



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTOS DE GLICOPEPTIDOLÍPIDOS DEL  
COMPLEJO *M. avium-intracellulare* SOBRE  
LINFOCITOS T

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACION  
BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A :  
OCTAVIO PANIAGUA TABOADA

MEXICO, D. F.

MARZO DE 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

271428



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.

El presente trabajo se realizó en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Luz María López Marín.

A mis padres Sonia y Fabio Rolando por su apoyo incondicional durante toda mi vida y estar cerca de mí. Se los agradezco.

A mis hermanos Rolando Ricardo y Alberto por sus palabras de aliento y coraje.

A todos mis tíos, tías, primos, abuelita y demás familiares.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo.

A todos aquellos profesores y personas que han participado en mi formación académica.

## **Agradecimientos**

A los H. miembros del jurado por sus valiosos comentarios y críticas a la presente tesis.

A los doctores Luz María López Marín y Rafael Saavedra Durán por su valiosa asesoría en el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Carlos Kubli Garfias y al Dr. Luis Padilla Noriega por su valiosa asesoría durante mi estancia en sus respectivos laboratorios.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Erika Segura por su ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A la Fundación Alberto y Dolores Andrade por haberme apoyado durante toda mi formación académica y continuar con ese apoyo.

A Fundación UNAM por apoyarme mediante el Programa de Becas de Tesis de Licenciatura y el Programa de Iniciación Temprana a la Investigación y la Docencia.

A la Fundación TELMEX por permitirme ser becario y apoyarme en la realización de mi segunda licenciatura.

## INDICE

<b>1. Resumen</b> .....	3
<b>2. Introducción</b> .....	5
<b>2.1 Problemática del complejo <i>M. avium-intracellulare</i></b> .....	5
<b>2.2 Lípidos micobacterianos</b> .....	6
2.2.1 Envoltura celular micobacteriana.....	7
2.2.2 Glicopeptidolípidos.....	8
2.2.3 Lípidos de micobacterias con actividades biológicas.....	9
<b>2.3 Patogénesis de la infección por <i>M. avium-intracellulare</i></b> .....	13
<b>3. Objetivos</b> .....	19
<b>4. Hipótesis</b> .....	19
<b>5. Material y métodos</b> .....	20
<b>5.1 Micobacterias</b> .....	20
<b>5.2 Extracción y purificación de lípidos</b> .....	20
5.2.1 Extracción .....	20
5.2.2 Purificación .....	21
5.2.2.1 Cromatografía de adsorción en columna abierta.....	21
5.2.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución.....	21
5.2.2.3 Cromatografía en capa fina preparativa.....	21
<b>5.3 Análisis químicos de los glicopeptidolípidos</b> .....	22
5.3.1 Análisis por cromatografía en capa fina.....	22

5.3.2 Análisis de azúcares.....	22
5.3.3 Desacidación alcalina.....	23
5.3.4 Análisis por espectrometría de masas.....	23
<b>5.4 Ensayos de proliferación celular.....</b>	<b>24</b>
<b>5.5 Determinación de la viabilidad celular.....</b>	<b>25</b>
5.5.1 Exclusión de azul de tripano.....	25
5.5.2 Determinación por citometría de flujo.....	26
<b>6. Resultados y discusión.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1 Purificación de los GPL.....</b>	<b>27</b>
6.1.1 Cromatografía de adsorción en columna.....	27
6.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución.....	30
6.1.3 Cromatografía en capa fina preparativa.....	33
6.1.4 Análisis de los GPL por espectrometría de masas.....	35
<b>6.2 Ensayos de proliferación celular.....</b>	<b>38</b>
<b>6.3 Ensayos de viabilidad celular.....</b>	<b>42</b>
6.3.1 Exclusión de azul de tripano.....	43
6.3.2 Ensayo de viabilidad celular por citometría de flujo.....	45
<b>7. Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>54</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>56</b>

## 1. Resumen

Una de las infecciones más frecuentes en pacientes con SIDA es la causada por cepas del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, que agrupa a veintiocho variantes. En esta infección los bacilos sobreviven y se reproducen dentro de los macrófagos, donde se acumulan algunos de los componentes, sobre todo de la pared celular. Las moléculas de la pared celular de las micobacterias desempeñan un papel muy importante en el reconocimiento por células del huésped y también en la modulación de la actividad de dichas células. Dentro de las moléculas de la pared celular, se encuentran los glicopeptidolípidos (GPL) polares y no polares. Los polares destacan por ser particularmente antigénicos y capaces de modificar la respuesta inmune de linfocitos. Existen estudios que sugieren que al igual que otros lípidos, los GPL polares podrían afectar el funcionamiento de las células del sistema inmune produciendo alteraciones físicas de sus membranas y no mediante un reconocimiento específico. Considerando esta hipótesis, los GPL homólogos apolares podrían tener efectos muy importantes sobre los linfocitos, puesto que producen alteraciones en membranas modelo y naturales; sin embargo, el estudio biológico de estos últimos no ha sido considerado debido a que son moléculas poco antigénicas. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos que los GPL apolares (compartidos por todas las variantes del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*) tienen sobre células T. Los GPL apolares fueron aislados de los extractos crudos de *Mycobacterium smegmatis* (especie que los comparte con el complejo



*Mycobacterium avium-intracellulare*) por cromatografía de adsorción en columna abierta y finalmente por cromatografía en capa fina preparativa y HPLC. Se realizaron ensayos de proliferación celular midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en células de bazo de ratón en presencia de distintas concentraciones de los GPL puros. Adicionalmente, se hicieron ensayos de viabilidad celular con azul de tripano y por citometría de flujo (exclusión de yoduro de propidio) para evaluar la toxicidad de los GPL.

En tres experimentos distintos se observó que los GPL son capaces de inhibir la respuesta proliferativa a concanavalina A (Con A) de células de bazo de ratón, de forma dependiente de la dosis. Por otra parte, los ensayos de viabilidad celular mostraron que, a pesar de que se observaba un ligero efecto citotóxico, éste no era responsable de la inhibición de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina.

Estos resultados destacan la importancia del estudio de dichas moléculas hasta ahora poco consideradas, para entender el complejo mecanismo de la patogenia de las micobacterias.

## 2. Introducción

### 2.1 Problemática del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*

Las infecciones causadas por micobacterias han afectado a la humanidad desde épocas muy antiguas. Las infecciones micobacterianas más conocidas son la tuberculosis y la lepra. No obstante, en años recientes otro grupo de micobacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* ha tomado importancia. Se ha observado que, poco tiempo después de la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), este complejo ha desempeñado un papel muy importante en la progresión y término del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) como oportunista [1, 5, 6, 15, 21, 25, 29, 30, 39, 53, 66-70]. Históricamente este complejo ha sido asociado con infecciones pulmonares no tuberculosas en pacientes inmunocomprometidos, como aquéllos sometidos a terapias inmunosupresoras, o con leucemia. Aunque el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* no había constituido un problema grave en salud pública, la epidemia del SIDA ha incrementado dramáticamente el número de casos de infección por este complejo. Por otra parte, ha habido también un incremento en infecciones por *M. avium-intracellulare* en personas no infectadas con VIH, especialmente en la población femenina de edad avanzada [16]. En las condiciones apropiadas, un patógeno oportunista como *Mycobacterium avium-intracellulare* puede crear las condiciones necesarias para provocar altas tasas de mortalidad. En el caso de *Mycobacterium avium-intracellulare* esto ocurre normalmente cuando la población de linfocitos T CD4+ es reducida.

Es importante notar que *Mycobacterium avium* es el causante de las infecciones bacterianas diseminadas más frecuentes que se observan en etapas avanzadas del SIDA. En Estados Unidos, se ha observado que entre el 50-70 % de los pacientes en etapas avanzadas tienen infecciones debidas a este complejo [7]. En países en vías de desarrollo, la infección principal asociada al SIDA es la tuberculosis, sin embargo se ha señalado que este complejo puede afectar del 12 al 24% de los pacientes con SIDA en estos países [56]. No obstante, es posible que en estos países el diagnóstico de infecciones micobacterianas distintas de la causada por *Mycobacterium tuberculosis* sea particularmente deficiente. Por otra parte, también es factible que debido a la menor tasa de supervivencia de los enfermos con SIDA en etapas avanzadas de la infección, las infecciones por el complejo *M. avium-intracellulare* se vean reducidas.

Recientemente, se ha observado que los macrófagos infectados por el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* exhiben niveles muy altos de replicación del VIH [44, 63], lo cual sugiere que este complejo es capaz de incrementar indirectamente la replicación del VIH en los pacientes infectados.

## **2.2 Lípidos micobacterianos**

El género *Mycobacterium* es conocido por su alto contenido en lípidos, los cuales llegan a constituir hasta el 40 % del peso seco [24]. Existe una gran variedad de lípidos micobacterianos que han sido descritos en los últimos años [11]. Con el objeto de entender cómo los lípidos de *Mycobacterium avium* pueden

afectar la respuesta del huésped, es necesario revisar algunos aspectos de la estructura básica de la envoltura celular.

### 2.2.1 Envoltura celular micobacteriana

Está conformada esencialmente por cuatro capas principales (fig. 1). La primera capa contiene la membrana plasmática (PM). Esta capa es similar a la encontrada en otras bacterias, formada por una bicapa de lípidos en donde se encuentran inmersas las proteínas de membrana. La segunda capa es la llamada zona densa en electrones (ED), debido a sus características de tñido al ser observada por microscopía electrónica de transmisión. En esta área se localizan los peptidoglicanos y arabinogalactanos que constituyen los componentes estructurales de la pared celular [51]. Adyacente a esta capa se encuentra la zona llamada transparente de electrones (ET). Uno de los componentes principales en esta zona es el ácido micólico, compuesto graso muy característico del género. En las capas más externas se encuentra una amplia variedad de componentes que dependen de la especie de la cual se esté hablando. Estas áreas son comúnmente llamadas L1 y L2 y son las más importantes en lo que respecta a las interacciones iniciales, pues se encuentran componentes capaces de inducir una determinada respuesta del huésped y proteger a la micobacteria de los efectos de los fagolisosomas.

### 2.2.2 Glicopeptidolípidos

Precisamente en las capas externas L1 y L2, en el caso de *Mycobacterium avium* y otras micobacterias, se encuentran los glicopeptidolípidos (GPL), cuya estructura básica consiste de una cadena acilada de hasta 30 carbonos y un tetrapéptido que contiene D-fenilalanina, D-*allo*-treonina, D-alanina y L-alaninol [38, 45]. Los GPL difieren entre sí en la naturaleza de los residuos glicosídicos unidos al extremo hidroxilo de la *allo*-treonina y del alaninol. Aquéllos que contienen varios residuos de oligosacáridos son los denominados GPL polares; éstos varían de especie a especie y son precisamente los que determinan las distintas serovariantes, ya que sus componentes glicosídicos son altamente antigénicos. También se encuentran otros GPL relacionados estructuralmente y que carecen de la extensión de oligosacáridos del dominio peptídico (sólo poseen 2 residuos) y a ellos nos referiremos como GPL apolares. Son precisamente estos GPL apolares los que se encuentran presentes en todas las especies de micobacterias oportunistas que infectan a los humanos; además representan un mayor porcentaje de GPL que sus homólogos polares. No obstante, dado que no son altamente antigénicos como los GPL polares, no se les ha puesto demasiada atención. En especies como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* no se ha reportado la existencia de GPL.

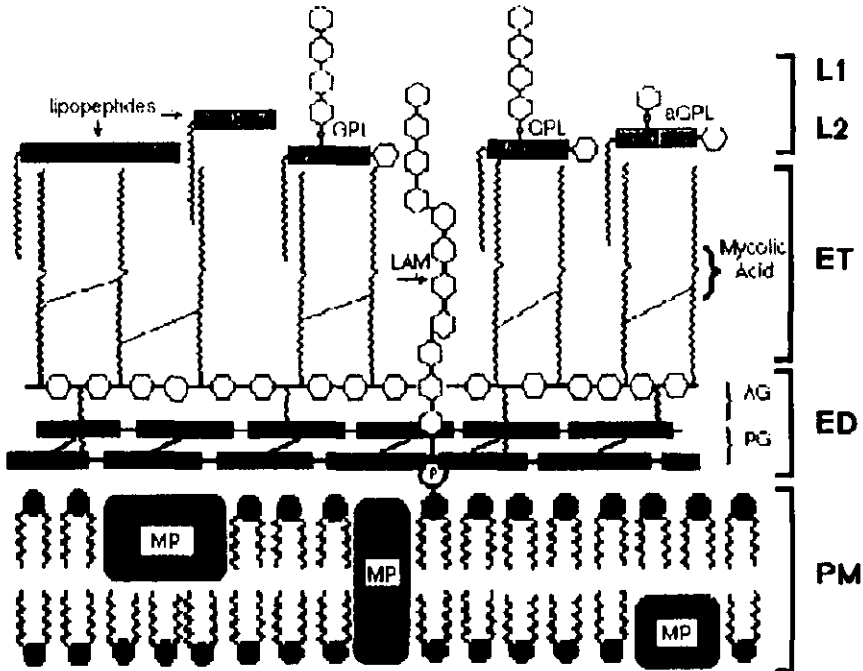


Figura 1. Modelo de la envoltura celular de las micobacterias, donde se representan la membrana plasmática (PM), la zona electrónica densa (ED) la zona electrónica transparente (ET) y las capas L1 y L2. En este mismo modelo también se observan proteínas de membrana (MP), peptidoglicanos (PG) arabinogalactanos (AG), lipoarabinomananos (LAM), lipopeptidos y glicopeptidolípidos (GPL). Modificada de Barrow *et al* [4].

Los GPL son importantes debido a que están unidos de manera no covalente a la pared celular y se acumulan durante el crecimiento de *Mycobacterium avium*. En caso de que el crecimiento ocurra dentro de un macrófago, los GPL se acumulan en los fagolisosomas.

### 2.2.3 Lípidos de micobacterias con actividades biológicas.

Con fracciones lipídicas extraídas de *Mycobacterium avium* se ha observado inmunosupresión [4, 26, 57]. Las fracciones lipídicas totales son

capaces de interferir con la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica a concanavalina A (Con A), derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) y fitohemaglutinina [57]. En estos estudios se sugiere que los lípidos impiden la expresión de moléculas accesorias en la superficie de las células mononucleares.

Sólo algunos componentes lipídicos de *Mycobacterium avium* han sido asociados con propiedades inmunomodulatorias, entre ellos los lipoarabinomananos, los GPL polares y un grupo poco caracterizado hasta el momento de glicolípidos [26]. Como se ha comentado, los arabinomananos y los GPL se localizan en la capa más externa de la envoltura celular; sin embargo, no hay estudios hasta el momento que describan el aislamiento y caracterización de lipoarabinomananos de *Mycobacterium avium*. Es probable que la localización de los arabinomananos en *Mycobacterium avium* sea similar a la de otras bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, en cuyo caso, el derivado no acilado arabinomanano, sería el compuesto expuesto en la superficie [46]. La localización de los otros glicolípidos descrita por el grupo de Hines [26] no ha sido definida. Se ha observado que lipoarabinomananos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* poseen una variedad de actividades biológicas como la inhibición de la activación de macrófagos mediada por interferón- $\gamma$ , supresión de la proliferación de células T [31, 40, 41], inhibición de la síntesis de mRNA de IL-2 y de IL-5 en la línea Jurkat de células T humanas [14] y un aumento de la producción de TNF- $\alpha$  en los macrófagos tratados con tioglicolatos [8].

Con respecto a los GPL polares, el grupo de Barrow [28] señaló que dichos GPL son esencialmente compuestos no tóxicos que estimulan una respuesta inflamatoria no específica cuando son inyectados intraperitonealmente en ratones. Sin embargo, después de 3 semanas, las células mononucleares esplénicas muestran una disminución significativa en la respuesta proliferativa a Con A, fitohemaglutinina y lipopolisacárido. Por otra parte, al analizar esas mismas células tratadas con GPL por citometría de flujo, se observó una disminución de células con el marcador Thy-1. Esta reducción en las células T se debe a un decaimiento selectivo en la población de células Lyt-2+. Se propuso en este mismo trabajo que la inmunosupresión observada fue debida a una exposición prolongada a los GPL y se asumió que los responsables eran los metabolitos derivados de estos mismos GPL [12].

Como con otros lípidos micobacterianos encontrados en la parte externa de la envoltura celular, no hay evidencia directa de que los GPL sean degradables o no [4]. Sin embargo, mediante ensayos de marcaje radioactivo (en los residuos glicosídicos y en la fenilalanina), se ha podido determinar que los GPL son relativamente inertes a la degradación por macrófagos [27, 65]. De igual modo, en tejidos infectados por *Mycobacterium leprae* los glicolípidos fenólicos antigénicos son depositados en la superficie del organismo y se acumulan en los macrófagos en cantidades similares a los GPL de *Mycobacterium avium* [31, 40]. Tomando en cuenta la información anterior, se podría inferir que estos glicolípidos son resistentes a la degradación. Esto podría tener consecuencias importantes para la



bacteria, pues los glicolípidos fenólicos de *Mycobacterium leprae* son inmunosupresivos, pueden reducir las respuestas oxidativas de los monocitos e inhibir la proliferación de células mononucleares humanas en una forma no específica. Similares efectos se han observado en glicolípidos de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium kansasii* [48, 59], con respecto a la inhibición de la proliferación de células mononucleares humanas.

Posteriormente, en otro estudio del grupo de Barrow [2] al utilizar fracciones lipídicas totales de *Mycobacterium avium* en células mononucleares de sangre periférica, dichas fracciones indujeron la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y TNF- $\alpha$  [2, 3]. Al purificar varias fracciones lipídicas por cromatografía en columna y probarlas con células mononucleares de sangre periférica, la fracción que mostró mayores propiedades inmunomodulatorias fue la fracción de los GPL [4]. Otros estudios de ese mismo grupo [47] muestran que la fracción de los GPL provoca la liberación de factores solubles de macrófagos murinos peritoneales que producen inmunosupresión en la respuesta linfoproliferativa de células esplénicas mononucleares. Un estudio similar sugiere que la inhibición era debida a IL-6 [58]. Al continuar con estos estudios se ha mostrado que fracciones lipídicas totales y aquéllas con GPL son capaces de inducir las 3 citocinas inflamatorias principales (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1) y además PGE<sub>2</sub> y TXB<sub>2</sub> [4].

Por otra parte, se ha mostrado que GPL polares de *Mycobacterium chelonae* tienen actividades biológicas. Pilet y su grupo han reportado que GPL polares de *Mycobacterium chelonae* tienen actividad coadyuvante, al aplicarse

junto con una vacuna contra la influenza [23, 42]; pueden llegar a utilizarse como un factor hematopoyético [62] y pueden incrementar la resistencia de ratones contra la infección por *Candida albicans*, aparentemente mediada por la capacidad de los GPL de producir hiperleucocitosis [33].

### **2.3 Patogénesis de la infección por *M. avium-intracellulare***

Las micobacterias son parásitos intracelulares facultativos. La ruta primaria de infección por *Mycobacterium avium* no se encuentra aún bien definida, aunque la vía respiratoria y la oral son candidatos evidentes. La mayoría de los enfermos por infección de *Mycobacterium avium* sin SIDA presenta enfermedad pulmonar, lo cual sugiere que este órgano es susceptible a la infección y que además es en este lugar donde se realiza el control primario de la infección [43]. Por otra parte, la ausencia de enfermedad pulmonar en pacientes con SIDA, no excluye a este órgano como una de las rutas primarias de llegada de la bacteria.

El progreso al estado de enfermedad después de la colonización de *Mycobacterium avium-intracellulare* es diferente en pacientes con SIDA que en los pacientes sin esta enfermedad. En el caso de estos últimos, la respuesta inmune adquirida responde al patógeno y la acumulación de monocitos y linfocitos terminará en un granuloma donde la infección será contenida, como pasa con *Mycobacterium tuberculosis*. En pacientes con SIDA, la pérdida de dicha respuesta inmune provoca la rápida diseminación de la bacteria hacia otros órganos del sistema reticuloendotelial [32]. No sólo la susceptibilidad del

huésped, sino también la virulencia de la bacteria contribuirá al desarrollo de la enfermedad. La respuesta inmune celular es considerada el mediador principal del control a la infección por micobacterias.

Después de la infección por vía gastrointestinal o respiratoria, las bacterias del complejo *M. avium-intracellulare* son fagocitadas por los macrófagos mediante un receptor del complemento, probablemente unido a un GPL [16]. Una vez dentro del macrófago las micobacterias residen en una vacuola (fagolisosoma) donde el pH se equilibra a 6.3-6.5 [54]; en la figura 2 se muestran micrografías de macrófagos infectados con este complejo.

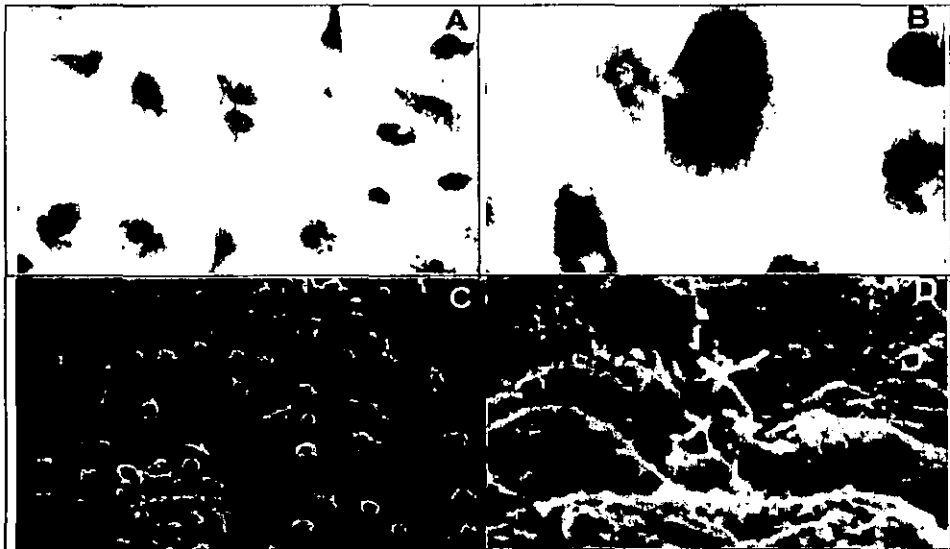


Figura 2. Micrografías de macrófagos de ratón peritoneales infectados con *M. avium* serovariente 4, al día cero (A) y al día 7 (B). Las micobacterias fueron teñidas por el método de Ziehl-Neelsen y vistas al microscopio de luz a 630X. En C y D se muestran fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido, de macrófagos peritoneales murinos infectados por *M. avium* serovariente 4. En la figura C la fotografía fue tomada a 400X, mientras que en D fue tomada a 4000X. (tomada de Barrow, *et al* [4]).

Los lisosomas se fusionan a los fagosomas para formar los compartimentos fagolisosomales, lo cual en condiciones normales es suficiente para destruir a algún organismo invasor. En el caso de *Mycobacterium avium* la degradación no ocurre debido a que la fusión no se lleva a cabo, o bien porque el organismo es protegido de la degradación lisosomal por su capa superficial protectora [19, 22], aunque los dos mecanismos pudieran llevarse a cabo al mismo tiempo. Durante la fagocitosis se induce la producción de TNF- $\alpha$ . Esta citocina activadora de macrófagos, puede actuar de manera autocrina, preparando al macrófago para actividades anti-bacterianas.

Durante el control de la infección también participan células de la respuesta inmune innata como las células NK, neutrófilos y células B de la zona marginal [13, 52]. Mientras que las células de la respuesta innata pueden generar IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$  requeridos para el control de la infección, éstas no pueden mantener dicha producción en ausencia de la respuesta inmune adquirida [49]. Mediante ensayos con animales *knock-out*, se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  es crucial para la respuesta inmune contra micobacterias. Conforme la infección progresa, *Mycobacterium avium* continuamente deposita lípidos de su superficie en los macrófagos. No es sorprendente que los GPL puedan persistir en los macrófagos del huésped, pues estos lípidos superficiales son relativamente inertes a la degradación por enzimas lisosomales [65]. Aunque no ha sido determinado aún lo que sucede con esos lípidos durante todo el proceso infeccioso en humanos, es muy probable que empiecen a acumularse dentro de

varios sitios del sistema reticuloendotelial. Los sitios más comunes donde se localiza *Mycobacterium avium* son los ganglios linfáticos, bazo e hígado; esto se vuelve una cuestión importante cuando se toma en cuenta que las infecciones diseminadas en pacientes con SIDA, pueden generar niveles en el suero tan altos como  $10^4$  CFU/ml y cargas de  $10^9$ - $10^{10}$  micobacterias por gramo de tejido. El grupo de Barrow [4] ha mostrado que de  $10^8$ - $10^{10}$  micobacterias pueden producir aproximadamente 0.18-18 mg de GPL, cantidad suficiente como para inducir efectos inmunomodulatorios.

Lanéelle y Daffé [34] mencionan que no existe un modelo coherente para explicar la patogenia de las micobacterias, sin embargo, señalan que las interacciones entre los lípidos de las micobacterias y las membranas del huésped pueden ayudar a explicar la patogénesis. Esta hipótesis está relacionada con el hecho de que las micobacterias liberan sustancias que pueden penetrar membranas [35], además de que otros estudios han demostrado que estos lípidos son capaces de alterar membranas [35, 36]. El grupo de Lanéelle [60, 61] demostró que los GPL se pueden insertar en las monocapas de fosfolípidos. En la figura 3 se representa la acumulación postfagocítica de distintos lípidos tras la infección por *Mycobacterium avium*.

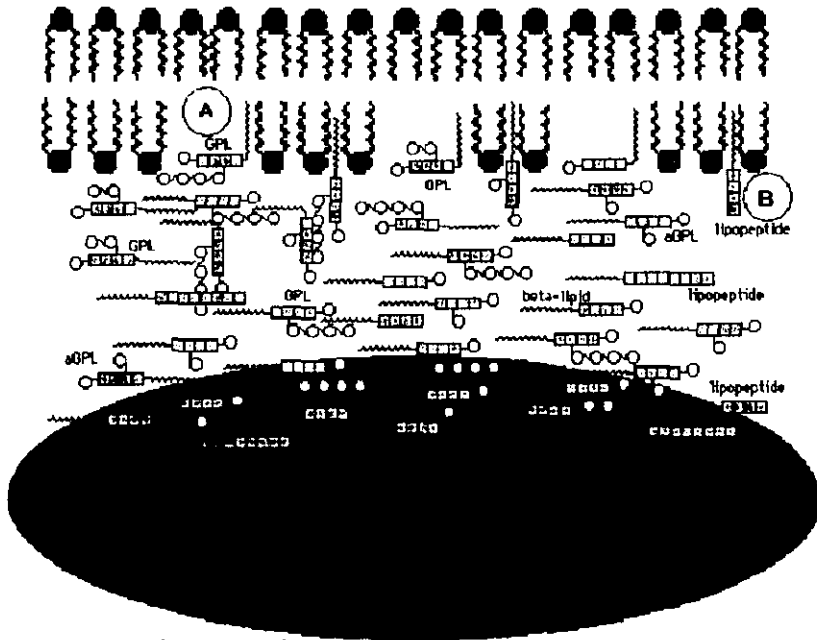


Figura 3. Representación de distintos lípidos de superficie que probablemente se acumularían como resultado del crecimiento de *Mycobacterium avium* en los compartimentos fagolisomales de los macrófagos. En la figura se encuentran varios lípidos representados cerca de la membrana del fagolisosoma: GPL polares específicos de cada serovariente [A], GPL apolares (aGPL) y lipopéptidos [B]. Modificada de Barrow *et al* [4].

Los lípidos micobacterianos como los GPL interactúan con las membranas, dependiendo de los residuos de carbohidratos, e incrementan la permeabilidad [35, 36]. Componentes de GPL que contienen 1 ó 3 residuos de carbohidratos, son capaces de interactuar más con la membrana y de alterarla que aquéllos que poseen más residuos.

Por ahora, los eventos postfagocíticos en etapas crónicas de la enfermedad únicamente pueden ser hipotetizados. Debido a su capacidad de interactuar con membranas, es probable que los GPL y otros lípidos relacionados puedan interactuar con células inmunológicamente importantes en la vecindad de

los macrófagos que los habían incorporado inicialmente. Si *Mycobacterium avium* tiene la capacidad de alterar la respuesta del huésped por medio de la alteración de la red de citocinas, es muy plausible que esta alteración pueda desempeñar un papel importante en el progreso del SIDA. De esta manera, las infecciones iniciales con *Mycobacterium avium* podrían ser solo subclínicas, debido a que es un patógeno de lenta evolución y la cantidad de lípidos acumulada no sería suficiente para alterar la respuesta normal del huésped. El paciente podría controlar la infección conforme la población de células T CD4 decrece; sin embargo, conforme la bacteria continúa creciendo y depositando lípidos, es probable que la relación–huésped parásito se vea afectada.

### **3. Objetivos**

Aislar GPL apolares diglicosilados, compuestos que no han sido estudiados (sólo han sido estudiados los GPL polares) y que además son los posibles responsables de efectos inmunomoduladores observados en fracciones lipídicas crudas. Una vez aislados dichos compuestos, se evaluará la actividad inmunomoduladora de dichos glicopeptidolípidos y con esto su importancia en la patogenia de las micobacterias, al examinar su efecto en proliferación de linfocitos T de ratón.

### **4. Hipótesis**

Los GPL apolares poseen efectos inmunomoduladores sobre linfocitos T y otras células del sistema inmune.



### **3. Objetivos**

Aislar GPL apolares diglicosilados, compuestos que no han sido estudiados (sólo han sido estudiados los GPL polares) y que además son los posibles responsables de efectos inmunomodulatorios observados en fracciones lipídicas crudas. Una vez aislados dichos compuestos, se evaluará la actividad inmunomodulatoria de dichos glicopeptidolípidos y con esto su importancia en la patogenia de las micobacterias, al examinar su efecto en proliferación de linfocitos T de ratón.

### **4. Hipótesis**

Los GPL apolares poseen efectos inmunomodulatorios sobre linfocitos T y otras células del sistema inmune.

## 5. Material y métodos

**5.1 Micobacterias.** *Mycobacterium avium* serovariante 2 y *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950 fueron compradas a la ATCC. *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>26</sup> fue proporcionada amablemente por la Dra. Clara Espitia. Las micobacterias fueron crecidas en medio líquido de Sauton.

### 5.2 Extracción y purificación de lípidos.

5.2.1. Extracción. Se inocularon 6 litros de medio Sauton con *Mycobacterium smegmatis* cepa mc<sup>26</sup> y se incubaron 1 semana y media. Una vez que las micobacterias habían crecido en forma abundante, la masa bacteriana se separó del medio por filtración. Los lípidos totales fueron extraídos de las bacterias, de acuerdo con el método descrito por Dobson *et al* [18], mediante una extracción con metanol-cloroformo (2:1, v/v). Esta mezcla se dejó 3 días para inactivar las bacterias y extraer los lípidos unidos de forma no covalente. Pasados los 3 días, esta primera extracción se recuperó por filtración y las bacterias fueron sometidas a una segunda extracción en una mezcla metanol-cloroformo (1:2, v/v) durante 10 horas. La nueva mezcla metanol-cloroformo fue obtenida por filtración y adicionada a la anterior. Finalmente se hizo una partición en la que se disolvió el extracto total en una mezcla de cloroformo-metanol-agua en proporciones 4:2:1 (v/v) y se recolectó la parte clorofórmica de la mezcla, en donde se localizan los lípidos de interés. Los lípidos fueron concentrados por evaporación.

## 5.2.2. Purificación.

5.2.2.1. Cromatografía de adsorción en columna abierta. Una vez obtenidos los lípidos se procedió a purificarlos, mediante cromatografía de adsorción en columna, utilizando florisil como matriz. La mezcla de solventes que se utilizó como eluyente fue cloroformo-metanol-agua (100-0-0, 97.5-2.5-0, 95-5-0, 92.5-7.5-0, 90-10-0, 85-15-0, 80-20-0, 75-25-0, 70-30-0, 60-40-0, 60-25-4, 60-35-8 v/v), se eluyó tres veces con cada mezcla de solventes y se recuperaron 36 fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina analítica y aquellas fracciones con los GPL de interés fueron seleccionadas para su posterior purificación.

5.2.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las fracciones seleccionadas anteriormente fueron sometidas a cromatografía líquida de alta resolución con el objeto de purificar más eficientemente los GPL obtenidos por la cromatografía anterior. En particular se utilizó la fracción eluida con cloroformo-metanol-agua 97.5-2.5-0 (v/v) con las condiciones siguientes: gradiente lineal de metanol en cloroformo a  $t_0 = 0\%$  →  $t_{20} = 10\%$ , flujo 1 ml/min. Se realizaron otras purificaciones donde se cambió el flujo hasta 2 ml/min y finalmente se aumentó el porcentaje final de metanol (20%) al mismo tiempo. La detección se realizó a 254 nm.

5.2.2.3 Purificación por cromatografía en capa fina preparativa. En placas de sílica-gel preparativas (Merck) fueron depositadas las fracciones enriquecidas con los GPL, que se obtuvieron en la cromatografía por adsorción sobre florisil. Se eluyó con una mezcla de solventes cloroformo-metanol-agua (90:10:1, v/v) y los lípidos fueron revelados con 5% de rodamina en acetona. Una vez marcadas las bandas con los GPL, éstas se rasparon y se les añadió la misma mezcla de solventes cloroformo-metanol-agua para extraer los GPL del gel. Posteriormente esta mezcla de sílica y solvente fue filtrada. Se recuperó el solvente y se pasó a través de una columna de florisil para eliminar la rodamina y los fragmentos de sílica. Las fracciones fueron recuperadas en tubos de ensayo, concentradas y posteriormente analizadas por cromatografía en capa fina.

### **5.3. Análisis químicos de los glicopeptidolípidos.**

5.3.1 Análisis por cromatografía en capa fina de los lípidos purificados. Todas las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, HPLC y cromatografía preparativa fueron analizadas en placas de cromatografía en capa fina de sílica-gel [9, 10]. Las mezclas utilizadas para dichos análisis fueron cloroformo-metanol-agua 100-0-0, 97.5-2.5-0, 95-5-0, 92.5-7.5-0, 90-10-0, 85-15-0, 80-20-0, 75-25-0, 70-30-0, 60-40-0, 60-25-4, 60-35-8 (v/v). Todas estas placas fueron reveladas con antrona al 0.2 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, calentando a 110 °C por 5 minutos.

5.3.2 Análisis de azúcares. Se hidrolizó una muestra de 1 mg de GPL con 1 ml de ácido trifluoroacético 1M, incubando en baño seco durante dos horas a 120 °C. Una vez evaporado el ácido, se realizó una partición con una mezcla agua-éter 1:1 (v/v) y se recuperó la fase acuosa. Finalmente, la fase acuosa fue corrida en una placa de cromatografía en capa fina, con una mezcla cloroformo-metanol 70:30 (v/v) y revelada con antrona al 0.2 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, calentando a 110 °C por 5 minutos. Se utilizaron como estándares azúcares conocidos obtenidos de GPL de *Mycobacterium peregrinum*.

5.3.3 Desacidación alcalina. Una muestra con 0.5 mg de GPL fue disuelta en una mezcla cloroformo-metanol 2:1 (v/v). Se le adicionó un volumen igual de NaOH 0.2 N disuelta en metanol y la mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37 °C. Se neutralizó con ácido acético concentrado y se secó con nitrógeno. Se resuspendió en 5 ml de una mezcla cloroformo-metanol-agua 4:2:1 (v/v), se recuperó la fase clorofórmica (inferior) y se lavó 2 veces con una mezcla metanol-agua 1:1 (v/v). Se concentró por evaporación y se guardó en congelación.

5.3.4 Análisis por espectrometría de masas (mediante bombardeo rápido de átomos [FABMS]). Las muestras se disolvieron en una mezcla cloroformo-metanol (1:1, v/v). Sobre el aplicador se mezcló 1µl de la solución con la muestra, 1µl de alcohol *meta*-nitrobencílico (MNBA) y 1µl de solución de NaI al 10% en agua. El

análisis se llevó a cabo en modo positivo en un espectrómetro de masas (Jeol JMS-SX12A) del Instituto de Química, en el laboratorio del Ing. Luis Velasco.

#### **5.4. Ensayos de proliferación celular.**

Los GPL fueron disueltos en etanol-hexano (1:1, v/v) para poder ser depositados en las cajas de 96 pozos utilizadas para los ensayos de proliferación. El depósito de distintas concentraciones de GPL en las cajas se realizó un día antes del ensayo de proliferación. Las cajas con las soluciones de GPL se dejaron evaporando durante toda la noche, en condiciones estériles.

Cuatro o dos (en el caso del último ensayo) ratones hembras de la cepa BALB/c (4-6 semanas de edad), fueron sacrificados e inmediatamente se procedió a extraerles el bazo. Los bazos fueron transfundidos con una jeringa con medio RPMI (Gibco) adicionado con HEPES y  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ . Una vez recuperadas en cajas de Petri, las células fueron transferidas a un tubo de centrifuga de 15 ml (Falcon), se dejaron sedimentar los residuos de los bazos durante 5 minutos y se transfirió el medio con las células a otro tubo Falcon de 15 ml. Las células se recuperaron por centrifugación durante 5 minutos a 1500 rpm. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de la solución de lisis para eritrocitos (compuesta de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [38 mM],  $\text{KHCO}_3$  [2 mM], EDTA.2Na [24 M]), la cual se dejó actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos con 10 ml de PBS o de medio RPMI. Después de la última centrifugación las células fueron resuspendidas a una concentración de  $10^6$  células/ml en medio

RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (v/v), piruvato de sodio (1 mM), aminoácidos no esenciales (0.01 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 g/ml) y  $\beta$ -mercaptoetanol (0.05 mM). Para cada experimento se hizo un conteo de viabilidad mediante la exclusión de azul de tripano. Si y sólo si la viabilidad era estrictamente mayor del 95 % se llevó a cabo el experimento. Posteriormente, se depositaron aproximadamente  $10^5$  células por pozo (en un volumen de 100  $\mu$ l, volumen final de 200  $\mu$ l/pozo). Adicionalmente, se les añadió otros 100  $\mu$ l de medio suplementado o de una concentración determinada de Con A. Se dejó incubando a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> por 3 días. La <sup>3</sup>H-timidina fue adicionada 48 horas después de haber iniciado el ensayo. Las células fueron cosechadas 18 horas después de haber añadido la timidina en papel filtro (Wallac) y la radioactividad incorporada fue medida por espectroscopía de centelleo en un contador Beta-plate (Wallac). Todos los ensayos fueron hechos por triplicado. Los resultados se expresan como cuentas por minuto de <sup>3</sup>H incorporado.

## **5.5. Determinación de la viabilidad celular.**

5.5.1. Exclusión de azul de tripano. Este método se utilizó para determinar el porcentaje de células viables a emplear para el ensayo de proliferación, y también se utilizó para medir el porcentaje de células viables en presencia de GPL a las 24, 48 y 72 horas. Se tomaba una cantidad de células de cada pozo (entre 20 y 50  $\mu$ l), y se mezclaba con azul de tripano, para contarlas directamente en el microscopio (vivas y muertas) y se tomaban los promedios correspondientes.

5.5.2. Determinación por citometría de flujo. Las células se prepararon de la manera siguiente: dentro de un tubo de centrifuga de 15 ml (Falcon) se reunió el contenido de tres pozos equivalentes (placa de 96 pozos) y se les añadieron 4 ml de PBS. Las células se recuperaron por centrifugación a 1500 rpm durante 6 minutos. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS y se transfirieron a tubos para leer en el FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). En este ensayo se cuantificó la exclusión de yoduro de propidio (50  $\mu$ g/ml) de acuerdo con Ronot *et al* [50]. Las muestras fueron leídas en el canal de FL2, primero sin yoduro de propidio, a fin de establecer el límite de fluorescencia intrínseca. Se les añadieron 10  $\mu$ l de la solución de yoduro de propidio y se volvieron a leer de inmediato.



## 6. Resultados y discusión.

### 6.1 Purificación de los glicopeptidolípidos.

#### 6.1.1 Purificación por cromatografía de adsorción en columna.

Antes de empezar con la purificación de los GPL se hicieron algunas pruebas con extractos. Es conocido que los GPL apolares son compartidos por todas las cepas del complejo *M. avium* que infectan a humanos [4], pero también por la especie *M. smegmatis*. Con el objeto de comparar los GPL apolares presentes en *M. smegmatis* con aquéllos presentes, tanto en *M. avium* como en *M. intracellulare*, se hizo una placa de cromatografía en capa fina donde se observan distintos extractos lipídicos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>6, *M. avium* serovariante 2 y *M. intracellulare* ATCC 13950 (fig. 4). Como se puede observar, los GPL presentan su característico color azul claro. En esta placa puede verse claramente, a pesar de un pigmento violeta superpuesto (pigmento lipídico característico del género *Mycobacterium*), cómo los GPL apolares (indicados con flechas) de esta cepa mutante de *M. smegmatis* tienen el mismo Rf que los GPL presentes en *M. avium* y en *M. intracellulare*. Asimismo, en esta figura puede apreciarse que la cantidad de GPL apolares presentes en *M. smegmatis* es mayor que la que se encuentra en *M. avium* o *M. intracellulare*. Por otra parte, la obtención de lípidos de *M. smegmatis* ofrece las ventajas de trabajar con una cepa de micobacteria que presenta un bajo nivel de riesgo biológico y una velocidad de crecimiento mucho mayor (1 semana aproximadamente, comparado

con el de *M. avium* y *M. intracellulare*, de 3 a 4 semanas). Por tales motivos, se decidió que *M. smegmatis* sería la fuente para obtener GPL apolares.

La cromatografía en columna de adsorción se realizó con los extractos lipídicos de *M. smegmatis*, pero al mismo tiempo también se cultivaron *M. avium* y *M. intracellulare* para obtener extractos lipídicos y posteriormente intentar aislar también los GPL apolares, objetivo que se descartó en este trabajo. Por otra parte, se realizó un tratamiento químico para desacilar los extractos de todas estas bacterias y observar la presencia de grupos acetilo en los GPL. Debido a que en el complejo *M. avium-intracellulare* la mayor parte de los GPL contienen acetilos en forma natural (aquellos que muestran un Rf mayor, señalados en la fig. 4), se decidió trabajar con los GPL intactos con el objeto de evitar resultados provocados por una alteración química en la molécula nativa.

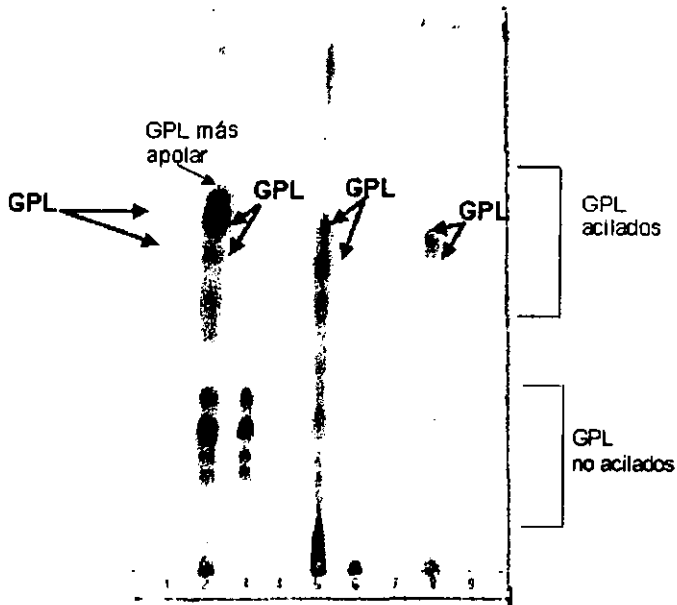


Figura 4. Placa de cromatografía en capa fina (sílica-gel) de los extractos lipídicos totales de las cepas *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. smegmatis*. Carriles 1, 4 y 7: GPL estándares. Carriles 2 y 3: extractos lipídicos de *M. smegmatis* cepa mc<sup>2</sup>6 intactos y desacilados, respectivamente. Carriles 5 y 6: extractos lipídicos de *M. intracellulare* ATCC 13950, intactos y desacilados, respectivamente. Carriles 8 y 9: extractos lipídicos de *M. avium* serovariante 2 intactos y desacilados, respectivamente. Placa revelada con antrona y corrida en la mezcla cloroformo-metanol-agua 90:10:1 (v/v).

Una vez recuperadas las fracciones obtenidas por la cromatografía de adsorción en columna, se realizaron análisis por cromatografía en capa fina (fig. 5). En ellos se observó que los GPL más apolares de interés se encontraban en las primeras fracciones (carriles 2 al 5), pues tenían el Rf esperado (fig. 5). Sin embargo, en la figura se observa que las bandas poseen una longitud de 3-4 cm, lo cual es indicativo de que los GPL no se encuentran en suficiente pureza (constituyen una mezcla), por lo que fue necesario utilizar otras metodologías como la cromatografía en capa fina preparativa y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

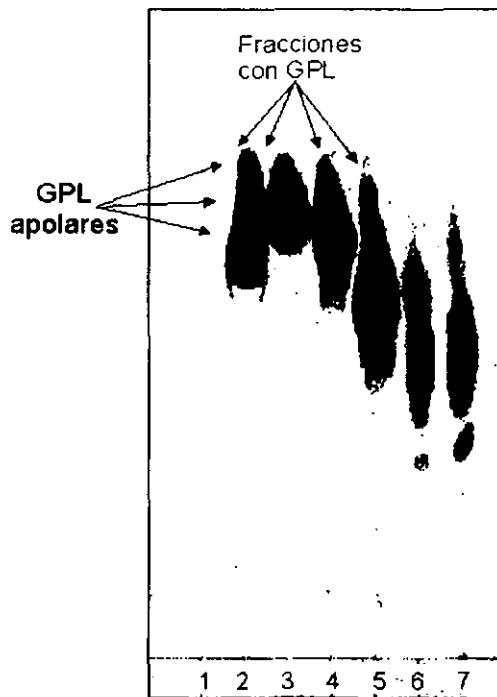


Figura 5. Placa de cromatografía en capa fina (silica-gel) de las primeras fracciones obtenidas de la cromatografía de adsorción del extracto de *M. smegmatis*. En el carril 1 se encuentran las fracciones que corresponden al primer eluyente (cloroformo 100 %); en los carriles 2 al 4 las fracciones que fueron eluidas con la mezcla cloroformo-metanol 97.5:2.5 (v/v); en los carriles 5 al 7 se encuentran las fracciones 7, 8 y 9 que corresponden a la mezcla cloroformo-metanol 95:5 (v/v). Placa corrida en la mezcla de solventes cloroformo-metanol 95:5 (v/v) y revelada con antrona.

### 6.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución.

Uno de los objetivos al llegar a este punto era el establecer condiciones óptimas para la separación de los GPL por HPLC. Sin embargo, al realizar modificaciones en el gradiente de solventes, no hubo cambios en el patrón de separación de las fracciones analizadas. Dicho patrón se muestra en la figura 6. Cabe mencionar, sin embargo, que este método proporcionó una mezcla pura constituida por dos GPL apolares homólogos (fig. 7).

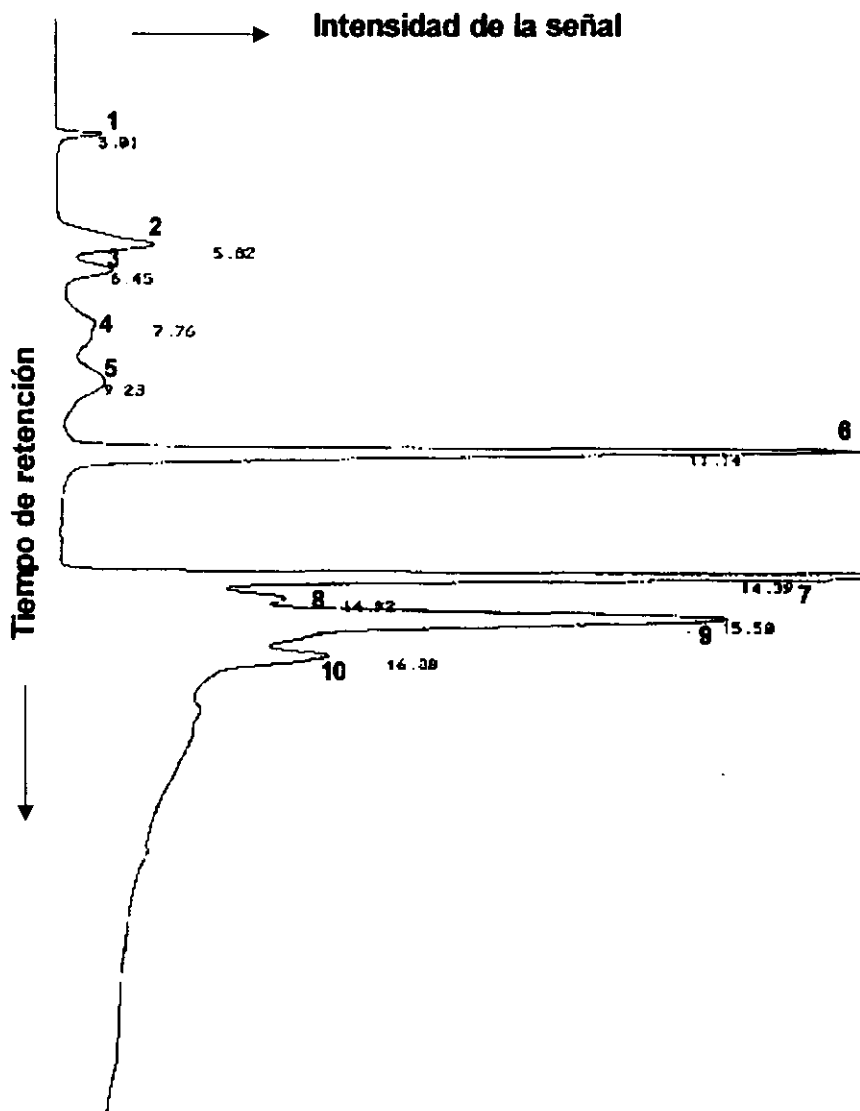


Figura 6. Cromatograma obtenido al inyectar la sexta fracción intacta de la columna de *Mycobacterium smegmatis* con los GPL de interés. Las fracciones correspondientes a cada pico fueron colectadas y analizadas posteriormente por cromatografía en capa fina.

Durante los análisis por cromatografía en capa fina, se observaron fracciones que contenían 3 GPL de interés (fig. 7); en particular, en los carriles 7

al 9 se encuentra una mezcla de los dos GPL más apolares presentes en *M. smegmatis*, mientras que en los carriles 6 y 10 se encuentran dichos GPL separados, la cantidad de producto obtenida en todos los casos fue muy pequeña, lo cual constituyó una desventaja. La mezcla obtenida en los carriles 7 al 9, constituida por dos GPL, se encontraba libre de otros lípidos que comúnmente coeluyen en la columna de adsorción (mismos que fueron eliminados durante la cromatografía líquida de alta resolución).

Se decidió trabajar con la mezcla de dos GPL puros (carriles 7 al 9, fig. 7), ya que representan una mezcla de moléculas encontrada en todas las cepas del complejo *M. avium*, es decir, GPL apolares con ligeras variantes en la longitud de ácidos grasos o por una posición O-metilada en sus azúcares. De esta manera, se reunieron todas las fracciones que de acuerdo con los análisis por cromatografía en capa fina contenían los 2 GPL homólogos. Se obtuvieron alrededor de 4 miligramos de dichos GPL, los cuales fueron mantenidos en congelación bajo atmósfera inerte y que fueron utilizados posteriormente para los análisis por espectrometría de masas.

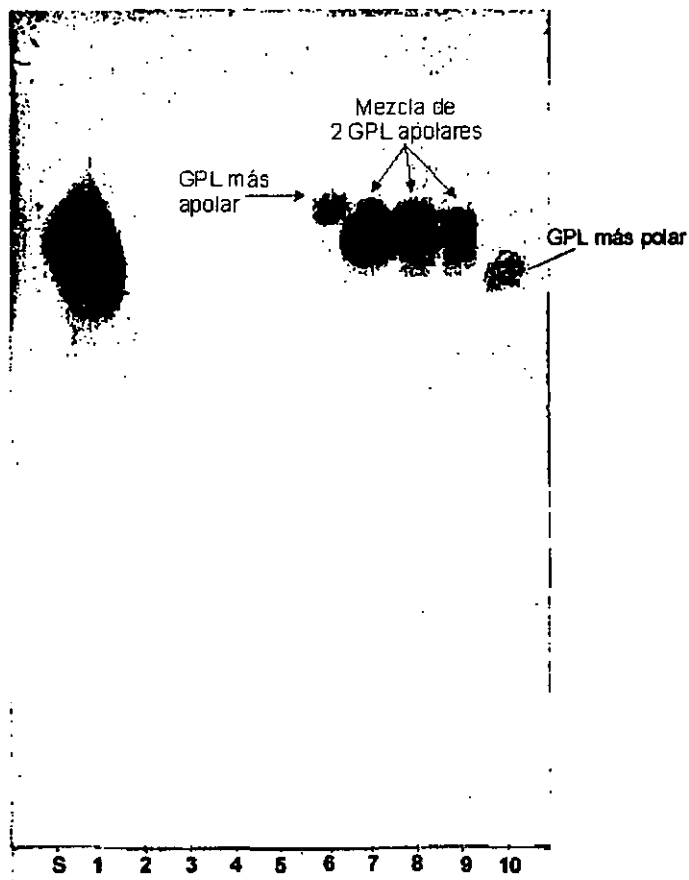


Figura 7. Placa de cromatografía en capa fina (silica-gel) de las fracciones obtenidas en una corrida con HPLC. Carril S: sexta fracción obtenida de la columna de *M. smegmatis* (estándar). Carriles 1 al 10: distintas fracciones obtenidas del HPLC y que corresponden a los números de los picos del cromatograma en la figura anterior. Placa corrida en una mezcla de solventes cloroformo-metanol 85:15 (v/v) y revelada con antrona.

### 6.1.3 Purificación por cromatografía en capa fina preparativa.

Con el objeto de obtener una cantidad mayor de producto puro en un tiempo menor, se recurrió a un método alternativo: la cromatografía en capa fina

preparativa. Utilizando las fracciones obtenidas por la columna de adsorción se obtuvieron GPL como los que se observan en la figura 8.

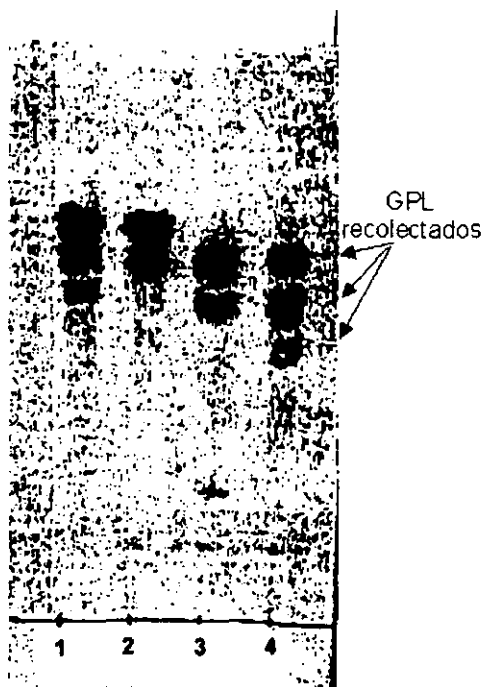


Figura 8. GPL obtenidos por cromatografía en capa fina preparativa. Carril 1: estándar de GPL purificado por HPLC. Carriles 2, 3 y 4: distintas bandas obtenidas durante la purificación, en el orden en que fueron separadas. Placa revelada con antrona y corrida en una mezcla de solventes cloroformo-metanol-agua 90:10:1 (v.v).

Como puede apreciarse en esta figura, en el carril 2 se encuentra una mezcla de los GPL homólogos más apolares, en el carril 3 y 4 se encuentran mezclas con GPL homólogos que son menos apolares. Se recolectaron y tomaron los GPL que se encontraban en los carriles 3 y 4 (figura 8), para los ensayos de proliferación celular. Se descartó la fracción con el GPL más apolar debido a que en la figura 4 se observó que éste no se encuentra presente ni en *M.*



*avium* ni en *M. intracellulare* (GPL señalado como el más apolar). La pureza obtenida en estos ensayos fue de muy buena calidad, comparable a la obtenida por HPLC, además de que la cantidad que se obtuvo fue mayor (alrededor de 10 mg de producto). Una vez hechos estos análisis, el producto fue conservado en congelación.

#### 6.1.4 Análisis de los GPL por espectrometría de masas.

La producción de iones moleculares por bombardeo rápido de átomos (FAB) en el caso de GPL ha sido reportada como difícil. No obstante se ha mejorado el análisis de dichos GPL mediante el uso de alcohol *meta*-nitrobencílico y cloruro de sodio como matriz [37].

El GPL purificado exhibió tres señales correspondientes a los cationes de 1215, 1255 y 1257  $m/z$  (fig. 9). Cada ión corresponde a un aducto pseudomolecular  $(M + Na)^+$  y difieren entre sí en la cadena lipídica, o por una posición O-metilada en el azúcar terminal. Dichos iones son homólogos a los reportados al ionizar por impacto electrónico el micósido C apolar de otra cepa de *Mycobacterium smegmatis* [17], los cuales se encuentran a 1241, 1269, 1283  $m/z$   $(M + Na)^+$ . Por otro lado, el proceso de desacilación alcalina suave provocó un cambio en los iones moleculares cationizados de 84 unidades de masa atómica por debajo del producto intacto. Esta pérdida corresponde a la sustitución de dos grupos acetilo por 2 átomos de hidrógeno, por lo que se infiere la presencia de 2 grupos acetilo en el compuesto intacto.

Mediante análisis químicos de GPL hidrolizados se observó la presencia de azúcares característicos de estos compuestos. En concordancia con el espectro obtenido, los azúcares fueron identificados como una 6-desoxihexosa (6-desoxitalosa) y una desoxihexosa metilada (di-O-metilramnosa). Dichos azúcares corresponden precisamente a los reportados previamente en el C-micósido apolar de *Mycobacterium smegmatis* [17]. Los GPL aquí estudiados no poseen grupos amino o carboxilo libres.

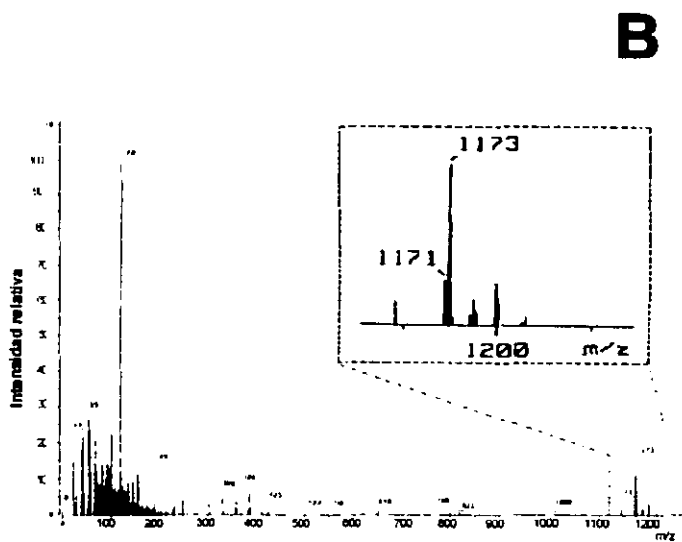
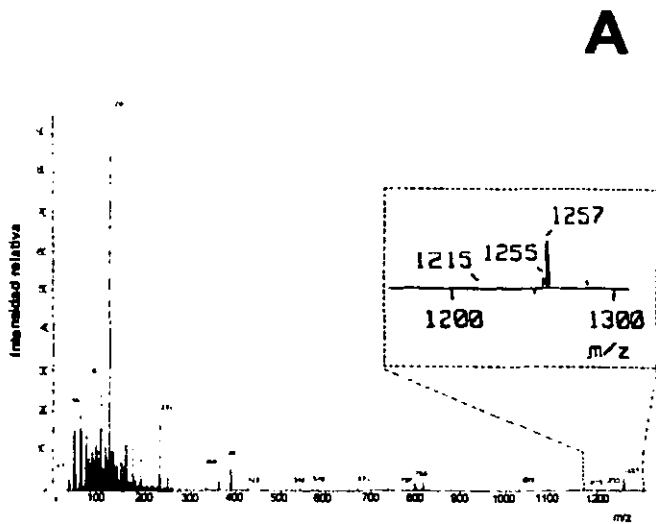


Figura 9. Espectro obtenido por FAB de los GPL apolares de *Mycobacterium smegmatis*. Se encuentra graficado el cociente masa/carga ( $m/z$ ) contra la intensidad relativa de cada ion. El segmento que muestra los aductos pseudomoleculares ( $M + Na$ )<sup>+</sup> del producto purificado se encuentra amplificado en el recuadro. (A) Muestra el espectro del compuesto intacto, mientras que (B) muestra el espectro del compuesto desencilado.

A partir de los datos obtenidos se puede concluir que el producto purificado es un glicolípido estable a tratamientos alcalinos suaves, que contiene dos grupos acetilos sobre uno de sus azúcares y con masa molecular de 1234 ó 1232, todo esto es consistente con un glicopeptidolípido apolar, cuya estructura se esquematiza en la figura 10.

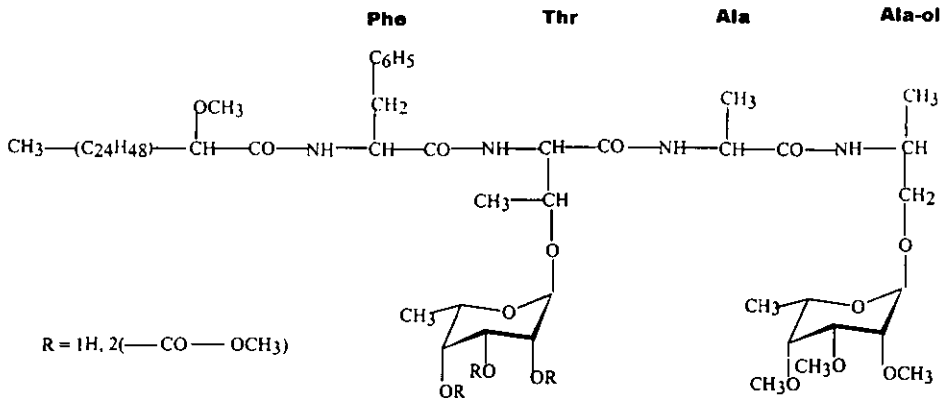


Figura 10. Estructura deducida mediante el análisis del GPL purificado. La estructura esquematizada corresponde al ion obtenido a  $1257 \text{ m/z}$  ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>.

## 6.2 Ensayos de proliferación celular.

Ensayos de proliferación celular mediante incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina.

Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo con el propósito de determinar los posibles efectos de los GPL sobre los linfocitos T. En estos ensayos las células de bazo de ratón fueron cultivadas junto con distintas concentraciones de un mitógeno (Con A) y con distintas concentraciones de GPL (incluyendo, desde luego, controles). A las células cultivadas se les adicionó  $^3\text{H}$ -timidina a las 48 horas, con el propósito de cuantificar síntesis de ADN, para

posteriormente ser cosechadas, a las 72 horas. Al ser medida la radioactividad es posible conocer si la respuesta al mitógeno es modificada por los GPL (comparando con los controles) y no sólo eso, sino también si la respuesta se modifica de manera dependiente de la dosis.

En un experimento preliminar se establecieron las condiciones óptimas para los ensayos de proliferación celular (concentración de mitógeno, de GPL, etc). Al realizar el ensayo de proliferación en las condiciones óptimas, se observa que sin GPL (fig. 11) las cuentas por minuto se incrementan de manera dependiente de la concentración de Con A, lo cual indica que no hay problemas en el sistema. Al agregar GPI se inhibe la proliferación de las células de una manera dosis-dependiente. Por otra parte se observa que, a 50 µg de GPL/ml la inhibición es más acentuada (71% de inhibición aproximadamente) en todas las concentraciones de Con A. En concentraciones de GPL mayores a ésta, podemos señalar que la inhibición es mucho más gradual. A concentraciones bajas de mitógeno, donde la estimulación es más pobre (0.625 y 1.25 µg de Con A/ml) se observa que los GPL rápidamente provocan la caída de las cpm hasta alcanzar prácticamente el cero. Para este experimento, se utilizaron dos conjuntos de células, cada uno con los bazos de dos ratones. En ambos conjuntos se obtuvieron los mismos resultados. Otro dato importante es que, se observa que en la concentración más alta de GPL (250 µg de GPL/ml) el número de cuentas por minuto para todas las concentraciones de Con A es prácticamente cero, lo cual podría significar un posible efecto citotóxico de estos GPL. Con el propósito de

evaluar la citotoxicidad de estos compuestos se realizaron los ensayos de viabilidad celular (observar más adelante).

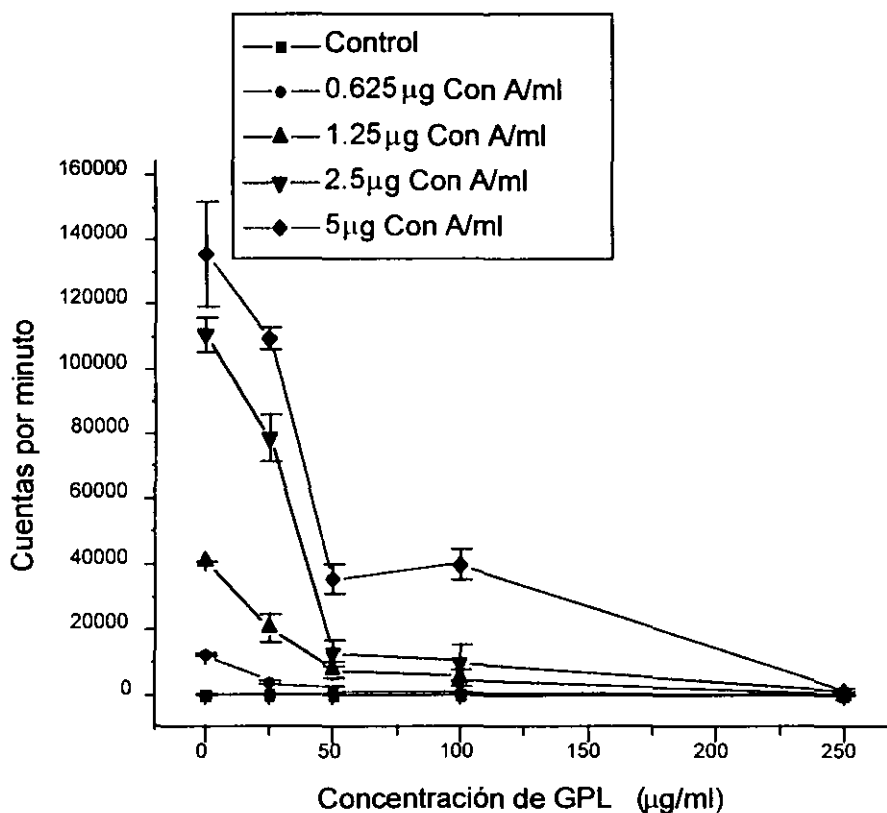


Figura 11. Gráficas dosis-respuesta a GPL en el segundo ensayo de proliferación celular (incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina). Se utilizaron 4 ratones y los bazos se reunieron en 2 conjuntos. Por otra parte se usaron 6 concentraciones de antígeno: control 0 (sin antígeno ni solvente), control 1 (únicamente solvente), 25, 50, 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las células fueron cosechadas a las 72 horas. Se encuentra graficada la media aritmética y las barras sobre los puntos representan la desviación estándar (resultados obtenidos por triplicado).

Se realizaron otros dos ensayos de proliferación celular con el objeto de observar reproducibilidad del efecto observado en el experimento anterior. En

primera instancia se observó que el efecto inhibitorio es reproducible y que dicho efecto sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina es dependiente de la dosis (fig. 12). Al analizar detalladamente los datos, se observaron algunas diferencias en los dos últimos experimentos, con respecto al primero. Por una parte la respuesta de las células del bazo a la Con A fue distinta: en el primer experimento a cero GPL con  $1.25 \mu\text{g}$  de GPL/ml se tuvieron alrededor de 40000 cpm, mientras que en estos dos últimos experimentos, las cpm llegaron a 110000 aproximadamente con la misma concentración de mitógeno; a  $0.625 \mu\text{g}$  de GPL/ml en el primer experimento se tuvieron 10000 cpm, mientras que en los dos últimos experimentos hubo 60000 cpm. Por otra parte, hay una caída drástica en las cuentas por minuto desde la primera concentración de GPL,  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ , donde se observa el mayor porcentaje de inhibición (93%) mientras que en el experimento anterior el efecto era más gradual (la máxima inhibición fue a  $50 \mu\text{g}$  de GPL/ml). Una de las probables causas de estas diferencias puede ser la Con A usada en este último experimento (distinto lote) o bien, algún problema que haya tenido que ver directamente con los ratones (distintas respuestas de los bazos). No obstante estas diferencias, el efecto inhibitorio sigue siendo observado. De nueva cuenta, se observa que a  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  de Con A el efecto no es revertido, lo cual sugiere que el efecto no se debe a un bloqueo sobre la Con A, porque si lo fuera esperaríamos observar un fenómeno de saturación y a concentraciones altas de Con A el efecto podría ser revertido.

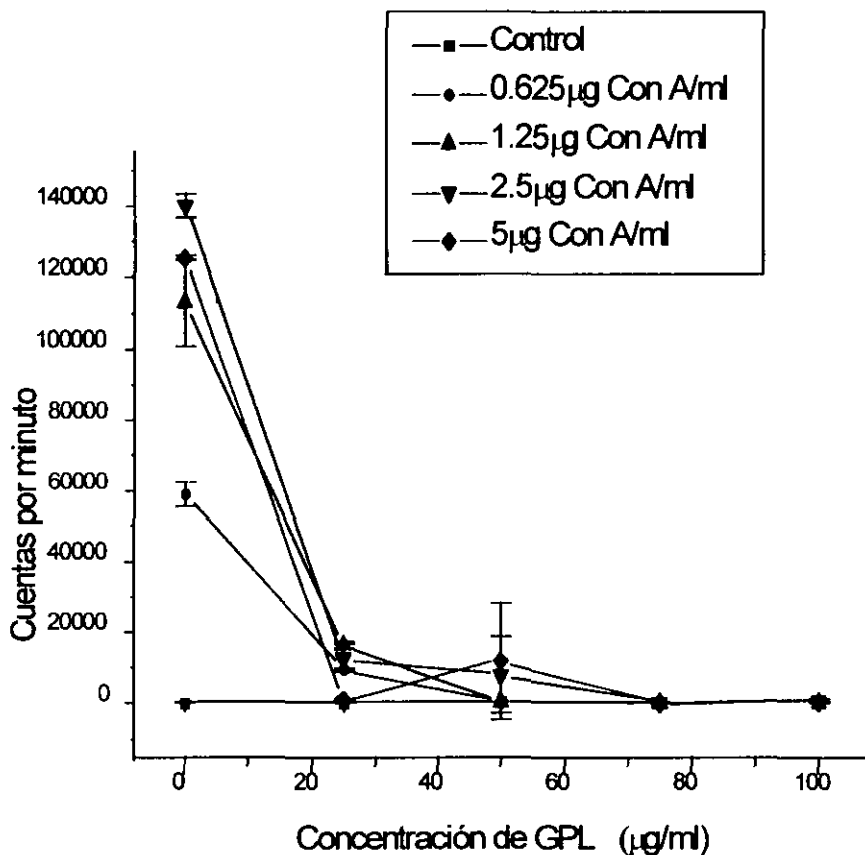


Figura 12. Gráfica dosis-respuesta a GPL en el tercer ensayo de proliferación celular (incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina). Experimento hecho con los bazo de 2 ratones, reunidos en un conjunto. Se utilizaron 6 concentraciones de antígeno: control 0, control 1, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/ml}$ . Las células fueron cosechadas a las 72 horas. Las barras sobre los puntos indican la desviación estándar sobre la media aritmética graficada.

### 6.3 Ensayos de viabilidad celular.

Enseguida, con el fin de descartar la citotoxicidad de los GPL como la probable causa del efecto observado, se realizaron los ensayos de viabilidad celular.



### 6.3.1. Exclusión de azul de tripano.

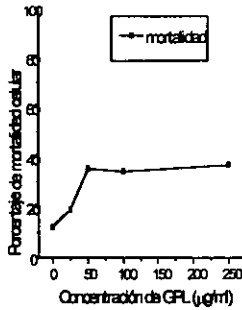
Los métodos de exclusión de colorantes son utilizados para cuantificar la muerte celular, como una medida de la pérdida de la integridad de la membrana. En este método, se toma una cantidad de las células de los pozos donde fueron sembradas (20-50  $\mu$ l), se les añade 10 % de azul de tripano (v/v) y se procede a contar directamente en el microscopio las células vivas y las muertas. El azul de tripano sólo se incorporará en aquellas células que tengan dañada su membrana celular y que por lo tanto estén muertas. Con el conteo se determinan los promedios y los porcentajes de células vivas contra células muertas. Este ensayo se realizó junto con el segundo ensayo de proliferación celular.

Los ensayos de viabilidad celular mediante exclusión de azul de tripano no tuvieron resultados confiables. El número de células que se contaban por pozo era muy pequeño (alrededor 20-30), lo cual no era representativo del total de la población celular originalmente depositado (200 mil células), además de que resultaba bastante difícil diferenciar células muertas de restos celulares. Los resultados representativos de viabilidad se muestran en la figura 13. Sólo son mostradas algunas gráficas correspondientes a células estimuladas con Con A y a células no estimuladas. Se observan cambios en la viabilidad que no tienen que ver ni con la Con A ni con la concentración de GPL depositada. Como ejemplo de ello son las gráficas a las 72 horas de cultivo, tanto de células estimuladas como de células no estimuladas (72 horas, células estimuladas en fig. 13). Se muestra que sin GPL las células mueren y sin embargo, a distintas concentraciones de

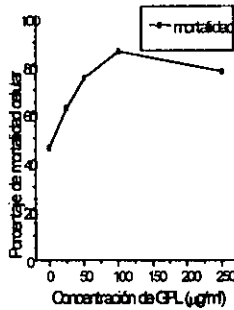
GPL una parte de las células están vivas. Por otra parte se observó una viabilidad muy pobre en general en todas las gráficas (datos no mostrados), consecuencia probable, de errores de manipulación al emplear el método.

Estos resultados no aclararon si el efecto observado en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina era debido a un efecto tóxico sobre las células, o si éstas eran incapaces de proliferar por la presencia del GPL. De modo que fue necesario repetir los ensayos de viabilidad celular en paralelo con otro ensayo de proliferación celular y además, fue necesario cambiar de metodología, por todos los inconvenientes que se presentaron al trabajar con azul de tripano.

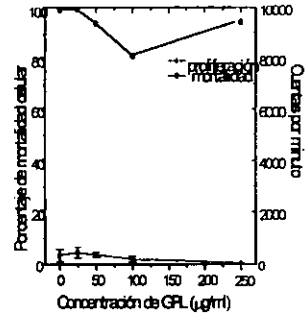
### Células no estimuladas



24 horas



48 horas



72 horas

### Células estimuladas con 2.5 µg concanavalina A/ml

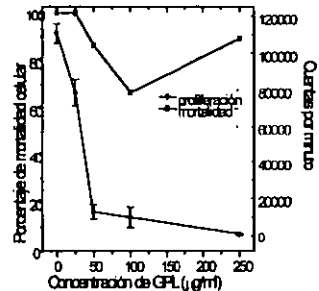
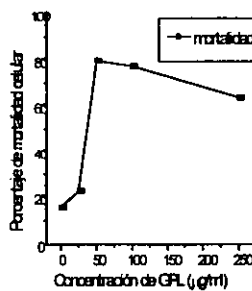
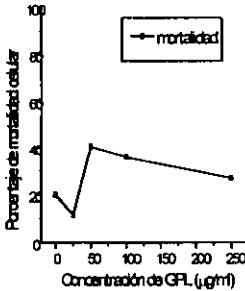


Figura 13. Curvas de viabilidad celular por azul de tripano, a las 24, 48 y 72 horas. En las gráficas a las 72 horas está también graficada la proliferación celular (incorporación de <sup>3</sup>H-timidina). Sólo se presentan curvas de un conjunto de bazos.

### 6.3.2 Ensayo de viabilidad por citometría de flujo.

Se analizaron varios protocolos y finalmente se optó por la citometría de flujo, mediante el análisis de exclusión de yoduro de propidio (PI). Una de las grandes ventajas que posee este método es el número de células que cuenta (10000) y la certeza para diferenciar las células vivas de las muertas. Por otra parte la

citometría de flujo, mediante sus métodos basados en la dispersión de luz, tiene ventajas sobre otras metodologías que se basan en la absorción de luz o en la transmitancia, ya que en éstas últimas es común que las células no absorban más que una pequeña fracción de la luz que pasa a través de ellas. La citometría de flujo proporciona, además de una gran cantidad de datos generados por las metodologías de tinción y fluorescencia, información acerca de las características estructurales de las células mediante los fenómenos de dispersión de luz detectados por el citofluorómetro (FACScan). El proceso de dispersión de luz es la respuesta en conjunto a la luz incidente y está constituida por tres componentes: reflexión, refracción y difracción. La medida de la dispersión de luz hacia delante (FSC), es utilizada para obtener una indicación del tamaño de las células. Por otra parte, la medida de la dispersión de la luz en forma angular o de lado (SSC) proporciona datos acerca de las características subestructurales celulares.

La viabilidad celular en este estudio fue evaluada mediante la exclusión de yoduro de propidio, compuesto que al ser excitado por un haz de luz a 550 nm, emite luz a 610 nm, en el rango de FL2 (580-620 nm). Dicho compuesto se une a ácidos nucleicos de doble cadena debido a su doble carga positiva, de modo que aquellas células cuya membrana ha sido dañada, incorporarán en su ADN este colorante. Las condiciones óptimas fueron establecidas en un ensayo previo (datos no mostrados).

Para el análisis de las lecturas, se realizaron gráficas de densidad celular, donde se grafica a FL2 contra FSC, de manera que puede observarse a un mismo tiempo qué tamaño tienen las células que están vivas y qué tamaño tienen las que están muertas. Cuantitativamente se hicieron histogramas donde está graficada la fluorescencia 2 (FL2) contra el número de eventos y mediante un control (sin yoduro de propidio) se estableció un margen de fluorescencia en el cual el 99.99 % de las células no están teñidas, con el fin de diferenciar vivas y muertas. En la figura 14 se muestra un ejemplo del patrón observado en las distintas poblaciones celulares estimuladas con Con A.

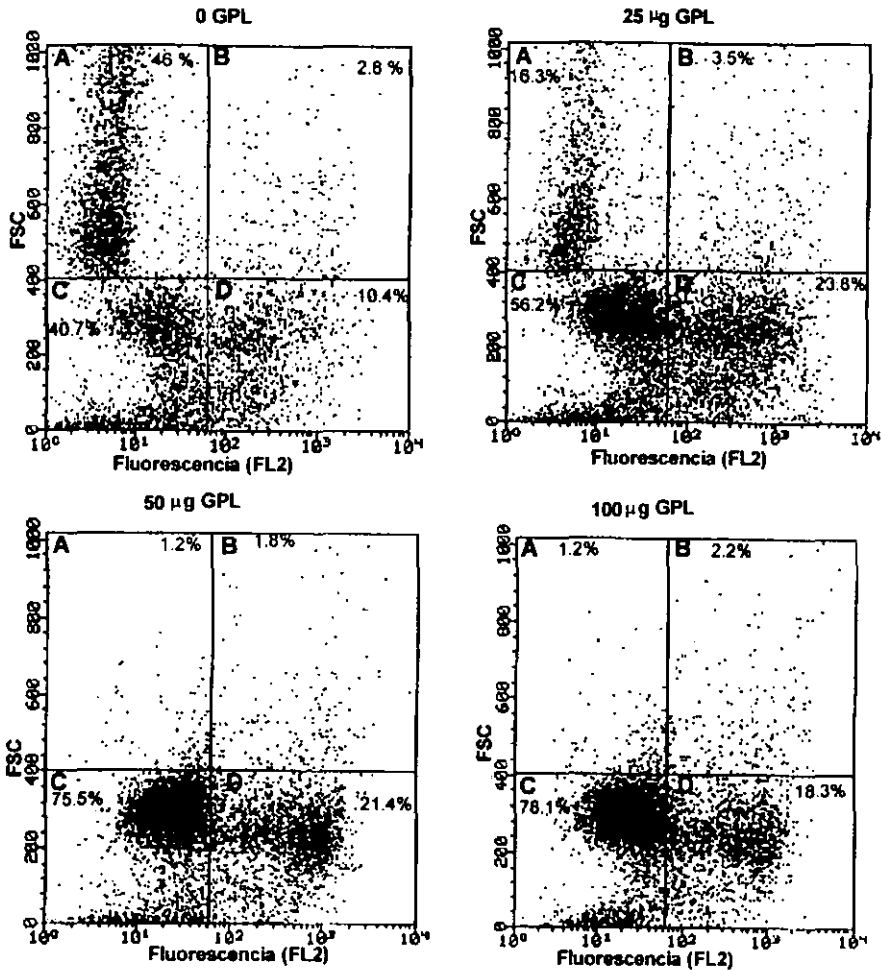


Figura 14. Gráficas de densidad celular correspondientes a células estimuladas con 2.5 µg de Con A /ml, a las 48 horas del experimento y marcadas con yoduro de propidio. El panel superior izquierdo corresponde a células sin GPL, el superior derecho corresponde a células expuestas a 25 µg de GPL /ml, el panel inferior izquierdo corresponde a células expuestas a 50 µg de GPL/ml y el panel inferior derecho corresponde a células expuestas a 100 µg de GPL/ml. Las letras corresponden a distintas poblaciones celulares observadas: (A) células vivas con un mayor tamaño que el resto de la población, blastos. (B) células muertas de tamaño mayor, blastos. (C) células vivas de tamaño menor que (A) y (B). (D) células muertas de menor tamaño que (A) y (B). Asimismo, se indica el porcentaje del total en cada población.

Al adicionar el yoduro del propidio, las células muertas son las que se desplazan en la escala de fluorescencia (FL2) por arriba del margen establecido como control. Con base en esto, se cuantificaron los porcentajes de células muertas y vivas, mediante histogramas basados en el margen establecido (datos no mostrados). Las gráficas de densidad celular mostraron datos muy importantes: al añadir el GPL, la región de células vivas y de mayor tamaño ([A] en la figura 14) disminuye considerablemente hasta casi desaparecer y por otra parte, la región [C] correspondiente a células vivas pero de menor tamaño aumenta considerablemente (fig. 14).

Pudo apreciarse cómo las células que han sido estimuladas (células grandes, blastos) disminuyen su número en presencia de GPL. Además, este efecto aumenta conforme se incrementa la concentración de GPL. En cambio, en células no estimuladas se observó que el cambio más importante radicó en que un porcentaje de células empieza a morir conforme aumenta la concentración de GPL. Cualitativamente estos datos son muy importantes, pues muestran una inhibición de la proliferación celular específico sobre los linfocitos T, dado que la Con A es un activador de linfocitos T. Aunado a esto, las células fueron observadas al microscopio poco antes de cosecharlas (a las 72 horas). En los pozos donde no fue depositado GPL se observa un incremento en el número de blastos conforme aumenta la concentración del mitógeno. En contraste, en los pozos donde se depositaron las concentraciones más altas de antígeno, se

observaron grumos y cúmulos de células, sin embargo no se observaron blastos (datos no mostrados).

Por otro lado, estos ensayos de viabilidad celular mostraron que, a pesar de producirse ligeros cambios en la viabilidad, esto no era dependiente de la concentración de GPL. En la figura 15 se muestran curvas representativas de la viabilidad observada en células no estimuladas y en células estimuladas en presencia de diferentes concentraciones de GPL.

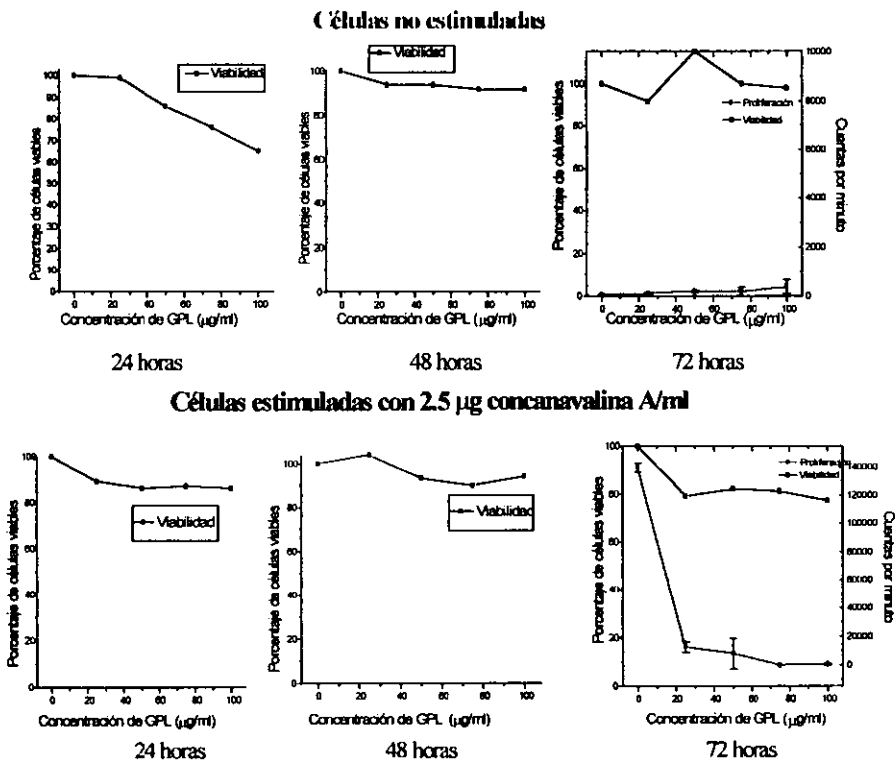


Figura 15. Curvas de viabilidad celular obtenidas por citometría de flujo correspondientes a células no estimuladas y a células estimuladas con 2.5 µg/ml de Con A. Un experimento en condiciones equivalentes fue realizado a fin de medir la proliferación celular a las 72 horas de cultivo. Las barras sobre los puntos muestran la desviación estándar sobre la media aritmética graficada.



Las gráficas de viabilidad por citometría de flujo revelan un aspecto importante: la viabilidad disminuye ligeramente al añadir GPL, pero al seguir añadiéndolo se mantiene constante. Los resultados obtenidos globalmente se muestran en la tabla 1, en donde se observa que, pese a ligeras oscilaciones, la viabilidad varía muy poco durante los 3 días y también se mantiene prácticamente constante al añadir el antígeno, aunque sí disminuye ligeramente al añadir la primera concentración de antígeno.

**Tabla 1. Efecto de los GPL apolares sobre la viabilidad celular.**

Viabilidad celular cuantificada por citometría de flujo												
GPL ( $\mu\text{g/ml}$ )	24 horas				48 horas				72 horas			
	0	0.625	1.25	2.5	0	0.625	1.25	2.5	0	0.625	1.25	2.5
25	99	92	101	89	94	90	86	104	92	76	90	79
50	86	90	82	86	94	97	89	93	115	72	78	82
75	76	86	80	87	92	91	91	90	100	89	93	81
100	65	88	80	86	92	94	95	94	98	83	85	77

Resultados obtenidos por citometría de flujo (exclusión de yoduro de propidio). Se muestran los resultados para 0, 0.625, 1.25 y 2.5  $\mu\text{g}$  Con A/ml. Los resultados son expresados como el porcentaje de viabilidad celular de cada muestra con respecto a la viabilidad observada en el experimento control (presencia de solvente).

Otro dato muy importante es que la mortalidad de las células en presencia del GPL en ningún momento llega a ser mayor del 28% (células estimuladas). Estos datos sugieren que el efecto observado está más relacionado con una inhibición de la transformación de blastos que con un efecto citotóxico.

En cuanto al mecanismo de acción, es difícil hablar de una probable interacción entre la Con A (lectina) y los residuos glicosídicos de los GPL, puesto

que estos residuos poseen grupos metilo y no forman parte de las estructuras reconocida por este mitógeno, a diferencia de otro tipo de compuestos (gangliósidos) que sí son capaces de unirse a Con A [64].

Como se ha discutido previamente [34, 4], parece que una explicación plausible de la patogenicidad de *Mycobacterium avium*, podría depender al menos en parte del papel que desempeñan los distintos lípidos en la inmunomodulación celular. Este estudio forma parte del proceso de entender la compleja naturaleza de los lípidos del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*. Por otro lado, Barrow señaló que probablemente la parte más activa como inmunomodulador de los GPL sea la lipídica, por los estudios que ha realizado con  $\beta$ -lípidos, compuesto que se obtiene al hidrolizar parcialmente los GPL [55]. Por otra parte, señala que el efecto supresor puede deberse en parte a la liberación de factores inhibitorios por parte de los monocitos, pues se ha visto que el  $\beta$ -lípidos es capaz de alterar su membrana. Otros grupos han señalado que los GPL son capaces de alterar la permeabilidad de membranas modelo, lo cual podría ser un posible mecanismo de inmunomodulación [36, 60].

Dado que en este trabajo se utilizó únicamente Con A, podemos decir que el efecto supresor a la respuesta blastogénica es principalmente sobre células T. La activación de células T requiere que los receptores de dichas células se unan a moléculas del MHC II (HLA-DR en humanos) junto con antígeno, aunque es probable que en este caso la activación no dependa de moléculas del MHC; además se ha reportado como necesaria la presencia de IL-1 como parte de

proceso de activación [57]. Por otra parte, se requieren interacciones de los linfocitos T con moléculas accesorias de los macrófagos activados, además de las interacciones MHC-antígeno-receptor, por lo que el efecto podría ser originado en estas células accesorias.

Todos estos datos nos llevan a pensar que el efecto citotóxico observado no es totalmente responsable de la disminución en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina inducida por Con A, sino que existe un proceso inhibitorio de la proliferación celular debido a los GPL, el cual es dependiente de la dosis. Este trabajo se enfocó al estudio de los GPL apolares debido a que los lípidos parecen ser, en gran parte, responsables de la inmunosupresión observada con bacterias del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* [20, 58] y se trata de moléculas presentes en gran abundancia en todas las cepas del grupo (los GPL apolares).

## 7. Conclusiones y perspectivas

- i) Al exponer células de bazo de ratón *in vitro* con GPL apolares de *Mycobacterium smegmatis* en concentraciones que no alteran significativamente la viabilidad celular, la respuesta proliferativa a Con A fue disminuida en una manera dependiente de la dosis.
- ii) Los ensayos de viabilidad celular por citometría de flujo revelaron que a pesar de un ligero efecto citotóxico del GPL, la viabilidad se mantiene constante en los 3 días del ensayo de proliferación y no es dependiente de la dosis.
- iii) Estos resultados confirman que la hipótesis planteada es correcta, esto es, que los GPL apolares poseen efectos inmunomodulatorios sobre la blastogénesis de linfocitos T.
- iv) Los GPL apolares son también compartidos por todas las cepas del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* que infectan a humanos. Considerando que estos homólogos diglicosilados se encuentran en mayor abundancia que los GPL polares multiglicosilados, podemos sugerir que las variantes aquí estudiadas contribuyen en mayor medida a la patogenia de las cepas de este complejo. Cabe señalar que éstos son los primeros

compuestos que se encuentran en una amplia distribución en este complejo, que muestran efectos inmunomoduladores.

- v) Dentro de las perspectivas de este proyecto, se encuentran el entender el proceso de inhibición a la respuesta blastogénica inducida por Con A, así como analizar el perfil de secreción de citocinas que inducen estos GPL. De acuerdo con trabajos previos de Barrow [2, 3, 4], las fracciones crudas, donde se encuentran los GPL apolares utilizados en este trabajo, inducían la secreción de  $\text{TNF-}\alpha$ , y  $\text{PGE}_2$ , por lo que es muy probable que los compuestos aquí estudiados sean la parte activa de dichas fracciones.

## 8. Bibliografía

1. Bates J. H. 1996. *Mycobacterium avium* disease: progress at last. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 153, 1737-1738.
2. Barrow, W. W., Carvalho de Sousa J. P., Davis T. L., Wright E. L., Bachelet M. and Rastogi N. 1993. Immunomodulation fo human peripheral blood mononuclear cell functions by defined lipid fractions of *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* 61, 5286-5293.
3. Barrow, W. W., Davis T. L., Wright E. L., Labrousse V., Bachelet M. and Rastogi N. 1995. Immunomodulatory spectrum of lipids associated with *Mycobacterium avium* serovar 8. *Infect. Immun.* 63, 126-133.
4. Barrow, William W. 1997 Processing of mycobacterial lipids and effects on host responsiveness. *Front. Biosci.* 2, 387-400.
5. Benson, C. A. and J. J. Ellner. 1993. *Mycobacterium avium* complex infection and AIDS: advances in theory and practice. *Clin. Infect Dis.* 17: 7- 20.
6. Benson, C. A. 1994. *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex disease in patients with HIV infection. *Curr. Op. Infec. Dis.* 7: 95-107.
7. Bermudez L. E. 1994. Immunobiology of *Mycobacterium avium* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 1000-1006.
8. Bradbury M. G., and Moreno C. 1993. Effect of lipoarabinomannan and mycobacteria on tumor necrosis factor production by different populations of murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 94, 57-63.
9. Brennan P. J., Heifets M. and Ullom B. P. 1982. Thin-layer chromatography of lipid antigens as a means of identifying nontuberculous mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 15, 447-455.
10. Brennan P. J., Souhrada M. *et al.* 1978 Identification of atypical mycobacteria by thin-layer chromatography of their surface antigens. *J. Clin. Microbiol.* 8, 374-379.
11. Brennan, P. J., Hunter S. W., McNeil M., Chatterjee D. and Daffé M. 1996. Reappraisal of the chemistry of mycobacterial cell walls, with a view to understanding the roles of individual entities in disease process. In: Microbiological determinants, virulence and host response. (Avoub E. M., Cassell G., Brandne W. C., Eds.) American Society for Microbiology. pp 55-75.

12. Brownback P. E. and Barrow. W. W. 1988. Modified lymphocyte response to mitogens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex. *Infect. Immun.* 56, 1044-1050.
13. Cassatella M. A., Meda L. Gasperini S., D'Andrea A, Ma X. and Trinchieri G. 1995. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leucocytes. *Eur. J. Immunol.* 25, 1-5.
14. Chujor C. S., Kuhn B., Schwerer B., Bernheimer H., Levis W. R. and Bevec D. 1992. Specific inhibition of mRNA accumulation for lymphokines in human T cell line Jurkat by mycobacterial lipoarabinomannan antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 87, 398-403.
15. Collins, F. M. 1989. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 360-377.
16. Cooper, A. M, Appelberg R. And Orme I. M. 1998 Immunopathogenesis of *Mycobacterium avium* infection. *Front. Biosci.* 3, 141-148.
17. Daffe M., Lanéelle M. A. and Puzo G. 1983. Structural elucidation by field desorption and electron-impact mass spectrometry of the C-mycosides isolated from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 751, 439-443.
18. Dobson G., Minnikin D. E., Parlett J. H. and Goodfellow M. 1985. Systematic analysis of complex mycobacterial lipids. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Society of Applied Bacteriology.
19. Draper P. and Rees R. J. W. 1970. Electron-transparent zone of mycobacteria may be a defense mechanism. *Nature* 228, 860-861.
20. Edwards III C. K., Hedegaard H. B., Zlotnik A., Gangadharam P. R., Johnston Jr R. B. and Pabst M. J. 1986. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E<sub>2</sub> and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-γ. *J. Immunol.* 136, 1820-1827.
21. Ellner, J. J., M.J. Goldberger, and D. M. Parenti. 1991. *Mycobacterium avium* infection and AIDS: a therapeutic dilemma in rapid evolution. *J Infect. Dis.* 163: 1326-1335.
22. Fr hel C., de Chastellier C., Lang T. and Rastogi N. 1986. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* 52, 252-262.

23. Gjata B., Hannoun C., Boulouis H.J., Neway T. and Pilet C. 1994. Adjuvant activity of polar glycopeptidolipids of *Mycobacterium chelonae* (pGPL-Mc) on the immunogenic and protective effects of an inactivated influenza vaccine. *C. R.Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences*. 317: 257-63.
24. Goren M. B. & Brennan J. P. 1979. Mycobacterial lipids: chemistry and biological activities. In: Tuberculosis. Ed: Youmans G. P., W. B. Saunders company, Philadelphia.
25. Guthertz, L. S. , B., Damsker, E. J. Bottone, E. G. Ford, T. F. Midura and J. M. Janda. 1989 *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections in patients with or without AIDS. *J. Infect. Dis.* 160: 1037-1041.
26. Hines I., Jaynes J. M., Barker, S. A., Newton J. C., Enright M. and Snider T. G. 1993. Isolation and partial characterization of glycolipid fractions from *Mycobacterium avium* serovar 2 (*Mycobacterium paratuberculosis* 18) that inhibit activated macrophages. *Infect. Immun.* 61, 1-7.
27. Hooper L. C., Johnson M. M., Khera V. R. and Barrow. W. W. 1986. Macrophage uptake and retention of radiolabeled glycopeptidolipid antigens associated with the superficial L<sub>1</sub> layer of *Mycobacterium intracellulare* serovar 20. *Infect. Immun.* 1986, 133-141.
28. Hooper L. C and Barrow. W. W. 1988. Decreased mitogenic response of murine spleen cells following intraperitoneal injection of serovar-specific glycopeptidolipid antigens from the *Mycobacterium avium* complex. *Adv. Exper. Med. Biol.* 239, 309-325.
29. Horsburgh, C. R., Jr. D. L. Cohn, R. B. Roberts et al. 1986. *Mycobacterium avium-intracellulare* isolates from patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 955-957.
30. Horsburgh, C. R., Jr. and JR. M. Selik. 1989 The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am. Rev. Resp. Dis.* 139: 4-7.
31. Kaplan G., Gandhi R. R., Weinstein D. E., Levis W. R., Patarroyo M. E. Brennan P. J. and Cohn Z. A. 1987. *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro. *J. Immunol.* 138, 3028-3034.
32. Klatt, E. C., D.F. Jensen, and P.R. Meyer. 1987. Pathology of *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in acquired immunodeficiency syndrome. *Hum. Pathol.* 18: 709-714.



33. Lagrange P. H., Fourgeaud M., Neway T. and Pilet C. 1994. Enhanced resistance against lethal disseminated *Candida albicans* infection in mice treated with polar glycopeptidolipids from *Mycobacterium chelonae* (pGPL-Mc). *C. R. Acad. Sci. Paris* 317, 1107-13.
34. Lanéelle G. and Daffé M. 1991. Mycobacterial cell wall and pathogenicity: a lipidologist's view. *Res. Microbiol.* 142, 433-437.
35. Lanéelle G. and Tocanne J. F. 1980. Evidence for penetration in liposomes and mitochondrial membranes of a fluorescent analogue of Cord factor. *Europ. J. Biochem.* 109, 177-182.
36. López-Marín L. M., Quesada L., Lakhdar-Ghazal D., Tocanne F. J-F. and Lannéelle G. 1994. Interactions of mycobacterial glycopeptidolipids with membranes: influence of carbohydrate on induced alterations. *Biochemistry* 33, 7056-7060.
37. López-Marín L. M., Promé D., Lanéelle M. A., Daffé M. and Promé J. C. 1992. Fast atom bombardment mass spectrometry of mycobacterial glycopeptidolipid antigens: structural characterization by charge remote fragmentation. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 3, 656-661.
38. McNeil M., Tsang Y. A. and Brennan P. J. 1987. Structure and antigenicity of the specific oligosaccharide hapten from the glycopeptidolipid antigen of *Mycobacterium avium* serotype 4, the dominant mycobacterium isolated from patients with acquired immune deficiency syndrome. *J. Biol. Chem.* 262, 2630-2635.
39. Modilevsky, T., F. R. Sattler, and P. F. Barnes. 1989. Mycobacterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch. Inter. Med* 49: 2201-2205.
40. Molloy A., Gaudernack G., Levis W. R., Cohn Z. A. and Kaplan G. 1990. Suppression of T cell proliferation by *Mycobacterium leprae* and its products: the role of lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 973-977.
41. Moreno C., Mehlert A. and Lamb J. 1988. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* 74, 206-210.
42. Neway T., Boulouis H. J., Thibault D. et Pilet C. 1992. Activité des glycopeptidolipides polaires de *Mycobacterium chelonae* sur la restauration

d'une leucopénie chimio-induite chez la souris. *C. R. Acad. Sci. Paris. T. 315, Série III*, 13-19.

43. O'Brien R. J., Geiter L. J. and Snider D.E. 1987 The epidemiology of nontuberculous mycobacterial disease in the United States. Results from a national survey. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 1007-1014.
44. Orenstein J. M., Fox C. and Wahl S.M. 1997. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science*. 276, 1857-1860.
45. Ortalo-Magné A., Lemassu A., Lanéelle M. A., Bardou F., Silve G., Gounon P., Marchal G. and Daffé M. 1996. Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *J. Bacteriol.* 178, 456-461.
46. Ortalo-Magné A., Andersen A. B. and Daffé M. 1996. The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli. *Microbiol.* 142, 927-935.
47. Pourshafie M., Ayub. Q. and Barrow W. W. 1993. Comparative effects of *Mycobacterium avium* glycopeptidolipid and lipopeptide fragment on the function and ultrastructure of mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* 93, 72-79.
48. Ravn P., Boesen H., Pedersen B. K. and Andersen P. 1997. Human T cells responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J. Immun.* 1951-1955.
49. Romani L., Menacacci A., Cenci E., Spaccapelo R., Del Sero G., Nicoletti I, Trinchieri G., Bistoni F. and Puccetti P. 1997. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J. Immunol.* 158, 5349-5356.
50. Ronot X., Paillason S. and Muirhead K. A. 1996. Assessment of cell viability in mammalian cell lines. In: *Flow cytometry. Applications in cell culture* (Al-Rubeai M. and Emery N. Eds.), pp 177-192. Marcel Dekker, Inc., New York.
51. Rulong S., Aguas A. P., Pinto Da Silva P. and Silva M. Intramacrophagic *Mycobacterium avium* bacilli are coated by a multiple lamellar structure: freeze fracture analysis of infected mouse liver. *Infect. Immun.* 59, 3895-3902.
52. Salazar-Mather T., Ishiwaka R. and Biron C. A. 1996. NK cell trafficking and cytokine expression in splenic compartments after IFN induction and viral infection. *J. Immunol.* 157, 3054-3057.

53. Stover, D. E., D. A. White, P. A. Romano, R. A. Gellene, and W. A. Robeson. 1985. Spectrum of pulmonary diseases associated with the acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Med.* 78: 429-437.
54. Sturgill-Koszycky S., Schlesinger P., Chakraborty P., Haddix P. L., Collins H. L., Fok. A. K., Allen R. D., Gluck S. L. Heuser J. and Russell D. G. 1994. Lack of acidification in mycobacterium containing phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 263, 678-681.
55. Tassell, S. K., Pourshafie M., Wright E. L., Richmond M. G. and Barrow W. W. 1992. Modified lymphocyte response to mitogens induced by the lipopeptide fragment derived from *Mycobacterium avium* serovar-specific glycopeptidolipids. *Infect. Immun.* 60:2 706-711.
56. Trakoshis, H., Pozniak A. and Yates M. [A] *Mycobacterium avium* complex in the CNS. Sixth European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV infections. Hamburg, October 11-15, 1997.
57. Tsuyuguchi I., Kawasami H., Takashima T., Tsuyuguchi T. and Kishimoto S. 1990. *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex-induced suppression of T-cell proliferation in vitro by regulation of monocyte accessory cell activity. *Infect. Immun.* 1369-1378.
58. Van Heyningen T.K., Collins H.L. and Russell D.G. 1997. IL-6 Produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J. Immunol.* 158, 330-337.
59. Vercellone A. and Puzo G. New-found phenolic glycolipids in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Immun.* 7447-7454.
60. Vergne I. and Daffé M. 1998. Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front. Biosci.* 3, 865-876.
61. Vergne I., Prats, J., Toccane F. and Lanéelle. 1995. Mycobacterial glycopeptidolipid interactions with membranes: a monolayer study. *FEBS Letters.* 375, 254-258.
62. Vincent-Naulleau S., Neway T., Thibault D., Barrat F., Boulouis J. and Pilet C. (1995) Effects of polar glycopeptidolipids of *Mycobacterium chelonae* on granulomacrophage progenitors. *Res. Immunol.* 146, 363-371.
63. Whal S.M., Green-Wild T., Peng G. Hale-Donze H., Doherty T. M. Mizel D. and Orenstein J. M. 1998. *Mycobacterium avium* complex augments macrophage

- HIV-1 production and increases CCR5 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 21: 12574-12579.
64. Whisler R. L. and Yates A. J. 1980. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. *J. Immunol.* 125, 2106-2111.
  65. Woodbury J.L. and Barrow W. W. 1989. Radiolabelling of *Mycobacterium avium* oligosaccharide determinant and use in macrophage studies. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1875-1884.
  66. Wong, B., F. F. Edwards, T. E. Kiehn, E. Whimbey, H. Donnelly, E. M. Bernard, J. W. M. Gold, and D. Armstrong. 1985. Continuous high-grade *Mycobacterium avium-intracellulare* bacteremia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* 78: 35-40.
  67. Wright E. L., Zywno van Ginkel S., Rastogi N., Barrow. W. 1996 Monoclonal infection involving *Mycobacterium avium* presenting with three distinct colony morphotypes. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2475-2478.
  68. Yakrus, M. A., and R. C. Good. 1990. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 28: 926-929.
  69. Young, L. S., C. B. Inderlied, O. G. Berlin, and M. S. Gottlieb. 1986. Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev. Infect. Dis.* 8: 1024-1033.
  70. Young L. S. 1993. Mycobacterial diseases and the compromised host. *Clin. Infec. Dis.* 17 (Suppl. 2) 436-41.