

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADHESINAS
MICOBACTERIANAS QUE PARTICIPAN EN LA FAGOCITOSIS DE
Mycobacterium tuberculosis POR EL MACRÓFAGO.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

BIOL. HUGO DÍAZ SILVESTRE

DIRECTOR DE LA TESIS:

Dr. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ



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

Quiero darles las gracias a las siguientes personas y grupos de personas que ayudaron a la realización de esta Tesis:

- Dr. Raúl Mancilla Jiménez por su confianza y apoyo durante todo este tiempo tanto en lo profesional como en lo personal.
- Al Biol. Patricia Espinosa por todo el apoyo, tiempo y dedicación que aportó a este trabajo y por ser una gran amiga.
- A Germán por la ayuda y amistad prestada durante el tiempo de convivencia en el lab.
- A Ismael por aportar su esfuerzo en la parte técnica y en lo humorístico que ayudaron a liberar la presión cotidiana en el lab.
- A todos los integrantes, del laboratorio con los cuales he compartido parte de mi vida (Maritrini, Mary, Elena, Ismael, Cristina, Ciro) y en especial a los que han dedicado parte de su valioso tiempo en apoyo a este trabajo (Miguel, Alejandro, Ana Laura).
- A mi comité tutorial (Dr. Enrique Ortega Soto, Dr. Eduardo Sada Díaz y por supuesto, Dr. Raúl Mancilla Jiménez) por sus consejos, regaños y jalones de oreja cada 6 meses que me ayudaron a mejorar este trabajo.
- A mi comité de candidatura por sus valiosas sugerencias y consejos para la feliz conclusión de este trabajo.
- A todos aquellos integrantes del Depto. de Inmunología y del Instituto de Investigaciones Biomédicas que en alguna ocasión me brindaron parte su tiempo y ayuda para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A las 6 mujeres que me han ofrecido sin reservas amor, cariño, comprensión, amistad y apoyo emocional durante mi vida y que me han servido de inspiración para la feliz conclusión de esta tesis.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1. Datos históricos.	8
2.2. Epidemiología.	9
2.3. Genética y tuberculosis.	10
2.4. Inmunoprofilaxis de la tuberculosis.	12
2.5. Estructura molecular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	13
2.6. Patogenia de la tuberculosis.	14
2.7. Métodos de diagnóstico.	16
2.8. La respuesta Inmune en contra de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	16
2.9. Interacción del macrófago con el bacilo de la tuberculosis.	18
2.10. Fagocitosis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	20
2.11. Interacción del bacilo de la tuberculosis con células no fagocíticas.	24
3. HIPOTESIS	
26	
4. OBJETIVOS	
27	
5. MATERIALES Y METODOS	28
5.1. Cultivo de células THP-1 y macrófagos humanos. derivados de monocitos de sangre circulante.	28
5.2. Cultivo de bacterias y obtención de extractos proteicos.	28
5.3. Marcaje de bacilos y proteínas micobacterianas.	29
5.4 PAGE-SDS y Western blot.	30
5.5. Ensayos de adhesión de proteínas micobacterianas a macrófagos.	30
5.6. Caracterización de GLP-19 de <i>M. tuberculosis</i> y de <i>M. smegmatis</i> +19.	
31	

5.7. Ensayos de ELISA celular.	32
5.8. Ensayos de fagocitosis con microesferas fluorescentes recubiertas con proteínas micobacterianas.	32
5.9. Ensayos de inhibición de la adhesión de GLP-19 a macrófagos con azúcares.	33
5.10. Ensayos de inhibición de la adhesión de GLP-19 a células THP-1 con anticuerpos monoclonales.	34
5.11. Inhibición de la fagocitosis de microesferas fluorescentes con carbohidratos y anticuerpos monoclonales.	34
5.12. Análisis por citometría de flujo de la expresión de receptores de membrana por células THP-1 activadas con PMA.	35
5.13. Blots de afinidad.	35
5.14. Inmunoprecipitación del receptor de manosa y GLP-19.	36
5.15. Inducción de la expresión en la membrana del receptor de manosa en células THP-1 por extractos <i>M. smegmatis</i> +19.	
Demostración por inmunohistoquímica y ELISA celular.	37
5.16. Inhibición de la unión de GLP-19 a células THP-1 con EDTA, EGTA y con un anticuerpo monoclonal anti-receptor de manosa.	38
5.17. Ensayos de fagocitosis con <i>M. smegmatis</i> +19 y células THP-1.	39
5.18. Análisis estadístico.	39
6. RESULTADOS	
40	
6.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> posee una adhesina de 19-kDa con afinidad por macrófagos humanos derivados de monocitos circulantes y por células de la línea monocítica THP-1.	40
6.2. Caracterización de la adhesina de 19-kDa de <i>M. tuberculosis</i> . Localización topográfica e identificación.	45
6.3. Caracterización de GLP-19 de <i>M. tuberculosis</i> expresada en <i>M. smegmatis</i> .	49
6.4. GLP-19 expresada en <i>M. smegmatis</i> mantiene su función de adhesina para células THP-1 y macrófagos humanos derivados de	

monocitos circulantes. Demostración por Western blot y ELISA celular.	
51	
6.5. Inhibición de la adhesión de GLP-19 a células con azúcares competidores del receptor de manosa y con anticuerpos anti-receptor de manosa.	56
6.6. Quelantes de calcio y anticuerpos anti-receptor de manosa inhiben la adhesión de GLP-19 a células THP-1.	61
6.7. Fagocitosis de microesferas recubiertas con extractos micobacterianos que contienen GLP-19. Inhibición con α -metil-manósido y un anticuerpo monoclonal anti-GLP-19.	65
6.8. Análisis de la expresión de receptores de membrana por células THP-1. Inducción por filtrados micobacterianos.	71
6.9. GLP-19 interacciona con el receptor de manosa. Demostración en blots de afinidad.	73
6.10. Inmunoprecipitación del receptor de manosa y GLP-19.	75
6.11. Demostración del receptor de manosa en células THP-1 y en macrófagos derivados de monocitos circulantes por inmunohistoquímica y ELISA celular.	77
6.12. Las células THP-1 fagocitan <i>M. smegmatis</i> +19 a través del receptor de manosa y de GLP-19.	80
7. DISCUSIÓN.	
83	
8. CONCLUSIONES.	91
9. PERSPECTIVAS.	92
10. BIBLIOGRAFÍA.	93

1. RESUMEN

En este estudio llevamos a cabo experimentos que muestran que una glicolipoproteína de 19-kDa (GLP-19) es la principal adhesina de *Mycobacterium tuberculosis* para macrófagos humanos. Lo anterior se demostró utilizando extractos proteicos de *M. tuberculosis* y de una cepa de *M. smegmatis* que sobreexpresa la glicolipoproteína de 19-kDa. Se demostró que GLP-19 tiene afinidad por el receptor de manosa (RM), ya que su adhesión se inhibía preincubando las células con manosa, manana, N-acetilglucosamina, α -metil-manosido y con anticuerpos monoclonales en contra del receptor de manosa. Así mismo la afinidad de GLP-19 por el RM se demostró por ELISA celular, en blots de afinidad, por inmunoprecipitación y por citometría de flujo. En experimentos con microesferas fluorescentes se demostró que su fagocitosis era significativamente mayor cuando se recubrían con extractos enriquecidos en GLP-19. Además se hicieron ensayos de fagocitosis con células THP-1 y la cepa de *M. smegmatis* que sobreexpresa GLP-19, observándose un alto porcentaje de células asociadas a uno o más bacilos ($74.84 \pm 10.46\%$); la fagocitosis de *M. smegmatis* se inhibió drásticamente preincubando las células con manana, α -metil-manosido, EDTA y con el anticuerpo monoclonal anti-RM. El papel de GLP-19 se demostró inhibiendo la fagocitosis con un anticuerpo monoclonal anti-GLP-19. En vista de que se ha cuestionado la expresión RM por células THP-1 se estudio por inmunohistoquímica y ELISA celular su expresión, observándose que la incubación de las células THP-1 por 1 h con extractos que contienen GLP-19 movilizaba el RM de depósitos citoplásmicos a la superficie celular. En conclusión en esta tesis se ha demostrado que el RM de macrófagos humanos es capaz de interactuar con una glicoproteína de *M. tuberculosis* y que esta interacción puede resultar en la fagocitosis de la micobacteria.

2. ANTECEDENTES

2.1. DATOS HISTÓRICOS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa producida por micobacterias patógenas de vida intracelular facultativa que constituyen el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta es una infección paradigmática que por siglos ha fascinado a médicos, científicos y literatos. La TB ha sido reconocida desde hace mucho tiempo, pero no fue sino hasta el Siglo XVIII cuando se publicaron los primeros estudios¹. Laennec, un médico francés, tiene un lugar importante en la historia de la TB, ya que en autopsias muy cuidadosas realizó las primeras descripciones postmortem de las lesiones tuberculosas. Otro médico francés que hizo contribuciones sobresalientes fue Antoine Villemin quien estableció por primera vez la naturaleza infecciosa de la TB al inducir lesiones tuberculosas en animales de laboratorio inoculados con tejido humano de un paciente con TB. Villemin, sin embargo, no logró identificar el agente infeccioso. Roberto Koch a finales del siglo XIX dio un paso histórico, cuando presentó su trabajo *Der Aetiology der Tuberculose* ante la Sociedad de Fisiología de Berlín el 24 de marzo de 1882. En este trabajo presentó técnicas histológicas para identificar el bacilo, métodos para cultivarlo y describió el modo de transmisión de la infección. Para probar que el bacilo era el agente etiológico de la TB siguió lineamientos que aun tienen vigencia y que se conocen como los postulados de Koch. Estos señalan que para demostrar la naturaleza infecciosa de una enfermedad se requiere: 1. aislar el microbio del organismo enfermo, 2. cultivarlo *in vitro* y 3. reproducir la infección en animales inoculados con el bacilo aislado y libre de elementos del organismo infectado¹.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La TB es en la actualidad una de las enfermedades infecciosas de mayor importancia a nivel mundial, sobretodo en países pobres. En el siglo pasado se observó una disminución progresiva de su frecuencia, que se atribuyó a la vacunación con BCG, uso de drogas antifímicas eficaces y a una mejoría en los niveles de vida. En consecuencia, el interés en la investigación básica disminuyó notablemente al considerar que la TB estaba en vías de ser erradicada. Sin embargo, a principios de la década de los 80s se observó un repunte en la frecuencia de la TB tanto en países pobre como en los ricos^{2,3}. Por ejemplo, en los Estados Unidos en la década de los 80s hubo 20,000 casos de TB por arriba de lo esperado. En el año 2000 se reportaron a la OMS 8.3 millones de casos nuevos y 1.8 millones de decesos.

El incremento en la incidencia de la TB se ha atribuido en parte a la epidemia del SIDA, que se inició justamente a principios de los 80s². Lo anterior se debe aparentemente a que en dicha infección viral hay una disminución marcada en el número de linfocitos CD4+ que son la principal defensa en contra del bacilo de la TB^{4,5}. Las células CD4+ secretan citocinas que activan la capacidad bactericida del macrófago⁶⁻⁸. Otro factor asociado al resurgimiento de la TB es el incremento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los medicamentos antimicobacterianos habituales, debido en parte a que no se siguen las recomendaciones para un tratamiento eficaz que se considera debe ser por lo menos de 6-12 meses⁹. Otros factores relacionados con el incremento de la TB son la pobreza, las dificultades en el acceso a servicios de salud pública, el aumento de personas sin hogar, el hacinamiento y el aumento en las corrientes migratorias.

La infección por el VIH ha tenido un enorme impacto en la epidemiología y curso de la tuberculosis: 9% de los casos de TB y 12% de los decesos por esta infección se atribuyen a la infección por VIH. En la actualidad la prevalencia de la coinfección

tuberculosis/VIH es de 0.36% con 11 millones de coinfectados reportados en todo el mundo². Solo en Sudáfrica hay 2 millones de adultos coinfectados, siendo la TB la causa más importante de muerte del paciente con SIDA^{10 3}. Por otra parte el curso de la enfermedad en el paciente coinfectado es más rápido y las complicaciones son más frecuentes¹¹.

2.3. GENÉTICA Y TUBERCULOSIS

Además de factores del medio ambiente y de la virulencia del agente infeccioso, la estructura genética del individuo es importante en la susceptibilidad o resistencia a la infección por *M. tuberculosis*. Es bien sabido que no todos los individuos expuestos a un foco de contagio se infectan y que hay grupos étnicos altamente vulnerables a la TB; ejemplos son algunos grupos de esquimales de Norteamérica y los indios Yanomami que habitan la amazonia en Brasil¹²⁻¹⁴. Estas observaciones parecen indicar que algunos individuos están dotados de sistemas inmunes innatos y/o adquiridos altamente eficaces para controlar la infección micobacteriana. Se han identificado trastornos mendelianos que se asocian a una alta susceptibilidad a la infección en general, incluyendo la infección con micobacterias patógenas y saprofitas¹⁵. Ejemplos son la inmunodeficiencia combinada severa, la enfermedad granulomatosa crónica y las inmunodeficiencias primarias, condiciones en las que hay defectos diversos que impiden una respuesta T adecuada.

En la respuesta del huésped al bacilo de la TB, la activación del macrófago por la micobacteria es fundamental ya que se induce la síntesis de IL-12, citocina que activa la producción de IFN- γ por los linfocitos T⁴. Esta citocina es sin duda la más importante en la respuesta inmunoprotectora en contra de *M. tuberculosis* ya que activa la capacidad micobactericida del macrófago infectado⁶⁻⁸. Recientemente se han

identificado pacientes con trastornos hereditarios mendelianos en los cuales el eje IL-12/IFN- γ es disfuncional y hay una susceptibilidad incrementada a la infección con micobacterias¹⁶. Así mismo, en pacientes tuberculosos se han detectado mutaciones en genes que codifican receptores macrofágicos para el IFN- γ y en receptores para IL-12 y STAT1 en células T. El denominador común de estos trastornos hereditarios, que generalmente son de tipo autosómico recesivo, es la ausencia de los mecanismos efectores que modula el IFN- γ .

Hay algunos estudios que involucran a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad con la TB, lo que es de interés pues las moléculas de este complejo presentan péptidos antigénicos a linfocitos T lo que resulta en su activación¹⁵. En algunas regiones se ha observado que HLA-DR2 es muy frecuente en pacientes con tuberculosis y estudios más recientes con métodos de tipificación del DNA han venido a demostrar asociación entre DRB1*1501 (un alelo de DR2) y TB pulmonar en India y México¹⁷. El estudio de la herencia en la susceptibilidad o resistencia a la TB adquirió mucho interés a partir de las observaciones de Skamene y su grupo¹⁸, quienes identificaron cepas murinas altamente resistentes o muy susceptibles a la infección con *M. bovis*/BCG. Las bases genéticas de la resistencia se ubicaron en un locus que codifica un gen en el cromosoma 1 del ratón denominado *nramp1*¹⁸. Este gen es responsable de la producción de la denominada “proteína macrofágica asociada a resistencia natural” (NRAMP1). Se ha demostrado que esta proteína es un transportador transmembranal de hierro que se expresa en la membrana endosomal de macrófagos. Se desconoce como NRAMP1 confiere protección; se ha sugerido que depriva de hierro a la bacteria, que favorece la producción de radicales libres de oxígeno y que induce la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico¹⁹. Este efecto es de la mayor relevancia ya que el principal factor micobactericida es el óxido nítrico²⁰. En nuestro

laboratorio hemos demostrado que los macrófagos de granulomas tuberculosos, que son reacciones protectoras del hospedero, coexpresan NRAMP1 y la sintasa de óxido nítrico sugiriendo su participación en mecanismos efectores (Pereira-Suárez A y col., en prensa en *Veterinary Pathology*). En ratones susceptibles la proteína NRAMP1 presenta una mutación puntual que la hace disfuncional y en seres humanos se han identificado varios polimorfismos de NRAMP1 que se asocian con una susceptibilidad aumentada a la TB^{18,21}. En conclusión, las observaciones anteriores sugieren que en la resistencia o susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* participan múltiples genes que están involucrados en las diversas fases de la respuesta inmune innata y adquirida. Es previsible que en este campo de la investigación se darán avances importantes que habrán de ayudar a diseñar estrategias en la lucha para controlar esta infección

2.4. INMUNOPROFILAXIS DE LA TUBERCULOSIS

La vacunación ha ocupado un lugar muy importante en los esfuerzos para controlar y/o erradicar la TB. Se ha utilizado una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) denominada bacilo de Calmette y Guérin (BCG) en honor de los investigadores que la desarrollaron; quienes después de numerosos pasos *in vitro* obtuvieron una cepa de *M. bovis* altamente inmunogénica pero incapaz de producir enfermedad en animales de laboratorio. La vacunación con BCG ha dado resultados variables lo que se ha atribuido a múltiples factores como son el tipo y viabilidad de la cepa utilizada, dosis y ruta de administración, características de la población vacunada en lo que concierne al estado nutricional e inmunológico, factores genéticos y exposición a micobacterias saprófitas del medio ambiente^{22,23}. En las poblaciones vacunadas con BCG, la disminución en el número de casos de TB pulmonar ha sido muy variable. En algunas regiones la

protección fue casi completa mientras que en algunos ensayos, como el llevado a cabo en el sur de la India, la vacunación con BCG no disminuyó la frecuencia de TB. Sin embargo, hay muchos datos que muestran que la protección en contra de la TB meníngea es muy alta lo que, en la opinión de muchos, justificaría por si solo la vacunación con BCG²⁴.

2.5. ESTRUCTURA MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis*

Un paso histórico en el estudio de la TB se dio cuando se secuenció el genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en 1998 por un grupo del Instituto Pasteur²⁵. Más recientemente, otras cepas de laboratorio y aislados clínicos se secuenciaron parcial o totalmente. La comparación de los genomas de *M. tuberculosis* y la cepa vacunal *M. bovis*/BCG mostró diferencias que están ayudando a entender la patogenia de la TB y a desarrollar métodos diagnósticos y de inmunoprofilaxis. En una actualización reciente del genoma de *M. tuberculosis* se ha reportado que tiene la capacidad de codificar 4006 proteínas y 50 RNAs²⁶. Casi la cuarta parte son genes que hipotéticamente codifican para proteínas conservadas. Se han identificado 272 genes que codifican para proteínas de función desconocida. Entre los genes que codifican para proteínas de función conocida destacan los involucrados en el metabolismo de lípidos, en el metabolismo intermediario, en la respiración y en la síntesis de la pared celular. Así mismo se han identificado 99 genes que codifican para proteínas que participan en la virulencia. La gran complejidad antigénica de *M. tuberculosis* se ha demostrado por el análisis en geles de dos dimensiones y por espectrometría de masa²⁷. Se han observado un total de 1800 "spots" de proteínas de las cuales solo se han podido identificar 263. En el sobrenadante del medio de cultivo se observaron 800 "spots" lográndose la identificación de 54 proteínas. Una tercera parte de las proteínas son integrales y 25 son

de choque térmico. Solo 3 proteínas están asociadas a la envoltura celular. También se identificaron proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y glicolípidos, la biosíntesis de ácidos micólicos, resistencia a isoniazida, y miembros del complejo antigénico 85A, B y C. La secuenciación del genoma y el análisis proteómico abren posibilidades enormes para avanzar en la caracterización de moléculas involucradas en la respuesta inmune protectora así como en los mecanismos de protección de la TB. Este conocimiento será de gran utilidad para diseñar estrategias racionales para combatir esta infección, particularmente para diseñar nuevas vacunas y métodos diagnósticos.

2.6 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS.

La patogenia de la tuberculosis es muy compleja por los múltiples factores involucrados. Entre estos están; la estructura genética del paciente y de la bacteria así como factores socioeconómicos²⁸⁻³⁰. La TB se puede adquirir por 3 vías principales: por vía respiratoria al inhalar aerosoles que transportan bacilos, por ingestión de material contaminado como la leche de vacas tuberculosas y por inoculación accidental en personas que laboran con material infectado. En la gran mayoría de los casos la TB se adquiere por la vía aérea; la infección por *M. bovis* ha disminuido notablemente desde que se instituyó la pasteurización de la leche. Alrededor del 30% de las personas que tienen contacto con pacientes tuberculosos en los que se les ha detectado bacilos ácido alcohol resistentes en frotis de expectoración desarrollan la infección, en contraste con 10% que desarrollan la enfermedad cuando el contacto es con pacientes con frotis negativos³¹. En la gran mayoría de los casos la infección es latente manifestándose únicamente por una prueba de PPD positiva, no habiendo evidencias clínicas o radiológicas de enfermedad. En aproximadamente 10% de las personas infectadas se

desarrolla la enfermedad, en la mitad de los casos durante los 2 primeros años y en el resto tardíamente, a menudo en la vejez³¹.

En la patogenia de la tuberculosis se distinguen los siguientes eventos²⁸⁻³⁰. El bacilo que arriba por el tracto respiratorio es fagocitado por macrófagos alveolares presentes entre las células epiteliales del alveolo pulmonar. Frecuentemente, el macrófago infectado es capaz de eliminar a la bacteria o bien de inhibir su crecimiento. La sobrevivencia de la bacteria depende de su virulencia, de la capacidad bactericida del macrófago y de factores genéticos del individuo. Cuando el macrófago falla y muere, el bacilo se multiplica y es liberado al espacio extracelular. Macrófagos y monocitos atraídos al sitio de inflamación fagocitan los bacilos liberados iniciándose nuevamente el ciclo de infección intracelular. En esta etapa llegan linfocitos atraídos por quimiocinas macrofágicas; linfocitos y macrófagos se organizan formando granulomas que son reacciones inflamatorias características de la TB.

En esta etapa hay un crecimiento logarítmico de la carga bacilar y en el centro del granuloma se observa necrosis de tipo caseoso. Los linfocitos T secretan citocinas entre las que sobresale el IFN- γ que activa la capacidad micobactericida de los macrofagos. Cuando la actividad inmunológica disminuye, el granuloma y la necrosis caseosa aumentan y el tejido pulmonar es destruido. El bacilo se multiplica de manera descontrolada e invade otras zonas del pulmón formando múltiples granulomas. En las etapas avanzadas hay licuefacción del tejido pulmonar lo que favorece la proliferación bacteriana y la necrosis que puede afectar el árbol bronquial permitiendo la expectoración de bacilos.

2.7. MÉTODOS DE DIAGNOSTICO

Los métodos para diagnosticar la TB son de diverso tipo: clínicos, radiológicos, inmunológicos y, más recientemente se han utilizado técnicas de biología molecular¹. El método de diagnóstico más utilizado es sin duda la intradermoreacción con PPD (prueba de la tuberculina), un derivado proteínico que se obtiene del medio de cultivo de *M. tuberculosis*. La prueba de la tuberculina es útil para demostrar la infección en todas las etapas de la enfermedad. En el laboratorio se utilizan una variedad de pruebas. La más utilizada es la tinción de frotis de expectoración por la técnica de Zhiel-Neelsen que permite demostrar bacilos ácido-alcohólico resistentes; también se utiliza la técnica de Auramina-Rodamina que es más sensible y específica. Sin embargo, estos métodos no permiten identificar las diferentes especies de micobacterias para lo que se utiliza el cultivo de esputo utilizando medios sólidos y líquidos que hacen más rápido el cultivo y la posterior identificación del tipo de micobacteria por métodos bioquímicos (producción de niacina, catalasa, nitrato reductasa). Actualmente para identificar las diferentes especies de micobacteria se están usando métodos de biología molecular, como el PCR, el análisis por RFLP y la búsqueda de elementos repetidos los que son diferentes para cada especie de micobacteria³¹.

2.8. LA RESPUESTA INMUNE EN CONTRA DE *Mycobacterium tuberculosis*.

M. tuberculosis es un microorganismo de una gran complejidad antigénica capaz de estimular tanto la respuesta inmune celular como la humoral. Es de aceptación general que la inmunidad protectora en contra de *M. tuberculosis* es mediada por linfocitos T y que los anticuerpos no juegan un papel significativo⁴. Sin embargo, recientemente el posible papel de los anticuerpos en la respuesta protectora en contra del bacilo de la

tuberculosis ha cobrado interés³². En un modelo murino de TB la transferencia pasiva de anticuerpos en contra de la lipoarabinomanana (LAM) y la hemaglutinina que une heparina confirió protección³². Clínicamente se ha observado que niños tuberculosos con títulos altos de anticuerpos en contra de la LAM tienen un curso benigno³³. Recientemente en un estudio con indios totonacos observamos que los pacientes con tuberculosis pulmonar y títulos de anticuerpos altos en contra del antígeno micobacteriano 85A tenían un curso benigno, en contraste con los pacientes con títulos bajos³⁴. Recientemente en un modelo experimental se demostró el papel inmunoprotector de las inmunoglobulinas de isotipo A, que son anticuerpos de secreción que opsonizan bacterias y favorecen su fagocitosis por macrófagos³⁵.

Hay muchas observaciones que muestran que la inmunidad mediada por linfocitos T protege en contra de la infección por *M. tuberculosis*^{4,36,37}. Los antígenos micobacterianos son presentados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad a las células CD4+, las que son activadas para producir muchos factores entre ellos IFN- γ , citocina prototípica de tipo Th1 que activa la capacidad microbicida del macrófago^{4,36-39}. Los linfocitos CD8+ también se expanden en respuesta a la infección micobacteriana, siendo su principal actividad efectora la lisis de macrófagos infectados⁴; para llevar a cabo este proceso secretan perforinas y granulisina, factores que tienen la capacidad adicional de matar bacilos directamente al interior del macrófago. Los linfocitos CD8+ son así mismo productores de cantidades substanciales de IFN- γ . Además de los linfocitos CD8+, otras células capaces de lisar macrófagos infectados con micobacterias son los linfocitos T γ/δ y células T CD1-restringidas³⁷.

Es importante señalar que en una gran proporción de pacientes tuberculosos la inmunidad mediada por linfocitos T esta deprimida lo que se correlaciona con la

severidad de la enfermedad^{40,41}. Se ha observado que del 17 al 25% de los pacientes con TB son anérgicos a la tuberculina y en 40-60% hay una disminución en la respuesta *in vitro* a mitógenos y antígenos micobacterianos⁴²⁻⁴⁴. Además se ha observado que la estimulación *in vitro* de linfocitos T de pacientes anérgicos resulta en la producción de IL-10 mientras que los linfocitos de individuos reactivos al PPD producen IL-12 e IFN- γ ⁴⁴. IL-10 es una citocina que disminuye la capacidad antimicobacteriana de los macrófagos, mientras que IL-12 e IFN- γ la activan^{43,44}. En pacientes anérgicos se han observado múltiples anomalías inmunológicas como linfopenia con disminución de linfocitos T CD4⁺⁴⁵⁻⁴⁸, baja producción de IFN- γ ⁴⁹⁻⁵¹, defectos en el receptor de IFN- γ ⁵², disminución en la producción de IL-2⁵³ y células genéticamente deficientes en el receptor para IL-12⁵⁴. Los hallazgos anteriores se han postulado como la causa de la anergia en pacientes con tuberculosis⁵³ y se han postulado como factores causales de una mayor producción de citocinas de tipo Th2 lo que facilita la infección micobacteriana^{51,55-57}. Algunos de estos defectos se corrigen con antifímicos sugiriendo que son causados por la micobacteria.

2.9. INTERACCIÓN DEL MACRÓFAGO CON EL BACILO DE LA TUBERCULOSIS

El macrófago es una célula especializada en eliminar por medio de la fagocitosis a agentes potencialmente dañinos. La fagocitosis consiste de una sucesión de eventos que incluye inicialmente el reconocimiento del agente dañino, transducción de señales, movimiento del citoesqueleto, formación del fagosoma y su fusión con lisosomas^{58,59}. En el reconocimiento del microbio, participan receptores de superficie del macrófago, como el receptor de manosa, el receptor “scavenger”, el receptor β -glucano, DC-SIGN y CD14 los que reconocen patrones específicos presentes en la superficie del microbio.

En la fagocitosis de patógenos participan opsoninas que son proteínas plasmáticas, siendo las mejor caracterizadas las inmunoglobulinas y las proteínas del sistema del complemento; estas moléculas, al recubrir el microbio, promueven su fagocitosis a través de receptores macrofágicos específicos como son los receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) y los receptores para fracciones del complemento C1qR, CR1, CR3 y CR4. Otras opsoninas menos estudiadas son la fibronectina, el fibrinógeno y las colectinas, como la proteína de unión a manosa y las proteínas surfactantes^{58,60}. Después del reconocimiento de la partícula blanco, se inician cascadas de fosforilación con generación de segundos mensajeros. El blanco de la cascada de transducción de señales es el citoesqueleto de actina lo que resulta en la emisión de prolongaciones de la membrana plasmática que envuelven a la partícula, las que al fusionarse forman el fagosoma, el cual se desliza en el citosol merced a la acción de complejos de actina y miosina⁵⁸⁻⁶⁰. Una vez formado el fagosoma se inicia un proceso de maduración que culmina con la fusión fagolisosomal, proceso que ocurre en aproximadamente 20 minutos. Durante la maduración del fagosoma disminuye el pH intrafagosomal por la acción de la ATPasa de protones y de la NADPH oxidasa lo que resulta en la generación de iones H⁺. Estos eventos culminan con la degradación del material fagocitado. El material degradado es reutilizado por la célula o bien permanece en la forma de cuerpos inertes. Finalmente, la membrana celular es reconstituida reincorporándose a la superficie celular los receptores utilizados en la fagocitosis.

La adhesión de la partícula a la superficie de la célula fagocítica es un evento clave que puede darse por diversos mecanismos. Además de la interacción molecular complementaria como ocurre en la interacción de ligandos microbianos y receptores macrofágicos, pueden participar mecanismos fisicoquímicos, del tipo fuerzas de Van

der Walls, la atracción hidrofóbica y, raramente, la atracción electrostática⁵⁹. En soluciones acuosas y en medios que contienen proteínas plasmáticas, las partículas más hidrofóbicas son las que se fagocitan mejor vía fuerzas de Van der Walls. Puede haber adhesión de la partícula a receptores de membrana de la célula fagocítica, como los receptores para inmunoglobulinas^{59,61}, moléculas del complemento, fibronectina y lectinas como el receptor de manosa (RM)⁶²⁻⁶⁴. En la fagocitosis de microbios participan además adhesinas microbianas que son moléculas ubicadas superficialmente, las que al interactuar con receptores de superficie del macrófago promueven la fagocitosis. Dentro de esta categoría hay lectinas, proteínas y componentes más complejos⁶⁵⁻⁶⁸.

Las consecuencias metabólicas de la fagocitosis son múltiples. Hay un aumento en el metabolismo oxidativo con producción de productos reactivos del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el singlete de oxígeno (O_2^-) o anión superóxido⁶⁹. Más recientemente ha adquirido mucha importancia como mecanismo antibacteriano la producción de radicales libres de nitrógeno por macrófagos^{69,69,70,70,71}. Además, durante la fagocitosis se incrementa la producción de otros factores con capacidad bacteriostática o bactericida como son las hidrolasas⁷², los metabolitos del ácido araquidónico y las defensinas, etc.⁷³. Por otra parte se generan segundos mensajeros incluyendo nucleótidos cíclicos y fosfatidilinositol y se incrementa el gasto de ATP^{74,75}.

2.10. FAGOCITOSIS DE *Mycobacterium tuberculosis*

El macrófago es la célula hospedera para una variedad de patógenos intracelulares. Al interior de la célula los microbios evitan ser detectados y evaden mecanismos de destrucción del sistema inmune como el complemento. Al interior de la células fagocítica los microbios intracelulares han desarrollado estrategias que les permiten

sobrevivir en el medio hostil del fagosoma. Estas estrategias incluyen escape al citosol, inhibición de la fusión fagolisosomal y anulación de la bomba de protones lo que impide la acidificación del fagosoma y por lo tanto la activación de proteasas⁷⁶.

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria intracelular que utiliza el macrófago como su célula hospedera. Las opsoninas pueden participar o no en la fagocitosis del bacilo. Las opsoninas mejor caracterizadas son componentes del sistema del complemento y los anticuerpos, para los cuales el macrófago posee receptores específicos en su superficie. A diferencia de lo que ocurre con otros patógenos, la IgG no parece jugar un papel importante en la fagocitosis de *M. tuberculosis*, lo que es interesante, pues en la TB hay una alta producción de anticuerpos y el macrófago posee receptores para la fracción Fc de la IgG⁷⁷. En cambio, está bien documentado el papel que el sistema del complemento juega en la fagocitosis del bacilo de la TB. In vitro *M. tuberculosis* es capaz de activar la vía clásica y la alterna del complemento y mas recientemente se ha reportado que activa la vía clásica del complemento presente en lavados broncoalveolares de individuos sanos; es posible que lo anterior se relacione con la presencia de anticuerpos IgA en el fluido broncoalveolar^{35,78}. También se ha demostrado que anticuerpos de la subclase IgG₂ anti-LAM de pacientes tuberculosos y de individuos sanos activan la vía clásica del complemento⁷⁹. Otros estudios han demostrado que C3 se deposita en la superficie de la bacteria y que interacciona con moléculas bacterianas generando C3b y C3bi que se unen a CR1, CR3 y CR4^{77,80,81}. Por otra parte se ha demostrado que *M. tuberculosis* posee en su superficie un adhesina de 28-kDa parecida a la hemaglutinina que une heparina (HbhA), que es capaz de unir la fracción C3 del complemento, induciendo la fagocitosis del bacilo a través de receptores para complemento presentes en la membrana del macrófago⁸².

Recientemente se han descubierto otras proteínas con función de opsonina, tal es el caso de la proteína A surfactante, una colectina que se secreta en el espacio alveolar, que reconoce residuos de manosa en glicoconjugados de patógenos⁸³. Esta proteína, que reviste el espacio alveolar incrementa la expresión del receptor para manosa en la superficie de macrófagos aumentando la fagocitosis a través de dicho receptor. También se ha descrito que la proteína D surfactante interacciona con el bacilo de la tuberculosis, sin embargo esta interacción disminuye la fagocitosis de la bacteria⁸³; la unión de las proteínas surfactantes a la lipoarabinomanna se debe a interacciones de tipo lectina. Otra proteína con función de opsonina es la fibronectina, la cual tiene afinidad por proteínas micobacterianas de superficie lo que podría facilitar la fagocitosis vía el receptor macrofágico para fibronectina⁸⁴.

En la fagocitosis independiente de opsoninas participan moléculas propias del bacilo que se conocen con el nombre genérico de adhesinas. Las adhesinas son moléculas de superficie que funcionan como ligandos que interaccionan con receptores celulares presentes en la superficie de las células hospederas, un prerrequisito para que se lleve a cabo la fagocitosis. Se han descrito adhesinas en patógenos intracelulares como son *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Salmonella typhimurium*⁸⁵⁻⁸⁸. En la fagocitosis del bacilo de la tuberculosis se han caracterizado algunas moléculas con función de adhesina, la mejor caracterizada es el LAM, un lipoglicano muy abundante en la pared del bacilo que posee residuos de manosa que le permiten interaccionar con el receptor para manosa y promover la fagocitosis de la bacteria^{89,90}. En un estudio se observó que la fagocitosis de bacilos y de microesferas recubiertas con LAM se inhibía con ligandos para el RM y con anticuerpos anti-LAM^{90,91}. Recientemente se ha demostrado que los fosfatidilinositol manosidos funcionan como adhesinas promoviendo la fagocitosis de *M. tuberculosis*, probablemente interaccionando con la

fracción lectina de CR3⁹². Otro ejemplo de fagocitosis donde participan adhesinas micobacterianas es la promovida por el receptor “scavenger”, el cual reconoce lipopolisacáridos y sulfolípidos polianiónicos de la pared de los microorganismos. Se ha reportado que ligandos del receptor “scavenger” inhiben la fagocitosis de *M. tuberculosis* por macrófagos⁹³. También se ha involucrado la participación de CD14 en la fagocitosis de *M. tuberculosis*. CD14 es una glicoproteína que reconoce principalmente componentes lipídicos y que requiere de la cooperación de otras proteínas para iniciar la fagocitosis ya que esta proteína carece de dominios intracitoplasmicos^{94,95}.

La participación de adhesinas micobacterianas de naturaleza proteica en la fagocitosis del bacilo de la TB ha sido poco estudiada. Se ha propuesto que una proteína de 50-kDa esta involucrada en la fagocitosis ya que *E. coli* no invasiva transfectada con dicho péptido adquiere la capacidad de infectar células⁹⁶. Otra posible adhesina es la proteína micobacteriana 85C que pertenece al complejo antigénico 85⁹⁷ y recientemente se ha reportado que las proteínas CFP-10 y ESAT-6 forman un complejo que puede adherirse a un receptor macrofagico aún no identificado, a través de un brazo flexible presente en el complejo⁹⁸. En *Mycobacterium avium* se ha demostrado una proteína de 67-kDa que interacciona con el receptor de vitronectina, lo que aumenta la expresión de CR3 y promueve la fagocitosis del bacilo⁹⁹. En nuestro laboratorio se han hecho estudios para identificar proteínas con función de adhesina. Se han obtenido evidencias de que la proteína de choque térmico de 71-kDa se une a la superficie de macrófagos alveolares de rata promoviendo la fagocitosis del bacilo a través de un receptor no identificado¹⁰⁰. Con macrófagos peritoneales de ratón y con la línea celular murina J774 hemos identificado como posibles adhesinas las proteínas de 30-31, 38 y 45-50-kDa (Díaz y Mancilla, datos no publicados).

2.11. INTERACCIÓN DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS CON CÉLULAS NO FAGOCÍTICAS.

Antes de llegar al espacio alveolar y a lo largo del tracto respiratorio se postula que *M. tuberculosis* entra en contacto con células epiteliales de diverso tipo que podrían ser infectadas por el bacilo. Algunas observaciones apoyan esta posibilidad. Se ha reportado que el bacilo puede unirse al factor de crecimiento epidérmico y lo que resulta en la infección de células de estirpe epitelial¹⁰¹. Además, se sabe que las micobacterias pueden infectar células HeLa y células epiteliales intestinales^{101,102}. *In vitro* se ha observado que las cepas H37Rv y H37Ra de *M. tuberculosis* invaden y se replican en pneumocitos A549¹⁰³. El nivel de la fagocitosis con células epiteliales es menor que con macrófagos de la línea J774 y derivados de monocitos de sangre periférica, sin embargo la replicación del bacilo es mayor en células epiteliales que en macrófagos¹⁰³. Más recientemente se ha reportado que el fosfatidilinositolmanósido de *M. tuberculosis* funciona como adhesina para células endoteliales y células CHO¹⁰⁴. Recientemente se ha reportado que las células epiteliales interiorizan micobacterias por macropinocitosis y se ha sugerido que la bacteria utiliza células epiteliales para entrar en latencia¹⁰⁵. Finalmente, hay observaciones que sugieren la participación del ácido hialurónico en la interacción entre la micobacteria y células epiteliales del pulmón¹⁰⁶.

De lo anterior se puede concluir que *M. tuberculosis* ha desarrollado una variedad de estrategias para llevar a cabo con éxito el paso crítico que es instalarse al interior de su célula nicho, el macrófago. Así mismo, las micobacterias son capaces de infectar células epiteliales; la importancia biológica de esta capacidad está aún por establecerse.

3. HIPÓTESIS

Mycobacterium tuberculosis posee una variedad de mecanismos para infectar al macrófago, incluyendo proteínas con función de adhesina presentes en la superficie bacteriana, las que al interactuar con receptores del macrófago promueven la fagocitosis.

4. OBJETIVOS

- Diseñar ensayos de adhesión con macrófagos y extractos proteicos micobacterianos para identificar adhesinas.
- Caracterización de las adhesinas micobacterianas.
- Identificación de los receptores macrofágicos a los que se unen las adhesinas.
- Desarrollar ensayos de fagocitosis para investigar la participación de las adhesinas en el proceso.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. CULTIVO DE CÉLULAS THP-1 Y MACRÓFAGOS HUMANOS DERIVADOS DE MONOCITOS DE SANGRE CIRCULANTE.

Se cultivaron las células THP-1, una línea monocítica humana, en RPMI-1640 (Gibco BAL Products) suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado por calor a 50°C, 1% penicilina-estreptomina, 1% aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1% y 1% L-glutamina (Gibco BRL Products, Rockville, MD). Las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Así mismo se utilizaron macrófagos derivados de monocitos de sangre circulante (MDM), donados por individuos sanos del personal del laboratorio. La sangre (40-60 ml) se obtuvo por venopunción y las células mononucleares se separaron por Ficoll-Hypaque (Sigma) y se aislaron los macrófagos por adherencia al plástico¹⁰⁷. Las células se cultivaron por 5-7 días en RPMI-1640, con 1% penicilina-estreptomina y 20% suero autólogo. La viabilidad se estimó por exclusión del azul tripano.

5.2. CULTIVO DE BACTERIAS Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

En este estudio se utilizó la cepa H37/Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294) que fue cultivada en Proskauer y Beck (PBY¹⁰⁸ y en el medio de GAS¹⁰⁹). Después de 6-8 semanas de cultivo para bacterias cultivadas en PBY y de 2 semanas cuando se usó el medio de GAS, las bacterias se prefiltraron con papel Whatman nivel medio y se eliminaron por filtración sucesiva a través de filtros de 1.2, 0.45 y 0.22 µm. Las proteínas del filtrado del medio de cultivo (PFC) se precipitaron con (NH₄)₂SO₄ al 70%¹¹⁰. Además se utilizaron dos cepas de *M. smegmatis* (mc²155), una nativa y otra que expresa la glicolipoproteína de 19-kDa de *M. tuberculosis* (GPL-19), la que fue

transformada con el plásmido p16R1 que contiene un fragmento SmaI de 1.8-kb que codifica el gen estructural de GLP-19 de *M. tuberculosis* (Donadas por Y. Zhang, MCR Tuberculosis and Related Infections Unit, Hammersmith Hospital, London, UK). Esta cepa se denominó *M. smegmatis*+19. Las bacterias se cultivaron en Middlebrook 7H9 (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD) con 2% glucosa e higromicina B (50 µg/ml). Las bacterias se cosecharon a los 5-6 días y se obtuvieron las PFC por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como se señaló anteriormente.

Se obtuvieron fracciones de la pared de *M. tuberculosis*/H37Rv y de las cepas de *M. smegmatis* de la siguiente manera: las bacterias se trataron con azida de sodio al 2%, se lavaron con PBS y se sometieron a ultrasonificación en hielo (6 pulsos de 5 min, con intervalos de 1 min). La fracción de pared se recobró por centrifugación a 20,000 rpm por 20 minutos. La concentración de proteína se determinó por los métodos de Lowry (Pierce Endogen, Rockford, IL) y Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

5.3. MARCAJE DE PROTEÍNAS MICOBACTERIANAS

Las PFC, las fracciones de pared y los bacilos se marcaron con biotina (Sigma) según el procedimiento de Anderson y col¹¹¹. Los bacilos se lavaron exhaustivamente con PBS, se dializaron en un amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9 y se marcaron con biotina (Sigma). Posteriormente y para liberar proteínas de pared marcadas con biotina, los bacilos se sonicaron y por centrifugación (20,000 rpm/20 min) se obtuvieron un sobrenadante y un precipitado, a los que se les determinó la concentración de proteína y se hicieron alicuotas que se almacenaron a -20°C.

5.4. PAGE-SDS Y WESTERN BLOT

Las proteínas micobacterianas se separaron en geles de poliacrilamida-bisacrilamida (PAGE-SDS), desnaturalizantes, generalmente al 15%, por medio del sistema discontinuo de Laemmli¹¹². Se corrieron a 100 V por 45 minutos. Los geles fueron transferidos a papel de nitrocelulosa a 200 V por 1 h y se bloquearon con PBS-BSA 3% toda la noche. Cuando se utilizaron extractos micobacterianos marcados con biotina, las membranas se incubaron con estreptavidina marcada con peroxidasa (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) por 1 h en dilución 1:1000 en PBS. En algunos blots se utilizó el anticuerpo monoclonal (AcMn) IT-19 (Donado por Colorado State University) específico para GPL-19 de *M. tuberculosis*, en dilución 1:1000, incubando toda la noche. Como control de carga se incubaron las membranas con un anticuerpo anti- β -actina en dilución 1:2000. Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa en dilución 1:2000 por 1 h. Finalmente, se agregó la solución reveladora (25 ml PBS-Tween, 25 μ l H₂O₂ y 2.5 μ g 3.3' tetracloruro de diaminobenzidina, DAB) por unos minutos, deteniéndose la reacción con agua. En algunos experimentos se utilizó un kit de quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

5.5. ENSAYOS DE ADHESIÓN DE PROTEÍNAS MICOBACTERIANAS A MACRÓFAGOS.

Los ensayos para investigar la posible adhesión de proteínas micobacterianas a macrófagos se realizaron de la siguiente manera. Se incubaron 5 X 10⁵ células en cajas de 12 pozos (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY). En los ensayos con la línea THP-1 se utilizaron células no activadas y células activadas con 10 ng de PMA, por 24 h antes de los ensayos de adhesión¹¹³. Enseguida las células se incubaron con PFC o fracciones de la pared bacteriana, marcadas o no con biotina. Los ensayos se hicieron

en RPMI 1640, con 0.2% azida de sodio, 10% suero fetal bovino, variando los tiempos de incubación y las cantidades de proteína; después de la incubación se lavó 3 veces con PBS. Además se utilizaron inhibidores de proteasas (0.04% parahidroximercuribenzoato de sodio, 0.006% fluoruro de fenil-metil-sulfonilo y 25 μ M EDTA). Las células se recuperaron con un levantador de células, se corrieron en PAGE-SDS y se transfirieron para Western blot. Las proteínas adheridas a las membranas de nitrocelulosa se revelaron con estreptavidina-peroxidasa o con el AcMn IT-19. Algunos experimentos de adhesión con PFC de *M. smegmatis* marcadas con biotina se analizaron por citometría de flujo. Para esto, después de incubar las células por 1 h con PFC marcadas con biotina, se fijaron en 1% paraformaldehído y se incubaron con estreptavidina-ficoeritrina por 1 h. Finalmente, las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo.

5.6. CARACTERIZACIÓN DE GLP-19 DE *M. tuberculosis* Y DE *M. smegmatis*+19.

Para investigar la presencia de manosa en GLP-19 de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*+19, las PFC se analizaron por Western blot utilizando Concanavalina A marcada con peroxidasa (Con A-PO; Sigma). Con A es una lectina que reconoce manosa en glicoconjugados¹¹⁰. Los blots se incubaron con 2.5 μ l/ml de una solución de Con A-PO (5 mg/ml) en PBS-Tween 20 al 0.3%. La presencia de residuos de manosa se investigó además haciendo digestiones de PFC con α -D-manosidasa (Sigma), como se ha reportado previamente¹¹⁴. Para esto se utilizaron 10 μ g de PFC de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*+19, que se trataron con α -D-manosidasa (5 U) por 1 h, a 37°C en un amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5. La reacción se detuvo con el amortiguador de corrida (0.5 M de Tris-HCl, pH 6.8, 1 mM de EDTA, 1% glicerol, 1% SDS, 15 mM 2-

β -mercaptoetanol y 0.01% pironina). Las proteínas se analizaron por Western blot utilizando el AcMn IT-19 específico para GLP-19.

5.7. ENSAYOS DE ELISA CELULAR

Para cuantificar la unión de GLP-19 a la superficie de los macrófagos, se hicieron ELISAs celulares¹¹⁵. En estos experimentos se colocaron 100, 000 células THP-1, en placas de ELISA de 96 pozos. Previamente se bloqueó la placa con PBS-albúmina 1% por 1 h. Enseguida, las células se incubaron con concentraciones crecientes de PFC de *M. smegmatis* por 1 h. Se lavaron las células por centrifugación 3 veces con PBS-albúmina 1% y se incubaron por 1 h con el AcMn IT-19 o con un isotipo control (Dako Corporation, Carpinteria, CA) en dilución 1:100. Posteriormente se lavaron las células con PBS y se incubaron con un AcMn anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Dako) en dilución 1:2000 por 1 h. Después de lavar las células se incubaron con p-nitrofenil-fosfato (Sigma) por 1 h. Las placas se leyeron a 405 nm en un lector de ELISA (Bio-Tek Instruments). En ensayos de inhibición, las células se preincubaron con α -metil-manósido en cantidades variables, por 1 h y posteriormente con 50 μ g de PFC, por 1 h.

5.8. ENSAYOS DE FAGOCITOSIS DE MICROESFERAS FLUORESCENTES RECUBIERTAS CON PROTEÍNAS MICOBACTERIANAS

Con el fin de determinar si GLP-19, además de adherirse a los macrófagos promovían la fagocitosis se hicieron ensayos con microesferas fluorescentes de 1 μ m de diámetro (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Las microesferas se recubrieron con BSA, una fracción lipoproteica de *M. tuberculosis* rica en GLP-19 y PFC de *M. tuberculosis* H37/Rv y de *M. smegmatis* nativa y *M. smegmatis*+19. Se siguió el

siguiente método¹¹⁶: a 500 µg de proteínas en buffer MES [2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, pH 6.0] se añadieron 400 µl microesferas (1.08×10^{10} /ml), y EDAC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide] (Molecular Probes) en una concentración final de 2.5 mg/ml. La incubación se llevo a cabo toda la noche a temperatura ambiente y en agitación. La reacción se detuvo con 100 mM glicina. Las microesferas fluorescentes se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en PBS-1% BSA con 2 mM de azida de sodio. En experimentos control se utilizaron microesferas recubiertas con BSA. Para los ensayos de fagocitosis se incubaron células THP-1 con microesferas a diferentes proporciones por 1 h. En ensayos de inhibición las células se preincubaron por 1 h con α -metil-manósido, a varias concentraciones por 1 h (10 y 100 µM). Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron con 10% formalina y se analizaron en un microscopio de epifluorescencia, contando el número de microesferas asociadas a por lo menos 200 células seleccionadas al azar.

5.9. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN DE GLP-19 A MACROFAGOS CON AZÚCARES

Para estos ensayos las células (5×10^5 células por pozo), se trataron por 1 h, a 37° C con glucosa (100, 200 y 500 µg), α -metil-manósido en concentraciones variables (1, 10, 100 y 1000 mM), N-acetyl-D-glucosamina (10 y 50 mM), manana (5 y 10 mg), D-galactosa (100 mM), manosa (100 mM) o BSA manosilada (2 mg/ml). Enseguida y sin lavar las células se incubaron por 1 h con los PFC (50 µg) marcados o no con biotina. Después de lavar con PBS, las células, se procesaron para PAGE-SDS y Western blot utilizando estreptavidina marcada con peroxidasa o el AcMn IT-19.

5.10. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN DE GLP-19 A CÉLULAS THP-1 CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Se utilizaron 5×10^5 células por pozo, las que se preincubaron por 30 min con AcMn en contra del RM, CR1, CR3 y CR4. La concentración final de los anticuerpos fue de 10 $\mu\text{g/ml}$. Enseguida, y después de lavar con PBS, las células se incubaron con 50 μg PFC marcado con biotina por 1 h. Después de varios lavados, las células se procesaron para PAGE-SDS y Western blot utilizando estreptavidina marcada con peroxidasa o el AcMn IT-19.

5.11. INHIBICIÓN DE LA FAGOCITOSIS DE MICROESFERAS FLUORESCENTES CON CARBOHIDRATOS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Se hicieron experimentos de inhibición de la fagocitosis de microesferas preincubando las células con α -metil-manósido (1, 10, 100 y 1000 mM). Después de 1 h de incubación se agregaron las microesferas recubiertas en proporción 20:1. En ensayos de inhibición de la fagocitosis de microesferas con la fracción lipoproteica de *M. tuberculosis*, las células se preincubaron con 1, 10 y 100 mM de α -metil-manósido o D-galactosa. En experimentos de inhibición de la fagocitosis de microesferas recubiertas con la fracción lipoproteica de *M. tuberculosis*, las microesferas se preincubaron con el AcMn IT-19 (10 mg/ml), a 4°C, toda la noche y en agitación. Después de lavar por centrifugación a 12,000 rpm por 10 min, las células se incubaron con las microesferas así tratadas. Para bloquear la fagocitosis de las microesferas recubiertas con el AcMn IT-19 vía el receptor para el fragmento Fc, antes de incubar con las microesferas las células se preincubaron por 4 h con IgG1 de especificidad no relacionada, agregada por calor a 65°C, 30 min, en baño María¹¹⁷. Finalmente, las

células se lavaron 3 veces con HBSS, se fijaron con 10% formalina y se observaron en un microscopio de epifluorescencia, contándose las microesferas pegadas a por lo menos 200 células escogidas al azar.

5.12. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE MEMBRANA POR CÉLULAS THP-1 ACTIVADAS CON PMA.

En primer término y con el fin de identificar el o los receptores involucrados en la adhesión de GLP-19 se analizó la expresión de algunos receptores de membrana de las células THP-1. Para esto las células se activaron con PMA (10 ng/ml) por 24, 72 y 168 hs. Después de lavar las células (5×10^5) 3 veces con HBSS se incubaron con AcMn en contra del RM, CR1, CR3 y CR4 (3 mg/ml) por 1 h. Después de lavar con PBS se añadió un AcMn anti-IgG1 de ratón marcado con FITC por 30 minutos. Finalmente, las células se lavaron, se fijaron en 1% paraformaldehído y se analizaron en un Citómetro de Flujo.

5.13. BLOTS DE AFINIDAD

Para identificar el receptor involucrado en la adhesión de GLP-19 a células THP-1, se hicieron blots de afinidad¹¹⁸. Las células THP-1 se lisaron con un amortiguador de lisis (Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8) en un agitador por 15 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron a 3 000 rpm por 5 min. En el pellet se obtuvieron los núcleos celulares; el sobrenadante se centrifugó a 32 000 rpm por 1 h para recuperar las proteínas del citosol en el sobrenadante y en el pellet las membranas celulares. Las proteínas de las membranas se extrajeron con 0.1% Triton X-100 (Sigma) en el amortiguador de lisis. Las fracciones se resolvieron por PAGE-SDS al 7.5% y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Enseguida las membranas de

nitrocelulosa se incubaron con PFC de por 3 h en un amortiguador con Tris/HCl 50 mM, BSA 5%, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8. Después de la incubación las membranas se lavaron extensamente y para investigar la adhesión de GLP-19 y se agregó el AcMn IT-19 seguido de un segundo anticuerpo en contra de IgG de ratón marcado con peroxidasa. En blots paralelos, y con el fin de investigar los receptores macrofágicos a los cuales podría estarse uniendo GLP-19, se hicieron incubaciones con AcMn en contra de CR1, CR3, CR4, CD14 y TLR-2, utilizando segundos anticuerpos marcados con peroxidasa. Así mismo se hicieron incubaciones con un anticuerpo policlonal de cabra anti-RM (Donado por P. Stahl, Washington University) por 3 h, diluido 1:200 y posteriormente con un anticuerpo anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa diluido 1:1000. Las membranas se revelaron con un kit de quimioluminiscencia (Pierce).

5.14. INMUNOPRECIPITACIÓN DEL RECEPTOR DE MANOSA Y GLP-19.

Para investigar si las células THP-1 expresaban el RM y si este interaccionaba con GLP-19 se hicieron ensayos de inmunoprecipitación utilizando membranas totales de células THP-1 y una fracción lipoproteica de *M. tuberculosis* enriquecida en GLP-19. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C, en agitación, con 2 mM de CaCl₂ y 2 mM de MgCl₂. Se hizo “precleanning” por 1 h con microesferas de agarosa que tenían acoplada proteína G. Las microesferas de agarosa se incubaron con 15 µl de suero de cabra anti-RM 1 h. Posteriormente las microesferas de agarosa así tratadas se usaron para inmunoprecipitar el complejo RM/GLP-19 incubando por 3 h, a 4°C, en agitación. Las microesferas se lavaron por centrifugación a 12 000 rpm por 5 min. Se añadió amortiguador de muestra, se hirvieron las microesferas, y se procesaron para Western blot. Para detectar el RM se hicieron geles al 7.5% en condiciones reductoras, evitando

así la sobreposición del RM y el anticuerpo. La membrana fue incubada con el anticuerpo policlonal anti-RM por 3 hs en dilución 1:200 y anti-cabra peroxidasa por 1 h en dilución 1:5000. Para detectar GLP-19, se hicieron geles al 15%, en condiciones no reductoras evitando así que las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas se sobrepusieran con GLP-19. Las membranas se incubaron con el AcMn IT-19 en dilución 1:1000 y con un segundo anticuerpo en contra de IgG murina. Otros geles fueron incubados con el AcMn IT-23, este anticuerpo reconoce a la glicolipoproteína de 38-kDa de *M. tuberculosis*, en dilución 1:500 los blots se revelaron con un kit de quimioluminiscencia (Pierce).

5.15. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN EN LA MEMBRANA DEL RECEPTOR DE MANOSA EN CÉLULAS THP-1 POR EXTRACTOS *M. smegmatis*+19.

DEMOSTRACIÓN POR INMUNOHISTOQUÍMICA Y ELISA CELULAR.

Las células THP-1 fueron cultivadas en cubreobjetos e incubadas con 50 mg de PFC de *M. smegmatis*+19 por 1 h. Enseguida se lavaron los cubreobjetos extensivamente con PBS y se fijaron en 1% de paraformaldehído a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de varios lavados con PBS los cubreobjetos fueron incubado con 3% BSA. Para inhibir la peroxidasa endógena, las células fueron tratadas con 5% metanol y 0.1% H₂O₂ por 30 min. Enseguida se permeabilizaron las células con 0.1% Triton X-100. Los cubreobjetos fueron incubados con un anticuerpo policlonal anti-RM diluido 1:100 en PBS, lavados 3 veces e incubados con un anticuerpo secundario de conejo IgG de cabra (Zymed) marcado con peroxidasa en dilución 1:1000. La peroxidasa fue revelada con 3,3'-diaminobencidina y H₂O₂. Como controles se omitió la incubación con PFC de *M. smegmatis*+19. Así mismo, en cubreobjetos controles se omitió el

anticuerpo anti-MR. Las laminillas se contratiñeron con Hematoxilina-Eosina y se montaron en portaobjetos para su análisis por microscopia de luz.

Para el ELISA celular se incubaron 1×10^5 por pozo con 50 mg de PFC de *M. smegmatis*+19 por 1 h a 37°C en placas de ELISA. Después de lavar 3 veces con PBS con 1% de suero fetal bovino y 0.1% de NaN_3 , las células se incubaron con 10 mg de un AcMn anti-RM (BD Pharmingen) o con un anticuerpo control del isotipo IgG1 (Dako Corporation) diluido en PBS por 1 h. Después de los lavados con PBS, las células fueron incubadas con fosfatasa alcalina y reveladas como se describe en párrafos anteriores.

5.16. INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE GLP-19 A CÉLULAS THP-1 CON EDTA, EGTA Y UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI- RECEPTOR DE MANOSA.

Las células (1×10^5 por pozo) fueron preincubadas con α -metil-manósido (1, 10, 100 y 1000 μM), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA ó 10 μg de AcMn anti-RM y al mismo tiempo se agregaron 20 μg de PFC de *M. smegmatis* nativa o *M. smegmatis*+19 y se incubaron por 1 h a 37°C. Posteriormente, las placas de ELISA se lavaron 3 veces a 1500 pm. 5 min con PBS conteniendo 1% de suero fetal bovino y 0.1% de NaN_3 . Después se incubaron con el AcMn IT-19 diluido 1:100 en PBS conteniendo 3% de BSA por 1 h. Inmediatamente se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina. Las células se lavaron como se describió anteriormente y se incubaron con p-nitrofenil-fosfato (Sigma) por 1 h. Las placas se leyeron a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Bio-Tek Instruments).

5.17. ENSAYOS DE FAGOCITOSIS CON *M. smegmatis*+19 Y CÉLULAS THP-1.

Las células THP-1 fueron cultivadas en cubreobjetos como se ha descrito anteriormente en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino. Antes de incubar las células con bacterias las células THP-1 se lavaron y se les agregó RPMI sin suero fetal bovino. Se descongeló una alícuota de *M. smegmatis*+19 y se lavó 3 veces con PBS. Se obtuvo una suspensión unicelular de bacterias pasando la suspensión bacteriana 10 veces por una jeringa con una aguja calibre 25. Se añadió *M. smegmatis*+19 en una proporción bacteria: célula de 20:1. Después de 1 h de infección, las células se lavaron varias veces con PBS, se fijaron con 1% paraformaldehído y se trataron con metanol y H₂O₂ para eliminar la peroxidasa endógena. Antes de incubar las células con un suero policlonal de conejo anti-*M. tuberculosis* cepa H37Rv (dilución 1:50), las células se permeabilizaron con 0.5% de Triton X-100 y 1% de BSA en PBS. Después de lavar varias veces con PBS, se añadió proteína A marcada con peroxidasa en dilución 1:1000, en PBS; finalmente la peroxidasa se reveló con indica en párrafos anteriores. En experimentos de inhibición de la fagocitosis, las células fueron preincubadas por 1 h con 5 mg de manana, 100 mM α -metil-manósido, 5 mg EDTA, 20 μ g del AcMn anti-RM o con el AcMn IT-19 en dilución 1:100. Como control, las células se incubaron con un AcMn de ratón del isotipo IgG1 por 1 h. Finalmente, las células se analizaron por microscopia de luz.

5.18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Algunos datos fueron analizados utilizando la prueba *t* de Student. Los datos de ELISA celular fueron analizados por ANOVA de dos vías y por el procedimiento de HSD (Tukey); se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. *Mycobacterium tuberculosis* POSEE UNA ADHESINA DE 19-kDa CON AFINIDAD POR MACROFAGOS HUMANOS DERIVADOS DE MONOCITOS CIRCULANTES Y POR CÉLULAS DE LA LINEA MONOCITICA THP-1

En los múltiples ensayos de adhesión con células de la línea monocítica humana THP-1 utilizando PFC de *M. tuberculosis* marcado con biotina resueltos en Western blots revelados con estreptavidina marcada con peroxidasa, mostraron regularmente la adhesión preferencial de una proteína de 19-kDa; la intensidad de la banda fue tiempo-dependiente (Fig. 1). Se observaron algunas bandas débiles de mayor peso molecular. En otros ensayos se variaron las cantidades de PFC en el medio de incubación lo que permitió demostrar que la unión de la proteína de 19-kDa era dosis-dependiente (Fig. 2). No se observaron bandas en los blots de los macrófagos control que no fueron incubados con PFC. En el extracto marcado con biotina usado para la incubación de los macrófagos, a diferencia de otras bandas que eran muy abundantes, la proteína de 19-kDa estaba poco representada.

Para investigar si la proteína de 19-kDa tenía además afinidad por macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM) se hicieron ensayos de adhesión incubando PFC-biotina en concentraciones crecientes con células obtenidas de donadores voluntarios sanos. Los Western blots mostraron que los MDM interaccionan con la proteína de 19-kDa de manera dosis-dependiente (Fig. 3). También se hizo evidente que los macrófagos humanos son más eficientes que las células THP-1 para pegar la proteína de 19-kDa pues se requirieron cantidades mucho menores del PFC en el medio de incubación para detectarla por Western blot.

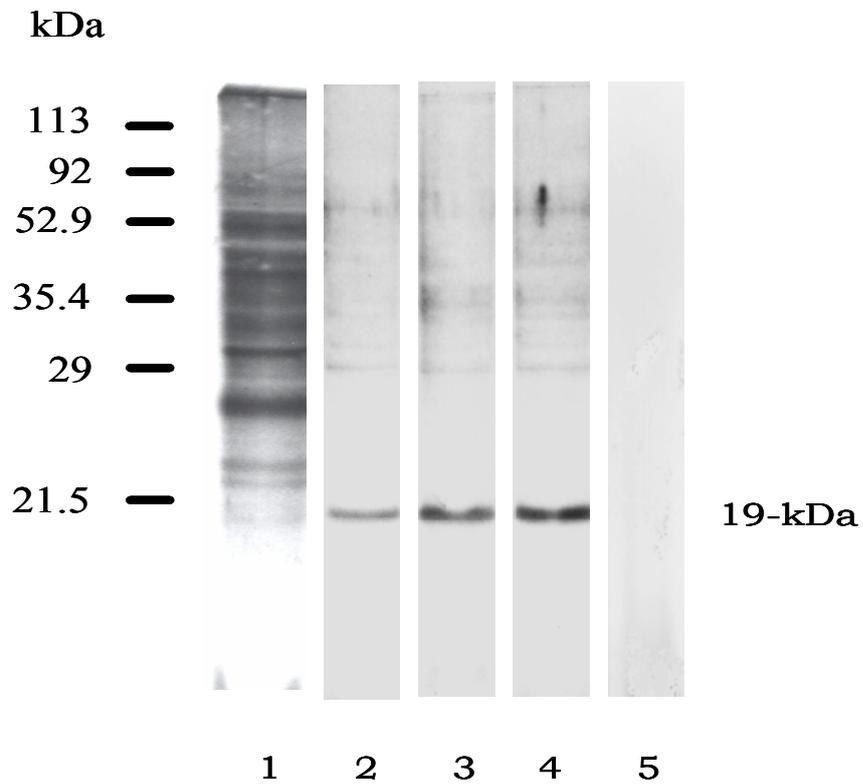


Figura 1. Ensayo de adhesión con células de la línea THP-1 y filtrado del medio de cultivo (PFC) de *M. tuberculosis* marcado con biotina (1). Se utilizaron 5×10^5 células por pozo y la incubación se hizo en presencia de azida de sodio e inhibidores de proteasas. Después de 1 h de incubación se realizó PAGE-SDS y Western blot con estreptavidina-peroxidasa. Las células se incubaron con 25 (2), 50 (3) y 100 µg (4); 5, macrófagos sin PFC.

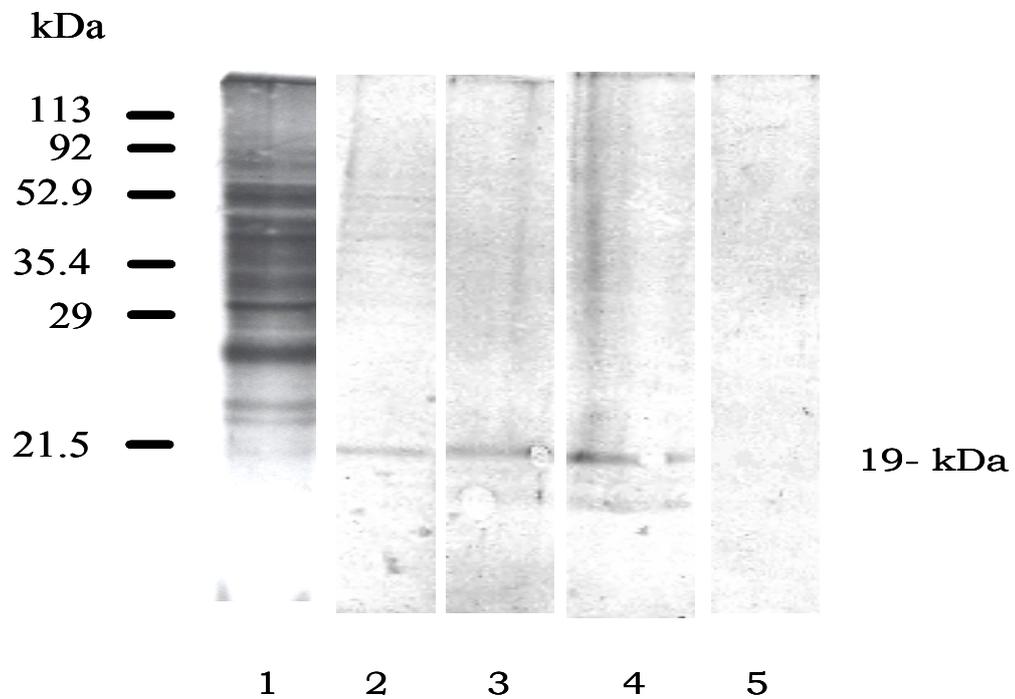


Figura 2. Ensayo de adhesión con células THP-1 activadas con PMA; 1×10^5 células se incubaron con PFC de *M. tuberculosis* marcadas con biotina (1). Después de la incubación las células se procesaron para PAGE-SDS y Western blot con estreptavidina-peroxidasa. Células THP-1 incubadas con $100 \mu\text{g}$ PFC-biotina por 15 (2), 30 (3) y 60 (4) minutos; 6, macrófagos sin PFC.

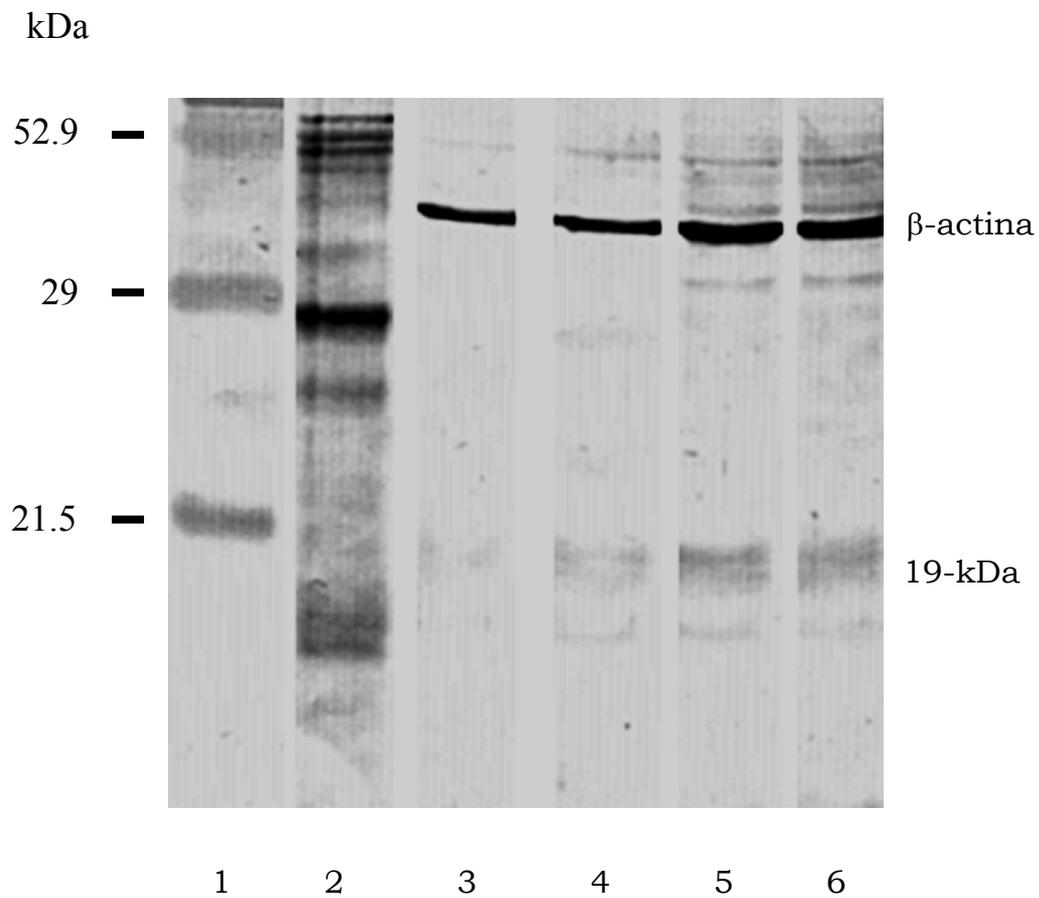


Figura 3. Ensayo de adhesión con macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM); Se incubaron 5×10^5 MDM por pozo con PFC de *M. tuberculosis* marcado con biotina por 1 hr. Carril 1, pesos moleculares; 2, PFC; 3, MDM sin PFC; incubación con 0.5 (4), 1 (5) y 2 μg (6)PFC. El blot se reveló con estreptavidina-peroxidasa.

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LA ADHESINA DE 19-kDa DE *M. tuberculosis*. LOCALIZACIÓN TOPOGRÁFICA E IDENTIFICACIÓN

Se ha reportado que *M. tuberculosis* posee 3 proteínas que migran en los 19-20 kDa: la glicolipoproteína de 19-kDa descrita por Garbe y col¹¹⁹, una proteína de 20-kDa que se expresa en condiciones de estrés calórico¹²⁰ y una proteína integral de membrana de 19-kDa¹²¹. Para caracterizar la adhesina detectada en los ensayos anteriores, se hicieron Western blots con PFC de *M. tuberculosis* H37/Rv que se revelaron con el AcMn IT-19 que reconoce a la glicolipoproteína de 19-kDa. Se observó una banda muy intensa (Fig. 4, carril 2), indicando que la banda de 19-kDa correspondía a la glicolipoproteína de 19-kDa de *M. tuberculosis*¹¹⁹. Esta banda reaccionó con Concanavalina A marcada con peroxidasa indicando la presencia de residuos de manosa (carril 3). Para confirmar lo anterior las PFC se sometieron a digestión con α -D-manosidasa, respectivamente que resultó en disminución del peso molecular de GLP-19 (carriles 4 y 5).

En vista de que las adhesinas son moléculas ubicadas en la superficie de los microorganismos¹²², investigamos si GLP-19 se ubicaba en la pared del bacilo. Para esto se obtuvo por un método de sonicación y centrifugación una fracción de pared de *M. tuberculosis* H37/Rv que se marcó con biotina. Con esta fracción se hicieron ensayos de adhesión con células THP-1, observándose la adhesión de una proteína de 19-kDa la cual estaba débilmente expresada en la fracción de pared (Fig. 5). Para conocer la identidad de esta banda, Western blots paralelos se incubaron con el AcMn IT-19 que reaccionó intensamente con la banda de 19-kDa en la preparación de pared y en células THP-1 que fueron incubadas con la fracción de pared de *M. tuberculosis*. Resultados similares se obtuvieron utilizando MDM (no se muestra). Los resultados anteriores mostraron que de *M. tuberculosis* posee una adhesina dominante de 19 kDa

que corresponde a la glicoliproteína originalmente caracterizada por Garbe y col.¹¹⁹, la que tiene afinidad por macrófagos humanos y que se localiza en la pared bacteriana.

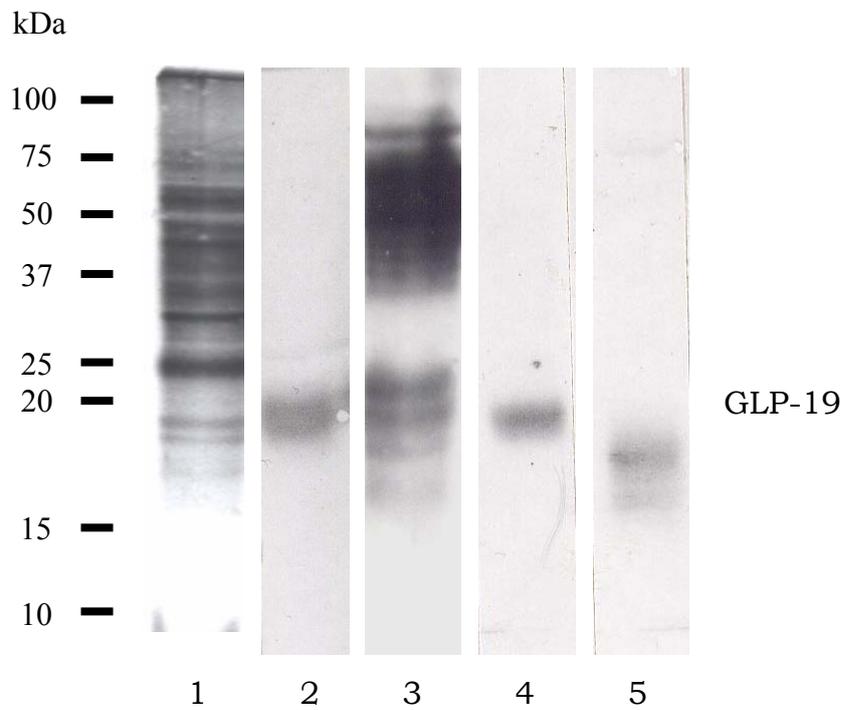


Figura 4. Caracterización de la proteína de 19-kDa de *M. tuberculosis* en el PFC. Carril 1, PFC marcadas con biotina; 2, PFC revelado con el anticuerpo monoclonal IT-19; 3, reactividad con concanavalina A marcada con peroxidasa; 4 y 5 revelados con el anticuerpo monoclonal IT-19, sin y con digestión con α -D-manosidasa, respectivamente.

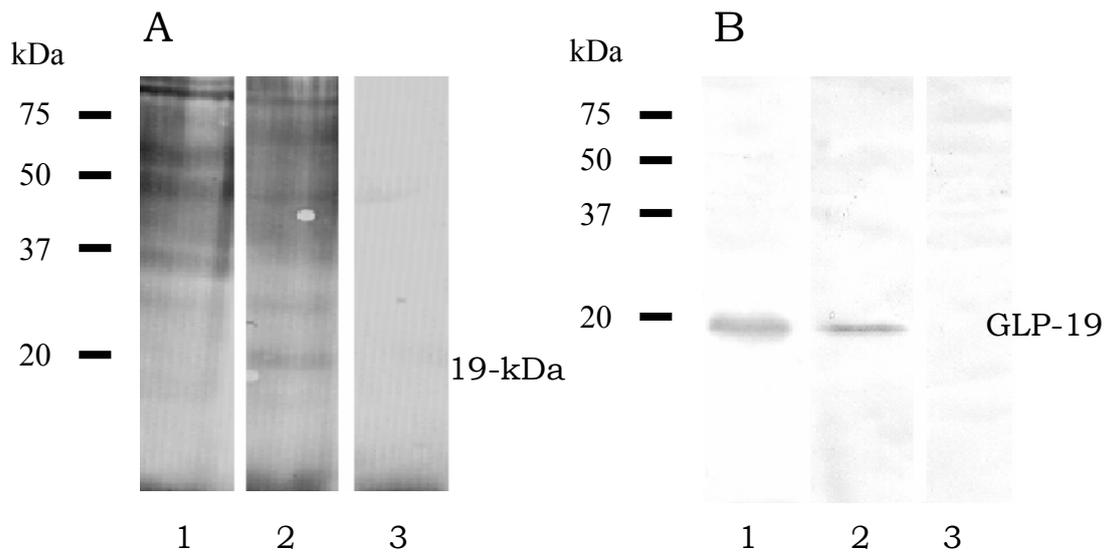


Figura 5. Ensayo de adhesión a MDM con una fracción de pared de *M. tuberculosis* marcada con biotina (A, 1). Las células se incubaron con 100 mg de la fracción de pared por 1 h (A, 2); macrófagos sin incubar (A, 3). Los blots en A se revelaron con estreptavidina-peroxidasa y en B con el anticuerpo monoclonal IT-19 que reconoce la glicolipoproteína de *M. tuberculosis*. B,1, extracto de pared, B2, MDM incubados con la fracción de pared; B,3, MDM sin incubar.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE GLP-19 DE *M. tuberculosis* EXPRESADA EN *M. smegmatis*.

Con la finalidad de refinar nuestras observaciones se obtuvo una cepa de *M. smegmatis* que sobreexpresa GLP-19 de *M. tuberculosis* (*M. smegmatis*+19). Como control se utilizó una cepa de *M. smegmatis* que contiene el plásmido pero no el inserto que codifica GLP-19, a la cual nos referiremos como *M. smegmatis* nativa. Los PFC de estas cepas se marcaron o no con biotina y se analizaron por Western blot. En la Figura 6 se muestran los resultados. En PFC de *M. smegmatis*+19 marcados con biotina se demostró la sobreexpresión de GLP-19 la que no era detectable en PFC de *M. smegmatis* nativa. Para confirmar que se trataba de GLP-19 se hicieron estudios de Western blot con el AcMn IT-19 que reaccionó intensamente con una banda de 19-kDa. Para verificar si GLP-19 tenía residuos de manosa se utilizó Concanavalina A marcada con peroxidasa y digestión enzimática con α -D-manosidasa, observándose que GLP-19 reaccionaba intensamente con Concanavalina A y que la digestión enzimática reducía su peso molecular. En PFC de *M. smegmatis* nativa el anticuerpo monoclonal IT-19 no reconoció banda alguna y la reacción Con A mostró varias bandas y una muy débil en la zona de 19-kDa. Estos resultados demostraron que GLP-19 de *M. tuberculosis* expresada en *M. smegmatis* posee residuos de manosa y mantiene el epítipo que reconoce el AcMn IT-19.

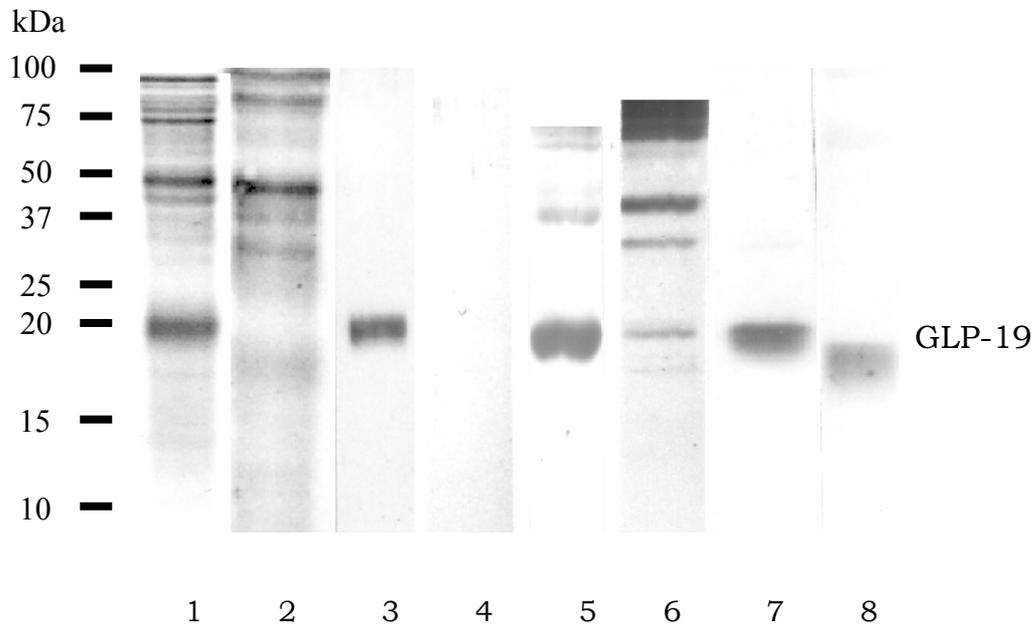


Figura 6. Caracterización de GLP-19 expresada en *M. smegmatis*. Carriles 1, 3, 5, 7 y 8, 10 μ g extracto de *M. smegmatis*+19 y carriles 2, 4 y 6, 10 μ g extracto de *M. smegmatis* nativa. Carriles 1 y 2, PFC-biotina revelados con estreptavidina-peroxidasa; 3 y 4, revelados con el anticuerpo monoclonal IT-19; 5 y 6, reactividad con Concanavalina A marcada con peroxidasa; 7, PFC de *M. smegmatis*+19 sin tratar con α -D-manosidasa y 8, PFC de *M. smegmatis*+19 tratado con α -D-manosidasa. Carriles 7 y 8, revelados con el anticuerpo monoclonal IT-19.

6.4. GLP-19 EXPRESADA EN *M. smegmatis* MANTIENE SU FUNCIÓN DE ADHESINA PARA CÉLULAS THP-1 Y MACROFAGOS HUMANOS DERIVADOS DE MONOCITOS CIRCULANTES. DEMOSTRACIÓN POR WESTERN BLOT Y ELISA CELULAR.

Para investigar si GLP-19 de *M. smegmatis*+19 mantenía su función de adhesina, se hicieron ensayos de adhesión con PFC de esta cepa. Por Western blot, utilizando el AcMn IT-19, se observó unión de GLP-19 a células THP-1 (Fig. 7A) el cual era dosis-dependiente. Los ensayos de adhesión con la línea THP-1 y *M. smegmatis* nativa no revelaron adhesión de GLP-19 (Fig. 7B). Así mismo se hicieron ensayos de adhesión utilizando PFC de *M. smegmatis*+19 y MDM, observándose adhesión de GLP-19 que era también dosis-dependiente y que requería para hacerse evidente cantidades de proteína menores que con células THP-1 (Fig. 8). Además se obtuvieron fracciones de pared de *M. smegmatis*+19 con las que se hicieron ensayos de adhesión utilizando células THP-1, observándose que GLP-19 mantenía su ubicación en la pared bacteriana y que se unía a células THP-1 de una manera dosis-dependiente (Fig. 9). Para confirmar los hallazgos anteriores los ensayos de adhesión se analizaron por ELISA celular que es un método más cuantitativo que detecta moléculas unidas a la superficie de células¹¹⁵. Los resultados del ELISA celular con el anticuerpo IT-19 corroboraron que GLP-19 de *M. tuberculosis* expresada en *M. smegmatis* se pega a la membrana de macrófagos de manera dosis-dependiente (Fig. 10). En experimentos en los que las células se incubaron 50 µg PFC, la diferencia entre las densidades ópticas de células incubadas con PFC de *M. smegmatis*+19 y con PFC

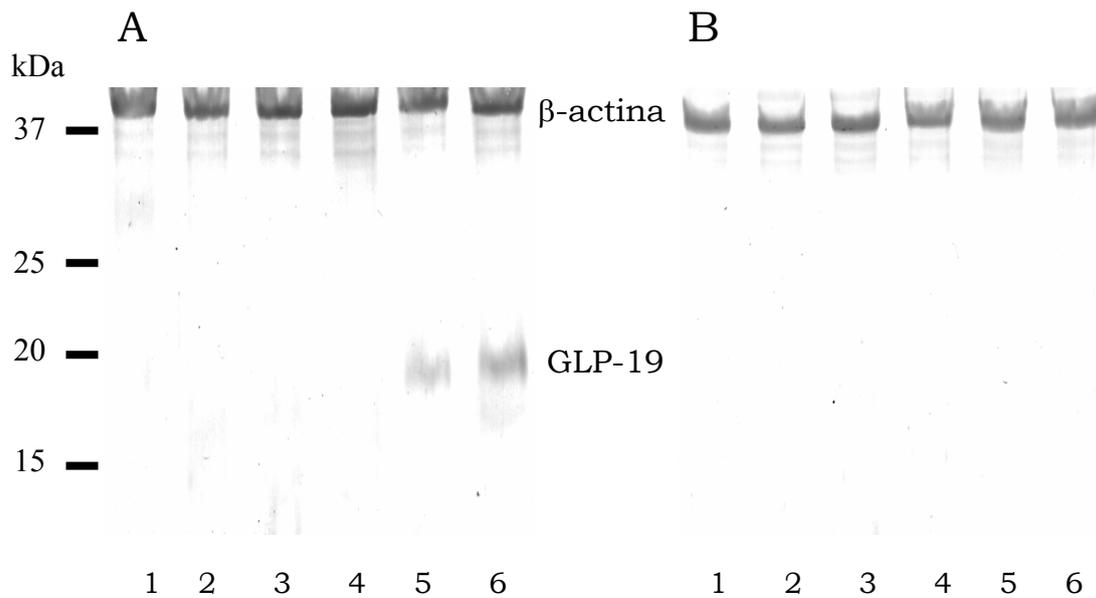


Figura 7. Ensayo de adhesión de GLP-19r a células THP-1. Se utilizaron 5×10^5 células por pozo a las cuales se les agregó azida de sodio e inhibidores de proteasas; posteriormente se agregó PFC de *M. smegmatis*+19 (A) o *M. smegmatis* nativa (B). Los blots fueron revelados con el AcMn IT-19. Carriles 1, macrófagos sin extracto; 2, 1 mg; 3, 2 mg; 4, 5 mg; 5, 10 mg y 6, 50 mg de PFC.

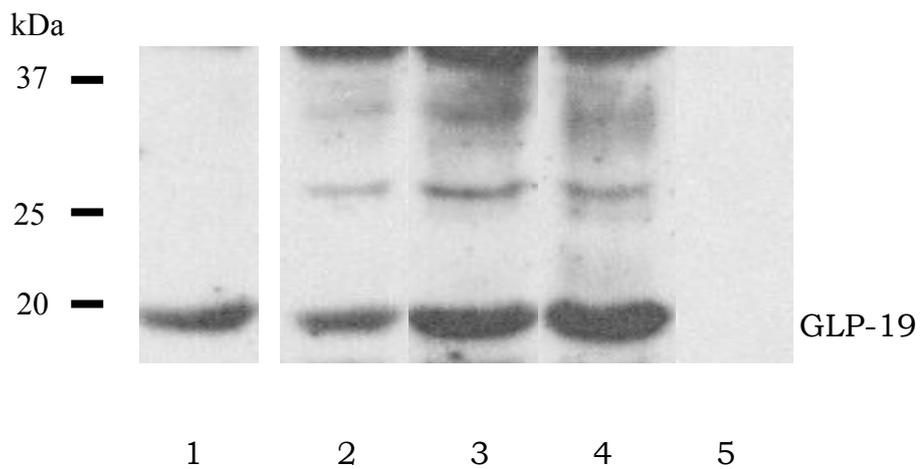


Figura 8. Ensayos de adhesión con PFC de *M. smegmatis*+19 y MDM. Se utilizaron 5×10^5 células por pozo, con azida de sodio e inhibidores de proteasas. Los blots fueron revelados con el AcMn IT-19. Carril 1, PFC de *M. smegmatis*+19 usado en el ensayo; células incubadas con 1 mg (carril 2); 10 mg (carril 3) y 50 mg PFC (carril 4); 5, macrófagos sin PFC.

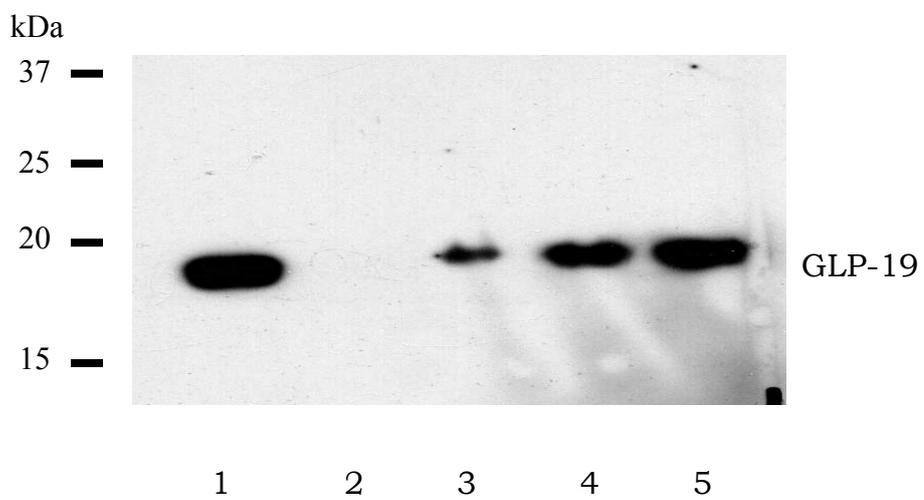


Figura 9. Ensayos de adhesión con THP-1 activadas con PMA (5 nM) incubadas con una fracción de pared de *M. smegmatis*+19 (carril 1); 2, células solas; 3, 50 μ g; 4, 100 μ g y 5, células incubadas con 200 μ g de la fracción de pared. EL blot se reveló con el anticuerpo IT-19.

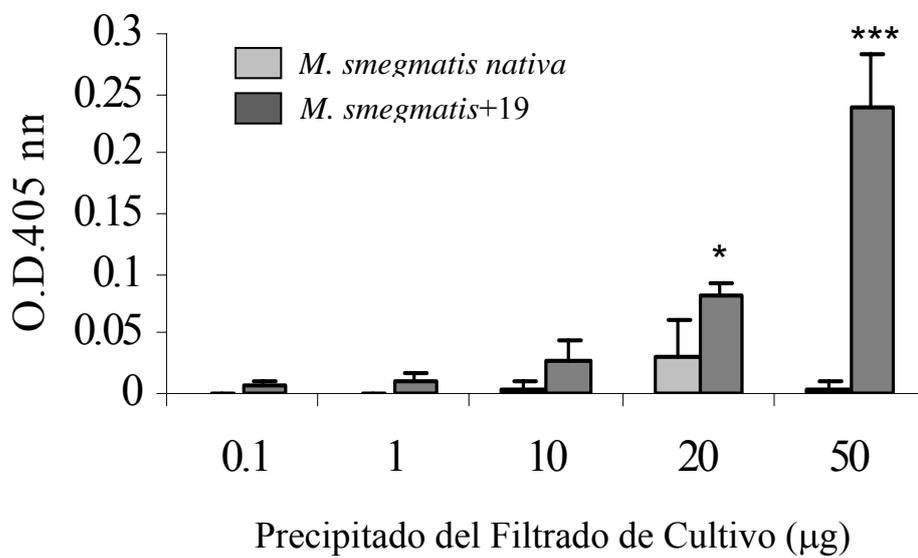


Figura 10. Ensayo de adhesión de GLP-19 a células THP-1 analizado por ELISA celular. Se utilizaron 1×10^5 células por pozo a las que se agregó PFC de *M. smegmatis+19* y *M. smegmatis* nativa. Posteriormente se incubaron con el AcMn IT-19 seguido de un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$.

6.5. INHIBICION DE LA ADHESIÓN DE GLP-19 A MACRÓFAGOS CON AZUCARES COMPETIDORES DEL RECEPTOR DE MANOSA Y CON ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE MANOSA.

Para identificar el receptor macrofagico al cual se unía GLP-19 se llevaron a cabo una serie de experimentos. En primer termino se hicieron ensayos de inhibición de la adhesión de GLP-19 a células THP-1 utilizando carbohidratos que se sabe tienen afinidad por el RM^{63,122}. En ensayos de inhibición con glucosa utilizando células THP-1 y PFC de *M. smegmatis*+19 marcados con biotina y analizados por Western blot se observó inhibición total de la adhesión de GLP-19 (Fig. 11). Igualmente los ensayos de inhibición preincubando las células con α -metil-manósido antes de incubarlas con PFC documentaron la inhibición de la adhesión por Western blot y por ELISA celular utilizando el AcMn IT-19 (Fig. 12). La inhibición fue proporcional a la cantidad de α -metil-manósido utilizada en el ensayo; por Western blot se observó que la inhibición era ya detectable con 1 mM de α -metil-manósido. En otros experimentos las células THP-1 se preincubaron con N-acetilglucosamina (10 y 50 mM) y manana (5 y 10 mg) observándose una disminución en la adhesión de GLP-19 acorde con la dosis usada (Fig. 13). Estos resultados fueron corroborados en ensayos con MDM en los que se observó que manana, α -metil-manósido y N-acetilglucosamina inhibían la unión de GLP-19 a células (Fig. 14).

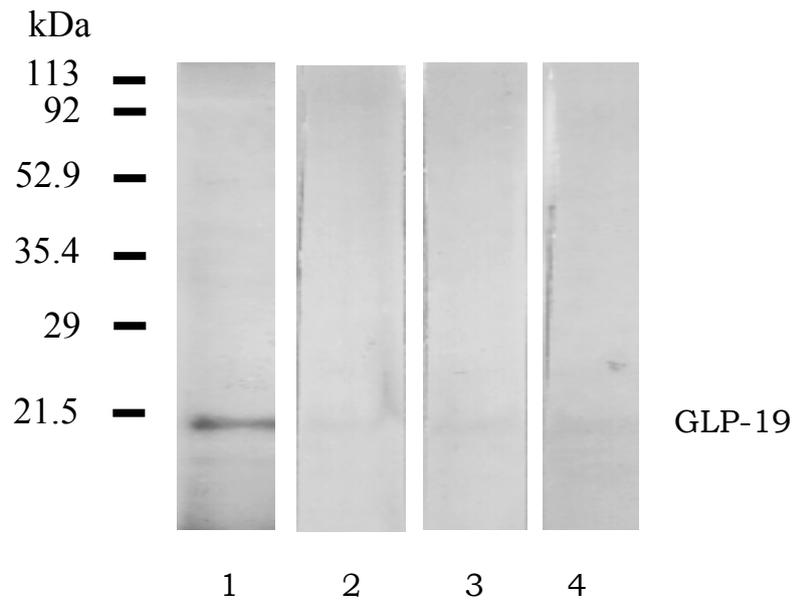


Figura 11. Ensayo de inhibición de la adhesión de GLP-19 a células THP-1 con glucosa. Las células se preincubaron con 100 (2), 300 (3) y 500 (4) mg de glucosa por 1 hr y después con 20 mg de PFC de *M. smegmatis*+19. Los blots se revelaron con el ACMn IT-19. Carril 1, células no tratadas.

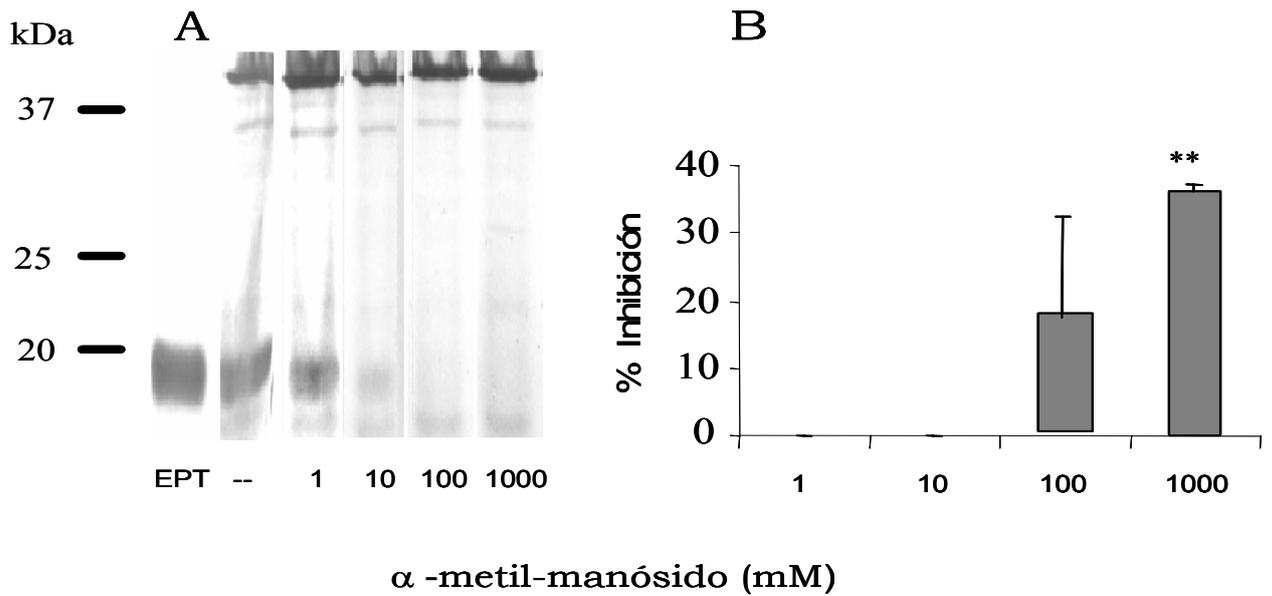


Figura 12. Inhibición de la adhesión de GLP-19 a células THP-1 con α -metil-manósido analizada por Western blot (A) y ELISA celular (B). Las células se preincubaron con diferentes concentraciones de α -metil-manósido por 1 h y después con PFC (50 μ g) de *M. smegmatis*+19. Los blots fueron revelados con el AcMn IT-19. Carril 1, PFC de *M. smegmatis*+19; 2, células sin α -metil-manósido; 3, células con 1 μ M de α -metil-manósido; 4, con 10 μ M; 5, con 100 μ M y 6 con 1000 μ M α -metil-manósido. B) ELISA celular de la inhibición de rGLP-19 con diferentes concentraciones de α -metil-manósido. ** $P \leq 0.01$.

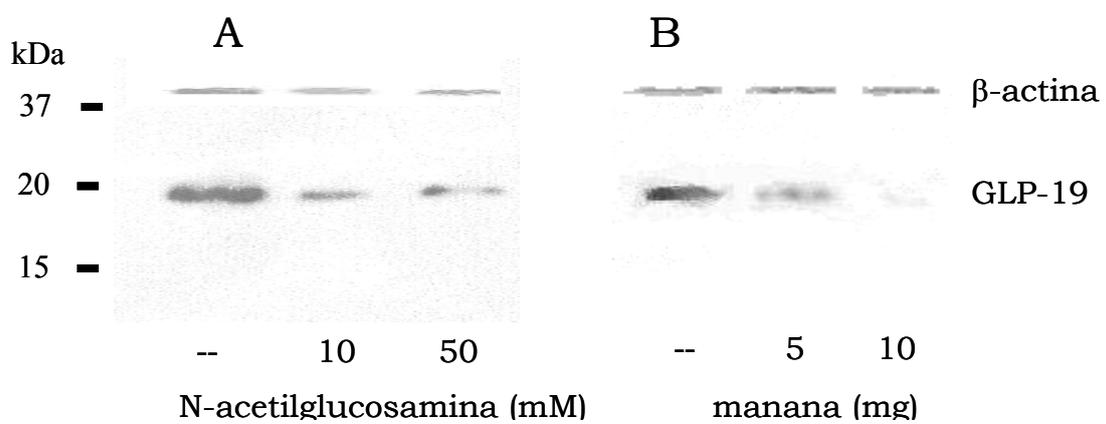


Figura 13. Ensayo de inhibición de la adhesión de GLP-19 a células THP-1 con ligandos del receptor de manosa. Las células se incubaron con los ligandos por 1hr y después con 20 μ g de PFC de *M. smegmatis*+19. Los blots se revelaron con el AcMn IT-19. Células no tratadas (--).

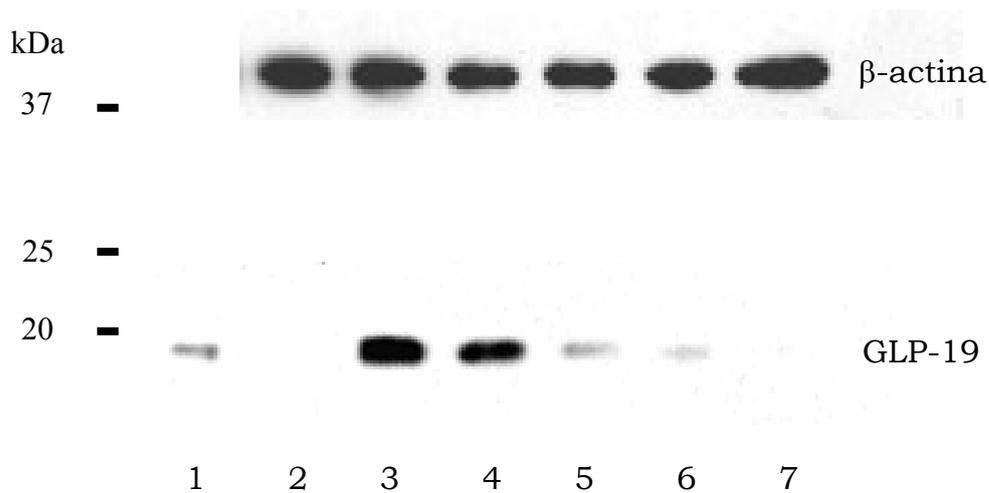


Figura 14. Ensayo de inhibición de la adhesión de GLP-19 a MDM con ligandos del receptor de manosa. Las células (1×10^5) se incubaron con $10 \mu\text{g}$ de PFC de *M. smegmatis*+19. Previamente las células se incubaron por 1 h con manana 1 mg (4), manana 5 mg (5), 10 mM α -metil-manósido (6) y N-acetil-glucosamina 1 mM (7). 1, PFC de *M.smegmatis*+19; 2, MDM sin PFC; 3, MDM con PFC y sin inhibición. Los blots se revelaron con el anticuerpo IT-19.

6.6. QUELANTES DE CALCIO Y ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE MANOSA INHIBEN LA ADHESIÓN DE GLP-19 A CÉLULAS THP-1.

Para confirmar las observaciones por Western blot que sugerían la interacción de GLP-19 con el RM se hicieron diversos ensayos. Inicialmente, las células THP-1 se incubaron con PFC de *M. smegmatis*+19 marcadas con biotina y para investigar el o los receptores involucrados las células se preincubaron con 10 mg de AcMn en contra de CR1, CR3, CR4 y el RM. En dos ensayos diferentes, los Western blots revelados con estreptavidina marcada con peroxidasa revelaron inhibición de la adhesión de GLP-19 con los anticuerpos anti-RM y anti-CR4 (Fig. 15).

Además se realizó un ensayo de inhibición que se analizó por citometría de flujo. Se observó que manana, BSA-manosilada y un anticuerpo policlonal anti-RM inhibían la adhesión de GLP-19 a células THP-1 (Tabla 1). Con el suero policlonal anti-RM obtenido de cabra diluido 1:500 se observó una disminución de la fluorescencia media de 57.39%.

Así mismo se llevaron a cabo ensayos de adhesión con PFC de *M. smegmatis*+19 que se analizaron por ELISA celular. Cuando las células se preincubaron con un AcMn anti-RM la unión de de GLP-19 a células THP-1 disminuyó en un 64±30% (Fig. 16). Finalmente, las células se trataron con quelantes de calcio y magnesio (EDTA y EGTA) ya que el receptor para manosa requiere de Ca⁺⁺ para unir carbohidratos¹²³. En estos experimentos se observó que ambos agentes disminuían la adhesión de GLP-19 a células THP-1 (44±20% y 40±36%, respectivamente; Fig. 16). Estos resultados vinieron confirmar los ensayos anteriores implicando la afinidad de GLP-19 por el RM.

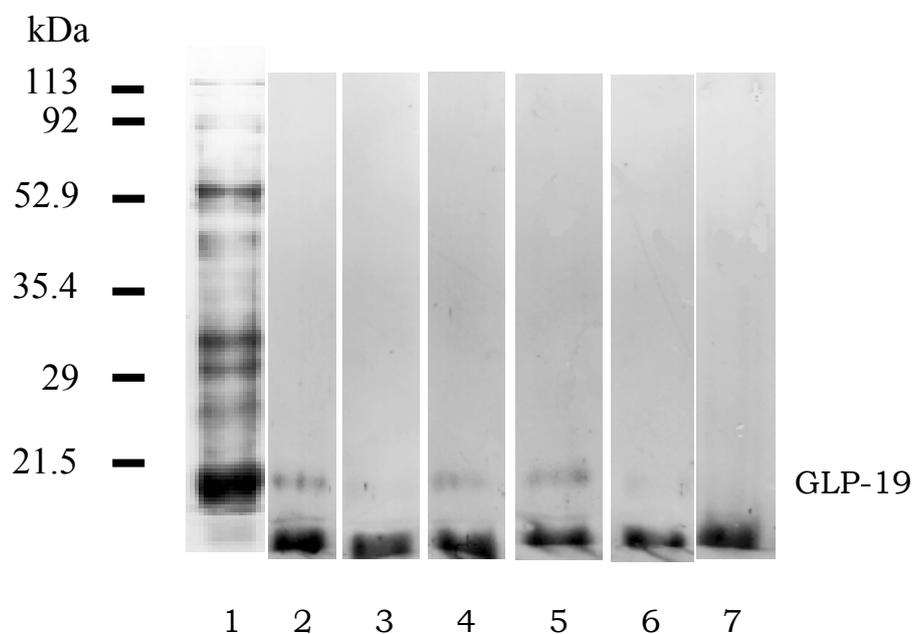


Figura 15. Ensayo de inhibición de la adhesión de GLP-19r a células THP-1 con AcMn para receptores macrofágicos. Las células fueron preincubadas con 3 mg/ml de anticuerpo por 30 minutos y posteriormente con 50 mg PFC de *M. smegmatis*+19 marcado con biotina por 1 H. Carril 1, PFC de *M. smegmatis*+19; 2, células con PFC y sin AcMn; 3, Anti-RM; 4, anti-CR1; 5, anti-CR3; 6, anti-CR4 y 7, macrófagos sin PFC. El blot fue revelado con estreptavidina-peroxidasa.

Tabla 1. Ensayo de inhibición de la adhesión de GLP-19 a células THP-1 analizado por citometría de flujo.

Extracto (10 µg)	Tratamiento	Fluorescencia media	% de Inhibición
√	-----	569.83	-----
√	Manana (2mg/ml)	188.07	66.70
√	BSA-Man (1mg/ml)	147.24	74.16
√	Ac. policlonal anti-RM (1:500)	242.83	57.39

Se realizó un ensayo con 1×10^5 células incubadas por 1 h con 10 µg de PFC de *M. smegmatis*+19. BSA-Man, albúmina bovina sérica unida a manosa; RM, receptor de manosa. Se uso el AcMn IT-19 seguido de un anticuerpo en contra de IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína.

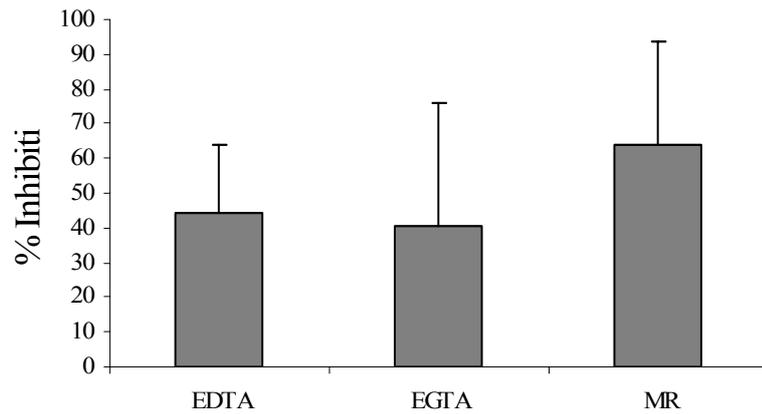


Figura 16. Inhibición de la adhesión de GLP-19 con quelantes de calcio y con un AcMn anti-RM por 1 h. Las células se preincubaron con 2 mM de EDTA, 2 mM de EGTA o con 10 mg de AcMn anti-RM, posteriormente se incubó con 20 mg de PFC de *M. smegmatis*+19 por 1hr y se siguió el procedimiento para el ELISA celular con el AcMn IT-19.

6.7. FAGOCITOSIS DE MICROESFERAS RECUBIERTAS CON EXTRACTOS MICOBACTERIANOS QUE CONTIENEN GLP-19. INHIBICIÓN CON α -METILMANOSIDO Y CON UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-GLP-19.

Para investigar la participación de GLP-19 en la fagocitosis se utilizaron dos estrategias. Se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis con células THP-1 y microesferas fluorescentes recubiertas con PFC de *M. tuberculosis* y con una fracción lipoproteica de *M. tuberculosis* enriquecida en GLP-19; como control se utilizaron microesferas recubiertas con BSA. En la Figura 17 se muestra una micrografía que ejemplifica los resultados obtenidos; se pueden observar macrófagos con microesferas en la superficie celular y aparentemente en posición intracitoplasmica. El análisis cuantitativo de los experimentos anteriores mostró un incremento significativo en la fagocitosis/adhesión de microesferas cuando estas fueron recubiertas con PFC de *M. tuberculosis* o con la fracción lipoproteica de la misma bacteria, siendo el número de microesferas adheridas mayor con esta última (Fig. 18). Además se hicieron en ensayos con microesferas fluorescentes recubiertas con PFC de *M. smegmatis* nativa y *M. smegmatis*+19 (Fig. 18), el número de células con microesferas asociadas fue significativamente mayor cuando se usaron microesferas recubiertas con PFC de *M. smegmatis*+19 que sobreexpresa GLP-19 ($p \leq 0.01$). En un ensayo con los mismos PFC y MDM incubados con microesferas en una proporción 10:1 se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). A fin de determinar si la adhesión/fagocitosis de las microesferas a células se debía los residuos de manosa en GLP-19, se hicieron ensayos de inhibición preincubando las células con α -metil manosido (Fig. 19). Se observó una inhibición de la adhesión/fagocitosis que fue altamente significativa cuando se utilizaron microesferas recubiertas con PFC de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*+19 ($p \leq 0.01$). En contraste con α -metil manosido la preincubación de células con D-

galactosa no fue inhibitoria, de acuerdo con la reportada falta de afinidad de este carbohidrato por el RM¹²⁴. Finalmente, se hicieron experimentos para demostrar la participación de GLP-19 en la adhesión/fagocitosis de las microesferas. En ensayos de fagocitosis en los cuales las microesferas se preincubaron al AcMn anti-GLP-19 se observó una disminución en el número de células con microesferas asociadas. Este efecto inhibitorio fue mayor cuando las células THP-1 se preincubaron con IgG1 agregada por calor, este efecto muy probablemente relacionado con el bloqueo de receptores Fc (Fig. 20).

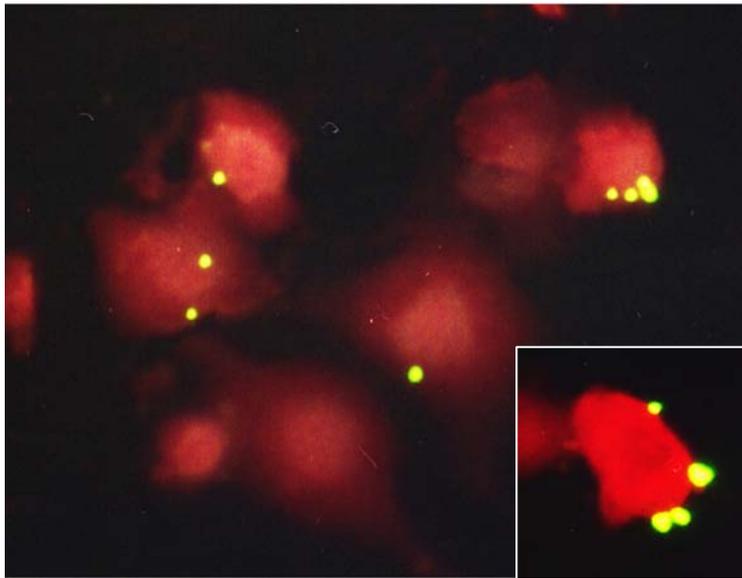


Figura 17. Ensayo de fagocitosis de microesferas fluorescentes recubiertas con PFC de *M. smegmatis*+19 y células THP-1. Las células se tiñeron con azul de Evans (en rojo). En el inserto se aprecia una célula con microesferas fluorescentes asociadas a la membrana.

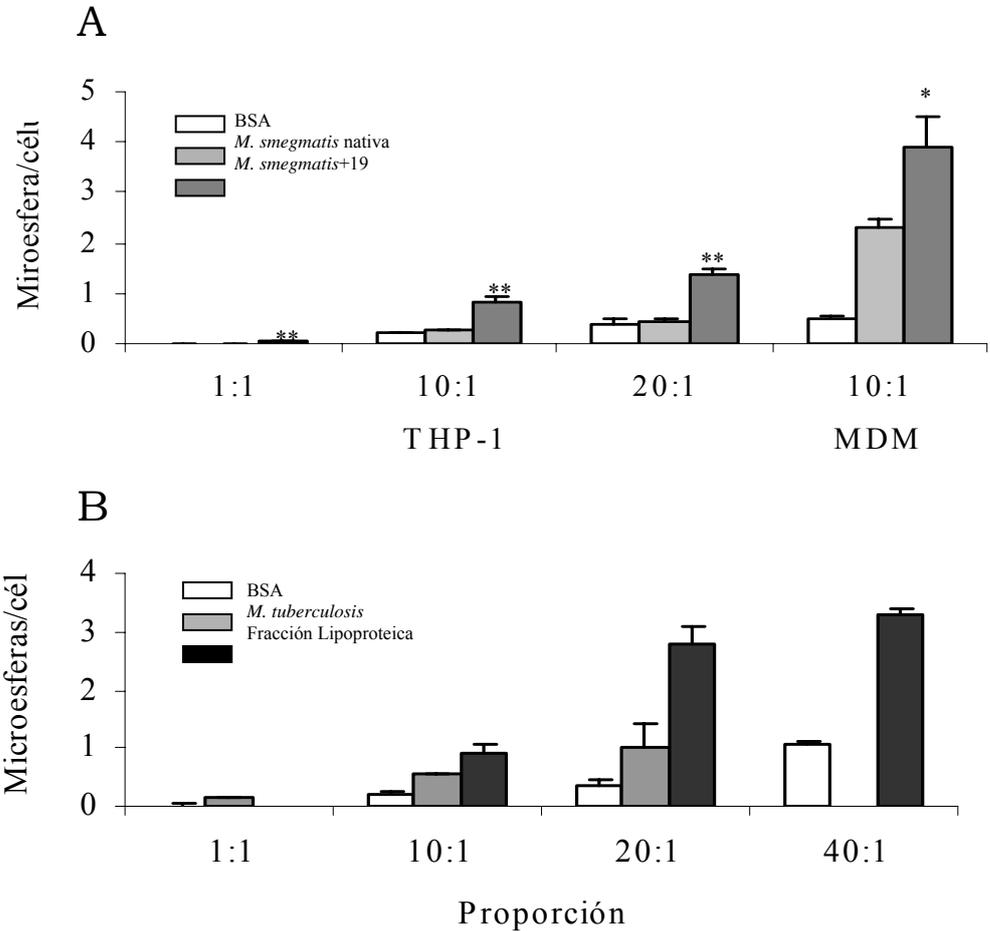


Figura 18. Ensayo de fagocitosis de microesferas fluorescentes recubiertas con PFCs micobacterianos. A. Células THP-1 fueron incubadas con diferentes proporciones microesfera:célula y los MDM humanos con una proporción de 10:1 por 1 h. B. Células THP-1 fueron incubadas con diferentes proporciones microesfera:célula por 1 h. Después de la incubación las células se fijaron con formalina al 10% y se contaron 200 células al azar en un microscopio de epifluorescencia. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

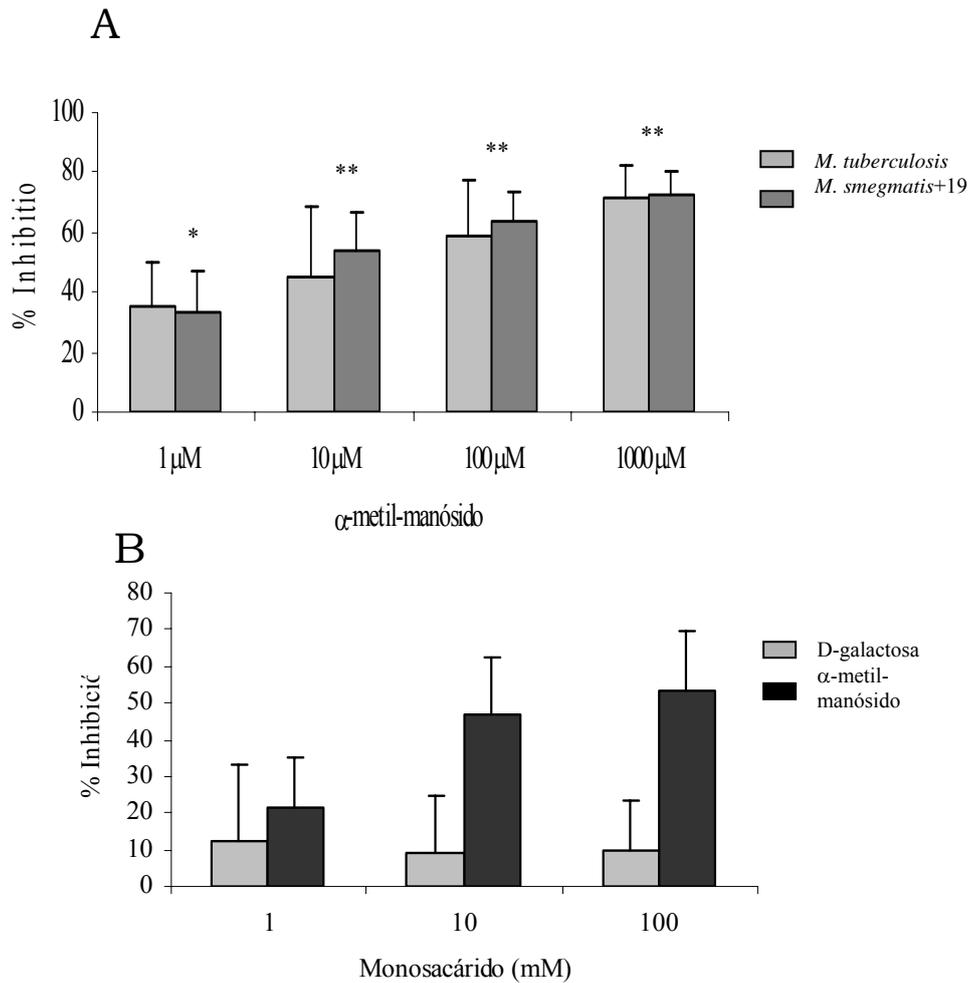


Figura 19. Inhibición de la fagocitosis de microesferas recubiertas con extracto micobacteriano. A. Las células THP-1 se preincubaron con α -metil-manósido en diferentes concentraciones por 1 h y posteriormente con microesferas a una proporción de 20:1. B. Las células THP-1 se incubaron con diferentes concentraciones de α -metil-manósido y D-galactosa por 1 h; posteriormente se incubaron con microesferas (20:1). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

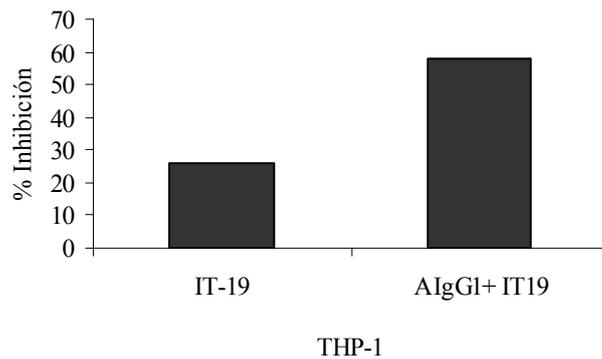


Figura 20. Inhibición de la fagocitosis de microesferas fluorescentes recubiertas con la fracción lipoproteica enriquecida en GLP-19. Para evaluar el papel de GLP-19 en la adhesión/fagocitosis de microesferas, estas se preincubaron con el anticuerpo IT-19 que reconoce GLP-19. Para prevenir la fagocitosis de las microesferas vía el receptor Fc de del AcMn IT-19, las células se preincubaron con IgG agregada por calor (AlIgG1) del mismo isotipo del AcMn IT-19 (IgG1). Las células se incubaron con las microesferas en proporción 20:1.

6.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE MEMBRANA DE LAS CÉLULAS THP-1. SU INDUCCIÓN POR FILTRADOS MICOBACTERIANOS.

En vista de los hallazgos anteriores que muestran que GLP-19 se une al RM y a que se ha cuestionado la expresión de dicho receptor por monocitos¹²⁵, llevamos a cabo un estudio para analizar la expresión de RM y de los receptores CR1, CR3 y CR4 en células THP-1 por citometría de flujo. Las células se estimularon por tiempos variables con PMA. Se observó que las células monocíticas de la línea THP-1 prácticamente no expresan RM en la superficie aún después de 7 días de estimulación con 20 ng/ml (Tabla 2). En cambio se observó una expresión importante de CR3 (36.45%) a los tres días de activación y de CR4 a las 24 h (45.91%).

Tabla 2. Expresión de receptores de membrana en células THP-1 estimuladas con PMA. Citometría de flujo.

Receptor	Días de activación		
	1 % células +	3 % células +	7 % células +
CR1	13.17	5.18	1.82
CR3	9.03	36.45	18.47
CR4	45.91	28.36	22.46
RM	1.62	0.4	0.12

Análisis de la expresión de los receptores de membrana de las células THP-1, las cuales fueron activadas con 20 ng de PMA por 1, 3 y 7 días. Posteriormente, las células se fijaron y se incubaron con 1 μ g de AcMns anti-CR1, CR3, CR4 y RM por 1 h y con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con Isotiocianato de fluoresceína.

6.9. GLP-19 INTERACCIONA CON EL RECEPTOR DE MANOSA. DEMOSTRACIÓN EN BLOTS DE AFINIDAD.

Para conocer el repertorio de receptores macrofágicos con afinidad por GLP-19 y para determinar su expresión en células THP-1, llevamos a cabo blots de afinidad con fracciones de células THP-1 no activadas (membrana plasmática, citosol y núcleos). Las fracciones se transfirieron a papel de nitrocelulosa los que se incubaron con una fracción lipoproteica de *M. tuberculosis*, la cual esta enriquecida en GLP-19 (ver Fig. 22). Los blots revelados con el anticuerpo IT-19 mostraron que GLP-19 interacciona intensamente con una banda de 60-kDa presente en la fracción de membrana plasmática y en el citosol, con una de bajo peso molecular de la fracción nuclear y con varias bandas de la fracción citosólica, una de ellas de 180-kDa (Fig. 21). Con el fin identificar las proteínas macrofagicas a las cuales se estaba uniendo GLP-19, se hicieron incubaciones con AcMn en contra de CR1, CR3, CR4, RM, TLR2 y CD14. Con el anticuerpo anti-RM se detectó una banda de 180-kDa en la fracción citosólica indicando que la GLP-19 se unía a depósitos intracitoplasmicos de RM. Además se observó una banda muy débil del mismo peso en la fracción de membrana plasmática, indicando que el RM se expresa en la en la superficie celular aun cuando en menor grado que en el citosol. Estos experimentos sugieren que GLP-19 es capaz de interaccionar con varios receptores macrofágicos y que se une al RM.

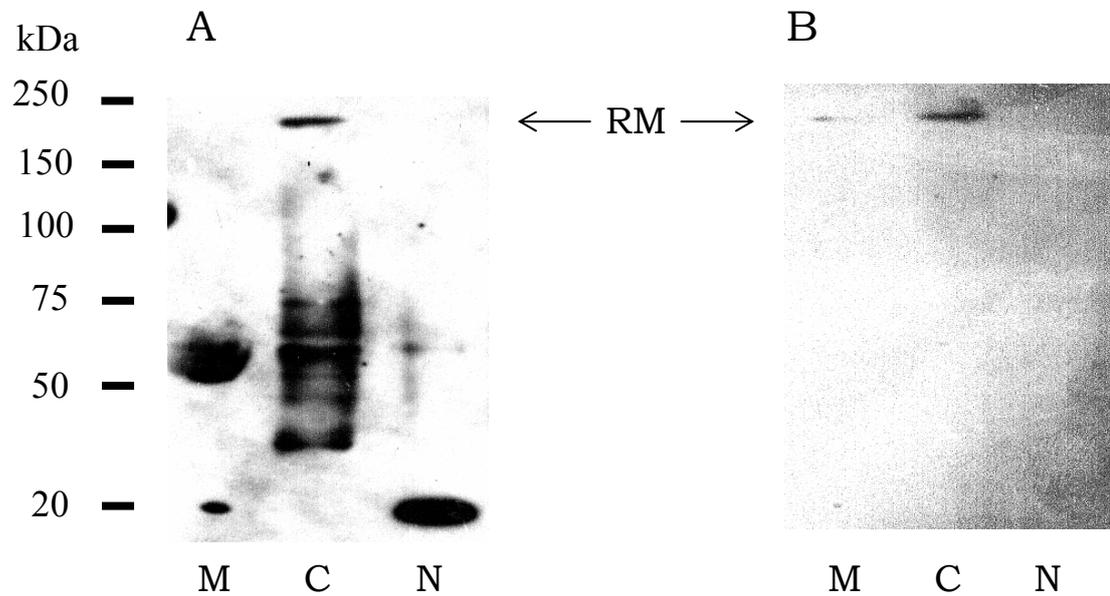


Figura 21. Blot de afinidad para identificar receptores para GLP-19 en células THP1. Las fracciones celulares; membrana plasmática (M), citosol (C) y fracción nuclear (N) se procesaron para PAGE-SDS y se transfirieron membranas de nitrocelulosa para incubarse con una fracción lipoproteica de *M. tuberculosis* y posteriormente con el AcMn IT-19 (A). En blots paralelos (B) las membranas se incubaron con AcMn para los receptores macrofágicos CR1, CR3, CR4, CD14, TLR-2, TLR-4 y para el RM. Enseguida los blots fueron revelados con anticuerpos en contra de IgG de ratón de la subclase correspondiente marcados con peroxidasa que se reveló por quimioluminiscencia.

6.10. INMUNOPRECIPITACIÓN DEL RECEPTOR DE MANOSA Y GLP-19.

Para confirmar la afinidad de GLP-19 por el RM y la expresión del RM por las THP-1 se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal anti-RM e incubando membranas totales de células THP-1 con una fracción lipoproteica de *M. tuberculosis* enriquecida en GLP-19. El análisis por Western blot del inmunoprecipitado reveló una banda de 180-kDa que fue reconocida por el anticuerpo policlonal anti-RM (Fig. 22). Así mismo, se observó una banda de 19-kDa que fue reconocida por el anticuerpo monoclonal IT-19, además de una banda reactiva con el anticuerpo monoclonal IT-23 que reconoce la glicolipoproteína de 38-kDa de *M. tuberculosis*.

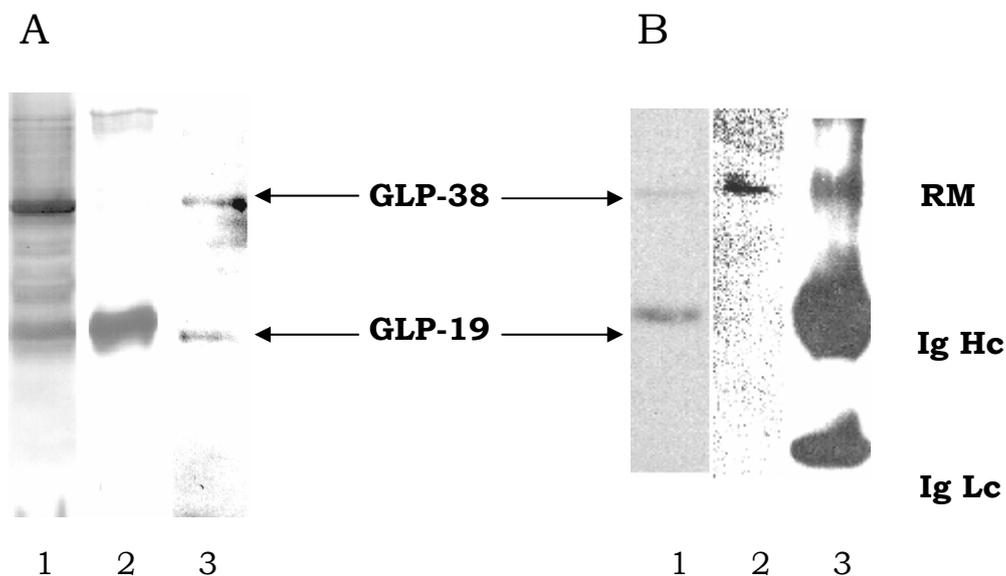


Figura 22. Inmunoprecipitación del RM y GLP-19 de *M. tuberculosis*. Se obtuvieron membranas totales de las células THP-1 que se incubaron con la fracción lipoproteica de *M. tuberculosis*. El complejo formado se inmunoprecipitó con un anticuerpo policlonal anti-RM y con Proteína G unida a agarosa. A. Fracción lipoproteica revelada con un suero hiperinmune de conejo anti-*M. tuberculosis* (1), con Concanavalina A-peroxidasa (2) con el anticuerpo monoclonal IT-19 que reconoce GLP-19 y con un anticuerpo en contra de la glicolipoproteína de 38-kDa (GLP-38) (3). B. En el inmunoprecipitado se identificaron con los anticuerpos correspondientes a GLP-19 y GLP-38 (1) y el RM (3). B, 2, membranas de las células THP-1 usadas en el ensayo reveladas con el anticuerpo policlonal anti-RM.

6.11. DEMOSTRACIÓN DEL RECEPTOR DE MANOSA EN CÉLULAS THP-1 Y EN MACROFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS CIRCULANTES POR INMUNOHISTOQUÍMICA Y ELISA CELULAR.

Para documentar la expresión del receptor para manosa en las células THP-1, se hicieron inmunotinciones con un anticuerpo policlonal anti-RM obtenido de cabras y un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa. En células permeabilizadas, que no se incubaron con PFC, se observó un marcaje muy débil en la membrana de algunas células y en el citoplasma se observaron abundante gránulos inmunomarcados, principalmente en la región paranuclear (Fig. 23). En contraste, en células preincubadas con 50 μ g PFC de *M. smegmatis*+19 por 1 h, se observó un marcaje intenso en la superficie celular mientras que RM intracelular era escaso. EN MDM la expresión del RM fue abundante aun sin estimulación con el PFC. En laminillas en las que se omitió el anticuerpo anti-RM no se observó marca alguna. Para confirmar los datos anteriores y obtener resultados cuantitativos, se hicieron ensayos semejantes que se analizaron por ELISA celular. Para esto se incubaron las células THP-1 con 50 μ g de PFC de *M. smegmatis*+19 y después de 1 h se procesaron para ELISA celular con el AcMn anti-RM. En la Fig. 24 se observa que la incubación con PFC aumenta la expresión del RM en la superficie de las células de manera significativa ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la estimulación de células THP-1 con PFC de *M. smegmatis*+19 induce la movilización del RM de depósitos intracitoplasmicos a la superficie celular.

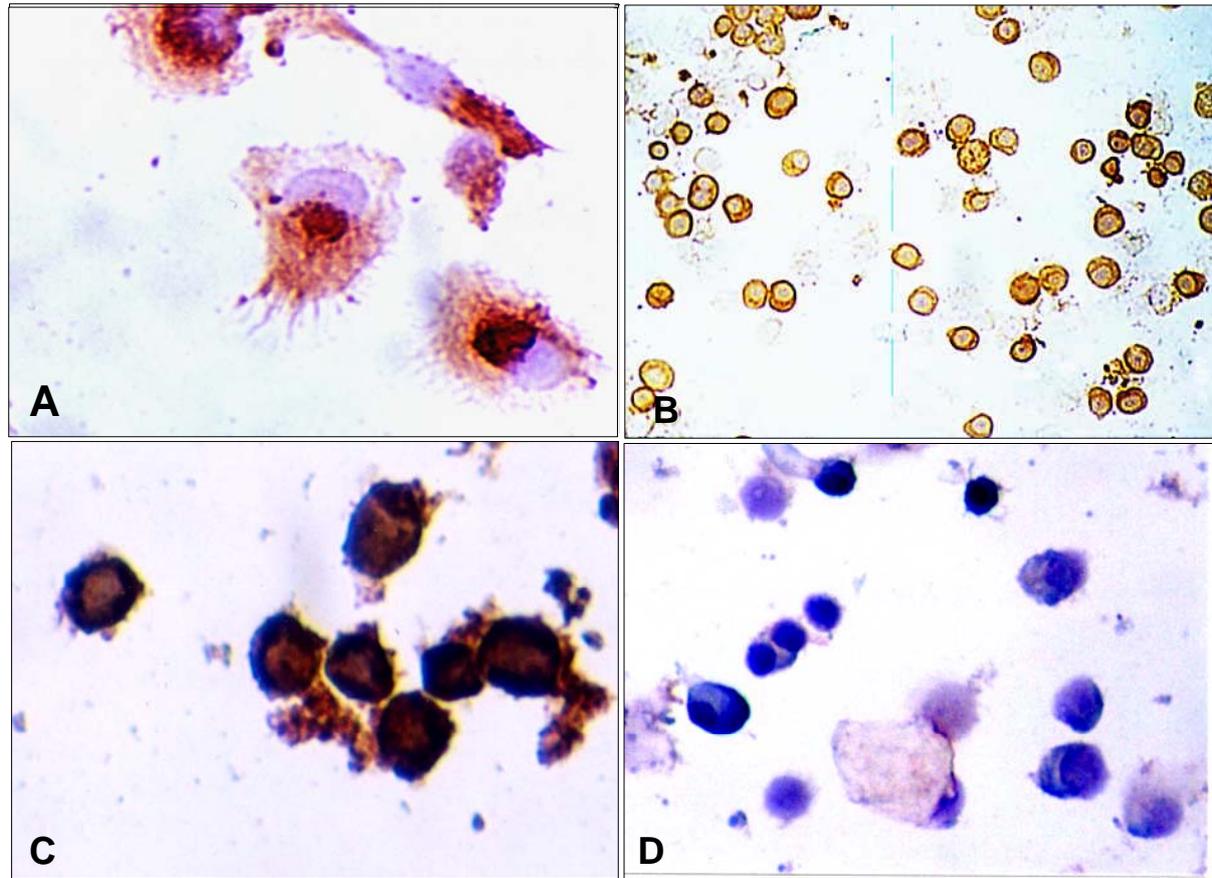
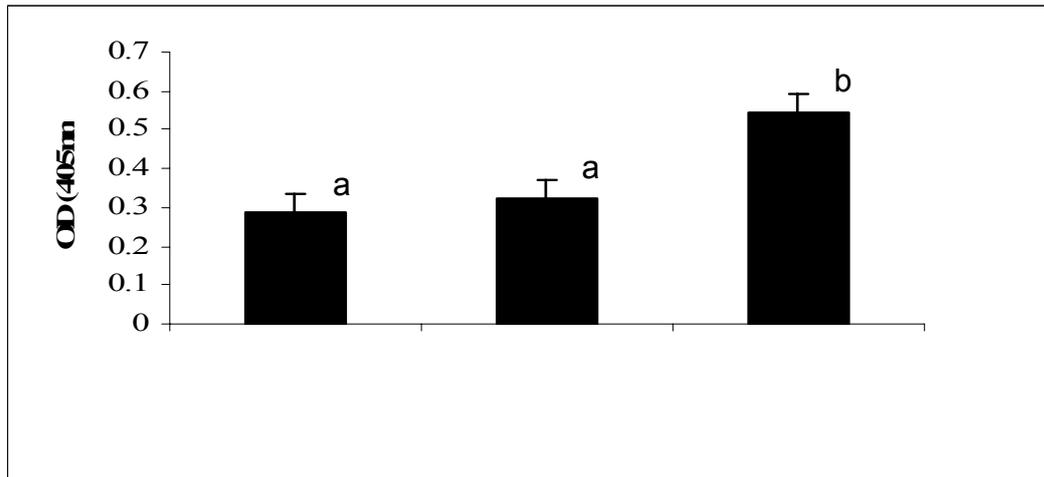


Figura 23. Inmunohistoquímica para demostrar la expresión de RM en células THP-1 (A, B). Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-RM obtenido en cabra y un anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa. Es evidente el patrón citoplásmico de expresión del RM en células sin incubar y después de una hora de incubación con el PFC de *M. smegmatis*+19. En C se pueden observar MDM con abundante RM que impide definir su localización. Los MDM no fueron incubados con PFC. D, laminilla control con omisión del anticuerpo anti-RM.



PFC	+	-	+
Isotipo	+	-	-
α-RM	-	+	+

Figura 24. ELISA celular para detectar la inducción de la expresión del receptor para manosa por células THP-1 (1×10^5) estimuladas con PFC de *M. smegmatis*+19 por 1 hr. Enseguida se llevo a cabo el ELISA celular utilizando un AcMn en contra del RM. Las barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$) usando la prueba de Anova seguida de la prueba de Tukey-HSD. Los datos presentados derivan de 3 experimentos independientes.

6.12. LAS CÉLULAS THP-1 FAGOCITAN *M. smegmatis*+19 A TRAVÉS DEL RECEPTOR PARA MANOSA Y DE GLP-19

Finalmente, para investigar si la interacción RM/GLP-19 inducía fagocitosis de micobacterias se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis con células THP-1 y *M. smegmatis*+19, incubando por 1 h en una proporción bacteria:célula de 20:1. El análisis por microscopía de luz mostró que la gran mayoría de las células estaban asociadas con uno o más bacilos. En muchas células los bacilos estaban adheridos a la superficie externa y en otros parecían localizarse al interior de las células (Fig. 25). Los controles en los que se omitió el suero de conejo anti-*M. tuberculosis* fueron totalmente negativos. En cuanto a la magnitud de la fagocitosis, se observó que $74.84 \pm 10.46\%$ de las células estaban asociadas con una o más bacterias (Tabla 3). Para investigar el papel del RM y de GLP-19 se hicieron ensayos de inhibición con ligandos para el RM, con EDTA y con AcMn anti-RM y anti-GLP-19. Cuando las células se preincubaron con α -alfa-metil-manósido y manana, la fagocitosis se inhibió de manera considerable (50.76% y 79.30%, respectivamente). Con EDTA y los AcMn en contra de GLP-19 y el RM la inhibición fue aun mayor ($P \leq 0.001$). Cuando se preincubaron las células con un anticuerpo control del isotipo IgG1 no se observó efecto alguno. Los resultados anteriores indican que la fagocitosis de las micobacterias es a través de la interacción del RM y de GLP-19 vía sus residuos de manosa.

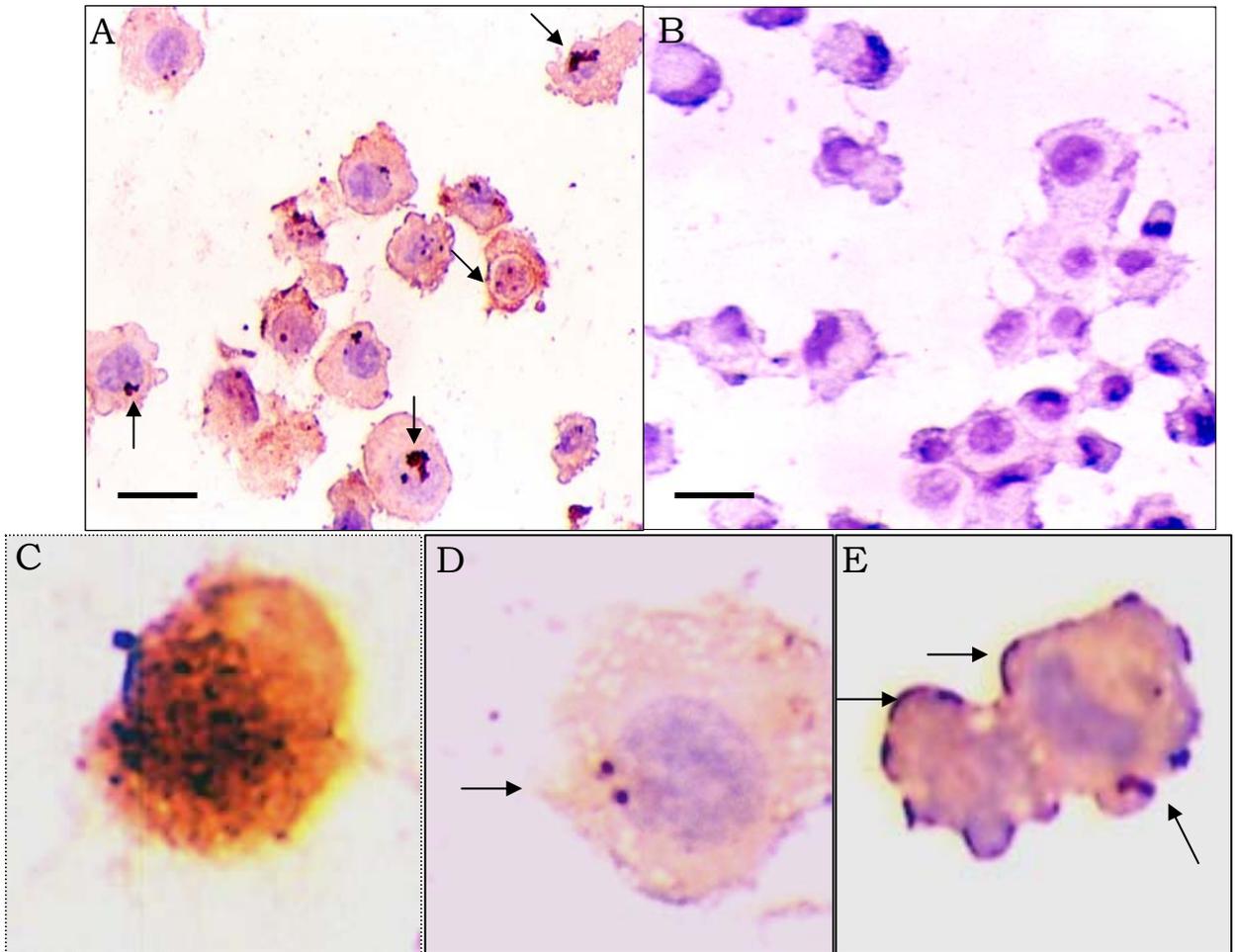


Figura 25. Fagocitosis de *M. smegmatis*+19 por células THP-1 (A-E). Las células fueron incubadas con bacterias en una proporción bacteria:célula 10:1 por 1 hr. Posteriormente se lavaron, se fijaron con 1% de paraformaldehído y se trataron con metanol y H₂O₂ para eliminar la peroxidasa endógena. Finalmente se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-*M. tuberculosis*, seguido de proteína A-peroxidasa. Se analizaron 200 células al azar en un microscopio de luz. Se observan bacterias marcadas tanto en la membrana como en el citoplasma (A, C-E). B. Laminilla control con omisión del anticuerpo anti-*M. tuberculosis*. Las laminillas se contratiñeron con Hematoxilina-Eosina. Las flechas muestran bacterias. Las barras representan 50 μ M.

Tabla 3. Fagocitosis de *M. smegmatis*+19 por células THP-1. Inhibición de la fagocitosis con azúcares competidores y anticuerpos monoclonales.

Tratamiento	Fagocitosis %	Inhibición (%)
Ninguno	74.84 ±10.46	---
α-MM	36.85 ±13.24*	50.76 ±17.70
Manana	15.49 ±3.99**	79.30 ± 5.33
EDTA	12.98 ±10.14**	82.66 ±13.55
AcMn-GLP-19	13.36 ±7.02**	82.15 ± 9.33
AcMn-RM	10.05 ± 6.15**	86.57 ± 9.33
Control de isotipo	82.97 ± 5.30	---

Ensayo de fagocitosis y de inhibición de la fagocitosis de *M. smegmatis*+19 por células THP-1. La células se preincubaron azúcares competidores para el receptor de manosa y con AcMn anti-GLP-19 y anti-RM. Los datos presentados representan la media ± SD de tres experimentos independientes. αMM, α-metil-manósido. AcMn-GLP-19, anticuerpo monoclonal anti-GLP-19. AcMn-RM, anticuerpo monoclonal anti-RM. * $P \leq 0.5$ ** $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$

7. DISCUSIÓN

La invasión de células del hospedero por bacterias es un fenómeno crucial en las infecciones bacterianas intracelulares como es la TB. Estos eventos, en los que participan adhesinas microbianas y receptores de superficie de la célula hospedera, permiten que el microbio escape de acciones potencialmente nocivas por parte del hospedero, como son las respuestas de inmunidad innata y adquirida. Al interior de las células nicho las bacterias se multiplican lo que permite el establecimiento de la infección. *Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa que infecta principalmente a los macrófagos. Un conocimiento profundo de cómo se da este proceso podría ayudar a desarrollar estrategias racionales para el control de esta infección, que hoy en día representa un problema de salud de gran relevancia, sobretodo en países pobres².

Son varios los receptores macrofágicos involucrados en la fagocitosis de *M. tuberculosis* por el macrófago, siendo los mejor caracterizados los receptores para fracciones del complemento y el RM^{80,89,107,126}. En contraste, poco se sabe acerca de ligandos o adhesinas micobacterianas; que participan en el proceso de fagocitosis. La adhesina mejor caracterizada es la LAM, un lipoglicano muy abundante presente en la pared del bacilo; en ensayos *in vitro* se ha demostrado LAM se une al RM presente en la membrana del macrófago lo que resulta en la fagocitosis de la micobacteria^{90,91,107,127}. Recientemente se ha reportado que los fosfatidilinositol-manósidos de la pared micobacteriana funcionan como adhesinas⁹².

Hasta ahora no se ha caracterizado plenamente una adhesina de *M. tuberculosis* de naturaleza proteica que al interactuar con un receptor macrofágico promueva la

fagocitosis del bacilo de la TB; sin embargo algunas observaciones sugieren su existencia. Recientemente en nuestro laboratorio se demostró que la proteína de choque térmico de 71-kDa tiene afinidad por macrófagos alveolares que condicionaba la fagocitosis de bacilos través de un receptor no conocido¹⁰⁰. En este sentido son de interés observaciones recientes que muestran que dicha proteína tiene afinidad por CD40¹²⁸. La escasa información acerca de las adhesinas micobacterinas y su importancia potencial motivaron el desarrollo de la presente Tesis. Las observaciones hechas muestran que *M. tuberculosis* posee una adhesina dominante de naturaleza proteica que migra en los 19-kDa. Los estudios que permitieron llegar a esta conclusión se dieron de la siguiente manera. Inicialmente se incubaron macrófagos de origen diverso con extractos proteicos de *M. tuberculosis* y para identificar posibles adhesinas se hicieron Western blots de los macrófagos utilizando un suero hiperinmune anti-*M. tuberculosis*; este método no fue exitoso, muy probablemente por su baja sensibilidad. En vista de lo anterior se hicieron ensayos de adhesión con extractos micobacterianos marcados con biotina y revelando los blots con estreptavidina marcada con peroxidasa. Este método resultó ser de mayor sensibilidad y permitió demostrar la adhesión casi exclusiva de la proteína de 19-kDa. Utilizando un AcMn específico se logró demostrar que dicha adhesina correspondía a la glicoliproteína de 19-kDa de *M. tuberculosis* (GLP-19) descrita originalmente por Garbe y col.¹¹⁹. El marcaje con biotina es un método alternativo al marcaje radioactivo que ha sido de mucha utilidad para ubicar proteínas en células o tejidos tomando ventaja de su gran afinidad por avidina o estreptavidina¹²⁹. Además se trata de un método muy conveniente por su bajo costo, fácil manejo y alta sensibilidad y por no entrañar riesgos como ocurre con los métodos de marcaje con material radioactivo. La biotina se une de manera covalente con residuos de lisina lo que no afecta la actividad biológica de las proteínas, ya que rara

vez los residuos de lisina se localizan en sitios activos de las proteínas. Este método fue utilizado para identificar una adhesina de 67-kDa de *M. avium* con afinidad por el receptor de vitronectina^{99,116}.

Los ensayos de adhesión sugirieron que GLP-19 es la adhesina dominante de *M. tuberculosis* pues a pesar de que estaba poco representada en los extractos usados en los ensayos de adhesión, en los Western blots de las células incubadas con los extractos se observó una banda muy intensa, sugiriendo un efecto concentrador por parte del macrófago. Estas observaciones, sin embargo, no descartan la existencia de otras adhesinas que pudieran ponerse de manifiesto por otros métodos. Al igual que lo observado con otras adhesinas, GLP-19 se ubica en la pared micobacteriana. Esto se demostró analizando por Western blot con un AcMn específico preparaciones de pared de *M. tuberculosis*. Aun más, en ensayos de adhesión con fracciones de pared se observó la adhesión de GLP-19 a células THP-1 y a MDM. La localización de GLP-19 en la pared micobacteriana ha sido ya reportada¹³⁰ y esta acuerdo con observaciones hechas con otras adhesinas bacterianas¹²².

Después de las observaciones anteriores y para ampliar nuestro estudio, utilizamos una cepa de *M. smegmatis* transformada con un plásmido que contenía el gen estructural que codifica para la GLP-19 de *M. tuberculosis*. Se documentó que la proteína expresada por *M. smegmatis*+19, expresaba residuos de manosa lo que se documentó por su reactividad con Con A y su susceptibilidad a la digestión con α -D-manosidasa. La presencia de residuos de manosa en GLP-19 expresada en *M. smegmatis* se había demostrado en estudios en otros laboratorios en base a su reactividad con Con A¹¹⁹ y por experimentos de mutagénesis dirigida y espectrometría de masas que demostraron sitios de O-glicosilación en los residuos de treonina¹³¹.

Los ensayos con extractos proteicos de *M. smegmatis*+19 y macrófagos vinieron a confirmar el papel de adhesina de GLP-19 y fueron fundamentales para identificar el receptor macrofágico involucrado. Una serie de experimentos nos permitió concluir que GLP-19 se unía al RM ya que la unión del RM a carbohidratos es calcio-dependiente por lo que hicimos ensayos de adhesión incluyendo quelantes de calcio como son EDTA y EGTA, resultando esto en inhibición de la adhesión de GLP-19 a células. Resultados similares se obtuvieron preincubando las células con α -metil-manósido, N-acetilglucosamina, manana y BSA-manosilada. Trabajos anteriores han mostrado que estos carbohidratos compiten con glicoconjugados por el RM^{123,124,132}. Otros ensayos que permitieron demostrar la interacción de GLP-19 con el RM fueron los blots de afinidad que mostraron que GLP-19 interaccionaba con una proteína de 180-kDa presente en la membrana y citosol de células THP-1 la que pudo ser identificada como el RM. Finalmente se hicieron ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal anti-RM, que confirmaron la afinidad de GLP-19 por el RM. En este estudio no se realizaron experimentos que permitieran analizar la participación de otros receptores para carbohidratos como son DC-SIGN o la fracción lectina de CR3^{133,134}.

En este estudio se demostró que GLP-19, además de unirse al RM, promovía la fagocitosis de micobacterias. Inicialmente se utilizó un sistema artificial con microesferas fluorescentes a las cuales se les acoplaron proteínas micobacterianas. Se observó que las microesferas recubiertas con extractos que contenían GLP-19 eran fagocitadas con mayor avidez, lo que se inhibía con α -metilmanosido y de manera más significativa con el anticuerpo monoclonal IT-19 que reconoce GLP-19. Las microesferas fluorescentes se han utilizado previamente para determinar la participación de ligandos y receptores en la fagocitosis de bacterias^{90,116}. Sin embargo, el mayor mérito de este estudio fue demostrar que la interacción de GLP-19 con el RM

resulta en fagocitosis de micobacterias. En los ensayos de fagocitosis se observó que la mayoría de las células THP-1 fagocitaban o adherían uno o más bacilos lo que se inhibía de manera dramática utilizando carbohidratos competidores para el RM, EDTA y sobretodo con el AcMn en contra del RM. La participación de GLP-19 en el proceso de fagocitosis de bacilos se demostró en experimentos en los cuales la preincubación de las células con el ACMn en contra de GLP-19 inhibía la fagocitosis de microesferas en casi un 80%. Una limitante de este estudio es que no se logró determinar la proporción de bacterias adheridas a la superficie celular o fagocitada, lo que deberá precisarse en futuros estudios de microscopia electrónica o confocal.

Este es el primer estudio que demuestra de manera inequívoca que una glicoproteína de *M. tuberculosis* es capaz de inducir la fagocitosis por macrófagos a través del RM. Recientemente, se ha sugerido que las glicoproteínas micobacterianas con residuos de manosa podrían interactuar con el RM induciendo la fagocitosis y/o activando macrófagos¹³⁵. Reportes previos han demostrado que la LAM, un lipoglicano de la pared de *M. tuberculosis* interactúa con RM induciendo la fagocitosis del bacilo^{136,137}.

La expresión del RM en células THP-1 no se había reportado anteriormente, sin embargo se ha sugerido su participación en la fagocitosis de microorganismos y del bacilo de la tuberculosis⁹¹. Así mismo se ha observado que LAM y otros ligandos para el RM inducen la producción de metaloproteínasa-9 por células THP-1, síntesis que es abolida con un AcMn anti-RM¹³⁸. Las observaciones en blots de afinidad, inmunoprecipitación y el bloqueo de la adhesión con ligandos para el RM y con AcMn indicaban la expresión del RM en la membrana de las células THP-1 que habían sido incubadas con extractos micobacterianos. Sin embargo, en estudios de citometría de flujo, que detecta moléculas en la superficie celular, la expresión del RM en células

THP-1 que no habían sido incubadas con extractos era virtualmente inexistente. Esta observación generó la hipótesis de que durante los ensayos de adhesión componentes del extracto micobacteriano inducían la expresión del RM en la superficie celular lo que explicaría las observaciones hechas en los ensayos de adhesión y fagocitosis. Esta hipótesis fue corroborada por inmunohistoquímica y ELISA celular que demostraron que una hora de incubación de las células THP-1 con extractos de *M. smegmatis*+19 resultaba en la movilización del RM de depósitos intracelulares a la superficie celular. En este estudio no determinamos si este fenómeno se asociaba o no a un incremento en la síntesis *de novo* del RM por las células THP-1. Los hallazgos anteriores están de acuerdo con observaciones recientes que muestran que 1 h de incubación de macrófagos humanos con la proteína A surfactante induce la expresión del RM en la superficie de macrófagos¹²⁵. En este estudio, al igual que en el nuestro, la aparición del RM en la superficie celular parece deberse a la movilización de depósitos intracelulares del RM en la ausencia de síntesis proteica *de novo*.

El RM ha cobrado mucha importancia por su participación en la inmunidad innata como un receptor de reconocimiento de patrones presentes en microbios⁶³. El RM es un receptor que participa en la fagocitosis de patógenos como *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cryptococcus*, *Leshmania donovani*, *Tripanosoma cruzi*, el virus de la influenza, virus Herpes simples y el virus de la inmunodeficiencia humana^{86,139-141}. La interacción de ligandos con RM genera señales intracelulares que activan el macrófago, induciendo la síntesis de citocinas proinflamatorias y radicales libres de oxígeno y nitrógeno lo que incrementa la actividad microbicida y funguicida¹⁴². Otra función que se le reconoce al RM es su participación en la homeostasis de glicoproteínas plasmáticas¹⁴³.

Recientemente se ha propuesto que la utilización preferencial del RM representa una ventaja evolutiva para el establecimiento de una infección intracelular como es la tuberculosis, ya que la fagocitosis a través de esta vía no está acoplada a funciones bactericidas del macrófago^{144,145}. Algunos autores han cuestionado la capacidad fagocítica del RM, señalando que se trata de un receptor de adhesión, que para que la fagocitosis se lleve a cabo, requiere de la cooperación de otro receptor¹⁴⁶. En contraposición, un estudio reciente muestra que el RM es capaz de generar señales que conducen a la fagocitosis de una partícula asociada con polimerización focal de actina y activación tiempo-dependiente de Cdc42, Rac1¹⁴⁷. La inhibición de la expresión de Cdc42 y RhoB por RNA de interferencia mostró que la fagocitosis es iniciada por Cdc42 y RhoB y que adicionalmente hay fosforilación de PAK-1, que depende de la activación de la RhoGTPasa. Estos hallazgos demuestran que la fagocitosis a través de RM activa una cascada de señalización diferente de la cascada de activación de la fagocitosis a través de los receptores del complemento.

GLP-19 es una de las moléculas de *M. tuberculosis* que ha sido más estudiada. Desde el punto de vista bioquímico es una molécula doblemente interesante ya que posee residuos de carbohidratos y lipídicos, es decir se trata de una glicoliproteína^{119,120}. En general, se considera que los residuos de carbohidratos confieren estabilidad a las glicoproteínas protegiéndolas de proteasas y de interacciones intermoleculares inespecíficas¹⁴⁸. Así mismo se sabe que los carbohidratos contribuyen a la formación de motivos de reconocimiento que explican la participación de las glicoproteínas en fenómenos de reconocimiento molecular, particularmente en la interacción entre ligandos y receptores celulares¹⁴⁹. Además de GLP-19, *M. tuberculosis* posee otras proteínas con residuos de manosa cuya función se desconoce, tales son las proteínas de 38-kDa y la de 45-47-kDa^{148,150}. Es de interés que en nuestro

ensayos de inmunoprecipitación, al mismo tiempo que GLP-19, se precipitaba la glicoproteína de 38-kDa. Es probable que esta glicoproteína funcione como una adhesina micobacteriana con afinidad por el RM.

GLP-19 es una proteína con propiedades biológicas interesantes. Es capaz de inducir anticuerpos en ratones y humanos, activa células T CD4+ y CD8+ y es capaz de inducir respuestas T de tipo citotóxico^{119,151-153}. Además, activa macrófagos vía el receptor tipo Toll-2 para producir citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-12) e inducir apoptosis de macrófagos. Así mismo, inhibe la presentación de péptidos antigénicos a través del complejo principal de histocompatibilidad tipo I y II, ya que bloquea la señalización de IFN- γ ¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Reportes recientes han mostrado que los azúcares de GLP-19 son importantes biológicamente, ya que una forma no glicosilada de la proteína es incapaz de activar macrófagos¹⁵⁸.

A todas estas múltiples propiedades biológicas debe agregarse la capacidad de GLP-19 para promover la fagocitosis vía el RM proporcionando al bacilo un nicho celular permisivo que podría favorecer su subsistencia y replicación. Por lo anterior, GLP-19 debe ser considerada un factor de virulencia de gran importancia en la patogenia de la TB.

8. CONCLUSIONES

- *Mycobacterium tuberculosis* posee una proteína de 19-kDa que funciona como una adhesina micobacteriana para macrófagos humanos.
- La adhesina de 19-kDa es una proteína ubicada en la pared bacteriana que corresponde a la glicolipoproteína de 19-kDa de *M. tuberculosis*.
- GLP-19 tiene afinidad por el receptor macrofágico para manosa con el cual interacciona a través de sus residuos de manosa.
- La estimulación de células de la línea monocítica humana THP-1 con extractos proteicos de *M. smegmatis*+19 resulta en la movilización del RM de depósitos intracitoplasmicos a la superficie celular.
- La interacción de la adhesina de 19-kDa con el RM presente en la superficie de las células THP-1 promueve la fagocitosis de micobacterias.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar investigaciones para saber si GLP-19 y el RM participan en la fagocitosis de *M. tuberculosis* por macrófagos humanos de sangre circulante y alveolares.
- Dilucidar los mecanismos involucrados en la inducción del RM por micobacterias y/o sus productos.
- Caracterizar el repertorio de receptores macrófagos con los cuales GLP-19 interacciona y estudiar la posible cooperatividad entre ellos.
- Investigar si el RM es un receptor que además de inducir fagocitosis es capaz de inducir fosforilaciones y activar al macrófago para producir citocinas proinflamatorias y aumentar la actividad microbicida.
- Investigar si las glicoproteínas de 38 y 45-47-kDa funcionan como adhesinas.

10. BIBLIOGRAFÍA

(1) Schluger NW. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:251-256.

(2) Corbett EL, Watt CJ, Walker N et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med.* 2003;163:1009-1021.

(3) Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ.* 1994;72:213-220.

(4) Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:93-129.

(5) Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:625-656.

(6) Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1993;167:1481-1497.

(7) Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ. Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes: requirement for CD4+ T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. *J Immunol.* 1998;160:2408-2417.

- (8) Stenger S, Modlin RL. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:89-93.
- (9) Jacobs RF. Multiple-drug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 1994;19:1-8.
- (10) Raviglione MC, Narain JP, Kochi A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis, and treatment. *Bull World Health Organ.* 1992;70:515-526.
- (11) Whalen C, Horsburgh CR, Hom D, Lahart C, Simberkoff M, Ellner J. Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:129-135.
- (12) Hoepfner VH, Marciniuk DD. Tuberculosis in aboriginal Canadians. *Can Respir J.* 2000;7:141-146.
- (13) Sousa AO, Salem JI, Lee FK et al. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:13227-13232.
- (14) Stead WW, Senner JW, Reddick WT, Lofgren JP. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med.* 1990;322:422-427.

- (15) Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:581-620.
- (16) Mansouri D, Adimi P, Mirsaeidi M et al. Inherited disorders of the IL-12-IFN-gamma axis in patients with disseminated BCG infection. *Eur J Pediatr.* 2005;164:753-757.
- (17) Teran-Escandon D, Teran-Ortiz L, Camarena-Olvera A et al. Human leukocyte antigen-associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. *Chest.* 1999;115:428-433.
- (18) Skamene E, Schurr E, Gros P. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med.* 1998;49:275-287.
- (19) Blackwell JM, Searle S, Mohamed H, White JK. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. *Immunol Lett.* 2003;85:197-203.
- (20) Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995;63:736-740.
- (21) Bellamy R. Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clin Sci (Lond).* 2000;98:245-250.

- (22) Orme IM, McMurray DN, Belisle JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol.* 2001;9:115-118.
- (23) Roche PW, Triccas JA, Avery DT, Fifis T, Billman-Jacobe H, Britton WJ. Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination with bacille Calmette-Guerin from infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1994;170:1326-1330.
- (24) Kumar R, Dwivedi A, Kumar P, Kohli N. Tuberculous meningitis in BCG vaccinated and unvaccinated children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76:1550-1554.
- (25) Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;393:537-544.
- (26) Camus JC, Pryor MJ, Medigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* 2002;148:2967-2973.
- (27) Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol.* 1999;33:1103-1117.
- (28) Dannenberg AM, Jr. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp Pract (Off Ed).* 1993;28:51-58.

- (29) Dannenberg AM, Jr., Ando M, Shima K. Macrophage accumulation, division, maturation, and digestive and microbicidal capacities in tuberculous lesions. 3. The turnover of macrophages and its relation to their activation and antimicrobial immunity in primary BCG lesions and those of reinfection. *J Immunol.* 1972;109:1109-1121.
- (30) Dannenberg AM, Jr. Pathogenesis of tuberculosis: local and systemic immunity and cellular hypersensitivity. *Bull Int Union Tuberc.* 1970;43:177-178.
- (31) Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:180-199.
- (32) Casadevall A. Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends Microbiol.* 1998;6:102-107.
- (33) Costello AM, Kumar A, Narayan V et al. Does antibody to mycobacterial antigens, including lipoarabinomannan, limit dissemination in childhood tuberculosis? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86:686-692.
- (34) Sanchez-Rodriguez C, Estrada-Chavez C, Garcia-Vigil J et al. An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:706-712.
- (35) Williams A, Reljic R, Naylor I et al. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology.* 2004;111:328-333.

(36) Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis?

Nat Rev Immunol. 2001;1:20-30.

(37) Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and

macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2002;61 Suppl 2:ii54-ii58.

(38) Denis M. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired

immunity in murine tuberculosis. *J Leukoc Biol.* 1991;50:495-501.

(39) Huygen K, Abramowicz D, Vandenbussche P et al. Spleen cell cytokine secretion

in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect Immun.* 1992;60:2880-2886.

(40) Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L. The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp*

Immunol. 1977;27:230-237.

(41) Vanham G, Toossi Z, Hirsch CS et al. Examining a paradox in the pathogenesis of

human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy. *Tuber Lung*

Dis. 1997;78:145-158.

(42) Kleinhenz ME, Ellner JJ. Antigen responsiveness during tuberculosis: regulatory

interactions of T cell subpopulations and adherent cells. *J Lab Clin Med.* 1987;110:31-

40.

(43) Murray PJ, Wang L, Onufryk C, Tepper RI, Young RA. T cell-derived IL-10

antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J Immunol.*

1997;158:315-321.

- (44) Delgado JC, Tsai EY, Thim S et al. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:7576-7581.
- (45) Beck JS, Potts RC, Kardjito T, Grange JM. T4 lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 1985;60:49-54.
- (46) Dhand R, De A, Ganguly NK et al. Factors influencing the cellular response in bronchoalveolar lavage and peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle*. 1988;69:161-173.
- (47) Onwubalili JK, Edwards AJ, Palmer L. T4 lymphopenia in human tuberculosis. *Tubercle*. 1987;68:195-200.
- (48) Pilheu JA, De Salvo MC, Gonzalez J, Rey D, Elias MC, Rupp MC. CD4+ T-lymphocytopenia in severe pulmonary tuberculosis without evidence of human immunodeficiency virus infection. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1997;1:422-426.
- (49) Aung H, Toossi Z, McKenna SM et al. Expression of transforming growth factor-beta but not tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-4 in granulomatous lung lesions in tuberculosis. *Tuber Lung Dis*. 2000;80:61-67.
- (50) Sanchez FO, Rodriguez JI, Agudelo G, Garcia LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect Immun*. 1994;62:5673-5678.

- (51) Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995;63:3231-3234.
- (52) Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med*. 1996;335:1956-1961.
- (53) Toossi Z, Ellner JJ. Mechanisms of anergy in tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;215:221-238.
- (54) Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E et al. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med*. 2003;197:527-535.
- (55) Baliko Z, Szereday L, Szekeres-Bartho J. Th2 biased immune response in cases with active *Mycobacterium tuberculosis* infection and tuberculin anergy. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998;22:199-204.
- (56) Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol*. 2002;32:1605-1613.
- (57) van CR, Karyadi E, Preyers F et al. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis*. 2000;181:1194-1197.

(58) Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:825-852.

(59) van Oss CJ. Phagocytosis: an overview. *Methods Enzymol.* 1986;132:3-15.

(60) Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593-623.

(61) Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:251-281.

(62) Lennartz MR, Wileman TE, Stahl PD. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from rabbit alveolar macrophages. *Biochem J.* 1987;245:705-711.

(63) Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:50-55.

(64) Wright SD, Craigmyle LS, Silverstein SC. Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b- and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med.* 1983;158:1338-1343.

(65) Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell.* 1987;50:769-778.

- (66) Russell DG, Talamas-Rohana P. Leishmania and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol Today*. 1989;10:328-333.
- (67) Sharon N. Carbohydrates as recognition determinants in phagocytosis and in lectin-mediated killing of target cells. *Biol Cell*. 1984;51:239-245.
- (68) Talamas-Rohana P, Wright SD, Lennartz MR, Russell DG. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol*. 1990;144:4817-4824.
- (69) Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest*. 1984;73:599-601.
- (70) Murray HW, Teitelbaum RF. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis*. 1992;165:513-517.
- (71) Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis*. 1993;167:1358-1363.
- (72) Adams LB, Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol*. 1990;144:2725-2729.
- (73) Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:105-128.

(74) Schmid SL, Carter LL. ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. *J Cell Biol.* 1990;111:2307-2318.

(75) Silverstein R, Christoffersen CA, Morrison DC. Modulation of endotoxin lethality in mice by hydrazine sulfate. *Infect Immun.* 1989;57:2072-2078.

(76) Deretic V, Singh S, Master S et al. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol.* 2006;8:719-727.

(77) Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990;144:2771-2780.

(78) Ferguson JS, Weis JJ, Martin JL, Schlesinger LS. Complement protein C3 binding to Mycobacterium tuberculosis is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun.* 2004;72:2564-2573.

(79) Hetland G, Wiker HG, Hogasen K, Hamasur B, Svenson SB, Harboe M. Involvement of antilipoarabinomannan antibodies in classical complement activation in tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5:211-218.

(80) Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages. *J Immunol.* 1994;152:743-753.

- (81) Swartz RP, Naai D, Vogel CW, Yeager H, Jr. Differences in uptake of mycobacteria by human monocytes: a role for complement. *Infect Immun.* 1988;56:2223-2227.
- (82) Mueller-Ortiz SL, Wanger AR, Norris SJ. Mycobacterial protein HbhA binds human complement component C3. *Infect Immun.* 2001;69:7501-7511.
- (83) Ferguson JS, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis.* 2000;80:173-184.
- (84) Pasula R, Wisniowski P, Martin WJ. Fibronectin facilitates Mycobacterium tuberculosis attachment to murine alveolar macrophages. *Infect Immun.* 2002;70:1287-1292.
- (85) Braun L, Ohayon H, Cossart P. The InIB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol.* 1998;27:1077-1087.
- (86) Marodi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB, Jr. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest.* 1993;91:2596-2601.
- (87) Sawyer RT, Drevets DA, Campbell PA, Potter TA. Internalin A can mediate phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by mouse macrophage cell lines. *J Leukoc Biol.* 1996;60:603-610.

- (88) van d, V, Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun.* 1998;66:2803-2808.
- (89) Schlesinger LS, Kaufman TM, Iyer S, Hull SR, Marchiando LK. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol.* 1996;157:4568-4575.
- (90) Schlesinger LS, Hull SR, Kaufman TM. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol.* 1994;152:4070-4079.
- (91) Stokes RW, Speert DP. Lipoarabinomannan inhibits nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages. *J Immunol.* 1995;155:1361-1369.
- (92) Villeneuve C, Etienne G, Abadie V et al. Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J Biol Chem.* 2003;278:51291-51300.
- (93) Zimmerli S, Edwards S, Ernst JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;15:760-770.

- (94) Peterson PK, Gekker G, Hu S et al. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect Immun.* 1995;63:1598-1602.
- (95) Stelter F. Structure/function relationships of CD14. *Chem Immunol.* 2000;74:25-41.
- (96) Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. Cloning of an M. tuberculosis DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science.* 1993;261:1454-1457.
- (97) Hetland G, Wiker HG. Antigen 85C on Mycobacterium bovis, BCG and M. tuberculosis promotes monocyte-CR3-mediated uptake of microbeads coated with mycobacterial products. *Immunology.* 1994;82:445-449.
- (98) Renshaw PS, Veverka V, Kelly G et al. Sequence-specific assignment and secondary structure determination of the 195-residue complex formed by the Mycobacterium tuberculosis proteins CFP-10 and ESAT-6. *J Biomol NMR.* 2004;30:225-226.
- (99) Rao SP, Ogata K, Catanzaro A. Mycobacterium avium-M. intracellulare binds to the integrin receptor alpha v beta 3 on human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun.* 1993;61:663-670.
- (100) Gonzales J y Mancilla R. *Tesis de Maestria en Investigacion Biomedica* [2004.

- (101) Bermudez LE, Sangari FJ. Mycobacterial invasion of epithelial cells. *Subcell Biochem.* 2000;33:231-249.
- (102) Mapother ME, Songer JG. In vitro interaction of Mycobacterium avium with intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 1984;45:67-73.
- (103) McDonough KA, Kress Y. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1995;63:4802-4811.
- (104) Hoppe HC, de Wet BJ, Cywes C, Daffe M, Ehlers MR. Identification of phosphatidylinositol mannoside as a mycobacterial adhesin mediating both direct and opsonic binding to nonphagocytic mammalian cells. *Infect Immun.* 1997;65:3896-3905.
- (105) Garcia-Perez BE, Mondragon-Flores R, Luna-Herrera J. Internalization of Mycobacterium tuberculosis by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microb Pathog.* 2003;35:49-55.
- (106) Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y et al. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem.* 2004;279:39798-39806.
- (107) Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* 1993;150:2920-2930.

(108) Youmans GP. A Method for the Determination of the Culture Cycle and the Growth Rate of Virulent Human Type Tubercle Bacilli. *J Bacteriol.* 1946;51:703-710.

(109) Takayama K, Schnoes HK, Armstrong EL, Boyle RW. Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Lipid Res.* 1975;16:308-317.

(110) Espitia C, Cervera I, Gonzalez R, Mancilla R. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol.* 1989;77:373-377.

(111) Anderson LJ, Coombs RA, Tsou C, Hierholzer JC. Use of the biotin-avidin system to study the specificity of antibodies against respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol.* 1984;19:934-936.

(112) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.

(113) Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies WA, de JG, Reiner NE. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J Immunol.* 1998;161:4882-4893.

(114) Espitia C, Espinosa R, Saavedra R et al. Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-kilodalton antigens. *Infect Immun.* 1995;63:580-584.

- (115) Grunow R, D'Apuzzo M, Wyss-Coray T, Frutig K, Pichler WJ. A cell surface ELISA for the screening of monoclonal antibodies to antigens on viable cells in suspension. *J Immunol Methods*. 1994;171:93-102.
- (116) Hayashi T, Rao SP, Catanzaro A. Binding of the 68-kilodalton protein of *Mycobacterium avium* to alpha(v)beta3 on human monocyte-derived macrophages enhances complement receptor type 3 expression. *Infect Immun*. 1997;65:1211-1216.
- (117) Mancilla-Jimenez R, Appay MD, Bellon B, Kuhn J, Bariety J, Druet P. IgG Fc membrane receptor on normal human glomerular visceral epithelial cells. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1984;404:139-158.
- (118) Yoshida H, Kondratenko N, Green S, Steinberg D, Quehenberger O. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J*. 1998;334 (Pt 1):9-13.
- (119) Garbe T, Harris D, Vordermeier M, Lathigra R, Ivanyi J, Young D. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton antigen in *Mycobacterium smegmatis*: immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infect Immun*. 1993;61:260-267.
- (120) Young DB. Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 1992;4:396-400.
- (121) Lee BY, Hefta SA, Brennan PJ. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1992;60:2066-2074.

- (122) Klemm P, Schembri MA. Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol.* 2000;290:27-35.
- (123) Mullin NP, Hitchen PG, Taylor ME. Mechanism of Ca²⁺ and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:5668-5681.
- (124) Kery V, Krepinsky JJ, Warren CD, Capek P, Stahl PD. Ligand recognition by purified human mannose receptor. *Arch Biochem Biophys.* 1992;298:49-55.
- (125) Beharka AA, Gaynor CD, Kang BK, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol.* 2002;169:3565-3573.
- (126) Schlesinger LS. Mycobacterium tuberculosis and the complement system. *Trends Microbiol.* 1998;6:47-49.
- (127) Kang BK, Schlesinger LS. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 1998;66:2769-2777.
- (128) Wang Y, Kelly CG, Karttunen JT et al. CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. *Immunity.* 2001;15:971-983.

- (129) Bayer EA, Wilchek M. Protein biotinylation. *Methods Enzymol.* 1990;184:138-160.
- (130) Ortalo-Magne A, Andersen AB, Daffe M. The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli. *Microbiology.* 1996;142 (Pt 4):927-935.
- (131) Herrmann JL, O'Gaora P, Gallagher A, Thole JE, Young DB. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.* 1996;15:3547-3554.
- (132) Yan F, Lutz DA, Shepherd VL, Boyle D, McLaughlin BJ. Characterization of rod outer segment plasma membrane proteins which bind to the mannose receptor. *Curr Eye Res.* 1995;14:465-471.
- (133) Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol.* 1996;156:1235-1246.
- (134) Zhou M, Todd RF, III, van de Winkel JG, Petty HR. Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J Immunol.* 1993;150:3030-3041.

- (135) Michell SL, Whelan AO, Wheeler PR et al. The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* contains O-linked mannose and (1-->3)-mannobiose moieties. *J Biol Chem.* 2003;278:16423-16432.
- (136) Kang BK, Schlesinger LS. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 1998;66:2769-2777.
- (137) Schlesinger LS. Role of mononuclear phagocytes in *M tuberculosis* pathogenesis. *J Investig Med.* 1996;44:312-323.
- (138) Rivera-Marrero CA, Schuyler W, Roser S, Ritzenthaler JD, Newburn SA, Roman J. M. tuberculosis induction of matrix metalloproteinase-9: the role of mannose and receptor-mediated mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:L546-L555.
- (139) Cinco M, Cini B, Murgia R, Presani G, Prodan M, Perticarari S. Evidence of involvement of the mannose receptor in adhesion of *Borrelia burgdorferi* to monocyte/macrophages. *Infect Immun.* 2001;69:2743-2747.
- (140) Chakraborty P, Ghosh D, Basu MK. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *J Parasitol.* 2001;87:1023-1027.
- (141) O'Riordan DM, Standing JE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infect Immun.* 1995;63:779-784.

- (142) Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol.* 1998;10:363-372.
- (143) Lee SJ, Evers S, Roeder D et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science.* 2002;295:1898-1901.
- (144) Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le C, V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun.* 1999;67:469-477.
- (145) Li YJ, Petrofsky M, Bermudez LE. Mycobacterium tuberculosis uptake by recipient host macrophages is influenced by environmental conditions in the granuloma of the infectious individual and is associated with impaired production of interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 2002;70:6223-6230.
- (146) Le C, V, Emorine LJ, Toesca I, Cougoule C, Maridonneau-Parini I. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *J Leukoc Biol.* 2005;77:934-943.
- (147) Zhang J, Zhu J, Bu X et al. Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages. *Mol Biol Cell.* 2005;16:824-834.

- (148) Dobos KM, Swiderek K, Khoo KH, Brennan PJ, Belisle JT. Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995;63:2846-2853.
- (149) Rudd PM, Wormald MR, Dwek RA. Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. *Trends Biotechnol*. 2004;22:524-530.
- (150) Espitia C, Mancilla R. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin Exp Immunol*. 1989;77:378-383.
- (151) Faith A, Moreno C, Lathigra R et al. Analysis of human T-cell epitopes in the 19,000 MW antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: influence of HLA-DR. *Immunology*. 1991;74:1-7.
- (152) Franco J, Camarena JJ, Nogueira JM, Blanquer R, Ruiz MJ, Marin J. Serological response (Western blot) to fractions of *Mycobacterium tuberculosis* sonicate antigen in tuberculosis patients and contacts. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5:958-962.
- (153) Mohaghehpour N, Gammon D, Kawamura LM, van VA, Benike CJ, Engleman EG. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein. *J Immunol*. 1998;161:2400-2406.
- (154) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999;285:732-736.

(155) Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB et al. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2004;190:1167-1176.

(156) Ciaramella A, Martino A, Cicconi R, Colizzi V, Fraziano M. Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates Mycobacterium tuberculosis-induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection. *Cell Death Differ.* 2000;7:1270-1272.

(157) Fulton SA, Reba SM, Pai RK et al. Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by Mycobacterium bovis BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infect Immun.* 2004;72:2101-2110.

(158) Post FA, Manca C, Neyrolles O, Ryffel B, Young DB, Kaplan G. Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits Mycobacterium smegmatis-induced cytokine production by human macrophages in vitro. *Infect Immun.* 2001;69:1433-1439.