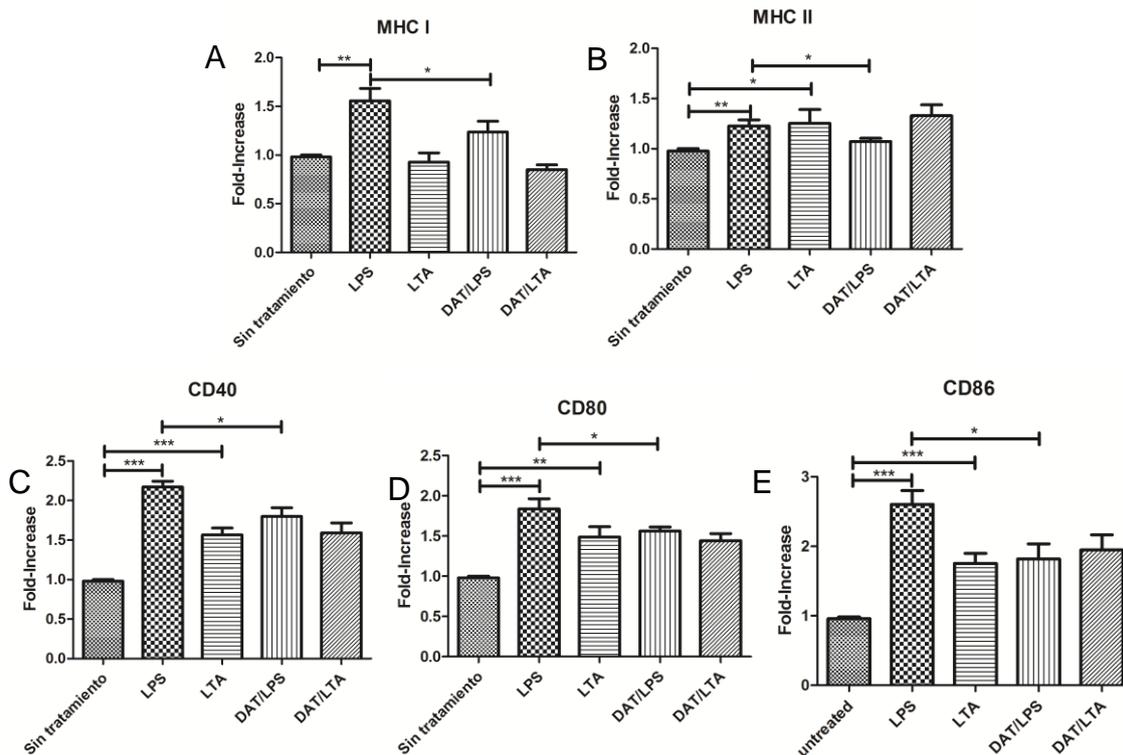


Figura 22. Efecto de DAT sobre la maduración inducida con agonistas de TLR-2 y TLR-4. Por citometría de flujo se analizó la expresión de moléculas de presentación de antígeno y co-estimuladoras en células CD11c⁺. El análisis del incremento de la intensidad de fluorescencia sobre el efecto inducido por LPS y LTA en donde se observa que DAT disminuye significativamente la expresión de las moléculas inducidas por LPS pero no por LTA (A-E). Análisis por t Student no pareada P<0.05. Los datos son el promedio de cinco experimentos independientes expresados como media ± SEM.

5. Efecto de DAT sobre la producción de citocinas inducidas por BCG

Con los resultados anteriores decidimos concentrarnos en estudiar la capacidad de DAT en la inducción de un perfil tolerogénico en las CDs. Primero se analizó la producción autócrina de citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-12, y de la citocina anti-inflamatoria IL-10 por el método de ELISA en CDs tratadas con DAT y se comparó con la producción inducida por los antígenos micobacterianos. Para TNF- α se observó que DAT induce su producción a las 6 h (**P=0.0025) y a las 24 hr y no tiene un efecto en la producción inducida por BCG (Fig. 23A). Con IL-12, se observó que a las 6 hr DAT disminuyó significativamente la producción inducida por BCG (*P=0.0157) (Fig. 23B). Contrastando con estos resultados, se observó que a las 6 hr DAT incrementó la producción de IL-10 y aumentó la

producción inducida por BCG (** $P < 0.0001$ y ** $P = 0.0062$, respectivamente) (Fig. 23C). Posteriormente se evaluó la producción de citocinas comparando la producción inducida por los agonistas de TLR-2 y TLR-4. Se observó que la producción de TNF- α a las 6 y a las 24 horas no se ve afectada por DAT (Fig. 23D). Sin embargo para IL-12, DAT disminuyó su producción a las 6 horas, y este efecto se vuelve estadísticamente significativo a las 24 horas en células tratadas con LPS (* $P = 0.0157$) (Fig. 23E). En cuanto a IL-10, se observa que a las 6 horas, DAT incrementa la producción de esta citocina inducida por LPS de manera significativa, a las 6 h y 24 h significativamente (** $P = 0.0022$ y ** $P = 0.0023$, respectivamente); también se observó un incremento a las 24 h en las CDs tratadas con LTA (** $P = 0.0016$) (Fig. 23F).

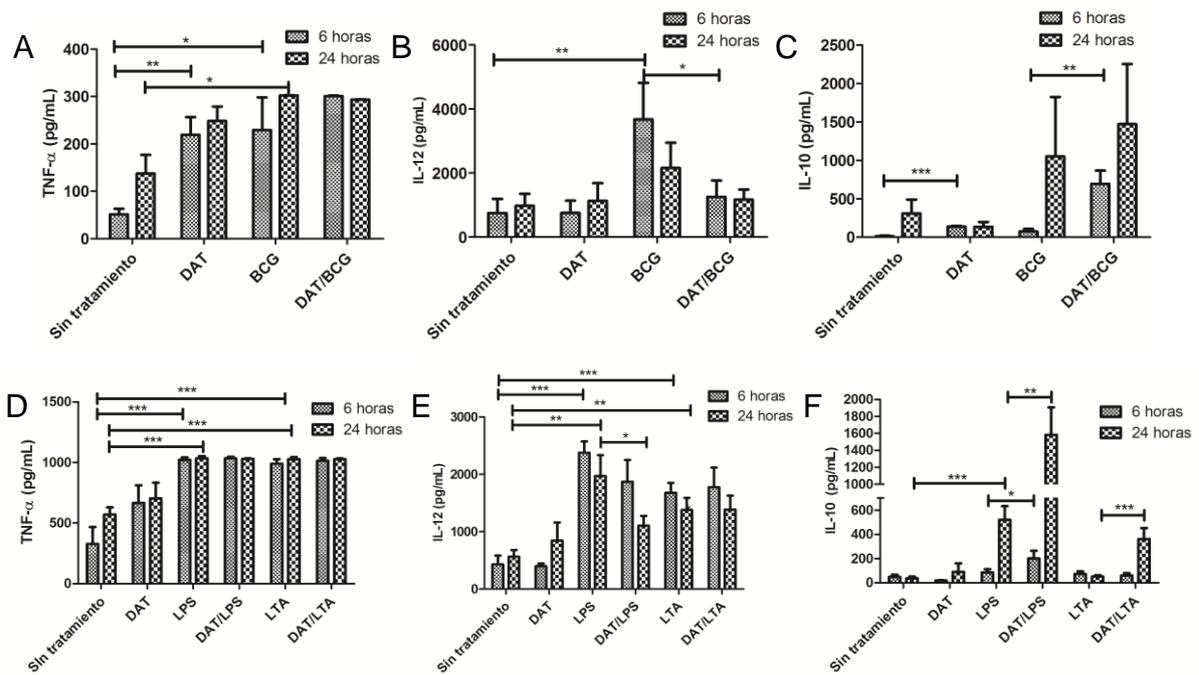


Figura 23. Efecto de DAT sobre la producción de citocinas en CDs. Por el método de ELISA se evaluó la producción de TNF- α , IL-12 e IL-10 comparando la producción con células tratadas con antígenos micobacterianos (A-C) y con agonistas de TLR 2 y TLR-4 (D-F). Análisis por t Student no pareada $P < 0.05$. Los datos son el promedio de cinco experimentos independientes expresados como media \pm SEM.

6. Generación de un perfil tolerogénico en las CD4 inducido por DAT

Los resultados obtenidos muestran que DAT interfiere con la maduración de las CD4. Una propiedad que tienen las CD4 inmaduras es tener una función reguladora de la respuesta inmune por medio de moléculas que llevan a cabo esta función. Por citometría de flujo se evaluó la expresión de PD-L1 en CD4 tratadas con DAT. Los resultados muestran que DAT no incrementa la expresión de esta molécula y tampoco tiene influencia sobre el estímulo dado por los inductores de maduración (Fig. 24A). Por otra parte también se hizo el análisis de la expresión de CD25 de membrana (CD25m) por citometría de flujo y la forma soluble (CD25s) por el método de ELISA en sobrenadantes obtenidos a las 6 y 24 horas. Los resultados obtenidos muestran que con excepción de LTA, los inductores de maduración incrementan la expresión de esta molécula, sin embargo DAT no tuvo ningún efecto en la expresión de la misma (Fig. 24B). Por otra parte, la producción de CD25s es la misma en todas las condiciones a las 6 horas, sin embargo, a las 24 horas incrementa en las células tratadas con los inductores de maduración, adicionalmente DAT disminuyó la producción de CD25s inducida por LPS (Fig. 24C).

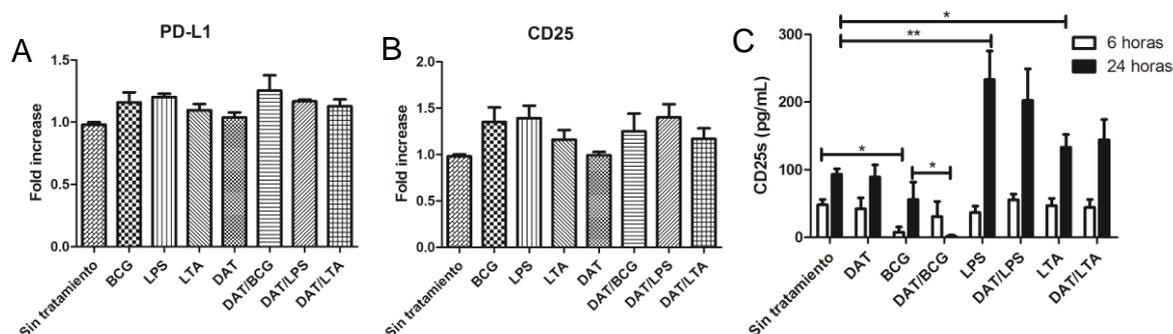


Figura 24. Efecto de DAT sobre la expresión de moléculas inmunoregulatorias. Por citometría de flujo se analizó la expresión de PDL-1 (A) y CD25 de membrana (B); por el método de ELISA se evaluó la producción de CD25s (C). En los tres casos no se observa un efecto de DAT en la expresión de estas moléculas. Análisis por t Student no pareada $P < 0.05$. Los datos son el promedio de cinco experimentos independientes expresados como media \pm SEM.

7. Efecto de DAT en la activación del AhR

Para saber si el eje AhR/IDO participa en la generación de un perfil tolerogénico en las CDs, se analizó la expresión y traslocación del AhR en CDs tratadas con DAT. Para ello se analizó la localización de AhR en las CDs por microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos muestran que las células sin tratamiento expresan la marca de AhR tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fig. 25A). Al tratar las CDs con los antígenos de BCG se observa que varias células muestran colocalización de AhR en el núcleo sin embargo, también se observan células que no expresan el receptor (Fig. 25B). Al tratar las CDs con LPS se observa que la mayoría de las células no expresan el receptor (Fig. 25C). Finalmente, las CDs tratadas con DAT muestran que la marca de AhR en el citoplasma se mantiene pero la colocalización en el núcleo es menor comparada con las CDs sin tratamiento (Fig. 25D).

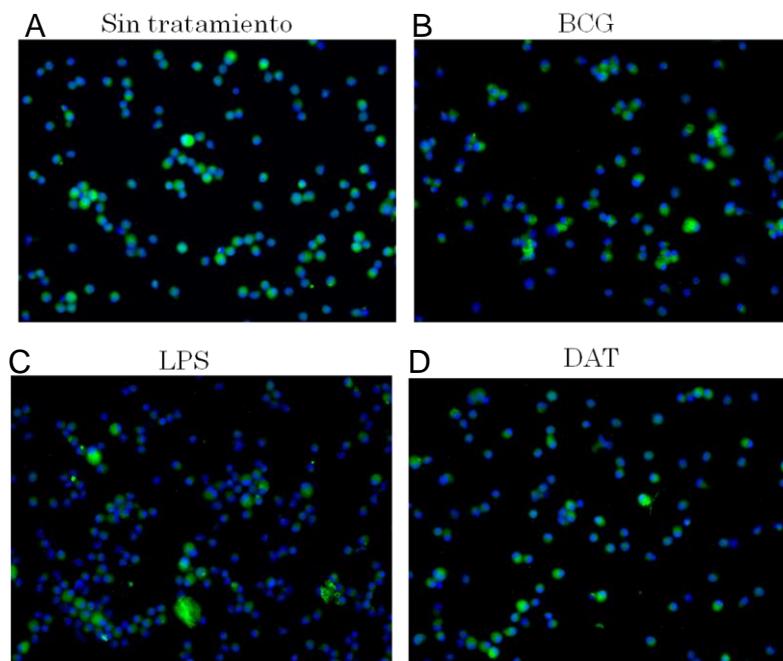


Figura 25. Efecto de DAT sobre la expresión del receptor AhR por microscopía de fluorescencia. Las CDs fueron permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo anti-AhR marcado con FITC. Aumento 20x.

8. Efecto de DAT sobre la expresión y actividad enzimática de la IDO

Otra molécula de interés en el estudio del perfil tolerogénico de las CDs generado por DAT es la enzima IDO; para ello se estudió su expresión y su actividad enzimática en las CDs. La expresión de la enzima se analizó mediante Western-blot. Los resultados muestran que IDO no se expresa a niveles basales, sin embargo al ser tratadas con DAT, los inductores de maduración y la combinación de estos con el glicolípido, se induce la expresión de esta enzima (Fig. 26A). Por otra parte, también se estudió la actividad enzimática de la IDO por medio de un método colorimétrico en donde se observa la producción de L-kinurenina utilizando una solución de reactivo de Ehrlich en ácido acético glacial. La producción se comparó con una curva estándar de L-kinurenina (Fig. 26B). Los resultados muestran que los inductores de maduración incrementaron la actividad de IDO, mientras que LPS la disminuye; también, DAT aumentó de manera significativa la producción de L-kinurenina ($***P < 0.001$). De la misma forma también incrementó la actividad de IDO en CDs tratadas con LPS ($***P < 0.0001$) y LTA ($**P = 0.0015$), pero no con BCG (Fig. 26C).

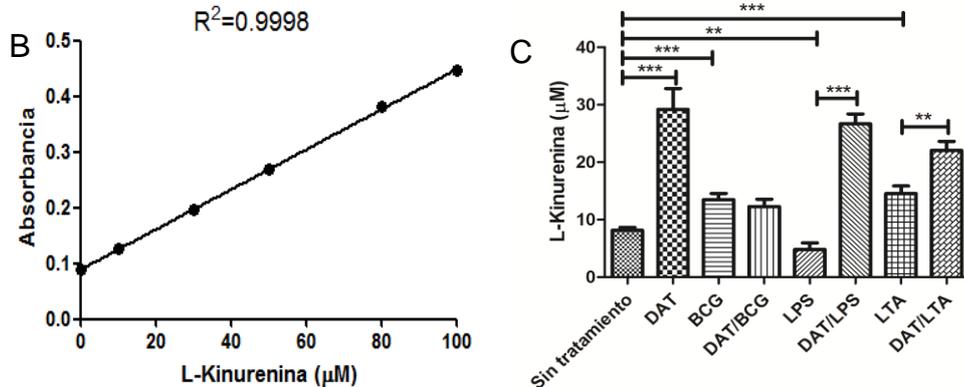


Figura 26. Efecto de DAT sobre la expresión y actividad enzimática de IDO. Se analizó la expresión de IDO por Western-blot utilizando un anticuerpo anti-IDO (A). Para determinar la actividad enzimática de IDO se estandarizó el método colorimétrico basado en la detección de L-kinurenicina utilizando reactivo de Ehrlich en ácido acético glacial. Para cada determinación se comparó con una curva estándar de L-kinurenicina (B). Gráfica de actividad enzimática de la IDO. Análisis por t Student no pareada $P < 0.05$. Los datos son el promedio de siete experimentos independientes expresados como media \pm SEM.

9. Efecto de la inhibición química de AhR sobre DAT

Otra forma de demostrar la participación del eje IDO/AhR en la generación de tolerancia ejercido por DAT es por medio de la inhibición del AhR. Para ello se utilizó un inhibidor químico 6,2',4' Trimetoxiflavona (TMF) y se analizó el efecto que tiene DAT sobre la IMF de CD40. Los resultados obtenidos muestran que al comparar las CDs que fueron pre-tratadas con el inhibidor se observa que el efecto de DAT se inhibe en las CDs tratadas con DAT/LPS (Fig. 27B).

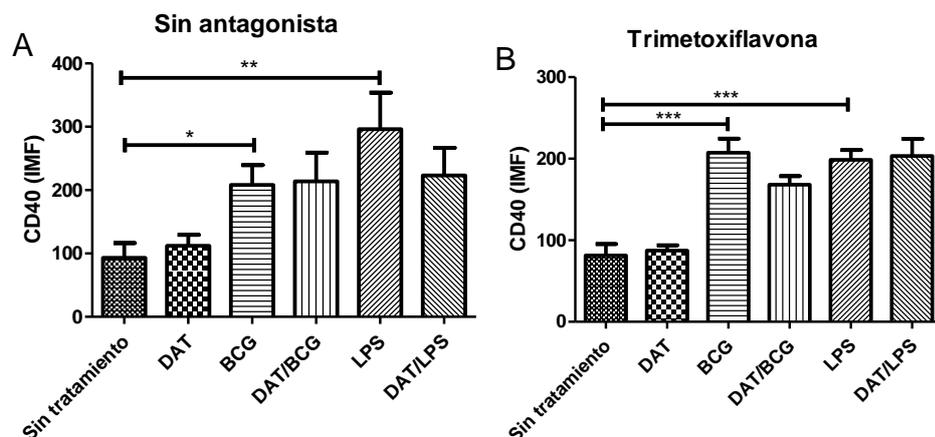


Figura 27. Efecto de la inhibición química del AhR sobre el efecto de DAT en las CDs. Por citometría de flujo se analizó la expresión de CD40 en células CD11c⁺. Se comparó el efecto entre células sin inhibidor (A) y tratadas con TMF (B). Análisis por t Student no pareada $P < 0.05$. Los datos son el promedio de cuatro experimentos independientes expresados como media \pm SEM.

10. Efecto de DAT sobre la proliferación de linfocitos T

Una característica importante que tienen las CDs tolerogénicas es su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T reguladores. Para estudiar la capacidad de las CDs para inducir la proliferación de linfocitos T efectores o reguladores, se realizó una MLR; en este experimento se utilizaron CDs obtenidas de ratones C57BL/6 con la capacidad de expresar la proteína verde fluorescente junto con el factor de transcripción FoxP3 (marcador de linfocitos T reguladores). Los linfocitos marcados con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 fueron purificados por cell sorting obteniendo las poblaciones CD4⁺FoxP3⁺ y CD4⁺FoxP3⁻; con el propósito de evaluar la proliferación de los linfocitos, estos fueron marcados con eDye Fluor 670. Los linfocitos fueron incubados con las CDs a una proporción 1:10 y la reacción se llevó a cabo durante 3 días. Transcurrido ese tiempo se recuperaron los linfocitos y fueron marcados con CD25 para hacer el análisis. La estrategia de análisis se llevó a cabo analizando la población CD4⁺; a partir de esta se determinó el dot plot de la población CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ y CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻, y en estas se hizo el análisis de la dilución del eDye 670. La proliferación se determinó mediante el porcentaje de división celular (Fig. 28A). Los resultados obtenidos muestran que DAT incrementa el porcentaje de división de la población CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ sobre los niveles basales (*P=0.0424); también se observa un incremento notorio al comparar las CDs tratadas con DAT/BCG y un incremento significativo con CDs tratadas con DAT/LPS (*P=0.0463) (Fig. 28B). Adicionalmente se hizo el análisis de la producción de IFN- γ e IL-10, los resultados obtenidos muestran que la producción de IFN- γ incrementan de manera significativa en CDs tratadas con DAT/LPS en comparación con las células tratadas con LPS (*P=0.0476) (Fig. 28C); finalmente, el análisis de

producción de IL-10 muestra un incremento generalizado en la producción de esta citocina en todos los tratamientos, siendo el más notorio en el cultivo con CDs tratadas con DAT/LPS (*P=0.0285) y con DAT/LTA (*P=0.0250) (Fig. 28D).

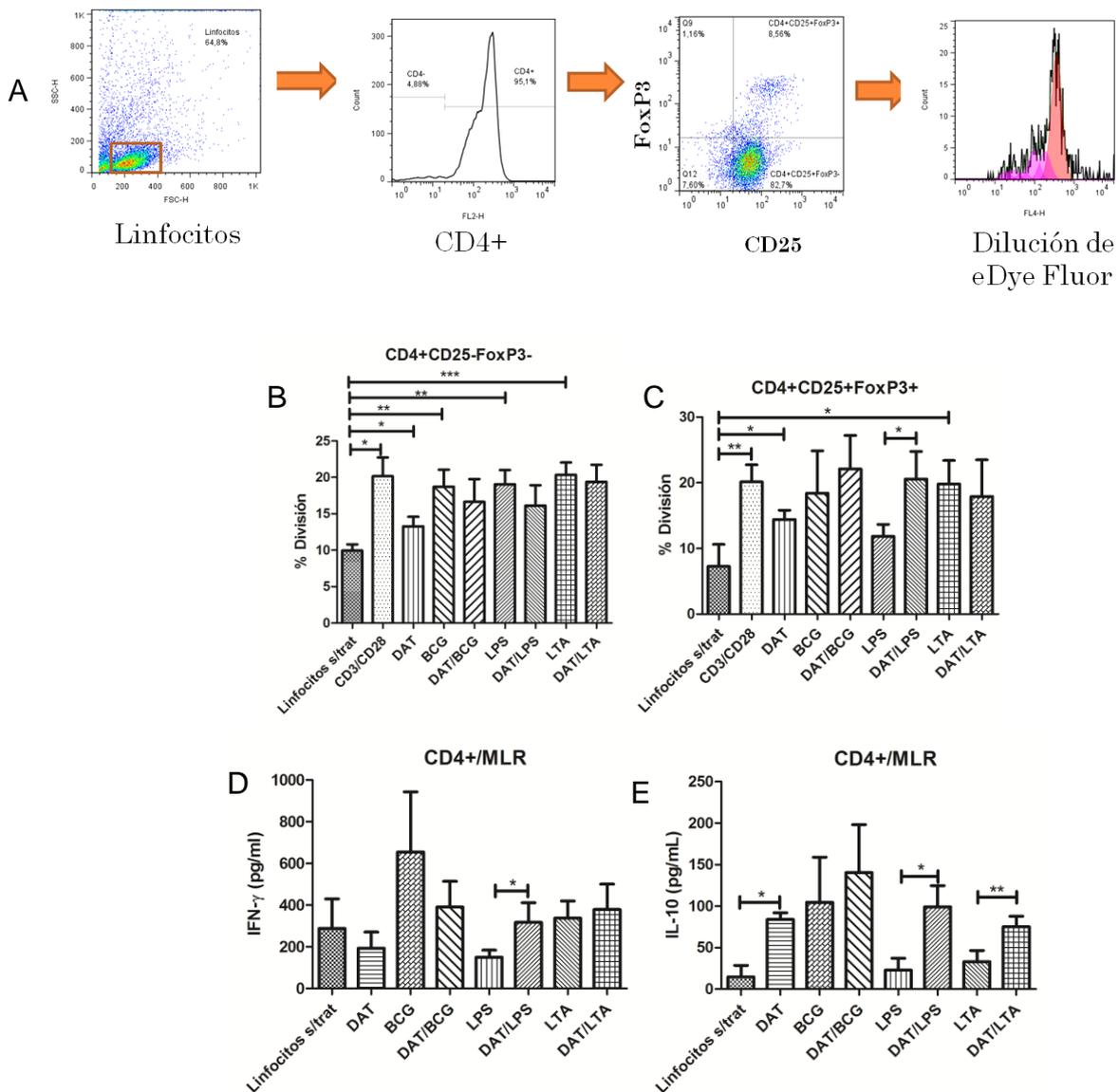


Figura 28. Efecto de DAT sobre la proliferación de linfocitos T. Análisis del porcentaje de proliferación de linfocitos por el método de dilución del eDye Fluor 670 (A) en poblaciones CD4+CD25+FoxP3- (B) y CD4+CD25+FoxP3+ (C). Los resultados son expresados como porcentaje de división de 4 experimentos independientes. Producción de IFN- γ (C) e IL-10 (D) en cultivos de linfocitos con células dendríticas determinado por el método de ELISA. Los datos son el promedio de 5 experimentos independientes.

VI. DISCUSIÓN

M. tuberculosis es un bacilo que ha logrado coevolucionar con el ser humano a tal punto de desarrollar factores de virulencia que le permiten evadir la respuesta inmune innata, la cual es responsable de controlar la infección [148]. Entre estos factores se encuentran los lípidos que se encuentran en su pared celular los cuales pueden manipular la respuesta inmune del individuo [139]. Se ha descrito que los lípidos de Mtb pueden modular la función de las CDs cuando hay interacción por medio de receptores como DC-SIGN [125]; la interacción con lípidos como las LAMs inducen la producción de IL-10 [125] y disminuyen la producción de IL-12 [149]; las ManLAMs también regulan la producción de TNF e IL-12 [150]. Estos factores que se encuentran en la superficie del bacilo sirven para regular la función de las CDs en la respuesta inmune en contra del bacilo y es una estrategia importante para su supervivencia.

En este proyecto nos interesó evaluar el efecto de los glicolípidos micobacterianos localizados en la membrana externa de la cubierta del bacilo: DMT, TAT y DAT, cuya actividad inmunoreguladora ya ha sido descrita en células de la respuesta inmune innata como son los macrófagos [129, 136]; al igual que estas células, las CDs se encargan de reconocer al bacilo y tienen la función ser un puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa en contra del bacilo [71]; para ello estas células deben madurar a un perfil inmunogénico, cuya inducción se puede ver alterada por los glicolípidos [125]. Como trabajo previo, durante la maestría se sentó un antecedente sobre el efecto de DAT en las CDs observando la inhibición de la maduración de estas células y se proponía que estas podían desarrollar un perfil tolerogénico [140], el cual sirve a Mtb para evadir a la respuesta inmune [151].

Estos glicolípidos también se encuentran presentes en la cubierta de *M. bovis* BCG [139]; el hecho de que estos se encuentren presentes en la cepa vacunal pueden ser una razón importante para que la efectividad de la vacuna sea baja [14]. Recientemente se ha planteado como estrategia para la generación de una vacuna efectiva, la eliminación de los glicolípidos libres de la cepa vacunal [152].

El primer paso fue comparar el efecto que tienen estos glicolípidos con CDs cuya maduración es inducida con antígenos proteicos de *M. bovis* BCG la cual es utilizada como cepa vacunal [6]. Tomando en cuenta lo anterior, utilizamos sonicados de BCG que previamente fueron deslipidizados con solventes orgánicos, y al analizarlos por western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-BCG en estos sonicados se puso de manifiesto la presencia de diversas proteínas que, por su peso molecular, sugiere la presencia de proteínas como PstS-1 [153], APA [154] o LpqH [155] por mencionar algunas, las cuales también tienen efectos sobre el funcionamiento del sistema inmune. Estos sonicados lograron inducir la maduración de las CDs y sirvieron como punto de referencia para estudiar el efecto de los glicolípidos.

Uno de los glicolípidos más estudiados es el DMT también conocido como factor cuerda; por una parte se ha dado énfasis al efecto tóxico que produce al ser administrado en ratones debido a la respuesta pro-inflamatoria que produce [156], además de su capacidad de inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-8 e IL-1 β [127]; al ser el glicolípido que se libera con más abundancia, se ha descrito que tiene un papel importante en la tuberculosis secundaria y que este es responsable de la necrosis caseosa y la generación de cavidades en el pulmón [157]. En este trabajo, al comparar el efecto que tiene sobre la maduración de las CDs se observó que el DMT induce de manera

significativa la expresión de CD40 y CD86, también indujo la expresión de estas moléculas al comparar con la expresión inducida por BCG. Este glicolípido es reconocido por el receptor Mincle, cuya interacción induce una respuesta del tipo Th1 [158] lo cual va relacionado con la inducción de CD40; esto le permite a las CDs producir citocinas pro-inflamatorias, entre ellas TNF- α la cual es necesaria para establecer la formación del granuloma [41, 129]; si bien se ha establecido que esta estructura es importante para contener la infección en un sitio, también se ha descrito que este sirve como un nicho en donde el bacilo puede mantenerse latente [159].

TAT y a DAT son glicolípidos libres cuyos efectos inmunoreguladores han sido descrito anteriormente en trabajos previos del laboratorio en donde se ha demostrado que puede alterar la proliferación de los linfocitos T [135] y que inhibe la producción de iNOS en los macrófagos [136]. En primera instancia, se observa que los glicolípidos no tienen un efecto sobre la maduración de las CDs al analizar la expresión de moléculas de presentación de antígeno y de co-estimulación; sin embargo, al hacer el reto con los antígenos micobacterianos se observa una disminución en la expresión de MHC-I, CD40 y CD80. La alteración de los procesos de maduración es importante para varios microorganismos intracelulares para evadir la respuesta inmune [120]. Además de Mtb, otros microorganismos utilizan una estrategia similar en las CDs como *Helicobacter pylori* [160] o *Bordetella pertussis* [161] las cuales generan un estado inmaduro en las CDs. Es importante señalar que las CDs que se encuentran inmaduras también tienen la capacidad de ejercer un efecto tolerogénico [91].

Dado que los antígenos micobacterianos son una mezcla compleja de proteínas que pueden ser reconocidas por diversos receptores en las CDs [162],

decidimos evaluar el efecto de los glicolípidos sobre los TLRs, cuya activación es importante en la generación de CDs maduras [80] siendo TLR-2 y TLR-4 los receptores de maduración más importantes en el reconocimiento del bacilo [141]. Se observó que DAT redujo significativamente la expresión de las moléculas de presentación de antígeno y co-estimuladoras en las CDs estimuladas por LPS pero no así con LTA sugiriendo que este lípido tiene efectos sobre la vía de TLR-4. Aunque en la vía de señalización de TLR-2 y TLR-4 se comparte la activación de moléculas como NF- κ B o MAPK [163], la activación entre estos receptores resulta en diferencias en la producción de citocinas, particularmente la producción de IL-12 aumenta más al activar TLR-4 [164]. En este contexto, DAT contribuye a regular la respuesta inmune disminuyendo la producción de IL-12 para favorecer la producción de IL-10, una citocina importante en la regulación de la respuesta inmune [165] sirviendo como un primer paso en la generación de CDs tolerogénicas.

Después de establecer que DAT altera la maduración de las CDs, pensamos que este glicolípido podría estar generando un perfil tolerogénico en estas células. Existen enfermedades virales que utilizan este mecanismo para modular la función de las CDs [166]; también la generación de tolerancia es un mecanismo utilizado por las células cancerígenas para evitar su eliminación [167]. Como parte de la generación de un perfil tolerogénico, el eje AhR/IDO juega un papel importante que culmina en la producción de linfocitos T reguladores [113]. Por microscopía de fluorescencia se visualizó la expresión del receptor AhR, el cual se encuentra en el citoplasma y que al activarse se trasloca al núcleo [168]. Las CDs sin tratamiento mostraban una colocalización de la marca fluorescente del AhR junto con la del núcleo, mientras que con los inductores de maduración el

número de células que mostraban la marca de AhR en el citoplasma disminuye. Esto se puede deber a que las mismas células que se encuentran en estado estacionario también tienen un alto potencial tolerogénico [119]. Finalmente en lo que respecta a DAT, se observa que hay marca de AhR en el citoplasma pero no hay tanta colocalización de la marca en el núcleo.

Para complementar este estudio, se analizó la expresión y actividad enzimática de la IDO, teniendo como resultado que todos los tratamientos inducen la expresión de esta enzima, por otra parte al analizar la actividad enzimática se observa que DAT induce de manera significativa la producción de L-kinurenina sobre los niveles basales y con los inductores de TLR. Esta molécula es muy importante ya que es un receptor de AhR que promueve la diferenciación de los linfocitos Tregs [110].

Finalmente otra característica importante de las CDs tolerogénicas es su capacidad de inducir la diferenciación y proliferación de linfocitos Treg, los cuales son importantes en la tolerancia periférica [91]. Los resultados obtenidos muestran que DAT es capaz de inducir la proliferación de estos linfocitos, también se observa este efecto al utilizar CDs que fueron tratadas con DAT/LPS. En el MLR también se observó una elevada producción de IL-10 con CDs tratadas con DAT, DAT/LPS y DAT/LTA. La obtención de células reguladoras con CDs tratadas con DAT se puede deber a la combinación de factores como la producción de IL-10 [163] y de moléculas reguladoras como la L-kinurenina [110]. Estos linfocitos tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inmune contra el bacilo además de que el número de estas células se encuentra elevado en pacientes con la enfermedad [169]. Aunque no hay estudios específicos sobre la generación de linfocitos T reguladores por los glicolípidos, se ha propuesto que

estos al producir un ambiente anti-inflamatorio, pueden participar de manera indirecta en la generación de linfocitos reguladores [170] y se ha demostrado que lisados de Mtb que contienen glicolípidos pueden inducir la proliferación de Tregs [171].

Estas observaciones demuestran que DAT, un glicolípido localizado en la cubierta celular de Mtb, se comporta como un factor de virulencia que modula la función inmunogénica de las CDs al inhibir su maduración, inducir la producción de IL-10 promoviendo la generación de un perfil tolerogénico con la producción de factores como la L-kinurenina y la promoviendo la proliferación de linfocitos T reguladores. La importancia de conocer el efecto que ejercen estos glicolípidos de la superficie como los estudiados en este proyecto radica en que estas moléculas tengan una participación importante en el establecimiento de la latencia del bacilo, en este caso al generar un estado de tolerancia hacia este. También es importante ahondar en el efecto de los glicolípidos de localizados en la superficie ya que estos también se encuentran presentes en la cubierta de *M. bovis* BCG y este puede ser un elemento adicional a la variabilidad que tiene la vacuna para dar protección, en este contexto, es importante conocer la interacción que existe con estos lípidos para así diseñar una vacuna con cepas que no contengan este tipo de glicolípidos.

VII. CONCLUSIONES

-DMT puede inducir la expresión de moléculas de co-estimulación en las CDs como CD40 y CD86 lo cual puede contribuir a la producción de TNF- α , una citocina que es inducida por este glicolípido.

-TAT no tiene efecto sobre la maduración de las CDs.

-DAT es un glicolípido inductor de tolerancia debido a que:

Altera la maduración de las CDs.

Induce la producción de la citocina inmunosupresora IL-10.

Induce la expresión de IDO y la producción de L-kinurenina.

Induce la proliferación de linfocitos T reguladores.

VIII. PERSPECTIVAS

-Definir la participación del eje AhR/IDO como mecanismo de tolerancia provocado por DAT.

-Estudiar el posible efecto tolerogénico de los extractos lipídicos de cepas vacunales en MOs y CDs.

IX. REFERENCIAS

1. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *Lancet*. 2019. 393:1642-1656.
2. Global Tuberculosis Report. 2019. WHO, World Health Organization. Geneva, Switzerland.
3. Eldholm V, Balloux F. Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Odd One Out. *Trends Microbiol*. 2016. 24: 637-648.
4. Singh AR, Singh SA. Diseases of Poverty and Lifestyle, Well-Being and Human Development. *Mens Sana Monogr*. 2008. 6:187-225.
5. Sotgiu G, Centis R, D'ambrosio L, Battista-Migliori G. Tuberculosis Treatment and Drug Regimens. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015. 5: a017822.
6. Oettinger T, Jørgensen M, Ladefoged A, Hasløv K, Andersen P. Development of the *Mycobacterium Bovis* BCG Vaccine: Review of the Historical and Biochemical Evidence for a Genealogical Tree. *Tuber Lung Dis*. 1999. 79: 243-50.
7. Information Sheet Observed Rate of Vaccine Reactions Bacille Calmette Guérin (BCG) Vaccine. 2012. WHO, World Health Organization. Geneva, Switzerland.
8. López-Antuñano FJ. Usos y Efectos del Bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Gerin Vacunación con BCG. *Salud Pública de México*, [S.l.], v. 39, n. 2, p. 156-161, mar. 1997. ISSN 1606-7916. Disponible en: <<http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5994/6848>>. Fecha de acceso: 22 dic. 2019.
9. Castillo-Rodal AI, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva JJ, Sada-Díaz E, y col. *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of

- Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infect Immun*. 2006. 74: 1718–1724.
10. Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Kelly L, Zakel, Grotzke JE y col. Individual RD1-region Genes Are Required for Export of ESAT-6/CFP-10 and for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2004. 51:359-70.
 11. Peng X, Sun J. Mechanism of ESAT-6 Membrane Interaction and Its Roles in Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxicon*. 2016. 116:29-34.
 12. Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S y col. Effect of BCG Vaccination Against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Children: Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ*. 2014. 349:g4643.
 13. Magdalena J, Supply P, Locht C. Specific Differentiation Between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent Strains of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Clin Microbiol*. 1998. 36:2471–2476.
 14. In vitro culture medium influences the vaccine efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG. Venkataswamy MM, Goldberg MF, Baena A, Chan J, Jacobs WR Jr, Porcelli SAVaccine. 2012. 30:1038-49
 15. Davenne T, McShane H. Why Don't We Have an Effective Tuberculosis Vaccine Yet?. *Expert Rev Vaccines*. 2016. 15:1009-13.
 16. Cambau E, Drancourt M. Steps Towards the Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect*. 2014. 20:196-201.
 17. Vera HD, Rettger LF. Morphological Variations of the Tubercle Bacillus and Certain Recently Isolated Soil Acid Fasters with Emphasis on Filterability. *J. Bacteriol*. 1940. 39:659-687.

18. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C y col. A New Evolutionary Scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. 99:3684-9.
19. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and Misconceptions: The Origin and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Rev Microbiol. 2009. 7:537-44.
20. Beeby M, Gumbart JC, Roux B, Grant J. Architecture and Assembly of the Gram-Positive Cell Wall. Mol Microbiol. 2013. 88:664–672.
21. Brennan PJ. Structure, Function, and Biogenesis of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 2003. 83:91–7.
22. Maitra A, Munshi T, Healy J, Martin LT, Vollmer W y col. Cell Wall Peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' Heel for the TB-Causing Pathogen. FEMS Microbiology Reviews. 2019. 43:548–575.
23. Minnikin DE. Lipids: Complex Lipids, Their Chemistry, Biosynthesis and Roles. In: Ratledge C, Stanford J, editors. The Biology of the Mycobacteria: Physiology, Identification and Classification. Academic Press; 1982. 95–184.
24. Niederweiss M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacterial Outer Membranes: In Search of Proteins. Trends Microbiol. 2010.18:109-16.
25. Daffe M, Draper P. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to Their Pathogenicity. Adv Microb Physiol. 1998. 39:131–203.
26. Pitarque S, Larrouy-Maumus G, Payré B, Jackson M, Puzo G y col. The Immunomodulatory Lipoglycans, Lipoarabinomannan and Lipomannan, are Exposed at the Mycobacterial Cell Surface. Tuberculosis. 2008. 88:560–565.

27. Bansal-Mutalik R, Nikaido H. Mycobacterial Outer Membrane is a Lipid Bilayer and the Inner Membrane is Unusually Rich in Diacyl Phosphatidylinositol Dimannosides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014. 111:4958–4963.
28. Jackson M. *The Mycobacterial Cell Envelope-Lipids* Cold Spring Harb Perspect Med. 2014. 4: a021105.
29. Dhiman RK, Dinadayala P, Ryan GJ, Lenaerts AJ, Schenkel AR y col. Lipoarabinomannan Localization and Abundance During Growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 2011. 193:5802–5809.
30. Morita YS, Velasquez R, Taig E, Waller RF, Patterson JH y col. Compartmentalization of Lipid Biosynthesis in Mycobacteria. *J Biol Chem*. 2005. 280:21645–21652.
31. Fukuda T, Matsumura T, Ato M, Hamasaki M, Nishiuchi Y y col. Critical Roles for Lipomannan and Lipoarabinomannan in Cell Wall Integrity of Mycobacteria and Pathogenesis of Tuberculosis. *mBio*. 2013. 4:e00472–12.
32. Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, Brennan PJ, Jackson M. Biogenesis of the Cell Wall and Other Glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol*. 2009. 69:23–78.
33. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*. 2014. 159:1497-509.
34. Kumar K, Kon OM. Diagnosis and Treatment of Tuberculosis: Latest Developments and Future Priorities. *Annals of Research Hospitals, North America*. 2017. Disponible en: <<http://arh.amegroups.com/article/view/3820>>. Fecha de acceso: 24 Enero. 2020.

35. Sasindran SJ, Torrelles JB. *Mycobacterium Tuberculosis* Infection and Inflammation: What is Beneficial for the Host and for the Bacterium?. *Front Microbiol.* 2011. 2:2.
36. Balasubramanian V, Wiegand EH, Taylor BT, et al. Pathogenesis of Tuberculosis: Pathway to Apical Localization. *Tuber Lung Dis.* 1994. 75:168–178.
37. Zhang N, Van Crombrugge K, Gevaert E, Bachert C. Barrier Function of the Nasal Mucosa in Health and Type-2 Biased Airway Diseases. *Allergy.* 2016. 71:295-307.
38. Sakamoto K. The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Vet Pathol.* 2012. 49:423-39.
39. Scordo JM, Knoell DL, Torrelles JB. Alveolar Epithelial Cells in *Mycobacterium tuberculosis* Infection: Active Players or Innocent Bystanders. *J Innate Immun.* 2016. 8:3-14.
40. Castro-Garza J, King CH, Swords WE, Quinn FD. Demonstration of Spread by *Mycobacterium tuberculosis* Bacilli in A549 Epithelial Cell Monolayers. *FEMS Microbiol Lett.* 2002. 212:145–149.
41. Li Y, Wang Y, Liu X. The Role of Airway Epithelial Cells in Response to Mycobacteria Infection. *Clin Dev Immunol.* 2012. 2012:791392.
42. Ulrichs T, Kaufmann SH. New Insights into the Function of Granulomas in Human Tuberculosis. *J. Pathol.* 2006. 208:261–269.
43. Saunders BM, Cooper AM. Restraining Mycobacteria: Role of Granulomas in Mycobacterial Infections. *Immunol. Cell Biol.* 2000. 78:334–341.

44. Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader S. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiol Spectr*. 2016. 4:TBTB2-0018-2016.
45. Flynn JL. Tuberculosis: Latency and Reactivation. *Infect Immun*. 2001. 69: 4195–4201.
46. Bell LCK. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* Co-Infection *Nat Rev Microbiol*. 2018. 16:80-90.
47. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ y col. The Immune Response in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013. 31:475-527.
48. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate Immunity in Tuberculosis: Host Defense vs Pathogen Evasion. *Cell Mol Immunol*. 2017. 14:963-975.
49. Ernst. JD. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1998. 66:1277-1281.
50. McClean CM, Tobin DM. Macrophage Form, Function, and Phenotype in Mycobacterial Infection: Lessons from Tuberculosis and Other Diseases. *Pathog Dis*. 2016. 74:pii: ftw068.
51. Braverman J, Stanley SA. Nitric Oxide Modulates Macrophage Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection through Activation of HIF-1 α and Repression of NF- κ B. *J Immunol*. 2017. 199:1805-1816.
52. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H. Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013. 49:503-10.
53. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014. 5:514.

54. Gopal R, Monin L, Torres D, Slight S, Mehra S y col. S100A8/A9 Proteins Mediate Neutrophilic Inflammation and Lung Pathology During Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013. 188:1137-46.
55. Dallenga T, Schaible UE. Neutrophils in Tuberculosis--First Line of Defence or Booster of Disease and Targets for Host-Directed Therapy?. *Pathog Dis*. 2016. 74.pii: ftw012.
56. Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA, Kampmann B, Hall BM y col. Neutrophil-Mediated Innate Immune Resistance to Mycobacteria. *J Clin Invest* 2007. 117:1988–1994.
57. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of Natural Killer Cells. *Nat Immunol*. 2008. 9:503-10.
58. Esin S, Counoupas C, Aulicino A, Brancatisano FL, Maisetta G y col. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall Components with the Human Natural Killer Cell Receptors NKp44 and Toll-Like Receptor 2. *Scand J Immunol* 2013. 77:460–469.
59. Allen M, Bailey C, Cahatol I, Dodge L, Yim J y col. Mechanisms of Control of *Mycobacterium tuberculosis* by NK Cells: Role of Glutathione. *Front Immunol* 2015. 6:508.
60. Mogue T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The Relative Importance of T Cell Subsets in Immunity and Immunopathology of Airborne *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. *J Exp Med*. 2001. 193:271-80.
61. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T y col. Initiation of the Adaptive Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Depends on Antigen Production in the Local Lymph Node, Not the Lungs. *J Exp Med*. 2008. 205:105–115.

62. Toossi Z. The Inflammatory Response in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2000. 48:513-519.
63. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. Cancers (Basel). 2016. 8:36.
64. Winslow GM, Cooper A, Reiley W, Chatterjee M, Woodland DL. Early T-Cell Responses in Tuberculosis Immunity. Immunol Rev. 2008. 225: 10.1111/j.1600-065X.2008.00693.x.
65. Li Q, Li J, Tian J, Zhu B, Zhang Y y col. IL-17 and IFN- γ Production in Peripheral Blood Following BCG Vaccination and *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Human. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2012. 16: 2029–2036.
66. Zenaro E, Donini M, Dusi S. Induction of Th1/Th17 Immune Response by *Mycobacterium tuberculosis*: Role of Dectin-1, Mannose receptor, and DC-SIGN. Journal of Leukocyte Biology. 2009. 86:1393-1401.
67. Grotzke JE, Lewinsohn DM. Role of CD8+ T Lymphocytes in Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Microbes Infect. 2005. 7:776–788.
68. Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. CD8+ CTL from Lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Mice Express Perforin in Vivo and Lyse Infected Macrophages. J Immunol. 2000; 165:353–363.
69. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR y col. An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin. Science. 1998. 282:121–125.
70. Mihret A. The Role of Dendritic Cells in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Virulence. 2012. 3:654-659.
71. Clark R, Kupper T. Old Meets New: The Interaction Between Innate And Adaptive Immunity. J Invest Dermatol. 2005. 125:629-37.

72. Liu K, Nussenzweig MC. Origin And Development Of Dendritic Cells. *Immunological Reviews*. 2010. 234:45–54.
73. Bhattacharya P, Thiruppathi M, Elshabrawy HA, Alharshawi K, Kumar P y col. GM-CSF: An Immune Modulatory Cytokine That Can Suppress Autoimmunity. *Cytokine*. 2015. 75:261–271.
74. von Garnier C, Filgueira L, Wikstrom M, Smith M, Thomas JA y col. Anatomical Location Determines The Distribution And Function Of Dendritic Cells And Other Apcs In The Respiratory Tract. *J Immunol*. 2005. 175:1609-18.
75. Grayson MH, Ramos MS, Rohlfing MM, Kitchens R, Wang HD y col. Controls For Lung Dendritic Cell Maturation And Migration During Respiratory Viral Infection. *J Immunol*. 2007.179:1438-48.
76. Voss Condon T, Sawyer RT, Fenton MJ, Riches DWH. Lung Dendritic Cells At The Innate-Adaptive Immune Interface. *J Leukoc Biol*. 2011. 90:883–895.
77. Inaba K, Inaba M. Antigen Recognition And Presentation By Dendritic Cells. *Int J Hematol*. 2005. 81:181-7.
78. Kapsenberg ML. Dendritic-Cell Control Of Pathogen-Driven T-Cell Polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003. 3:984-93.
79. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition And Innate Immunity. *Cell*. 2006. 124:783-801.
80. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic Cell Maturation: Functional Specialization Through Signaling Specificity And Transcriptional Programming. *EMBO J*. 2014. 33:1104-1116.
81. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-Presentation By Dendritic Cells. *Nat Rev Immunol*. 2012. 12:557-69.

82. Ma DY, Clark EA. The Role of CD40 and CD40L in Dendritic Cells. *Semin Immunol.* 2009. 21: 265–272.
83. Kobayashi T, Walsh MC, Choi Y. The Role Of TRAF6 In Signal Transduction And The Immune Response. *Microbes Infect.* 2004. 6:1333-8.
84. Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol.* 2002. 22:1-7.
85. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016. 39: 98–106.
86. Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86?. *Trends Immunol.* 2003. 24:314-9.
87. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol.* 2003. 75:217-27.
88. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2010. 22:333-40.
89. van Kooyk Y. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans.* 2008. 36:1478-81.
90. Chen M, Huang L, Wang J. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood.* 2007. 109:4360–4367.
91. Audiger C, Rahman MJ, Yun TJ, Tarbell KV, Lesage S. The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J Immunol.* 2017. 198:2223-2231.
92. Guerri L, Peguillet I, Geraldo Y, Nabti S, Premel V y col. Analysis of APC types involved in CD4 tolerance and regulatory T cell generation using reaggregated thymic organ cultures. *J Immunol.* 2013. 190:2102–2110.

93. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med*. 1997. 185:541–550.
94. Atibalentja DF, Murphy KM, Unanue ER. Functional redundancy between thymic CD8 α ⁺ and Sirp α ⁺ conventional dendritic cells in presentation of blood-derived lysozyme by MHC class II proteins. *J Immunol*. 2011. 186:1421–1431.
95. Coquet JM, Ribot JC, Babala N, Middendorp S, van der Horst G y col. Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *J Exp Med*. 2013. 210:715–728.
96. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K y col. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001. 194:769–779.
97. Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, Budd RC, Strasser A y col. Apoptosis regulators fas and bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity*. 2008. 28:197–205.
98. Lutz MB. Differentiation stages and subsets of tolerogenic dendritic cells. In: Lutz MB, Romani N, Steinkasserer A, editors. , editors. *Handbook of Dendritic Cells. Biology, Diseases and Therapy*. Weinheim: VCH-Wiley; (2006). pp. 517–43.
99. García-González P, Ubilla-Olguín G, Catalán D, Schinnerling K, Aguillón JC. Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2016. 15:1071–80.

100. Maldonado RA, von Andrian UH. How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells. *Advances in Immunology*, 2010. 108:111-144.
101. Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol*. 2010. 8: 296–307.
102. Butcher SK, O'Carroll CE, Wells CA. Toll-Like Receptors Drive Specific Patterns of Tolerance and Training on Restimulation of Macrophages. *Front Immunol*. 2018. 9: 933.
103. Mbongue JC, Nicholas DA, Torrez TW, Kim NS. The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. *Vaccines (Basel)*. 2015. 3:703-29.
104. Najfeld V, Menninger J, Muhleman D, Comings DE, Gupta SL. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase gene (INDO) to chromosome 8p12/p11 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1993. 64:231e232.
105. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW y col. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol*. 2000. 164:3596e3599.
106. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J*. 1991. 5: 2516–22.
107. Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood*. 2009. 113:2394–401.
108. Popov A, Abdullah Z, Wickenhauser C, Saric T, Driesen J y col. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppressive

- granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J Clin Invest*. 2006. 116:3160–70.
109. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR y col. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell Receptor {zeta}-chain and induce a regulatory phenotype in naïve T cells. *J Immunol*. 2006; 176:6752–6761.
110. Yan Y, Zhang GX, Gran B, Fallarino F, Yu S y col. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2010. 185:5953–5961.
111. Routy JP, Routy B, Graziani GM, Mehraj V. The Kynurenine Pathway Is a Double-Edged Sword in Immune-Privileged Sites and in Cancer: Implications for Immunotherapy. *Int J Tryptophan Res*. 2016. 9:67–77.
112. Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open*. 2018. 7:1-9.
113. Bock KW, Kohle C. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol* 2006. 72:393–404.
114. Haarmann-Stemmann, Bothe H, Abel J. Growth Factors, Cytokines and Their Receptors as Downstream Targets of Arylhydrocarbon Receptor (AhR) Signaling Pathways. *Biochem Pharmacol*. 2009. 77: 508-20.
115. Busbee PB, Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr Rev*. 2013. 71:353–369.

116. Negishi T, Kato Y, Ooneda O, Mimura J, Takada T y col. Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J Immunol* 2005. 175:7348–7356.
117. Wilhelmsson A, Whitelaw ML, Gustafsson JA, and Poellinger L. Agonistic and antagonistic effects of alpha-naphthoflavone on dioxin receptor function. Role of the basic region helix-loop-helix dioxin receptor partner factor Arnt. *J Biol Chem*. 1994. 269:19028–19033.
118. Murray IA, Flaveny CA, DiNatale BC, Chairó CR, Schroeder JC y col. Antagonism of aryl hydrocarbon receptor signaling by 6, 2', 4'-trimethoxyflavone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010. 332:135-44.
119. Bankoti J, Rase B, Simones T, Sheperd DM. Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010. 246:18-28.
120. Khan N, Gowthaman U, Pahari S, Agrewala JN. Manipulation of costimulatory molecules by intracellular pathogens: veni, vidi, vici!!. *PLoS Pathog*. 2012. 8:e1002676.
121. Goldberg MF, Saini NK, Porcelli SA. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spec*. 2014. 2:MGM2-0005-2013.
122. Korb VC, Chuturgoon AA, Moodley D. *Mycobacterium tuberculosis*: Manipulator of Protective Immunity. *Int J Mol Sci*. 2016. 17:131.
123. Mahon RN, Sande OJ, Rojas RE, Levine AD, Harding CV y col. *Mycobacterium tuberculosis* ManLAM inhibits T-cell-receptor signaling by interference with ZAP-70, Lck and LAT phosphorylation. *Cell Immunol*. 2012. 275, 98–105.

124. Vergne I, Chua J, Deretic V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J. Exp. Med.* 2003. 198:653–659.
125. Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM y col. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 2003. 197:7–17.
126. Daffé M, McNeil MR, Brennan PJ. Novel type-specific lipooligosaccharides from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* 1991. 30:378-388.
127. Saita N, Fujiwara N, Yano I, Soejima K, Kobayashi K. Trehalose 6,6'-Dimycolate (Cord Factor) of *Mycobacterium tuberculosis* Induces Corneal Angiogenesis in Rats. *Infect Immun.* 2000. 68:5991–5997.
128. Behler F, Steinwede K, Balboa L, Ueberberg B, Maus R, y col. Role of Mincle in alveolar macrophage-dependent innate immunity against mycobacterial infections in mice. *J Immunol.* 2012 189:3121–3129.
129. Yamagami H, Matsumoto T, Fujiwara N, Arakawa T, Kaneda K y col. Trehalose 6,6-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign body and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infection and Immunity.* 2001. 69:810-815.
130. Indrigo J, Hunter RL, Jr, Actor JK. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology.* 2003. 149:2049–2059
131. Lima VM, Bonato VL, Lima KM, Dos Santos SA, Dos Santos RR y col. Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infect Immun.* 2001. 69:5305-12.

132. Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westerveen J, Huygen K, Hernández-Pando R, y col. PhoP: A Missing Piece in the Intricate Puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence. PLoS One. 2008. 3: e3496.
133. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem. 2000. 69:183-265.
134. Escamilla L, Mancilla R, Glender W, López-Marín LM. Mycobacterium fortuitum glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. AM Rev Resp Crit Care Med. 1996. 154: 1864-1867.
135. Palma-Nicolas JP, Hernández-Pando R, Segura E, Ibarra-Sánchez MJ, Estrada-García I y col. Mycobacterial Di-O-acyl-trehalose inhibits Th-1 cytokine gene expression in murine cells by down-modulation of MAPK signaling. Immunobiology. 2010. 215:143-152.
136. Espinosa-Cueto P, Escalera-Zamudio M, Magallanes-Puebla A, López-Marín LM, Segura-Salinas E y col. Mycobacterial glycolipids Di-O-acyl-trehalose and Tri-O-acyl-trehalose downregulate inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in macrophages. BMC Immunol. 2015. 23: 1-6.
137. Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G y col. Isolation of dendritic cells. Curr Protoc Immunol. 2009. Chapter 3: Unit 3.7.
138. Kim KD, Lee HG, Kim JK, Park SN, Choe IS y col. Enhanced antigen-presenting activity and tumour necrosis factor-alpha-independent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Immunology. 1999. 97:626–33.
139. Ghazaei C *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence J Res Med Sci. 2018. 23:63.

140. Magallanes-Puebla A. Efectos inmunoreguladores del glicolípido micobacteriano Di-O-acil trehalosa sobre la maduración de las células dendríticas. 2015. Tesis de Maestría.
141. Faridgozar M, Nikoueinejad H. New findings of Toll-like receptors involved in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Pathog Glob Health*. 2017. 111: 256–264.
142. Luger R, Valookaran S, Knapp N, Vizzardelli CDohnal AM y col. Toll-like receptor 4 engagement drives differentiation of human and murine dendritic cells from a pro- into an anti-inflammatory mode. *PLoS ONE*. 2013. 8:e54879.
143. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*. 2018. 48:434-452.
144. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*. 2008. 26, pp. 453-479.
145. Russell SE, Moore AC, Fallon PG, Walsh PT. Soluble IL-2R α (sCD25) Exacerbates Autoimmunity and Enhances the Development of Th17 Responses in Mice. *PLoS One*. 7(10): e47748
146. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol Rev*. 2013. 65:1148-61.
147. Wu H, Gong J, Liu Y. Indoleamine 2, 3-dioxygenase regulation of immune response (Review). *Mol Med Rep*. 2018. 17:4867-4873.
148. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR y col. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013. 4: 3–66.

149. Nigou J, Gilleron M, Rojas M, García LF, Thurnher M, Puzo G. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes Infect.* 2002. 4:945-53.
150. Józefowski S, Sobota A, Kwiatkowska K How *Mycobacterium tuberculosis* subverts host immune responses. *Bioessays.* 2008. 30:943-54.
151. Kim H, Kwon KH, Kim WS, Shin SJ. Virulence-dependent induction of interleukin-10-producing-tolerogenic dendritic cells by *Mycobacterium tuberculosis* impedes optimal T helper type 1 proliferation. *Immunology.* 2017. 151:177-190.
152. Tran V, Ahn SK, Ng M, Li M, Liu J. Loss of Lipid Virulence Factors Reduces the Efficacy of the BCG Vaccine. *Sci Rep.* 2016. 6: 29076.
153. Esparza M, Palomares B, García T, Espinosa P, Zenteno E y col. PstS-1, the 38-kDa *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein, is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis. *Scand J Immunol.* 2015. 81:46-55.
154. Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V. The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model. *Infect Immun.* 2003. 71:1929-37.
155. 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. *Clin Dev Immunol.* 2012. 2012:950503.

156. Batra JK, Raj HG, Subramanian TA. Effect of cord factor, a toxic glycolipid from *Mycobacterium tuberculosis*, on mouse liver drug metabolizing enzymes. *Toxicon*. 1987. 25:345-9.
157. Hunter RL, Olsen MR, Chinnaswamy J, Actor JK. Multiple Roles of Cord Factor in the Pathogenesis of Primary, Secondary, and Cavitory Tuberculosis, Including a Revised Description of the Pathology of Secondary Disease. *Ann Clin Lab Sci*. 2006. 36:371-86.
158. Behler F, Maus R, Bohling J, Knippenberg S, Kirchhof G y col. Macrophage-Inducible C-Type Lectin Mincle-Expressing Dendritic Cells Contribute to Control of Splenic *Mycobacterium bovis* BCG Infection in Mice. *Infect Immun*. 2015. 83:184-96.
159. Ehlers S, Schaible UE. The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host–Pathogen Collusion. *Front Immunol*. 2012. 3: 411.
160. Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, y col. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol*. 2006 176: 3000–3009.
161. Skinner JA, Reissinger A, Shen H, Yuk MH. Bordetella type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state. *J Immunol*. 2004. 173: 1934–1940
162. Chen Y, Danelishvili L, Rose SJ, Bermudez LE. *Mycobacterium bovis* BCG Surface Antigens Expressed under the Granuloma-Like Conditions as Potential Inducers of the Protective Immunity. *Int J Microbiol*. 2019. 2019:9167271.
163. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol*. 2008. 180:5771-5777.

164. Lin PL, Plessner HL, Voitenok NN, Flynn JL. Tumor necrosis factor and tuberculosis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2007. 12:22-5.
165. Barry CE, Boshoff H, Dartois V, Dick T, Ehrt S y col. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the goals of prophylaxis. *Nat Rev Microbiol.* 2009. 7:845–855.
166. Ahmed R, Salmi A, Butler LD, Chiller JM, Oldstone MB. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J Exp Med.* 1984. 160:521-40.
167. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 2007. 25:267-96
168. Li CH, Liu CW, Tsai CH, Peng YJ, Yang YH, y col. Cytoplasmic aryl hydrocarbon receptor regulates glycogen synthase kinase 3 beta, accelerates vimentin degradation, and suppresses epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. *Arch Toxicol.* 2017; 91(5): 2165–2178.
169. Wergeland I, Amus J, Dyrhol-Riise AM. T regulatory cells and immune activation in *Mycobacterium tuberculosis* infection and the effect of preventive therapy. *Scand J Immunol.* 2011. 73:234–42.
170. Garg A, Barnes PF, Roy S, Quiroga MF, Wu S, y col. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin e2-dependent expansion of regulatory t cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol.* 2008 Feb; 38(2): 459–469.

171. Hirsch CS, Rojas R, Wu M, Toossi Z. *Mycobacterium tuberculosis* Induces Expansion of Foxp3 Positive CD4 T-cells with a Regulatory Profile in Tuberculin Non-sensitized Healthy Subjects: Implications for Effective Immunization against TB. *J Clin Cell Immunol*. 2016. 7: 428.