



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

“BASES MOLECULARES DE LA
INMUNOSUPRESIÓN POR GLICOLÍPIDOS EN LA
TUBERCULOSIS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA EL M. en C.

JOSÉ PRISCO PALMA NICOLÁS

Directora de tesis: Dra. Luz María López Marín
Comité tutorial: Dra. Iris Estrada García
Dr. Rafael Saavedra Durán



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la supervisión de la Doctora Luz María López Marín, y fue financiado con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto PAPIIT IN218506), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CONACYT 48509).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi tutora, la Dra. Luz María López Marín por recibirme en su laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), y por apoyarme con una beca pre-doctoral que me permitió competir por un lugar en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

A la Dra. Iris Estrada García, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por sus invaluables sugerencias para el mejoramiento del trabajo de tesis.

Al Dr. Raúl Mancilla Jiménez, del IIB de la UNAM por compartir un poco de su vasta experiencia en el estudio de la tuberculosis.

A los Doctores Rogelio Hernández Pando, Alejandro Zentella-Dehesa y Rafael Saavedra por su colaboración en algunos de los aspectos cruciales durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Biol. Erika Segura Salinas y al Biol. Carlos Castellanos Barba por su excelente apoyo técnico en cromatografía y citometría de flujo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca para la realización de los estudios de doctorado (Reg. 128156).

A mi familia en Ciudad Valles, S.L.P., de quienes siempre he recibido un apoyo incondicional para la realización de mis metas. Aun cuando eso implique mantenerme alejado un poco de ellos.

A mis compañeros y amigos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

*“El pensamiento científico no se distingue tanto
por proporcionar las respuestas correctas,
como por formular las preguntas correctas”*

Claude Levi-Strauss

Resumen

La protección contra la tuberculosis se basa en la respuesta inmune mediada por células y frecuentemente se encuentran signos de inmunosupresión, especialmente en la etapa crónica de la enfermedad. Entre las diversas moléculas de la pared celular de *M. tuberculosis*, particularmente los lípidos y glicolípidos tienen propiedades inmunosupresoras sobre algunas de las fases de la respuesta inmune. Recientemente se demostró que la 2,3 di-O-aciltrealosas (DAT) inhibe la transformación blástica de las células T en células de bazo de ratones naïve. En el presente estudio se infectaron ratones de la cepa BALB/c por vía intratraqueal con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, y las células aisladas del bazo fueron activadas *in vitro* con proteína total del bacilo en presencia del DAT para determinar sus efectos sobre la proliferación celular y la expresión de citocinas Th1. Los resultados demuestran que aunque las células T proliferan ante la activación policlonal con un mitógeno (Con A), su incapacidad para responder ante estímulos antigénicos específicos (proteína total de *M. tuberculosis*) revela un estado de anergia clonal. El glicolípido inhibió la expresión de citocinas Th1 a nivel transcripcional tanto en células totales de bazo de ratones infectados, como en células T CD4+ purificadas del bazo de ratones naïve activadas policlonalmente con el mitógeno. Un análisis más detallado de las vías de señalamiento involucradas en la activación de las células T, revela que el glicolípido inhibe la activación de la vía de señalamiento PLC- γ /DAG/GRP1 que conduce a la activación de la vía de las MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK), pero no así las vías de activación de la PKC y NF κ B.

Abstract

Protection against tuberculosis (TB) is based on cell-mediated immune responses, TB is often characterized by immunological dysfunction of peripheral blood mononuclear cells, especially at chronic stages. Lipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall have been shown to produce various suppressive effects on cell-mediated immunity. For instance, it was previously shown that purified di-*O*-acyl-trehalose (DAT) inhibits T cell proliferation and cytokine secretion in spleen cells from naïve BALB/c mice. In the present study, BALB/c mice were infected with *M. tuberculosis* H37Rv, and *ex vivo* spleen cell proliferation and cytokine gene expression were evaluated in the presence of DAT. Our results showed that, whereas mitogen-activated T-cell proliferation was unaffected by DAT, stimulation by *M. tuberculosis* antigen decreased in the presence of the lipid, consistent with mycobacterial antigen-specific anergy. Moreover, the lipid was shown to inhibit at the transcriptional level the production of Th1-type cytokines, a critical step for the containment of *M. tuberculosis* infection. Finally, it is herein demonstrated that the immunosuppressive effect of DAT involves downmodulation of the PLC- γ /DAG/GRP1 pathway leading to MAPK activation (Ras/Raf/MEK/ERK), but not the PKC or NF- κ B pathways.

INDICE	pag.
1. INTRODUCCION	1
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.1.1 Características generales	2
1.1.2 Arquitectura de la pared celular	3
I. El complejo central de la pared celular	3
II. Moléculas asociadas con la pared celular	4
1.2 Fisiopatología de la tuberculosis humana	5
1.2.1 Infección pulmonar (primoinfección).	5
1.2.2 Latencia y reactivación de la tuberculosis	6
1.3 Respuesta inmune a la infección por <i>M. tuberculosis</i>	6
1.3.1 Formación de anticuerpos anti- <i>M. tuberculosis</i>	6
1.3.2 La respuesta inmune protectora (inmunidad celular de tipo Th1)	7
1.3.3 Inmunosupresión y anergia	11
1.4 Inmunomodulación por glicolípidos	14
- Lipoarabinomanano (LAM)	16
- Sulfolípidos.	19
- Glicolípidos fenólicos	19
- Trealosas di- y tri- aciladas (DATs y TATs)	21
2. ANTECEDENTES	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. OBJETIVO GENERAL	26
5. HIPOTESIS	27
6. MATERIAL Y METODOS.	28
7. RESULTADOS	37
8. DISCUSION	57
9. REFERENCIAS	64
10. APENDICES	76

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

A) FIGURAS

Figura 1. DAT purificado a partir de <i>M. fortuitum</i> (ATCC6841)	37
Figura 2. Efecto del DAT sobre la proliferación de las células T	39
Figura 3. El DAT inhibe la producción de citocinas	41
Figura 4. El DAT inhibe la expresión de genes de citocinas Th1 y Th2	44
Figura 5. Anergia clonal de las células T	46
Figura 6. EL DAT inhibe la expresión de genes de citocinas durante la infección por <i>M. tuberculosis</i>	48
Figura 7. EL DAT inhibe vías de señalamiento por debajo de la activación de la PLC γ	51
Figura 8. El DAT inhibe la activación de la vía de las MAPK	53
Figura 9. El DAT no inhibe la activación de las isoformas clásicas de la PKC	55
Figura 10. El DAT no inhibe la fosforilación/degradación de I κ -B α , en la vía canónica de activación de NF- κ B	56

B) TABLAS

Tabla 1. Inhibición en la secreción de citocinas	40
Tabla 2. Inhibición en la expresión de genes de citocinas	43
Tabla 3. Inhibición en la expresión de genes de citocinas	49

APENDICES

A. Incidencia estimada de tuberculosis pulmonar a nivel global	80
B. Modelo esquemático de la pared celular de las micobacterias	81
C. Representación esquemática de los principales lípidos inmunosupresores de <i>M. tuberculosis</i>	82
D. Síntesis Curricular	84
E. Artículo publicado como requisito para la obtención del grado	87

ABREVIATURAS

CPA	Célula presentadora de antígeno
aPKC	Isoenzimas “atípicas” de la PKC ($\zeta, \lambda/\iota$)
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BSL III	Nivel de riesgo biológico III
Con A	Concanavalina A
cPKC	Isoenzimas “clásicas” de la PKC ($\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$)
DAT	2,3 di-<i>O</i>-acil-trealosa
DAG	2,3 diacil-glicerol
DNAc	DNA complementario
ERK	Cinasas reguladas extracelularmente (del inglés Extracellular Regulated Kinase)
G3PDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
H37Rv	Cepa tipo virulenta de <i>M. tuberculosis</i>
H37Ra	Cepa tipo avirulenta de <i>M. tuberculosis</i>
IP3	Trifosfato de inositol
κB-α	Inhibidor endógeno de NFκB
manLAM	LAM que se encuentra manosilado externamente
MEK	Cinasa de ERK
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MΦ	Monocitos/Macrófagos
MAPK	Cinasas Activadas por Mitógeno (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase)
NF-κB	Factor nuclear κB
nPKC	Isoenzimas “nuevas” de la PKC ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$)
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud
PD98059	Inhibidor de MEK
PIM	Fosfatidilinositolmanósido (del inglés Phosphatidylinositol Mannosides)
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PLC-γ	Fosfolipasa C-γ
PMA	12-miristato -13-acetato de phorbol
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PKC	Proteína cinasa C
Raf-1	Cinasa de MEK
RPMI	Medio de cultivo Rosswell Park Memorial Institute
TB	Tuberculosis
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β (del inglés Transforming growth factor β)
TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés Thin layer chromatography)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
U73122	Inhibidor de la fosfolipasa C

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis pulmonar es la forma más común de tuberculosis, así como la forma más importante en términos epidemiológicos. Se trata de una enfermedad pulmonar infecto-contagiosa de naturaleza crónica que afecta a seres humanos de todas las edades. Se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo de Koch (*M. tuberculosis*) y de acuerdo con las cifras oficiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay aproximadamente ocho millones de nuevos casos de tuberculosis cada año, y dos millones de muertes por dicha enfermedad [1]. A pesar de la disponibilidad de la vacuna antituberculosa (BCG), la incidencia de la enfermedad no ha disminuído y la eficacia de dicha vacuna ha sido cuestionada, aunque es claro que los individuos vacunados tienen menor riesgo de desarrollar las formas extrapulmonares de la tuberculosis, especialmente en el caso de la tuberculosis meníngea en los niños.

En México, un país con una incidencia baja de tuberculosis [1], mueren aproximadamente 2,000 individuos por tuberculosis cada año y las cifras oficiales de la Secretaría de Salud indican que la tuberculosis ocupa el lugar 20 como causa de muerte de la población general en edad productiva. Hasta la semana 26 de 2008 (correspondiente a la segunda del mes de junio) se han reportado 7,439 casos nuevos de tuberculosis pulmonar y 87 casos de meningitis tuberculosa. En contraste, en el año 2007 se reportaron 14454 casos de tuberculosis pulmonar y 159 de meningitis tuberculosa [2]; a pesar de la aplicación del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), la incidencia de tuberculosis se ha mantenido constante en los últimos cinco años. Una

visión general de la distribución de casos de tuberculosis pulmonar por país puede verse en el

Apéndice A.

1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

1.1.1 Características generales

Las micobacterias (taxonómicamente referidas como el género *Mycobacterium*) incluyen a un grupo de poco más de 100 especies de microorganismos débilmente Gram positivos. Aunque la mayoría de estas especies son saprófitas, algunas son patógenas para algunos animales y el hombre. Todas las especies del género presentan una pared celular compleja, extraordinariamente rica en lípidos que les confiere la propiedad de ácido-resistencia. Mientras que las especies no patógenas son de rápido crecimiento, las especies patógenas se caracterizan por su lento crecimiento, con tiempos de generación que varían de 12 a 24 horas.

La mayoría de las especies que causan enfermedad natural en humanos o animales pertenecen a los denominados a) complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum*, y *M. microti*) y b) complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, y *M. intracellulare*). Entre dichas especies, sin duda *M. tuberculosis* es el principal patógeno estricto que causa la tuberculosis en humanos, seguido de *M. bovis*, mientras que *M. avium* subsp. *avium* y *M. intracellulare* son causa de enfermedad pulmonar en individuos inmunosuprimidos; se estima que hasta el 70% de los pacientes con VIH-SIDA ($CD4^+ \leq 50/mm^3$) padecen de infección por alguno de estos oportunistas [3].

1.1.2 Arquitectura de la pared celular

Entender la arquitectura y función de la pared celular de las micobacterias constituye un gran reto en micobacteriología, ya que se postula que esta estructura, y en particular sus lípidos, son en gran parte responsables de otorgar las propiedades características del género *Mycobacterium*, como son la ácido-resistencia, y la baja permeabilidad de su pared celular, la cual se asocia con la ineficacia de los fármacos anti-tuberculosos empleados para el tratamiento de la enfermedad. La gran cantidad de lípidos localizados en la pared celular podría contribuir también a la lentitud de su crecimiento, tanto al dificultar el paso de nutrientes, como al consumir gran parte de la capacidad biosintética del microorganismo.

I) El complejo central de la pared celular. Se define como la matriz insoluble derivada de la pared celular, después de que han sido extraídos químicamente los lípidos, las proteínas y los carbohidratos solubles. Está formado por tres tipos de macromoléculas unidas entre sí de forma covalente: los ácidos micólicos al arabinogalactano y éste a su vez al peptidoglicano.

- *Peptidoglicano.* Se encuentra en la capa más interna de la pared celular, adyacente a la membrana plasmática de las micobacterias, y es análogo al de las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*. Químicamente está compuesto de un glicano [$\rightarrow 4$)- β -D-GlcNAcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Mur-(1)n, al que está unido un tetrapéptido (L-Ala- γ -D-glu-Dap-D-Ala). Dap es el ácido meso-diaminopimélico, que comparte con las bacterias gram negativas. Un disacárido fosfatado sirve de unión entre el muramato del peptidoglicano y el arabinogalactano.

- *Arabinogalactano*. Este complejo sacarídico también se encuentra en otros miembros de la familia *Actinomycetales*. Está formado por residuos de los azúcares D-Arabinofuranosil (D-Araf) y D-Galactofuranosil (D-Galf). La región galactano del arabinogalactano es la que está ligada covalentemente al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster.

- *Ácidos micólicos*. Los ácidos micólicos son característicos del género *Mycobacterium*; están unidos a los residuos de arabinosa (D-Araf) del arabinogalactano en el carbono 5. Químicamente se definen como ácidos grasos α -alquílicos- β -hidroxilados de alto peso molecular. *M. tuberculosis* contiene una gran cantidad de homólogos que difieren en sus cadenas α -alquilo. Se conocen dos familias de micolatos, 1) los α -micolatos que no poseen grupos funcionales oxigenados, y 2) los micolatos oxigenados.

Con base en los datos generados por microscopía electrónica, en la pared celular de las micobacterias se distinguen claramente las dos capas principales que constituyen el complejo central de la pared celular, a) una región transparente al paso de los electrones, que corresponde a la localización de los ácidos micólicos, y b) otra mucho más electrodensa que corresponde a la localización del peptidoglicano y arabinogalactano [4], como se detalla en el **Apéndice B**.

II) Moléculas asociadas con la pared celular. La parte más externa de la pared de *M. tuberculosis* se encuentra recubierta con una gran diversidad de glicolípidos y azúcares complejos que no se encuentran unidos de manera covalente entre sí, ni al complejo central de la pared celular. Estos lípidos asociados son: a) el lipoarabinomanano (LAM), el cual está presente

en todas las micobacterias tanto saprófitas como patógenas, los sulfolípidos, los glicolípidos fenólicos, los lipooligosacáridos y los glicolípidos de trealosa. La descripción química de dichos lípidos así como el recuento de sus propiedades inmunosupresoras será descrito más adelante.

1.2 Fisiopatología de la tuberculosis humana

1.2.1 Infección pulmonar (primoinfección)

La infección se inicia cuando un individuo enfermo expelle pequeñas gotas de secreción bronquial (~5 μM , con 1-10 bacilos) que por su tamaño logran evadir las barreras mecánicas de la nasofaringe y del tracto respiratorio superior de un hospedero susceptible, llegando hasta las vías respiratorias inferiores. Una vez depositados en los espacios alveolares, los bacilos son fagocitados por los macrófagos [5].

En este foco primario de infección hay multiplicación intracelular de los bacilos y muerte de los macrófagos, lo que inicia la respuesta inflamatoria. La llegada de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), macrófagos activados y posteriormente de células mononucleares (células T específicas de antígeno) limitan la diseminación del proceso infeccioso al formarse el granuloma, aproximadamente de 2-3 semanas después de la infección primaria.

Los granulomas presentan necrosis sólida y se abate el crecimiento bacilar, lo que resulta en una infección estacionaria o latente que durará meses o años, hasta que algún evento ajeno que curse con pérdida de la inmunidad celular tenga como consecuencia la reactivación de las lesiones y la diseminación del bacilo (reinfección endógena). La diseminación hematógena, aunque es poco frecuente, ocurre hacia sitios de alta tensión de oxígeno, como el cerebro, las epífisis de los

huesos largos, los cuerpos vertebrales, y el riñón.

1.2.2 *Latencia y reactivación de la tuberculosis*

A pesar de que un gran número de individuos se encuentran infectados (~ 1/3 de la población mundial), se estima que un 90% de ellos logran controlar la infección confinando a la bacteria en granulomas; esta “tuberculosis latente” cursa sin sintomatología pero con una clara respuesta celular específica contra antígenos de la micobacteria [6]. El restante 10% de los individuos infectados presentan la “tuberculosis activa” en algún momento de su vida, con fiebre, tos productiva, disnea, fatiga, pérdida de peso, y en los casos avanzados no tratados se pueden presentar sonidos bronquiales y hemoptisis. Aunque la mayoría de dichos casos derivan de la reactivación de la forma latente, un bajo porcentaje de éstos progresan muy rápidamente durante el transcurso del primero o segundo año de infección y cursan con cuadros sintomatológicos, radiológicos e histopatológicos severos. Esta forma severa de la enfermedad, conocida como “tuberculosis primaria progresiva” generalmente se presenta en individuos que tienen una franca inmunodeficiencia primaria (mutaciones en los genes que codifican para IFN- γ , STAT-1, IL-12, etc.), y constituyen del 2-3 % de los casos de tuberculosis.

1.3 Respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*

1.3.1 *Formación de anticuerpos anti-*M. tuberculosis**

Entre los hallazgos clínicos característicos, pero no específicos de la tuberculosis se encuentra la hipergamaglobulinemia policlonal [7]. Los pacientes desarrollan una fuerte respuesta humoral

contra una amplia diversidad de antígenos proteicos, lipídicos y sacarídicos, entre los que destacan el antígeno de 30 kDa (Ag 85), la proteína de 38 kDa, las proteínas ESAT-6 y CFP-10, los glicolípidos de trealosa DAT, TAT, así como el sulfolípidos 1 (SL-1), y entre los compuestos sacarídicos el lipoarabinomanano (LAM). Aunque se produce una gran cantidad de anticuerpos específicos durante la infección, éstos no contribuyen a la protección contra la tuberculosis [8, 9]. Sin embargo, el montaje de dicha respuesta humoral ante una gran variedad de antígenos ha servido de base para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico serológico [10].

1.3.2 *La respuesta inmune protectora (inmunidad celular tipo Th1)*

Las primeras evidencias de la participación de las células T en la protección contra la tuberculosis, particularmente las CD4⁺, se derivaron de estudios de transferencia adoptiva en modelos experimentales de tuberculosis [11, 12]. Posteriormente, mediante estudios de bloqueo *in vivo* con anticuerpos anti-CD4 se confirmaron dichos hallazgos [13, 14]. En años más recientes, la generación de modelos *knock-out* en ratón, deficientes en la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II) han permitido establecer firmemente el papel central de dicho linaje de células T en la protección frente a la infección [15]. En humanos, la evidencia más fuerte a favor del papel determinante de las células T CD4⁺ en la protección contra la tuberculosis es el incremento en la susceptibilidad de individuos infectados con el VIH [16-18].

Los mecanismos mediante los cuales las células T CD4⁺ contribuyen determinadamente a la protección se relacionan con la producción de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ). La importancia del IFN- γ en el control de la infección por *M. tuberculosis* se hizo evidente al demostrar que los

modelos murinos *knock-out* para el receptor de IFN- γ (IFN- γ R^{-/-}) son extremadamente susceptibles a la tuberculosis [19, 20]. Asimismo, los humanos homocigotos para mutaciones en el receptor de interferón γ (IFN- γ R) son muy susceptibles a infecciones micobacterianas, incluso a la enfermedad por diseminación hematológica de las cepas vacunales de BCG [21-23]. También se ha demostrado que las células T CD4⁺ presentan actividad citolítica y pueden lisar células infectadas con *M. tuberculosis*, *in vitro* [24]. Este mecanismo puede contribuir a la muerte celular por apoptosis de macrófagos infectados en los sitios de infección [25], ya que se ha demostrado que la apoptosis, pero no la necrosis, es importante para contener el crecimiento bacilar [26].

La participación de las células T CD8⁺ en la respuesta inmune a *M. tuberculosis* recibió poca atención durante mucho tiempo, hasta que se demostró que los ratones *knock-out* para β 2-microglobulina o TAP (transportador asociado al procesamiento antigénico), ineficientes para presentar antígenos en el contexto de moléculas MHC clase I, eran muy susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* [27, 28]. En humanos sanos PPD⁺ se ha descrito la existencia de células T CD8⁺ con especificidad antigénica para *M. tuberculosis* [29]. Dichas células secretan IFN- γ cuando son estimuladas *in vitro* con la micobacteria o sus antígenos, aunque en menor cantidad que las células CD4⁺ [30, 31]. También expresan granzima, Fas-L, granulisina, perforina, etc., que les permite llevar a cabo su función efectora lisando macrófagos infectados [32, 33]. Estas células T CD8⁺ específicas para antígenos de *M. tuberculosis* presentan restricción antigénica clásica (MHC I) y no clásica (CD1). Entre los antígenos micobacterianos que son reconocidos por las células T CD8⁺ con restricción antigénica MHC I se encuentran la proteína de 38 kDa [34], una proteína de choque térmico de 65 kDa [35], y la proteína de 19 kDa

[36]. Uno de los mecanismos por el cual las proteínas micobacterianas son presentadas en el contexto de moléculas MHC I se debe a la formación de un poro fagosomal [37], que permite la salida de moléculas de hasta 70 kDa hacia el citoplasma [37]. Adicionalmente, los antígenos de *M. tuberculosis* pueden ser procesados a través de una “ruta alternativa” que no requiere su transporte por la vía exocítica para la presentación por moléculas MHC I [31]. También, recientemente se ha demostrado que los fagosomas procesan antígenos exógenos y presentan sus péptidos en el contexto de moléculas MHC I, y se ha postulado que la transferencia a la membrana de las células presentadoras de antígeno de dichos complejos péptido-MHC I, podría realizarse a través de la maquinaria de reciclaje del fagosoma [38].

Un linaje más de células T α/β que responde a *M. tuberculosis* son las denominadas doble negativas, ya que no expresan CD4 ni CD8. Estas células reactivas a los antígenos de *M. tuberculosis* presentan restricción por CD1, una molécula con una estructura similar a MHC-I que se asocia con β 2-microglobulina, y que es constitutivamente expresada por las células dendríticas maduras [39]. Los genes no polimórficos de la familia *CD1* (a,b,c,d, y e, en humanos) codifican para moléculas presentadoras de antígenos lipídicos, como es el caso de varios glicolípidos de *M. tuberculosis*, entre los que se encuentran los ácidos micólicos [40], el lipoarabinomanano y los fosfatidilinositolmanósidos (PIMs) [41], el monomicolato de glucosa [42], algunos glicolípidos isoprenoides [43] y un sulfátido [44]. Estas células T α/β con restricción antigénica CD1 secretan IFN- γ y presentan un perfil citotóxico. El blanco de la citotoxicidad de dichas células podrían ser las células dendríticas infectadas que expresan abundantemente las moléculas CD1 en su superficie [45, 46].

M. tuberculosis también tiene la capacidad de expandir de manera específica una población de células T humanas que expresan la variante $\gamma\delta$ del TCR (V γ 9V δ 2) [47]. Se ha demostrado que los individuos sensibilizados a antígenos micobacterianos (PPD+) tienen una mayor capacidad para activar células T $\gamma\delta$ en respuesta a *M. tuberculosis* que los individuos PPD- [47, 48], y que la vacunación con BCG potencia dicha expansión celular específica [48]. Asimismo, se ha descrito que la ausencia o disminución de dichas células en los pulmones o sangre periférica de los pacientes correlaciona con el grado de severidad de la enfermedad [49]. Las células T $\gamma\delta$ humanas reconocen moléculas pequeñas que contienen grupos fosfato [50], el reconocimiento de estas moléculas es dependiente del TCR, pero independiente de restricción por el MHC o incluso por moléculas como CD1. Sin embargo, los fosfoantígenos que se han descrito en las micobacterias son intracelulares, no secretados por el bacilo, y no se ha determinado cómo podrían ser presentados a las células T $\gamma\delta$. Con el uso de marcaje intracelular para citocinas se ha determinado que en respuesta a los antígenos fosfatados micobacterianos, las células T $\gamma\delta$ humanas producen tanto IFN- γ como TNF- α , *in vitro* [51, 52]. Así mismo, al igual que las células T CD8⁺, las células T $\gamma\delta$ pueden lisar macrófagos infectados [53].

Así, la respuesta de las células T humanas a la infección por *M. tuberculosis* está caracterizada por la participación de múltiples subtipos celulares T. Esta respuesta celular presenta una clara diferenciación Th1 caracterizada por la producción de IFN- γ [54, 55], que en el modelo murino se ha demostrado que es indispensable para el montaje de la respuesta granulomatosa y la resistencia a largo plazo [56, 57]. En contraste, la participación de una respuesta Th2 no parece ser relevante en la protección [58-61], aunque hay evidencias de que es necesaria para limitar los

efectos adversos de la exacerbación de la respuesta Th1 en los modelos murinos de tuberculosis [62, 63].

1.3.3 Inmunosupresión y anergia

La tuberculosis pulmonar activa está acompañada por signos de activación inmune sistémica, como son la hipergamaglobulinemia policlonal, altos niveles séricos de TNF- α y una alta expresión de HLA-DR en las células T circulantes [7]. Sin embargo, aunque las células T y los monocitos muestran éstas evidencias inespecíficas de activación, se ha demostrado que su capacidad para responder a estímulos específicos se encuentra afectada (utilizando antígenos micobacterianos). Se estima que de un 20 – 25 % de los pacientes con tuberculosis no responden a la prueba cutánea de la tuberculina. Empleando pruebas más sensibles, como la medición de la respuesta linfoproliferativa *in vitro* al PPD, se ha encontrado que los individuos con tuberculosis tienen disminuida dicha respuesta hasta en un 50%, comparada con individuos sanos que responden a la estimulación *in vitro* con PPD. Asimismo, la producción de IL-2 e IFN- γ por parte de dichas células estimuladas *in vitro* con PPD se encuentra disminuida [64].

Una de las hipótesis iniciales planteada por J.J. Ellner, en 1986, implicaba la participación de los fagocitos mononucleares en la inmunosupresión. En estos estudios se encontró que los pacientes con tuberculosis pulmonar activa pertenecían a dos grupos bien diferenciados: unos mostraban respuestas linfoproliferativas *in vitro* al PPD comparables con las de sujetos sanos, mientras que otros mostraban respuestas francamente deprimidas a dicho estímulo, sin correlación alguna por grupo étnico, sexo, edad, o evidencia radiográfica del avance de la enfermedad. Una diferencia era muy clara: el grupo de pacientes que presentaban respuestas disminuidas al PPD, presentaba

una mayor proporción de monocitos ($38.6\% \pm 4.5\%$ vs. $16.6\% \pm 3.6\%$, $P < 0.01$), los cuales una vez removidos por adherencia a superficies plásticas, permitían la recuperación de la respuesta blastogénica al PPD en dicho grupo de pacientes, hasta en veinte veces su valor original, aunque sin llegar a ser comparable a las respuestas de los individuos sanos. Dichas observaciones han tratado de explicarse en términos de una participación deficiente de los monocitos/macrófagos ($M\Phi$) como células presentadoras de antígeno (CPA), o bien a que podrían estar liberando factores solubles supresores de la respuesta Th1.

En cuanto a la función de los monocitos/macrófagos, se ha demostrado que al ser infectados *in vitro* con *M. tuberculosis*, se reducen sus capacidades como células presentadoras de antígeno [65]. También se ha demostrado que la infección inhibe la expresión de moléculas de clase II en la superficie de las CPA [66], lo que podría explicar en parte la disfunción. En cuanto a la participación directa de los monocitos/macrófagos en la inmunosupresión, se ha demostrado que los $M\Phi$ de pacientes con tuberculosis expresan en mayor grado el receptor para IL-2 ($IL-2R\alpha$), lo cual podría limitar la disponibilidad de la IL-2 para la proliferación clonal de las células T [67].

Otro de los mecanismos que ha recibido mucha atención es la producción de TGF- β por parte de los monocitos/macrófagos, y se ha demostrado que es significativamente más secretado por los $M\Phi$ de pacientes tuberculosos, que por los individuos sanos [68]. Además, el bloqueo de la actividad del TGF- β utilizando anticuerpos monoclonales normaliza la respuesta blastogénica al PPD, y favorece la producción del IFN- γ *in vitro* [68]. Se ha demostrado que el TGF- β bloquea la expresión de los complejos antígeno-MHC II en la superficie de las CPA, inhibe la blastogénesis de las células T y B, inhibe la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-1, e interfiere con

el señalamiento intracelular de muchas citocinas pro inflamatorias [69-73], además de facilitar la multiplicación intracelular de la micobacteria [74]. Otra de las citocinas producidas por monocitos/macrófagos, la IL-10, se ha reportado sobreproducida en la tuberculosis por algunos autores [75], aunque no por otros [60], pero se ha visto que el bloqueo *in vitro* de su actividad con anti-IL-10 también incrementa la respuesta blastogénica al PPD y sinergiza con el bloqueo de la actividad del TGF- β [76]. Todo ello podría contribuir *in vivo* a la inmunosupresión.

Sin embargo, ni la eliminación de las células adherentes supresoras, ni la neutralización del TGF- β e IL-10, ni la adición de IL-2 exógena permiten normalizar la producción *in vitro* del IFN- γ en células de pacientes tuberculosos inmunosuprimidos [77]. Incluso, cuando un tratamiento antituberculoso es llevado con éxito, la respuesta blastogénica al PPD y la producción de TGF- β por parte de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes (PBMCs) se normalizan en pocos meses, pero la producción de IFN- γ permanece suprimida, incluso hasta un año después de concluido el tratamiento [78]. Dicha deficiencia en la producción de IFN- γ por parte de las células T, a pesar de la restauración de la respuesta blastogénica y la normalización de la secreción de inmunosupresores endógenos como el TGF- β , sugiere la posibilidad de una disfunción intrínseca en las células T en la respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*. Sin embargo, la cuenta total, así como la proporción numérica TCD4⁺/TCD8⁺ es normal en la tuberculosis [79].

Recientemente se ha descrito que una subpoblación de células T CD4⁺, conocidas como células T reguladoras (Tregs), las cuales se caracterizan por presentar altos niveles de expresión de CD25, y que fueron originalmente descritas por su participación en el control de la

autoinmunidad [80], también tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune [81]. Particularmente se ha descrito que éstas células proliferan durante la infección por *M. tuberculosis*, y suprimen de manera antígeno-específica la respuesta inmune celular de tipo Th1 [82, 83].

Una posibilidad adicional que está siendo activamente investigada es la tendencia de las células T de los pacientes con tuberculosis pulmonar a presentar apoptosis. Se ha demostrado que los linfocitos T ($CD4^+$ y $CD8^+$) de los pacientes con tuberculosis presentan patrones de fragmentación de ADN, característicos de la apoptosis, que no se observan en individuos sanos, y que dicho evento es potenciado cuando las células son infectadas *in vitro* con la micobacteria (el 36.3% de las células $CD4^+$ de pacientes tuberculosos presentaron apoptosis, en contraste con sólo el 6% de las mismas células de individuos sanos). La apoptosis también parece ser específica, ya que no se presenta cuando las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los pacientes con tuberculosis son estimuladas con antígenos de otro patógeno [84].

También ha recibido mucha atención el papel regulador que podrían estar desempeñando las citocinas Th2, pero al igual que con la IL-10, no hay una participación clara de la IL-4 en la supresión de la respuesta inmune en la tuberculosis [60, 85, 86].

1.4 Inmunomodulación por glicolípidos

El estudio de los mecanismos moleculares de los que depende la supresión de la respuesta blastogénica de los linfocitos T, así como la activación de los monocitos/macrófagos en el contexto de la infección con *M. tuberculosis* es relativamente reciente. El PPD tiene la propiedad

de inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α por los M Φ , actividad atribuida también a ciertas proteínas del filtrado del medio de cultivo donde ha crecido *M. tuberculosis*. Tal es el caso de la proteína de 58 kDa, con probable actividad de glutamato sintetasa [87], y la de 30 kDa (Ag 85B), una de las más abundantemente secretadas por el bacilo [88]. De hecho la sola fagocitosis de *M. tuberculosis* constituye por sí misma una potente señal para la producción de citocinas [5]. En contraste, recientemente se ha descrito que las lipoproteínas de 19 y 24 kDa inhiben el procesamiento y la presentación de antígenos por un mecanismo dependiente de TLR-2 [89, 90].

Pero no sólo las proteínas tienen propiedades inmunomoduladoras. El género *Mycobacterium* es conocido por su alto contenido de lípidos, los cuales constituyen hasta el 40% del peso seco de la célula [91]. Dichos lípidos característicos se encuentran distribuidos en la gruesa pared celular que protege al bacilo, y son responsables de algunas propiedades como la alta impermeabilidad y la ácido-resistencia. Algunos lípidos, como los ácidos micólicos, se encuentran unidos covalentemente al complejo peptidoglicano-arabinogalactano, mientras que otros como el dimicolato de trealosa (TDM), los sulfolípidos (SL), las diacil y triaciltrealosas (DAT, TAT), los glicolípidos fenólicos (PGL), fosfatidilinositolmanósidos (PIM) y el lipoarabinomanano (LAM), se mantienen formando la capa más externa, unidos de manera no covalente. Recientemente se ha demostrado que el bacilo de Koch tiene la capacidad de secretar diversos tipos de moléculas no proteicas desde el interior del fagosoma en el que reside dentro del macrófago. Estas moléculas han sido encontradas en organelos diferentes al fagosoma, en la membrana celular, en el medio extracelular de la célula fagocítica e incluso en células vecinas no infectadas [91-94]. Entre los lípidos asociados a la pared celular de *M. tuberculosis*, el lipoarabinomanano (LAM) y

el fosfatidilinositolmanósido (PIM) han sido identificados como lípidos exportables [95, 96]. Estos lípidos son abundantemente producidos durante la infección, como se ha demostrado por la generación de anticuerpos específicos contra muchos de ellos [96, 97], y se ha postulado que su interacción específica o inespecífica con las membranas de las células del hospedero puede alterar funciones biológicas asociadas con la membrana, como la comunicación intercelular, la transducción de señales, los procesos de tráfico y fusión vesicular, etc., [98]. Así, mediante su interacción con las membranas celulares, los glicolípidos micobacterianos podrían contribuir de manera importante a la disfunción de las células T y los monocitos/macrófagos, característica en la tuberculosis. A continuación se describen químicamente los glicolípidos que por su distribución en la especie causante de la tuberculosis, y por sus propiedades biológicas estudiadas *in vitro*, podrían contribuir a la inmunosupresión generalizada encontrada en la fase crónica de la tuberculosis.

- *Lipoarabinomanano (LAM)*

De los glicolípidos de *M. tuberculosis* el lipoarabinomanano es uno de los más abundantes, encontrándose hasta 15 mg por gramo de masa celular [99]. Está formado por un polímero multiramificado de residuos de arabinosa unido al lipomanano (LM). Adicionalmente, la parte más externa del polímero multiramificado de arabinosa presenta un recubrimiento adicional (cap), lo que da lugar a las tres variantes estructurales de LAM que se han descrito, dependiendo de la especie de micobacteria de la que se obtenga (Ver **Apéndice C**). El ManLAM de las cepas virulentas Erdman y H37Rv, también encontrado en H37Ra y BCG se caracteriza por la presencia de un “cap” de residuos de manosa [100, 101], el PILAM encontrado en algunas

micobacterias de crecimiento rápido como *M. smegmatis* y *M. fortuitum*, presenta un “cap” de residuos de *myo*-inositol-fostato [102], mientras que el AraLAM de *M. chelonae*, una micobacteria no patógena, simplemente no presenta “cap” [103].

Aunque hay diferencias estructurales en los patrones de glicosilación y acilación de los diferentes LAM, las diferencias encontradas en sus propiedades biológicas han sido atribuidas principalmente a la composición del cap [104]. El AraLAM, pero no el ManLAM, se ha descrito que induce la quimiotaxis de macrófagos [104], así mismo, que el AraLAM es un inductor más eficiente de la producción de quimiocinas como MCP-3, pentaxina-3, IL-8, entre otras [105-108]. *In vivo*, la administración intratraqueal de ManLAM (obtenido de las micobacterias patógenas) no induce el reclutamiento de neutrófilos hacia el pulmón del ratón, como lo hace el AraLAM [109]; así mismo el cap de manosa del ManLAM parece estar involucrado en la modulación de las respuestas efectoras del macrófago, ya que el AraLAM es un potente inductor de la producción del TNF- α por el macrófago, en comparación con el ManLAM [110]. Además de ser un pobre inductor de la síntesis de citocinas, el ManLAM inhibe de manera directa la respuesta del macrófago induciendo la activación de la fosfatasa SHP-1, lo que resulta en la desfosforilación de muchas proteínas de señalamiento intracelular, incluyendo a las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógeno (MAPK; [111]. También, el ManLAM aislado de *M. tuberculosis* y de *M. bovis BCG* es incapaz de inducir la activación del macrófago dependiente de los receptores de tipo Toll (TLR-2), como ha sido descrito para el AraLAM de micobacterias no patógenas [112]. El ManLAM, además de inhibir la activación del macrófago por el IFN- γ [113], induce la producción del TGF- β [114], el cual interfiere con el señalamiento intracelular

iniciado por muchas citocinas pro inflamatorias [72], y se ha demostrado que facilita la multiplicación intracelular de la micobacteria [74]. De igual forma, se ha demostrado que el ManLAM de *M. bovis* inhibe la producción de IL-12 en células dendríticas humanas estimuladas con LPS, y que dicho evento es dependiente de la presencia del cap de manosa [115]. Más recientemente se demostró que el DC-SIGN, un receptor específico de células dendríticas altamente homólogo al Receptor de Manosa del macrófago (MR-1), media la internalización de *M. bovis* BCG por reconocimiento del ManLAM [116]. El reconocimiento del ManLAM por parte del receptor de manosa del macrófago [117, 118] y de DC-SIGN por parte de las células dendríticas puede ser perjudicial para el montaje de la respuesta inmune [119].

Adicionalmente a sus propiedades inhibitoras sobre la activación y la respuesta efectora del macrófago, el ManLAM también tiene la capacidad de suprimir la activación y proliferación de las células T *in vitro*. El ManLAM de *M. tuberculosis* se ha demostrado que inhibe la proliferación de clones T CD4⁺ humanas específicas para el virus de la influenza, dicho efecto inhibitor está relacionado con el procesamiento de los antígenos virales, ya que la inhibición en la proliferación no se presenta cuando se estimula con un péptido sintético que contiene el epítipo que es reconocido por dichas clonas de células T [120]. También se ha reportado que la inhibición que ejerce el LAM sobre la activación de las células T está asociada con la inhibición en la expresión del RNAm para algunas citocinas como IL-2, IL-3, GM-CSF, y para la cadena α del IL-2R [121].

- *Sulfolípidos*

Los sulfolípidos constituyen una familia de cinco glicolípidos sulfatados que hasta el momento solo han sido identificados en *M. tuberculosis*. Esta familia se caracteriza por la presencia de un grupo sulfato en la posición 2 de una de las dos glucosas que integran la trealosa (Ver **Apéndice C**). Los miembros de la familia se distinguen entre sí por el número y tipo de los sustituyentes acilo y por la posición que ocupan en la trealosa. Los sustituyentes acilo de 16 – 18 átomos de carbono presentan insaturaciones, además de las características metilaciones hacia el extremo carboxilo. El sulfátido preponderante de la familia es el 2,3,6,6'-tetraacil- α,α' -D-trealosa 2'sulfato ó sulfátido I (SL-I) [122]. A este glicolípidos se le atribuyó la propiedad de inhibir la maduración fagosomal, un evento que ocurre después de la fagocitosis de cepas virulentas de micobacterias; sin embargo más tarde el mismo autor proporcionó evidencias alternativas para explicar dicha inhibición [123]. Aunque se ha demostrado que el SL-I estimula la producción de superóxido por los neutrófilos [124], también es cierto que inhibe el “priming” con IFN- γ de los macrófagos, lo que resulta en inhibición de la producción de superóxido al estimular las células con PMA [125, 126]. Recientemente se han identificado dos genes esenciales para la biosíntesis del SL-I, *pks2* [127] y *mmpL8* [128], y se ha encontrado que las micobacterias mutantes para *mmpL8*, incapaces de sintetizar sulfolípido, presentan un fenotipo atenuado en cuanto a su virulencia en el modelo murino [129, 130].

- *Glicolípidos fenólicos*

Además de encontrarse en *M. tuberculosis*, distintas variedades de glicolípidos fenólicos se han descrito en *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. gastri* [131, 132],

M. haemophilum [133] y *M. ulcerans* [134]. Estructuralmente están formados por un grupo fenol derivado biosintéticamente de la tirosina, al que se encuentra unido un beta-diol de 33 – 41 átomos de carbono por dos cadenas de ácido graso de 27 – 34 carbonos (Ver **Apéndice C**). Dichas cadenas también son multi-metiladas, como las de los sulfolípidos. Adicionalmente, desoxiazúcares de 1 – 4 unidades o algún oligosacárido metilado se encuentran unidos al grupo fenólico [135-137], siendo esta parte sacarídica la responsable de especificidad antigénica entre distintos glicolípidos fenólicos. Particularmente, se ha encontrado que la cepa Canetti de *M. tuberculosis* produce un glicolípido fenólico [138].

Estos glicolípidos son antigénicos, ya que se ha demostrado la producción de anticuerpos específicos anti-PGL-I en pacientes con lepra [139, 140], y anti-PGL-tb en pacientes con tuberculosis [141], así mismo se ha evaluado su potencial utilidad en el inmunodiagnóstico de la lepra y la tuberculosis [142]. Se ha demostrado que el glicolípido fenólico purificado de *M. leprae* (PGL-I) inhibe la producción de radicales libres derivados del oxígeno (ROI) en macrófagos humanos derivados de monocitos estimulados con la micobacteria [143-145], aunque también se ha postulado que dicho efecto inhibitorio no es sobre la producción, sino sobre la disponibilidad de éstos, ya que el PGL-I actúa secuestrando grupos reactivos como el OH y O₂⁻ y no como un inhibidor enzimático [146]. También, se ha demostrado que el PGL-1 de *M. leprae* favorece la invasión de las células de Schwann en el sistema nervioso periférico [147]. En cuanto a la respuesta de las células T humanas, se ha demostrado que PGLs con distintos determinantes sacarídicos inhiben indistintamente la linfoproliferación estimulada con antígenos o mitógenos [148, 149].

- *Trealosas di- y tri- aciladas* (DATs y TATs)

Entre los ésteres de trealosa que elaboran las micobacterias, la 2,3-diacil y la 2,3,6-triaciltrealosa (DAT y TAT, respectivamente) son producidos por *M. tuberculosis* [150, 151]. Estos ésteres de trealosa también se encuentran asociados con la pared celular y se diferencian entre sí por sus patrones de acilación y por el tipo de ácido graso que se encuentra esterificado a la trealosa (Ver **Apéndice C**). Los individuos afectados por la tuberculosis presentan altos títulos de anticuerpos específicos anti-DAT, lo que ha permitido su evaluación como candidatos potenciales para diagnóstico serológico [152, 153].

Curiosamente, *M. fortuitum*, especie atípica que es causante de infecciones oportunistas, también sintetiza estos glicolípidos [154]. El DAT de ambas especies es similar antigénicamente, ya que los anticuepos anti-DAT de pacientes con tuberculosis reaccionan indistintamente de manera cruzada contra ambos [155]. Recientemente se ha demostrado que el DAT inhibe la proliferación de linfocitos T *in vitro* [156]. Dicha inhibición es independiente del estímulo de activación, ya que se presenta cuando la proliferación celular se induce con antígenos micobacterianos, antígenos no relacionados (proteína total de *Toxoplasma gondii*) y aun con el mitógeno concanavalina A (Con A).

2. ANTECEDENTES

Previamente se había demostrado que las di-*O*-aciltrealosas inhiben la respuesta blastogénica de las células T [156]. Lo anterior fue demostrado infectando ratones BALB/c con taquizoitos de una cepa termosensible de *Toxoplasma gondii*, y las células del bazo fueron empleadas en los ensayos de proliferación celular usando proteína total del parásito como antígeno. Aunque el DAT de *M. tuberculosis* presenta variaciones estructurales en la composición de los sustituyentes acilo esterificados a la trealosa, respecto al DAT derivado de *M. fortuitum*, ambos inhiben la blastogénesis de las células T de manera comparable. De igual forma, empleando el mitógeno Con A como activador policlonal de las células T, se obtienen resultados similares de inhibición en la linfoproliferación en las células tratadas con DAT [156].

Como ya se ha descrito, la pared celular de *M. tuberculosis* contiene una gran cantidad de lípidos y glicolípidos con propiedades inmunosupresoras. Dichos efectos varían desde la inhibición de la linfoproliferación y la producción de IFN- γ por parte de las células T, hasta la inhibición del estallido respiratorio y la presentación de antígenos por parte de los macrófagos y otras células presentadoras profesionales.

Actualmente se considera que los glicolípidos micobacterianos ejercen una actividad inmunosupresora inespecífica debido a que se liberan de la pared celular del bacilo y se insertan en la membrana celular, cambiando la composición y fluidez de la bicapa lipídica, y por lo tanto alterando sus propiedades biológicas [98]. Una evidencia en favor de dicha hipótesis es el haber demostrado que, tanto glicolípidos de bajo peso molecular como los PIMs, así como glicoconjugados complejos como el LAM pueden ser “exportados” desde el fagosoma de los

macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, llegando a localizarse incluso en la membrana celular de células vecinas no infectadas [95, 96].

Por otra parte, recientemente se logró demostrar que los glicolípidos de alta polaridad de *M. avium* inducen la movilización/reorganización de las balsas de lípidos (rafts), en macrófagos J774 estimulados con perlas de látex recubiertas por glicolípidos [157]. Así mismo se ha demostrado que la interacción del LAM de *M. tuberculosis* con los rafts es un evento requerido, previo a la inhibición de la maduración fagosomal en los macrófagos infectados [158].

Lo anterior sugiere que si bien los glicolípidos de *M. tuberculosis* pueden insertarse de manera inespecífica en las membranas, existe la posibilidad de que al alterar la movilidad y/o composición de las balsas de lípidos, inhiban las vías de señalamiento implicadas en la activación de las células del sistema inmune. Considerando que actualmente se desconocen las bases moleculares detrás del efecto inmunosupresor de los glicolípidos de *M. tuberculosis*, nos propusimos profundizar en el conocimiento de dichos mecanismos mediante el estudio del efecto inmunosupresor de las 2-3-di-*O*-aciltrealosas (DAT).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio del efecto inmunosupresor de los lípidos de *M. tuberculosis* aborda tres aspectos centrales del montaje de la respuesta inmune: a) el procesamiento y la presentación de antígenos en el contexto de las moléculas del MHC de clase II por parte de los macrófagos y células dendríticas, b) la proliferación clonal de las células T, y c) la producción de las citocinas efectoras derivadas de la activación de las células T. Cada uno de estos tres aspectos es inhibido en mayor o menor grado por los diversos glicolípidos de la micobacteria. Aunque estos tres aspectos son igualmente importantes, en el presente trabajo nos enfocamos en el estudio del efecto inmunosupresor del DAT sobre las células T.

El DAT inhibe la blastogénesis de las células T [156]. Las células T maduras alcanzan la circulación periférica y se mantienen en un estado no-activado, en la fase G₀ del ciclo celular, hasta el momento en que se genera el reconocimiento de antígeno por parte de su receptor (TCR) y su unión de alta afinidad al péptido presentado por las CPA en el contexto de las moléculas del MHC de clase II. El reconocimiento de antígeno por parte de las células T a través del TCR desencadena la activación de varias vías de señalamiento intracelular que reactivan la progresión del ciclo celular y su entrada a la fase S.

La progresión del ciclo celular promovida por la estimulación mitogénica/antigénica está mediada por los complejos formados por las Ciclinas y las Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs) [159].

La Ciclina D1 juega un papel central en la regulación de la proliferación celular ya que constituye el nexo entre las señales mitógenicas externas y la progresión del ciclo celular hacia la fase G1 al unirse a la CDK4 y 6 [160]. Por otra parte, las ciclinas E y A se unen a la CDK2 y regulan la progresión de la fase G1 y la transición a la fase S, promoviendo de manera irreversible la mitosis celular. La unión de la Ciclina E con la CDK2 controla la progresión del ciclo de la fase G1 a la fase S, mientras el complejo Ciclina A/CDK2 regula el inicio de la replicación del DNA [159]. Finalmente la transición a través de G2/M es controlada por la Ciclina B y la CDK1 [161].

La expresión del gen de la Ciclina D1 es regulada a nivel transcripcional mediante el pegado del complejo AP-1 (Jun/Fos) y NF- κ B en la región del promotor, y se ha demostrado que en diversos tipos de células la activación de AP-1 es dependiente de la activación de la vía de señalamiento de las Cinasas Activadas por Mitógeno (MAPK), en tanto que la vía canónica de activación de NF- κ B está ligada a la activación de la Pi3-K y la PKC. Todas ellas a su vez dependientes de la activación de la Fosfolipasa C (PLC- γ).

Considerando que el DAT es capaz de inhibir un evento tardío en la activación de las células T, como es la proliferación linfoblástica, se propuso estudiar su probable efecto sobre la activación temprana de las principales vías de señalamiento involucradas en la progresión del ciclo celular, así como determinar los alcances de la inmunomodulación en el contexto de la infección por *M. tuberculosis* en un modelo experimental en ratón.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la inmunosupresión por DAT en el contexto de la infección por *M. tuberculosis* en un modelo experimental en ratón y estudiar el probable efecto del glicolípidos sobre la activación temprana de las principales vías de señalamiento involucradas en el montaje de la respuesta de las células T.

5. HIPOTESIS

Las propiedades inmunosupresoras del DAT derivan de su capacidad para modular las vías de señalamiento acopladas a la activación de las células del sistema inmune.

6. MATERIAL Y METODOS

Reactivos. Los reactivos para la preparación del medio de cultivo Sauton modificado se adquirieron de Sigma-Aldrich Corp., (St. Louis, MO. EUA). Los solventes grado reactivo y HPLC empleados para los procesos de purificación fueron adquiridos de J.T. Baker (D.F., México). Los reactivos empleados en la preparación de medios de cultivo celular fueron adquiridos a Sigma - Aldrich Corp., (St. Louis, MO. EUA) y a Invitrogen Life Technologies, (Carlsbad, CA. EUA). Los reactivos para la cuantificación de citocinas por ELISA se adquirieron de BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA. EUA).

Material biológico. Para la obtención del DAT se utilizó la cepa ATCC6841 de *Mycobacterium fortuitum*, por ser una especie de rápido crecimiento que sintetiza DAT, el cual posee propiedades biológicas similares a las reportadas para el DAT de *M. tuberculosis* [155, 156]. Para los ensayos de actividad biológica se emplearon grupos de al menos 3 ratones hembra de 3-4 semanas de edad de la cepa BALB/c. La infección de los ratones BALB/c en el modelo experimental de tuberculosis se llevó a cabo con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv.

Purificación del DAT. La cepa ATCC6841 de *Mycobacterium fortuitum* se creció a 37 °C en medio Sauton modificado, sin agitación. Las células fueron cosechadas durante la fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente dos semanas después) y se obtuvo la biomasa por filtración y la fracción lipídica cruda por extracción con cloroformo-metanol (1:2 + 2:1, v/v). El extracto lipídico crudo fue fraccionado en columnas de florisil, y cada una de las fracciones

fueron analizadas por cromatografía en capa fina. Los lípidos glicosilados fueron evidenciados revelando con antrona (0.2% en ácido sulfúrico) a 110 °C. Posteriormente las fracciones enriquecidas en DAT fueron precipitadas con metanol a 4 °C, y los sobrenadantes libres de micelatos fueron evaporados a sequedad. El DAT fue semipurificado de las fracciones enriquecidas por cromatografía en capa fina preparativa, (cloroformo-metanol-agua; 60:16:2, v/v/v) y finalmente purificado a través de una minicolumna de sílica gel (Sep-Pack; Waters, Milford, Mass.) El DAT puro se mantuvo en atmósfera inerte de argón, a -20 °C, hasta su uso.

Ensayos de linfoproliferación. El DAT fue disuelto en hexano-etanol (1:1, v/v) y depositado por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge, Mass.), a una concentración final de 25.0, 50.0, y 100.0 µM. El solvente se evaporó a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad, y a cada pozo se agregaron 1×10^5 células de bazo de ratones BALB/c en 100 µl de medio RPMI1649 suplementado con piruvato de sodio (1 mM), aminoácidos no esenciales (0.01 mM), HEPES (25 mM), L-Glutamina (2 mM), 2-Mercaptoetanol (0.05 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y suero fetal bovino (10% v/v). Después de dos horas de exposición al DAT, incubando a 37 °C en atmósfera de 5%CO₂-95% aire, se indujo la proliferación celular adicionando Con A disuelta en 100 µl del medio suplementado, a concentraciones finales de 1.0 y 3.0 µg/ml, o una combinación de PMA (10 nM) + Ionomycin (0.5 µM). Los cultivos fueron incubados por 72 horas más bajo las mismas condiciones, y posteriormente se evaluó la proliferación celular por incorporación de ³[H]-timidina durante las últimas 18 horas de cultivo.

Determinación de citocinas por ELISA. Para la obtención de sobrenadantes de cultivos, los ensayos se escalaron a placas de 24 pozos (Costar, Cambridge, MA., EUA.) con 6×10^5 células totales de bazo (BALB/c) en 1.2 ml de medio RPMI 1649 suplementado. Se indujo la proliferación celular adicionando Con A (Sigma, St. Louis, MO. EUA) a una concentración final de 3.0 $\mu\text{g/ml}$. De acuerdo con ensayos previos se había determinado que el estímulo con 1.0 $\mu\text{g/ml}$ no permitía la detección de algunas de las citocinas de interés.

Los cultivos fueron incubados por 24, 48 y 72 horas a 37 °C en atmósfera de 5% CO_2 -95% aire, al término de las cuales se recuperaron los sobrenadantes para la determinación por ELISA de IL-2, IL-4 e IFN- γ . Se utilizaron los kit OptEIA (Pharmingen, San Diego, CA. EUA) para cada una de ellas, siguiendo las instrucciones del proveedor. El tiempo óptimo para la detección por ELISA fue a las 48 horas.

Brevemente, las placas de ELISA (Nunc-Immuno™Plate, Nalge Nunc International, Rochester, NY., EUA), fueron sensibilizadas con el anticuerpo de captura correspondiente (1:250 en el buffer de sensibilización: NaHCO_3 0.1 M, pH 8.2) durante 12 horas a 4 °C. Después de dos lavados con PBS/Tween (0.5% v/v) se realizó el bloqueo con albúmina sérica bovina (BSA 3% en PBS, m/v), por 2 horas a 25 °C. Muestras y estándar fueron diluidos en medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado), agregados a 100 μl /pozo, e incubados por 12 horas a 4 °C. Para la detección se utilizaron los anticuerpos biotinilados correspondientes (diluidos 1:250 en PBS/BSA 1%, m/v), y para el revelado se empleó avidina-peroxidasa (1:500 en PBS/BSA 1% m/v) y ABTS como sustrato (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA., EUA).

Expresión de genes de citocinas por RT-PCR. Para determinar si el DAT afecta transcripcionalmente la expresión de genes de citocinas, se midió por RT-PCR semi-cuantitativamente la expresión de los genes IL-2, IL-4, IL-12p40, IFN- γ y TNF- α en células de bazo de ratón expuestas al DAT (100 μ M) durante dos horas antes de estimular la proliferación con Con A (1.0 μ g/ml). Las células de bazo de ratones naive (6×10^5 /ml) fueron estimuladas con la Con A durante 24 horas, mientras que las células de bazo de ratones infectados con *M. tuberculosis* fueron estimuladas con proteína total de la cepa H37Rv durante 96 horas antes de cuantificar la proliferación celular. Los tiempos de estimulación fueron determinados previamente como los óptimos para la medición de la expresión de los genes de interés por RT-PCR. En cada uno de los tiempos indicados se cosecharon las células y se guardaron a -20°C hasta la extracción del RNA. Brevemente, las células fueron lisadas en 1.0 ml del reactivo comercial TRI REAGENT (Sigma, St. Louis, MO., EUA), y los sobrenadantes fueron recuperados por centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos, a 4 °C. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo para extraer las proteínas hacia la fase orgánica, y después de centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el RNA fue precipitado a partir de la fase acuosa con 0.5 ml de isopropanol. La pastilla de RNA fue lavada con 1.0 ml de etanol al 75% para eliminar sales residuales. Para eliminar la posibilidad de contaminación con DNA genómico, las muestras fueron sometidas a digestión con DNAsa I (1.0 U/mg de RNA, Invitrogen Life technologies). La integridad del RNA extraído se verificó visualmente por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en condiciones desnaturalizantes, y la cantidad y concentración del mismo por espectrofotometría ($A_{260 \text{ nm}}$).

Síntesis de los DNAc. Se llevó a cabo con 2.0 µg de RNA total en un volumen de 30 µl, bajo condiciones estándar [Oligo dT₁₂₋₁₈, 33 µg/ml; buffer para transcripción reversa 1X; DTT, 6.6 mM; dNTPs, 333 µM, y 13 U/ml de la transcriptasa reversa MMLV-RT, Gibco-BRL]. La reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 60 minutos.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la determinación semicuantitativa de la expresión de genes de citocinas se utilizaron los siguientes primers: IL-2 (5'-ATGTACAGCATGCAGCTAGCATC-3' y 5'-GGCTTGTTGAGATGATGCTTTGA CA-3'), IL-4 (5'-CCAGCTAGTTGTCATCCTGCTCTTCTTTCTCG-3' y 5'-CAGTGATGTGGACTTGGACTCATTTCATGGTGC-3'), IL-12p40 (5'-CAGAAGCTAACCA TCTCCTGGTTTG-3' y 5'-TCCGGAGTAATTTGGTGCTTCACAC-3'), IFN-γ (5'-TG AACGCTACACACTGCATC TTGG-3' y 5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG-3') y TNF-α (5'-ATGAGCACAGAAA GCATGATCCGC-3' y 5'-CCAAAGTAGACCTGCCCGGACTC-3'). Como control para normalizar la expresión se amplificó una región de 452 bp del gen constitutivo G3PDH (5'- ACC ACAGTCCATGCCATCAC-3' y 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGT-3'). Los productos amplificados para dichos pares de primers son: IL-2 (504 pb), IL-4 (360 pb), IL-12p40 (398 pb), IFN-γ (462 pb) y TNF-α (694 pb).

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl, usando buffer de PCR 1X [KCl, 50mM; Tris-HCl (pH 8.3), 20 mM; MgCl₂, 2.5 mM; glicerol 0.2% v/v; DMSO, 0.2% v/v], 375 nM de cada primer, 300 µM de dNTPs, 1.5 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen Life Technologies), y 4.5 µl del DNAc (equivalente a ~ 250 ng de RNA). Se realizaron 30 ciclos de amplificación, en un termociclador Perkin-Elmer (Gene Amp PCR System 2400, Wellesley,

MA., E.U.A), bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, desnaturalización al final de cada ciclo 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 40 segundos, extensión a 72 °C por 1 minuto, y extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos amplificados para cada gen fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %, comparados contra estándares comerciales de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder, Invitrogen) y cuantificados por densitometría óptica (Fluor-S, MultiImager System, y Quantity One Software v4.5, Biorad, Hercules, CA., EUA). Los resultados normalizados se reportan como el porcentaje de la expresión del gen constitutivo G3PDH.

Infección con *M. tuberculosis* H37Rv y modulación del perfil de expresión Th1. Se empleó el modelo murino de infección por vía intratraqueal (ITT) establecido por el Dr. Rogelio Hernández Pando (INCMNSZ). Se emplearon grupos de 10 ratones de 14 y 21 días de infección con H37Rv (1×10^6 micobacterias/ratón). Los bazo fueron retirados asépticamente y las células se trabajaron bajo estrictas condiciones de bioseguridad (BSL-III). Los tiempos de infección corresponden a la fase en la que los ratones mantienen una respuesta celular Th1, de acuerdo con el modelo experimental previamente descrito [162].

Para determinar la cinética de expresión de los genes de citocinas (il-2, il-4, ifn- γ , tnf- α , e il-12p40), las células de bazo de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* fueron estimuladas *in vitro* durante 12, 24, 48, 72, y 96 horas. Se cosecharon las células, se extrajo el RNA total y se determinó semicuantitativamente la expresión de dichos genes como se describió previamente. Para evaluar el efecto del DAT sobre la expresión de los genes de interés las células de bazo fueron expuestas a DAT (100 μ M) durante dos horas, incubando a 37 °C en

atmósfera de 5% CO₂-95% aire, antes de ser estimuladas con proteína total de H37Rv (5.0 µg/ml) durante 96 horas.

Proliferación celular con PMA + ionomicina. Los ensayos se realizaron en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA., EUA.), con 1×10^5 células murinas de bazo (BALB/c) en 0.2 ml de medio RPMI-1649. Se indujo la proliferación celular con PMA (acetato de 12-forbol-13-acetato, 10 nM) + Ionomicina (0.5 µM). Dichas dosis fueron las óptimas para la inducción de la proliferación celular, de acuerdo con resultados de ensayos preeliminares medidos en un rango de concentraciones de 0 – 40 nM, y 0 – 1.0 µM, respectivamente. Los cultivos fueron incubados durante 72 horas a 37°C en atmósfera de 5%CO₂-95% aire, al término de las cuales se evaluó la proliferación celular por incorporación de ³H-timidina.

Para determinar si el DAT tenía efecto sobre la proliferación celular inducida con PMA + Ionomicina, éste fue disuelto en hexano-etanol (1:1, v/v) y depositado por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos, a una concentración final de 12.5, 25.0, 50.0 y 100.0 µM. El solvente se evaporó a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad, y posteriormente se agregaron 1×10^5 células de bazo/pozo. Las células se mantuvieron expuestas al lípido por dos horas antes de estimular la proliferación celular con PMA + Ionomicina, a las dosis antes indicadas.

Western Blot. Las células totales de bazo de ratones BALB/c se incubaron durante dos horas con el glicolípido DAT (100 µM) en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, a 37 °C en atmósfera de CO₂ (5%). El contenido de suero en el medio de cultivo se redujo al 5% por dilución 1:1 agregando medio RPMI libre de suero, y al término de dos horas mas de

incubación, las células fueron estimuladas con Con A (1 µg/ml) o PMA (25 nM) durante 15 ó 30 minutos en presencia del DAT. Al término de la incubación, las células fueron resuspendidas en 150 µl de buffer de lisis [20 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.5 mM EGTA; 1.0 mM EDTA; 10 mM 2-mercaptoetanol; 1.0 mM PMSF; 40 mM β-glycerofosfato; 10 mM pirofosfato de sodio; y 0.5% Triton X-100] suplementado con DNAsa I (2.0 U/ml) y un *pool* de inhibidores de proteasas (Sigma, 10% v/v). Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford, y aproximadamente 30 µg de proteína se resolvieron por electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnatularizantes (SDS-PAGE, 15% m/v), y posteriormente transferidas a membranas de PVDF, las cuales se incubaron con los anticuerpos primarios anti-IκB-α (H-4, 1:1000), anti-ERK (1:4000) y anti-fosfo-ERK (pThr²⁰²/pTyr²⁰⁴; 1:1000). Los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidada (HPR) y la adición de un sustrato quimioluminiscente permitieron el desarrollo de la reacción. La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría y en cada caso normalizadas por su contenido de β-actina usando el anticuerpo correspondiente (1:10,000). En cada caso los datos normalizados se expresan como el porcentaje de la señal correspondiente a las células no tratadas (fosforilación basal de ERK y de IκB-α).

Actividad bioquímica de la PKC. Para medir la actividad bioquímica de la PKC se empleó el método no radiactivo de Promega (Madison, WI, USA), en el que un sustrato específico marcado con fluorescencia cambia su carga eléctrica y sus propiedades electroforéticas al ser fosforilado por la PKC, lo que permite separar y cuantificar la fracción fosforilada del sustrato mediante electroforesis en gel de agarosa. Brevemente, las fracciones celulares conteniendo PKC (1.0 µg

de proteína) o bien PKC (α,β,γ) recombinante (0.1 μg) se incubaron en un buffer de reacción [HEPES (pH 7.4), 100 mM; CaCl_2 , 6.5 mM; DTT, 5mM; MgCl_2 , 50 mM; ATP, 5 mM], conteniendo además el sustrato específico fluorescente C1 (P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K, 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y el co-activador fosfatidilserina (1 mg/ml), durante 30 minutos a 30 °C. La reacción se detuvo colocando los tubos a 100 °C durante 15 minutos más, y posteriormente las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 0.8 %. La forma fosforilada y sin fosforilar del péptido C1 fueron separadas por electroforesis en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 (100 V, 15 minutos), y las bandas correspondientes fueron visualizadas bajo luz UV y digitalizadas para su análisis por densitometría.

7. RESULTADOS

7.1 Purificación del DAT

En el presente estudio utilizamos *M. fortuitum* (ATCC 6841) como fuente alterna para la purificación del DAT (2,3, di-O-aciltrealosa) por tratarse de una micobacteria no patógena, de rápido crecimiento y que sintetiza DAT con propiedades biológicas equivalentes a las del DAT de *M. tuberculosis* [155, 156]. El compuesto puro presentó una movilidad cromatográfica equivalente a la de un estándar previamente caracterizado por espectrometría de masas (**Figura 1**).

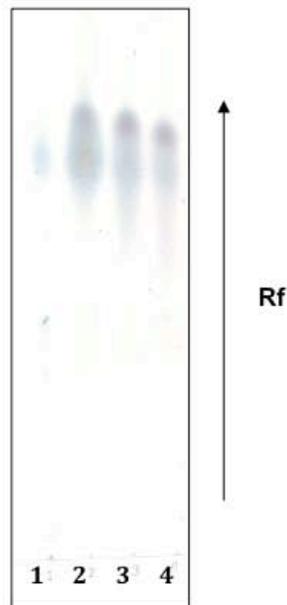


Figura 1. DAT purificado a partir de *M. fortuitum* (ATCC6841). Se muestra el corrimiento cromatográfico en capa fina (cloroformo/metanol/agua, 60:16:2) de un estándar previamente caracterizado (1), y de tres productos purificados (2, 3,y 4) por cromatografía en columna de florisil (30-40 mesh), y sílica-gel (Sep-Pack, Waters, Milford, MA). Los lípidos glicosilados se revelaron calentando la placa a 110 °C, en antrona (0.2% en ácido sulfúrico).

7.2 Efecto del DAT sobre la proliferación de las células T

Una fracción representativa del lote de DAT purificado de *M. fortuitum* (ATCC 6841) fue probado en ensayos de linfoproliferación de células T, empleando el mitógeno Con A (1.0 µg/ml). Como era esperado, el efecto inhibitorio sobre la linfoproliferación de las células totales de bazo (esplenocitos) fue dependiente de la dosis empleada del DAT. La inhibición de la proliferación celular fue del 28, 36 y 46% , a 25, 50 y 100 µM de DAT, respectivamente (**Figura 2a**). La incubación de las células con el disacárido puro no tiene ningún efecto sobre la linfoproliferación de los esplenocitos, por lo que sus efectos inmunosupresores se atribuyen a la parte lipídica de la molécula. Para demostrar que el DAT afecta directamente a las células T, se purificaron las células T CD4⁺ por citometría de flujo a partir de los esplenocitos totales, y como puede verse en la **Figura 2b**, el DAT inhibe su proliferación hasta en un 36% y 47% con 50 y 100 µM de DAT, respectivamente.

7.3 El DAT inhibe la producción de citocinas.

En experimentos preeliminares (no mostrados) se había encontrado que al término de 72 horas de estimulación con 1.0 µg/ml de Con A se detectaba la producción de IFN-γ mediante la técnica de ELISA (hasta 200 pg/ml), pero no se detectaba la producción de IL-2 y de IL-4, por lo que se procedió primeramente a determinar la cinética de producción de dichas citocinas en los sobrenadantes de los cultivos estimulando las células con una dosis más alta de Con A (3.0 µg/ml), para establecer parámetros óptimos que nos permitieran posteriormente evaluar el efecto del DAT sobre su producción.

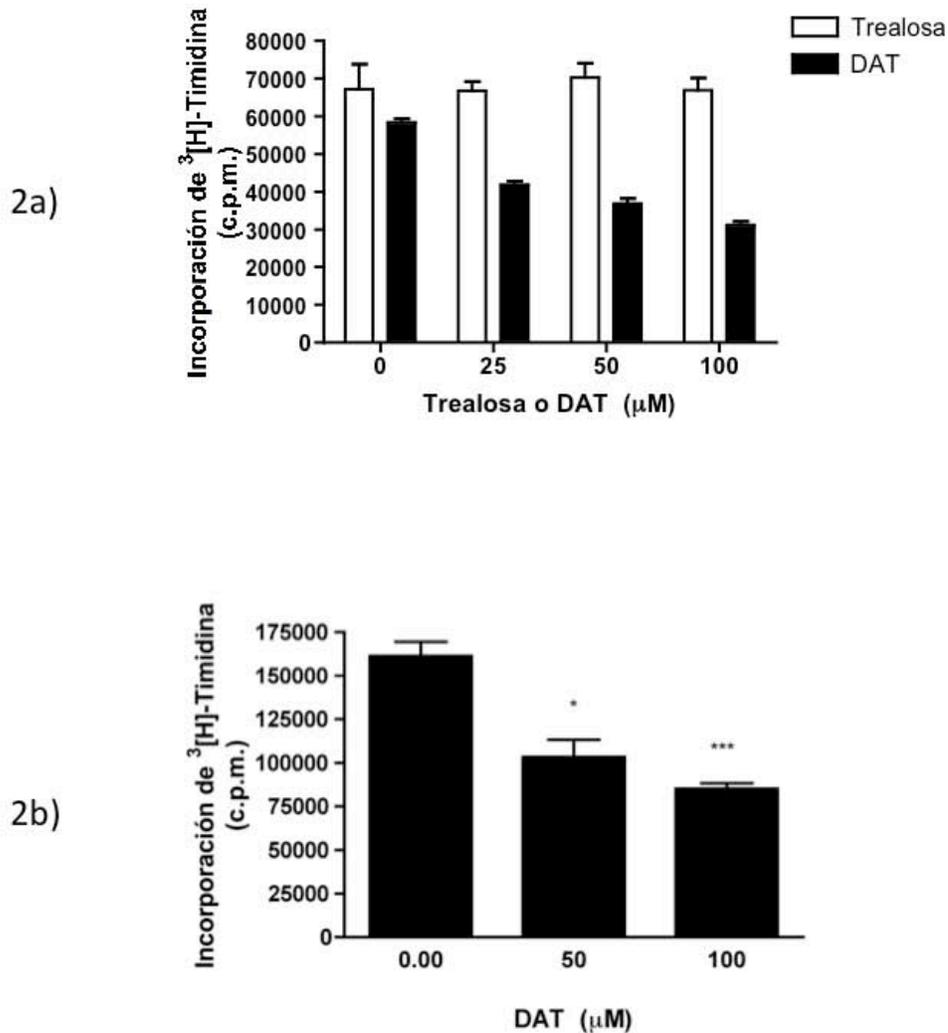


Figura 2. Efecto del DAT sobre la proliferación de las células T. Las células de bazo (2a), o células T CD4+ purificadas por citometría de flujo (2b) fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con el glicolípidio DAT o trealosa a las dosis indicadas. Posteriormente las células fueron estimuladas con el mitógeno Con A (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 72 horas, y la proliferación celular fue medida por incorporación de ^3H -timidina. En cada caso se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente, y analizados mediante la prueba “t” de student (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Para ello, se recuperaron los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos estimulados con Con A (3.0 µg/ml) a 24, 48 y 72 horas post-estimulación, y se cuantificó la producción de IL-2, IL-4 e IFN-γ por ELISA. Como puede observarse en la **Figura 3a**, a las 48 horas de estimulación con el mitógeno fue posible detectar niveles relativamente altos para las tres citocinas de interés, por lo que este tiempo de incubación fue el utilizado en los ensayos siguientes. Para determinar si el DAT ejerce algún efecto sobre la secreción de estas citocinas, como se ha reportado para otros glicolípidos de micobacterias, las células totales de bazo fueron expuestas al DAT durante 2 horas antes de ser estimuladas con el mitógeno. El DAT (50 y 100 µM) inhibió la secreción de IFN-γ (24 y 39%) y de IL-4 (36 y 49%), respectivamente, como se muestra en la **Tabla 1** y en la **Figura 3b**. Aunque también encontramos inhibición en la producción de IL-2, ésta fue de solamente el 9.2 %, y no resultó estadísticamente significativa. En células no estimuladas (control negativo) la secreción de citocinas fue indetectable (los límites de detección de la técnica de ELISA empleada para cuantificar estas citocinas fueron: IL-2, 7.8 pg/ml; IL-4, 5.8 pg/ml; IFN-γ, 15.6 pg/ml).

Tabla 1. Inhibición en la secreción de citocinas.

Citocina (pg/ml)	Sin DAT	DAT (50 µg/ml)	% I ¹	DAT (100 µg/ml)	% I ¹
IL-2	722.2 ± 4.0	768.0 ± 12.5	-6	655.7 ± 32.5	9.2
IL-4	400.0 ± 20.0	254.4 ± 12.2	36.4	203.3 ± 30.0	49.1
IFN-γ	1240.0 ± 85.0	940.0 ± 25.0	24.1	760.0 ± 15.0	38.7

¹ Porcentaje de inhibición: $100 - [(secreción\ en\ presencia\ de\ DAT \times 100) / secreción\ en\ ausencia\ de\ DAT]$.

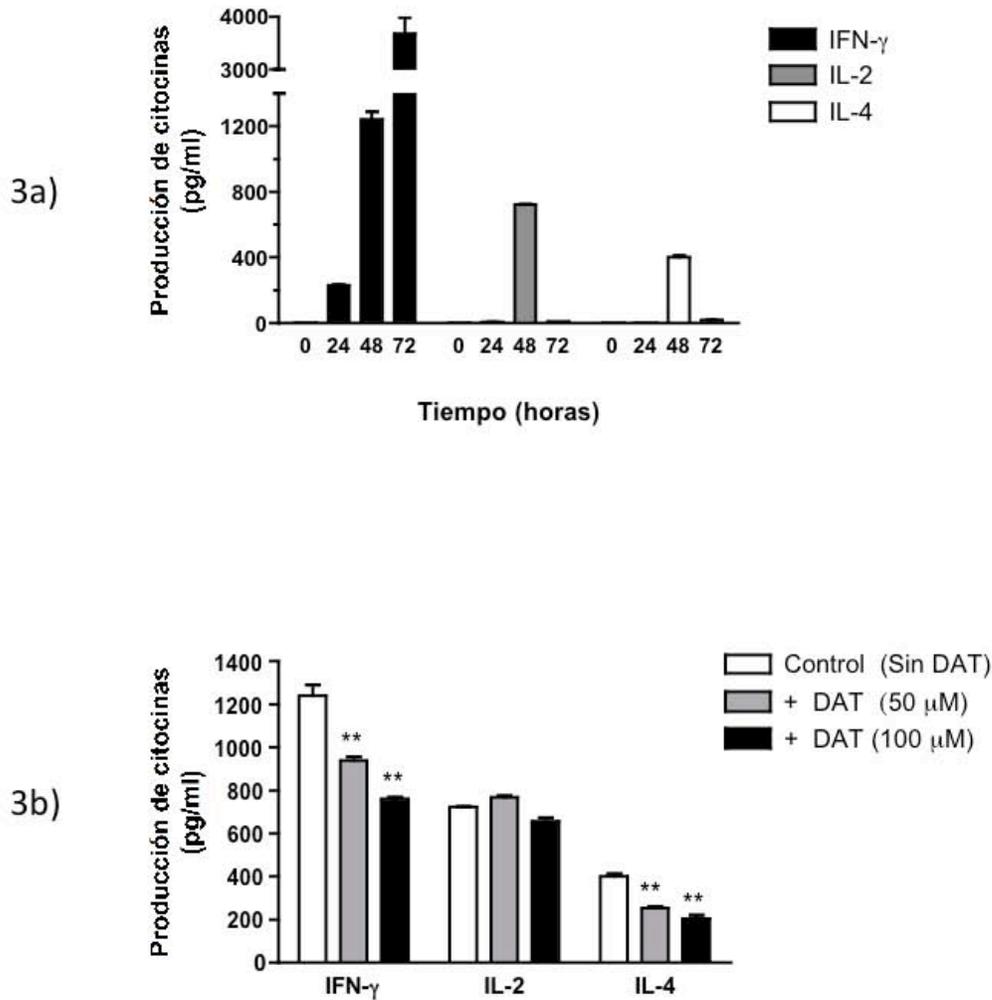


Figura 3. El DAT inhibe la producción de citocinas. 3a) Las células de bazo fueron estimuladas con el mitógeno Con A (3.0 $\mu\text{g/ml}$) durante 24, 48 y 72 horas, y se cuantificó la secreción de las citocinas en los sobrenadantes de los cultivos, mediante la técnica de ELISA. 3b) Las células de bazo fueron incubadas con diferentes dosis de DAT durante 2 horas antes de estimularlas durante 48 horas con Con A. En cada caso se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente, y analizados mediante la prueba “t” de student (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

7.4 El DAT inhibe la expresión de genes.

Primeramente se determinó la cinética de expresión de los genes que codifican para IL-2, IL-4, e IFN- γ en células de bazo de ratones BALB/c estimuladas *in vitro* durante 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas con el mitógeno Con A (1.0 $\mu\text{g/ml}$). Bajo las condiciones de amplificación previamente descritas en la sección de Material y Métodos, cada par de oligonucleótidos generó una sola banda del tamaño esperado, como fue estimado mediante el análisis previo de los productos teóricos derivados del análisis *in silico* de las secuencias de los oligonucleótidos (Amplify v.2.53, Bill Engels, ©1992, Madison, WI.), y comprobado mediante su comparación con la movilidad electroforética de marcadores comerciales de peso molecular (Biorad, Hercules, CA). Se lograron detectar transcritos desde las 8 horas de estimulación con el mitógeno, alcanzándose los picos de expresión a las 24 horas (datos no mostrados).

Para determinar si la inhibición en la producción de las citocinas de las células T activadas por el mitógeno era debida a un efecto del DAT sobre la transcripción de sus genes, preincubamos las células totales de bazo de ratones BALB/c con DAT (100 μM) durante dos horas y posteriormente las estimulamos con la Con A (1.0 $\mu\text{g/ml}$). A las 24 horas post-estimulación se cosecharon las células, se extrajo el RNA, y se cuantificó la abundancia relativa de los transcritos correspondientes a IL-2, IL-4, e IFN- γ .

Mediante la técnica de ELISA habíamos encontrado que el DAT inhibió modestamente la secreción de IL-2 (9.2 %), y aunque no fue posible concluir acerca de la expresión del gen en esplenocitos activados con Con A, debido a la baja abundancia del RNAm en nuestro sistema,

mediante el uso de células T CD4⁺ purificadas por citometría de flujo se encontró que el DAT inhibe significativamente la expresión del gen *il-2* hasta en un 61.3%. Para el resto de los genes expresados por células T se demostró que el glicolípidos inhibe transcripcionalmente su expresión (Tabla 2 y Figura 4). Los genes afectados incluyen a los que codifican para citocinas Th1 (IFN- γ ; 57% de inhibición en esplenocitos totales y 81% en células T purificadas CD4⁺) y citocinas Th2 (IL-4; 66% de inhibición en ambas poblaciones celulares).

Tabla 2. Inhibición en la expresión de genes de citocinas¹

Gen	Esplenocitos			Células T CD4 ⁺		
	Sin DAT	DAT (100 μ M)	%I ²	Sin DAT	DAT(100 μ M)	%I ²
<i>il-2</i>	2.03 \pm 0.49	2.31 \pm 1.35	ND ³	35.9 \pm 5	13.5 \pm 2.9	61.3
<i>il -4</i>	37.82 \pm 3.44	12.84 \pm 4.66	66.0	109.5 \pm 15	36.5 \pm 9.4	66.6
<i>ifn-γ</i>	22.07 \pm 2.77	9.45 \pm 3.77	57.1	117.3 \pm 9.8	21.9 \pm 2.3	81.3

¹ Expresión Relativa (ER) a G3PDH.

² Porcentaje de inhibición: 100 – [(ER DAT x 100)/ER Sin DAT].

³ Expresión no detectada, o valores < 2SEM.

Otros genes cuya transcripción fue también inhibida por el DAT son los expresados por macrófagos y otras células presentadoras de antígeno presentes en el *pool* de esplenocitos activados con la Con A, como son los que codifican para la citocina pro-inflamatoria TNF- α (42% de inhibición), así como para la IL-12 (30% de inhibición) las cuales son determinantes para el montaje de la respuesta Th1 (gráficos no mostrados).

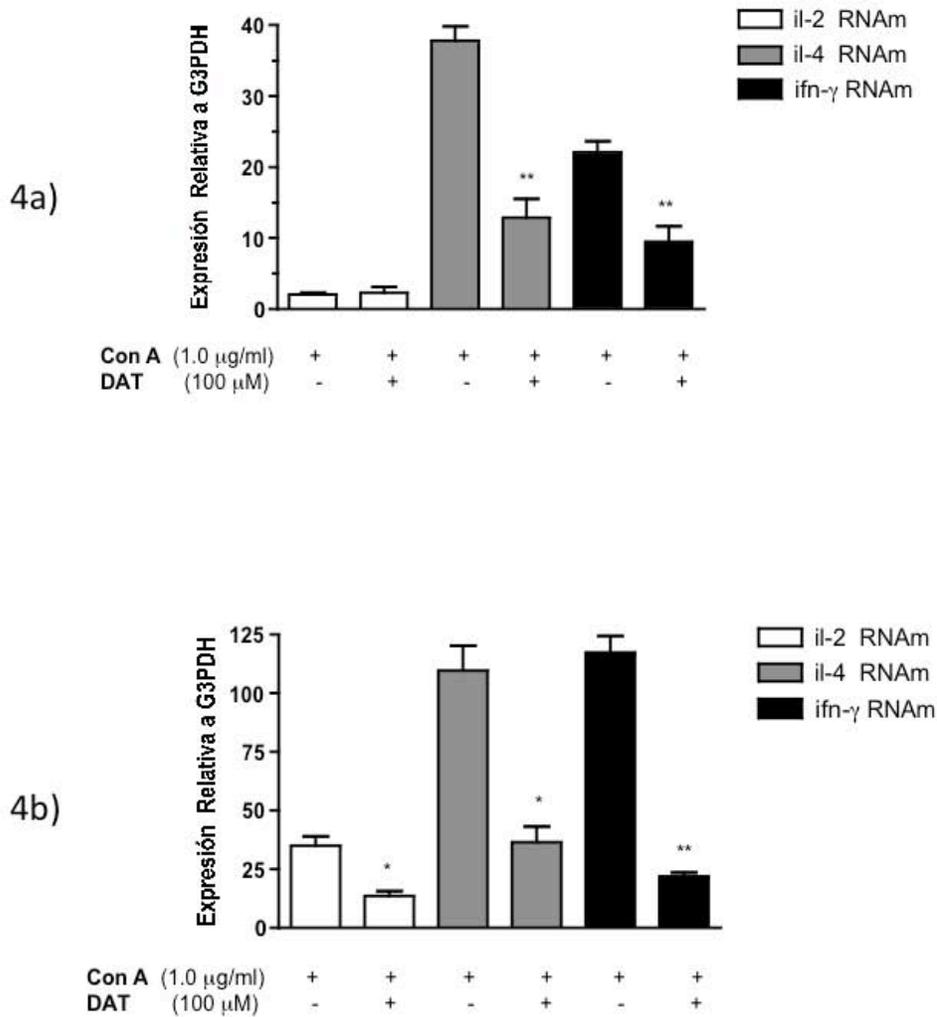


Figura 4. El DAT inhibe la expresión de genes de citocinas Th1 y Th2. Las células de bazo (4a), o células T CD4⁺ purificadas por citometría de flujo (4b) fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con el glicolípidio DAT (100 µM). Posteriormente las células fueron estimuladas con el mitógeno Con A (1.0 µg/ml) durante 24 horas, al término de las cuales se cosecharon las células, se extrajo el RNA, y se cuantificó la expresión de los genes por RT-PCR. En cada caso se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente, y analizados mediante la prueba “t” de student (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001).

7.5 Modulación del perfil de expresión de citocinas Th1 por el DAT.

Para determinar el impacto de la inmunomodulación por el DAT en el contexto de la infección con *M. tuberculosis*, y particularmente en el montaje de la respuesta Th1, se utilizó un modelo murino de tuberculosis primaria progresiva en el que se infectaron los ratones BALB/c por vía intratraqueal (ITT) con 1×10^6 micobacterias/ratón. En dicho modelo de infección los ratones mantienen una respuesta celular Th1 entre los días 14-21 post-infección con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv [162].

Todos los procedimientos experimentales, además de la infección y sacrificio de los ratones fueron realizados bajo estrictas medidas de bioseguridad en un laboratorio de contención biológica (Nivel III). Los esplenocitos fueron estimulados *in vitro* con el mitógeno Con A durante 72 horas o con proteína total de la cepa H37Rv durante 96 horas para inducir la proliferación de las células T. Como se muestra en la **Figura 5a**, las células T del bazo de los ratones infectados con *M. tuberculosis* proliferan ante el estímulo mitogénico (Con A), pero no ante el estímulo con antígeno proteico de la micobacteria (*M. tuberculosis*, H37Rv). Este estado de anergia clonal también se presenta en las células de ratones infectados con *M. fortuitum* (**Figura 5b**). Como control del antígeno empleado, en la **Figura 5c** se muestra la respuesta proliferativa de las células T de sangre periférica (PBMCs) de un individuo sano PPD+ ante el estímulo antigénico con proteína total de H37Rv.

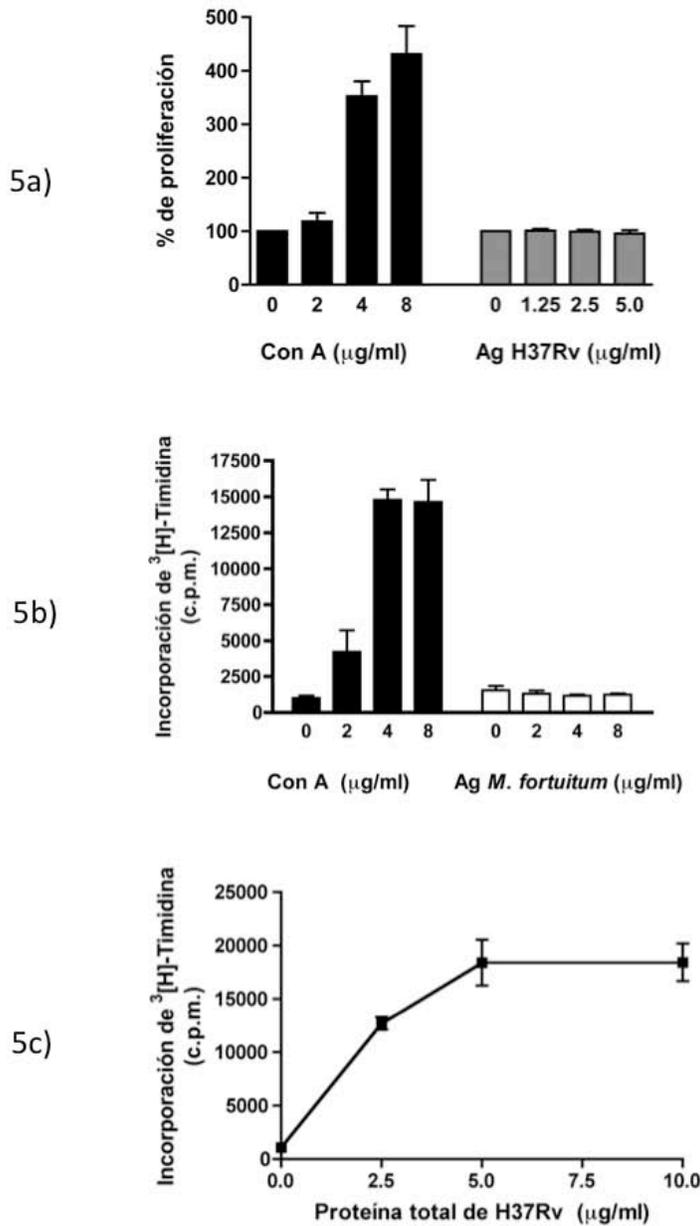


Figura 5. Anergia clonal de las células T. Se infectaron ratones BALB/c con *M. tuberculosis* por vía intratraqueal (5a) ó con *M. fortuitum*, por vía intradérmica (5b). Al término de 21 ó 90 días de infección, respectivamente, los ratones se sacrificaron y las células de bazo fueron estimuladas con Con A (72 horas, 1 µg/ml) ó proteína total de la cepa H37 Rv como antígeno (120 horas, 5 µg/ml), y se cuantificó la proliferación celular. 5c) Se muestra la respuesta proliferativa de las células T de sangre periférica de un donante sano PPD+ ante el estímulo antigénico empleado (Proteína total de H37Rv). En cada caso se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente.

Para establecer el tiempo adecuado de estimulación *in vitro* en el que se pudiera evaluar el efecto del DAT sobre la expresión de los genes de citocinas en las células de bazo de los ratones infectados, se determinó la cinética de expresión de los genes de IL-2, IL-4, IL-12p40, TNF- α , e IFN- γ ante el estímulo antigénico correspondiente (proteína total de *M. tuberculosis*, H37Rv, 5.0 μ g/ml). Se cuantificó la abundancia relativa de los RNAm a 12, 24, 48, 72 y 96 horas de estimulación con el antígeno. Como puede verse en la **Figura 6a**, el tiempo más adecuado para evaluar la expresión de estos genes fue a las 96 horas. Se obtuvieron resultados similares con ratones de 14 ó 21 días de infección.

Para determinar el efecto de DAT sobre la expresión de genes de citocinas se sacrificaron grupos de cinco ratones (BALB/c) infectados con *M. tuberculosis* (H37Rv), y las células del bazo, previamente expuestas al DAT (100 μ M), fueron estimuladas *in vitro* con proteína total de H37Rv (5.0 μ g/ml). A las 96 horas de estimulación se extrajo el RNA total y se determinó la abundancia relativa del RNAm de il-2, il-4, il-12p40, ifn- γ y tnf- α por RT-PCR. El DAT inhibió de manera significativa la expresión de ifn- γ (91.6%), il-12p40 (70.3%) y tnf- α (62%), como se muestra en la **Tabla 3** y en la **Figuras 6b** y **6c**. Como se esperaba, no se detectó la expresión de il-4 en las células del bazo de ratones en esta etapa de la infección. La expresión del RNAm de la il-2 también fue inhibida por el DAT (89.9%), pero no resultó estadísticamente significativa.

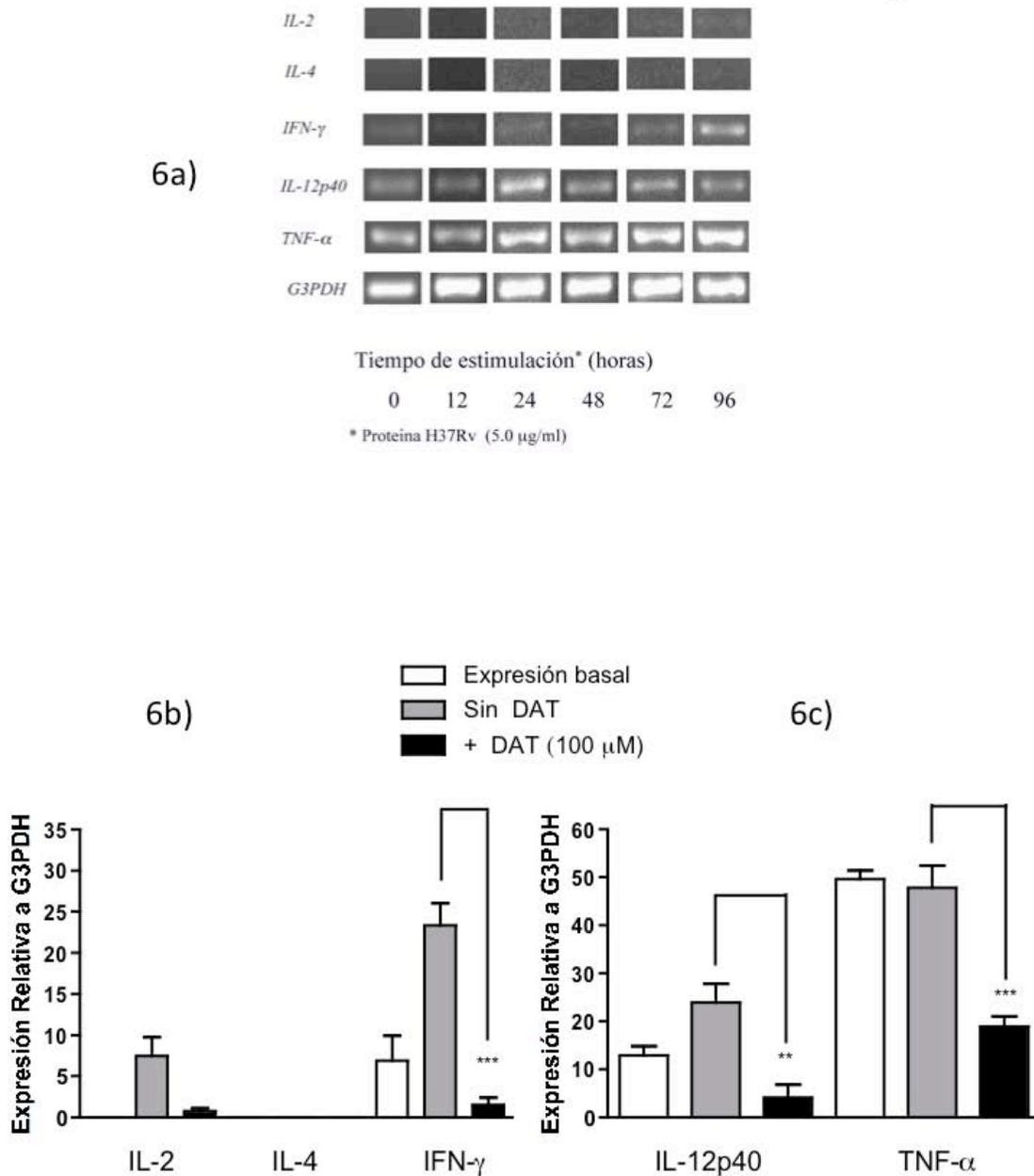


Figura 6. EL DAT inhibe la expresión de genes de citocinas durante la infección por *M. tuberculosis*. 6a) Las células de bazo de ratones infectados se incubaron con proteína de H37Rv durante 12 a 96 h, se extrajo el RNA y se cuantificó la expresión de los genes de interés por RT-PCR. En 6b y 6c, las células de bazo fueron pre-incubadas durante 2 horas con DAT (100 μM) y la expresión de los genes se determinó a las 24 horas de estimulación con el antígeno. La expresión basal (barras blancas) corresponde al contenido de RNAm en las células de bazo al inicio del experimento. En 6a se muestra un experimento representativo, mientras que en 6b y 6c se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente, y analizados mediante la prueba “t” de student (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001).

Tabla 3. Inhibición en la expresión de genes de citocinas¹

RNAm	No estimuladas	+ Con A (1.0 µg/ml)		
		Sin DAT	DAT (100 µM)	%I ²
<i>il-2</i>	ND ³	7.4 ± 3.2	0.75 ± 0.52	89.9
<i>il-4</i>	ND ³	ND ³	ND ³	-
<i>ifn-γ</i>	6.9 ± 4.0	23.3 ± 4.7	1.9 ± 1.0	91.6
<i>il-12p40</i>	13 ± 2.6	23.8 ± 6.0	7.0 ± 3.1	70.3
<i>tnf-α</i>	49.5 ± 2.5	50.88 ± 8.3	19.3 ± 4.6	62.0

¹ Expresión Relativa a G3PDH (ER).

² Porcentaje de inhibición: $100 - [(ER\ DAT \times 100)/ER\ Sin\ DAT]$.

³ Expresión no detectada, o valores de expresión < 2SEM.

7.6 El DAT inhibe la proliferación celular dependiente de la activación de la PLC-γ

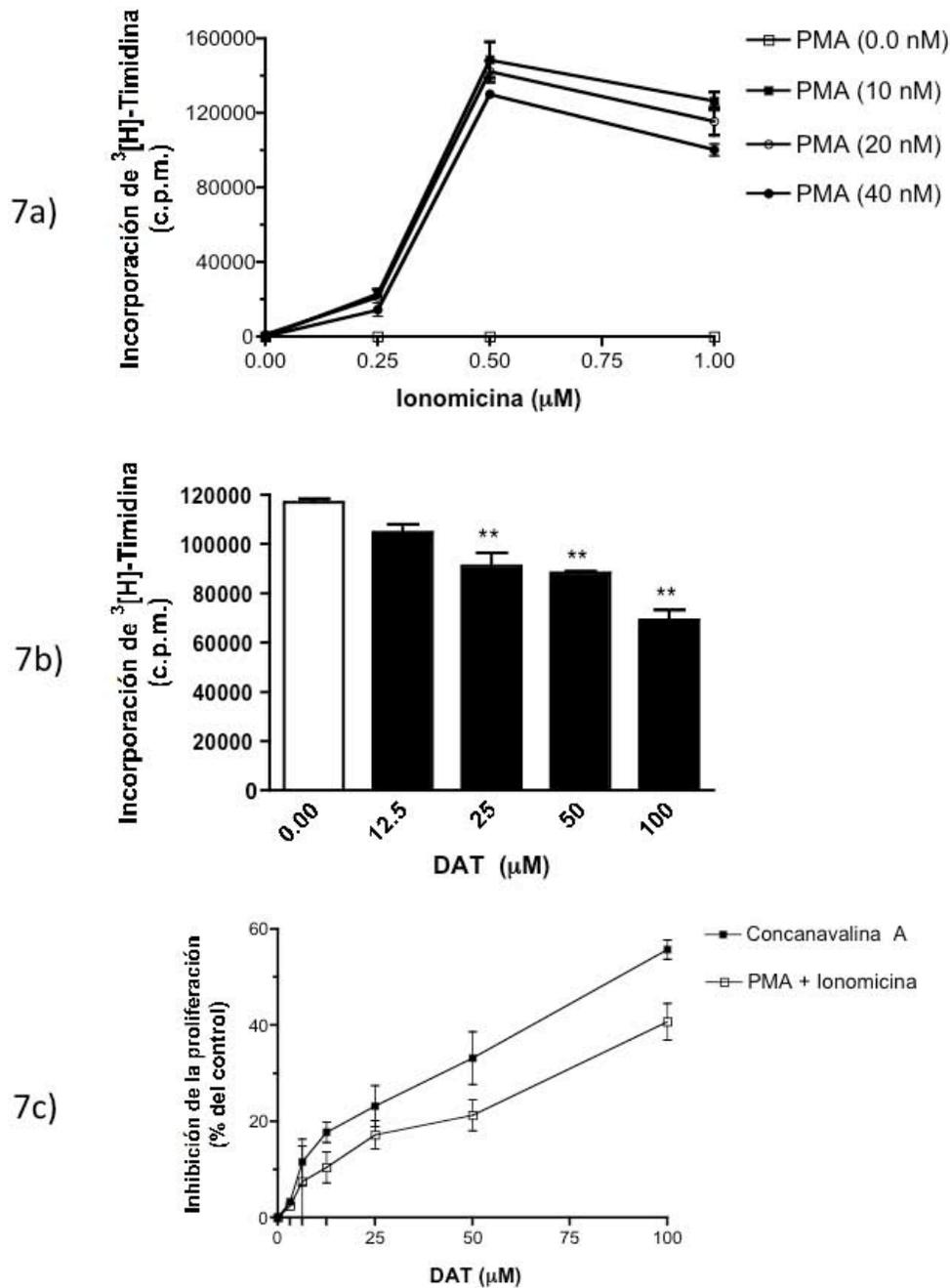
El reconocimiento de antígeno por las células T, a través de la actividad de cinasa de tirosina de la región intracitoplásmica de su receptor (TCR), inicia una cascada de señalamiento intracelular que lleva a la activación de la fosfolipasa C gamma (PLC-γ). Ésta, una vez activada genera los segundos mensajeros di-acilglicerol (DAG) e inositol-trisfosfato (IP3) a partir del fosfatidilinositol 4'5'-bisfosfato (PIP2) localizado en la membrana celular [163]. El efecto de activación de la PLC-γ puede ser reproducido mediante el uso de un análogo estructural del di-acilglicerol, el PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), y la administración conjunta de un ionóforo de Ca⁺⁺, como la ionomicina, que imita los efectos de la unión del IP3 a sus receptores en el retículo endoplásmico y la consecuente liberación de calcio intracelular.

Para dilucidar los mecanismos moleculares asociados con el efecto inmunosupresor del DAT sobre la blastogénesis de las células T y su efecto inhibitor sobre la expresión de genes de citocinas, se usó una combinación de PMA + ionomicina para determinar el probable efecto del

DAT sobre las vías de señalamiento acopladas a la activación de la PLC- γ .

Primeramente se establecieron las condiciones óptimas para inducir la proliferación celular, estimulando las células totales de bazo durante 72 horas con PMA (10, 20, y 40 nM) + ionomicina (0.25, 0.50, y 1.0 μ M), y midiendo la proliferación celular por incorporación de 3 [H]-timidina. Como está reportado en la literatura, se requiere de ambos estímulos administrados de manera simultánea para inducir la proliferación; en el presente estudio se obtuvieron los mejores resultados con 10 nM de PMA + 0.5 μ M de ionomicina (**Figura 7a**).

Para determinar si el DAT tiene efecto sobre la proliferación celular dependiente de la activación de la PLC- γ , las células totales de bazo fueron previamente expuestas al lípido durante dos horas, y posteriormente estimuladas con PMA (10 nM) + ionomicina (0.5 μ M). En la **Figura 7b** puede observarse que el DAT inhibió de manera dependiente de la dosis la proliferación celular inducida con PMA+ionomicina, en grado comparable a la inhibición de la proliferación inducida previamente con la Con A (40 % y 55 % con 100 μ M del DAT, respectivamente; **Figura 7c**), lo que sugiere que el efecto inmunosupresor del DAT puede afectar las vías de señalamiento acopladas a la activación de la PLC- γ , como son la vía de las Cinasas Activadas por Mitógeno (MAPK) y la vía de la Proteína Cinasa C (PKC).



Figura

7. EL DAT inhibe vías de señalamiento por debajo de la activación de la PLCγ. 7a) Las células totales de bazo se incubaron con PMA + Ionomicina durante 72 horas, al término de las cuales se cuantificó la proliferación celular por incorporación de ³H-timidina. 7b) Las células fueron incubadas durante dos horas con el DAT antes de estimularlas con PMA (10 nM) + ionomicina (0.5 μM). En 7c se muestra un gráfico comparativo de la inhibición sobre la linfoproliferación inducida con Con A vs. PMA+ionomicina. En cada caso se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente, y analizados mediante la prueba “t” de student (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001).

7.7 El DAT inhibe la activación de la vía de las MAPK

La vía de señalamiento de las Cinasas Activadas por Mitógeno (MAPK) es la involucrada principalmente en la proliferación celular, así como en la diferenciación Th1/Th2 mediante la activación en cascada del módulo Ras/Raf/MEK/ERK[164-166]. En linfocitos T, Ras puede ser activado directamente por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) específicos de Ras, como RasGRP1, mediante la unión directa de diacil-glicerol (DAG) a su dominio activador C1 [167].

Considerando que el efecto inmunosupresor del DAT afecta las vías de señalamiento intracelular acopladas a la activación de la PLC- γ , se decidió probar si el glicolípido micobacteriano podría inhibir la activación de la vía de las MAPK (la vía de activación de ERK que requiere de DAG). Para ello se estimularon las células de bazo solamente con PMA (25 nM) durante 15 y 30 minutos en presencia del glicolípido (100 μ M), al término de la incubación las células se lisaron y se cuantificó la activación de ERK por Western Blot empleando anticuerpos específicos para el reconocimiento de la forma fosforilada de la cinasa. Como puede verse en la **Figura 8a** y **8b**, el DAT inhibió la activación de ERK inducida por el PMA hasta el nivel basal. En la **Figura 8c** se demuestra que la expresión de las citocinas Th1, IL-2 e IFN- γ , depende de la activación de la vía de las MAPK, ya que los niveles de expresión de su RNAm disminuyen al tratar las células con el inhibidor de MEK (PD98059, 50 μ M). Lo anterior explica que la inhibición de la vía de señalamiento de las MAPK es al menos uno de los mecanismos mediante los cuales el DAT inhibe la expresión de las citocinas Th1.

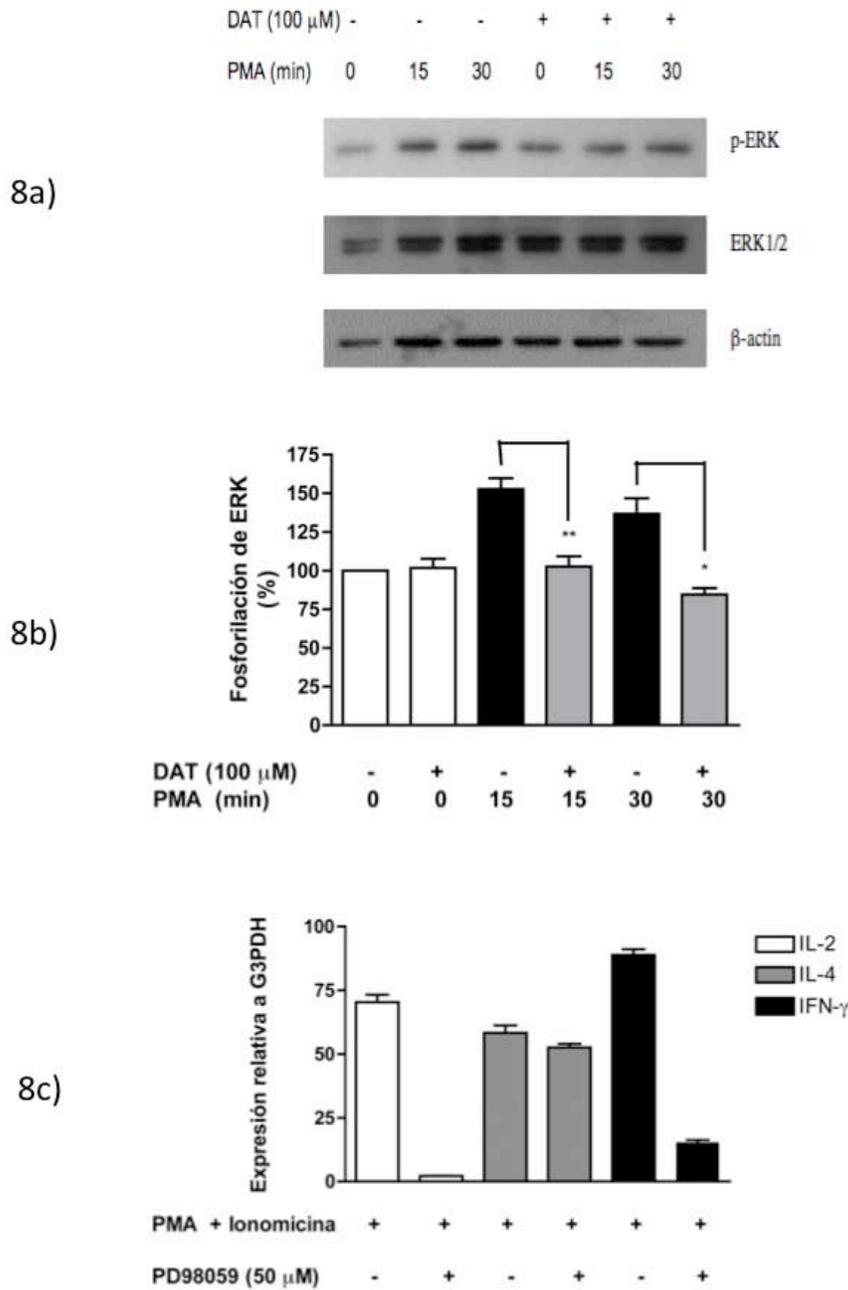


Figura 8. El DAT inhibe la activación de la vía de las MAPK. 8a) Las células de bazo fueron incubadas con el DAT durante dos horas y posteriormente estimuladas con PMA (25 nM) durante 15 y 30 minutos. Las células fueron lisadas, y las proteínas totales se resolvieron por SDS-PAGE para cuantificar la fosforilación de ERK mediante western blot, en 8b) se muestra la densitometría correspondiente. 8c) Las células fueron estimuladas con PMA + ionomicina durante 24 horas, se extrajo el RNA, y se determinó la expresión de los genes por RT-PCR. En cada caso se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente, y analizados mediante la prueba “t” de student (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

7.8 La inhibición de la vía de las MAPK no depende del efecto del DAT sobre su trans-activación por la PKC.

Es bien conocido que el DAG, además de activar a la vía de las MAPK, se requiere para la completa activación/translocación de las isoformas clásicas de la PKC (α , β I, β II, γ), una subfamilia de cinasas de serina/treonina cuya activación es dependiente de la actividad bioquímica de la PLC- γ para la generación de IP3 (liberador de Ca^{++} intracelular) y DAG. Se ha reportado que la PKC- α trans-activa la vía de señalamiento de las MAPK mediante la fosforilación directa de la MAPKKK Raf-1 [168] así como mediante la activación de la MAPKK MEK [169]. Por lo anterior se consideró relevante determinar si el efecto inhibitor del DAT sobre la activación de la vía de las MAPK era debido a un posible efecto sobre la actividad bioquímica de las cPKC. Para ello se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de activación de la PKC, midiendo la fosforilación de su sustrato específico en presencia del DAT. Como se aprecia en la **Figura 9**, el DAT no inhibió la actividad de cinasa de un *pool* de las isoformas clásicas de la PKC (α , β I, β II, γ). Como control se utilizó un péptido miristoilado derivado de la región de pseudo-sustrato de las cPKC (Myr-RFARKGALRQKNV).

En apoyo a lo anterior, se demostró que la fosforilación/degradación de I κ B- α , uno de los eventos por debajo de la activación de PKC- α que llevan a la activación de la vía canónica de NF- κ B [170, 171], no es afectado por el DAT en células totales de bazo estimuladas con el mitógeno Con A (**Figura 10**). Lo anterior demuestra que el DAT inhibe selectivamente la activación de la vía de las MAPK, sin afectar la actividad bioquímica de la cPKC ni la vía canónica de activación de NF- κ B.

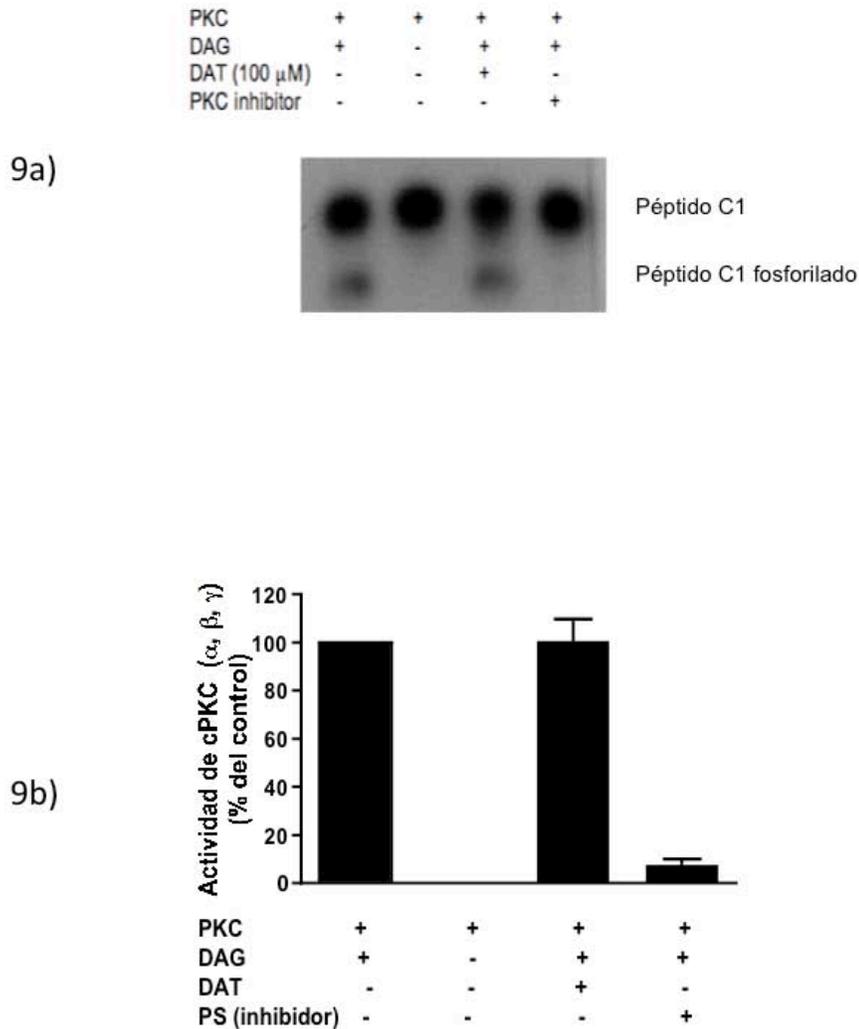


Figura 9. El DAT no inhibe la activación de las isoformas clásicas de la PKC. 9a) Se empleó un estándar comercial (Promega, Madison, WI), conteniendo las isoformas clásicas de PKC (α , β , y γ) para llevar a cabo ensayos de fosforilación a un sustrato específico de PKC (C1) en presencia del glicolípidos DAT (100 μ M). La fracción fosforilada del péptido C1 se separó por electroforesis en agarosa al 0.8%. Como control de especificidad se usó la región de pseudosustrato derivada de la PKC- α . 9b) En cada caso se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente.

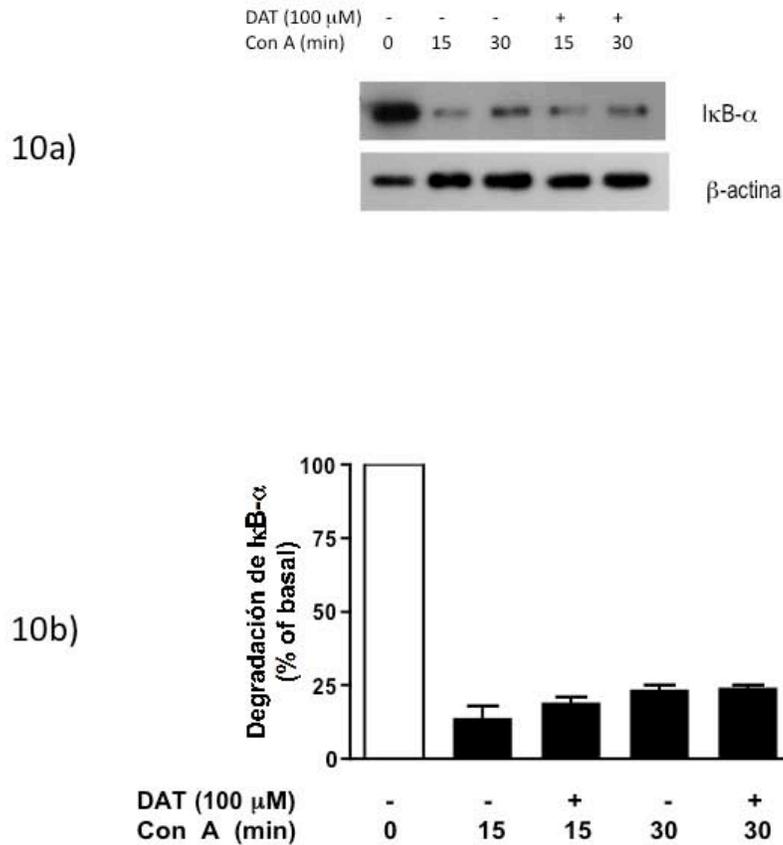


Figura 10. El DAT no inhibe la fosforilación/degradación de IκB-α, en la vía canónica de activación de NF-κB. Las células totales de bazo fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con el DAT (100 μ M), y posteriormente estimuladas con el mitógeno Con A (1 μ g/ml) durante 15 y 30 minutos. Las células fueron lisadas, y las proteínas totales resueltas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF, para cuantificar la degradación de IκB-α por western-blot. En cada caso se muestra el promedio (+ SEM) de tres experimentos realizados de manera independiente, y analizados mediante la prueba “t” de student (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

8. DISCUSIÓN

La inmunosupresión constituye una característica de la tuberculosis activa, especialmente documentada en estadios avanzados de la enfermedad, la cual se pone de manifiesto tanto *in vivo*, por la pérdida de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) [172], como *in vitro*, al estar afectada la capacidad de las células T para proliferar ante antígenos específicos [173, 174], así como por la inhibición en la producción de citocinas proinflamatorias y del tipo Th1 [175, 176].

Se han planteado varias hipótesis para tratar de explicar estos eventos: a) que el reclutamiento de las células específicas de antígeno en el sitio de la infección impide el montaje de la DTH, b) que los macrófagos se comportan como inmunosupresores al secretar altos niveles de IL-10 y TGF- β , y c) que existe un defecto intrínseco en la activación de las células T, dada su incapacidad para proliferar ante estímulos específicos y por mostrar una marcada tendencia a la apoptosis.

Esta última, en los últimos años ha recibido mucha atención, particularmente porque se ha demostrado que la mayoría de los lípidos y glicolípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* se comportan como inmunosupresores. Así, se ha descrito que el lipoarabinomano (manLAM), los fosfatidilinositolmanósidos (PIMs), los glicopeptidolípidos (GPLs), el glicolípido fenólico (PGL), los sulfolípidos (SL) y recientemente las diaciltrealosas (DATs), inhiben la proliferación de las células T, o bien la activación de macrófagos y células dendríticas [177]. Aunque dichas propiedades han sido descritas desde hace varios años para algunos lípidos, aún no se conocen los mecanismos moleculares implicados en la inmunosupresión, aunque se ha postulado que los lípidos podrían interactuar inespecíficamente con las membranas celulares y afectar la fluidez

de la bicapa lipídica, la transducción de señales etc. [98].

En el presente trabajo nos propusimos determinar el papel que juegan los glicolípidos de trealosa en la respuesta inmune a *M. tuberculosis*. Dada la complejidad del problema planteado, decidimos abordar dos preguntas básicas: a) ¿Qué impacto tiene dicha inmunomodulación en el montaje de la respuesta Th1?, y b) ¿Cuáles son los eventos moleculares implicados en la inmunomodulación por las di-O-aciltrealosas (DAT)?

En el trabajo que constituye el antecedente directo para el presente, se demostró que el glicolípidos DAT de *M. tuberculosis* y *M. fortuitum* inhiben la transformación blástica de las células T sin comprometer la viabilidad celular [156]. Asimismo, se demostró que dicho efecto inmunosupresor se observa indistintamente al emplear estímulos tanto antigénicos como mitogénicos. En el presente trabajo utilizamos el DAT de *M. fortuitum* por ser ésta una micobacteria de rápido crecimiento, de bajo riesgo biológico, y porque se ha demostrado que es estructuralmente similar al DAT de *M. tuberculosis*, además de compartir sus propiedades biológicas y antigénicas conocidas [155, 156].

a) ¿Qué impacto tiene el DAT en el montaje de la respuesta Th1?

Un primer abordaje fue hecho al investigar si el DAT tenía la capacidad de inhibir la producción de citocinas, como se ha reportado para otros glicolípidos de *M. tuberculosis* [177]. Los resultados obtenidos mediante su cuantificación por la técnica de ELISA demuestran claramente

que la secreción de citocinas por parte de las células T ante un estímulo mitogénico (Con A) son inhibidas por el DAT (IFN- γ , 38.7% e IL-4, 49.1%). También, empleando un *pool* de células de bazo de ratones BALB/c activadas policlonalmente con el mitógeno Con A, se demostró que los efectos del DAT sobre la producción de las citocinas se deben a la inhibición transcripcional de los genes que las codifican. Empleando células T CD4⁺ purificadas mediante citometría de flujo, se demostró que el DAT inhibe la transcripción de IFN- γ (81.3%), IL-2 (61.3%) e IL-4 (66.6%) en esta subpoblación celular, que es esencial para el control de la infección por *M. tuberculosis*. Está bien documentada la participación del IFN- γ (junto con la producción de IL-12 por los macrófagos y células dendríticas) en la diferenciación de las células Th0 hacia el fenotipo Th1, indispensable para el desarrollo de la respuesta inmune protectora en la tuberculosis [6, 178].

Habiendo demostrado que el DAT inhibe la expresión génica nos propusimos evaluar el efecto del glicolípido sobre el montaje de la respuesta Th1, fundamental para el control de la infección por *M. tuberculosis*. Para ello se utilizó el modelo murino de infección intratraqueal que corresponde a uno de tuberculosis primaria progresiva. En dicho modelo se reconocen dos fases de la respuesta inmune: 1) desde la segunda semana y hasta el día 21 de infección la respuesta celular es del tipo Th1, caracterizada por la producción de altos niveles de IFN- γ y TNF- α , y 2) mas allá del día 21 comienza a encontrarse un patrón mezclado Th1/Th2, con alta producción de IL-4, y comienza a perderse el control del crecimiento bacilar, que finalmente conduce a la muerte de los ratones [162]. En el presente trabajo se reporta que el DAT inhibe la transcripción de los genes que codifican para IL-2, IFN- γ , IL-12p40, y TNF- α en esplenocitos de ratones infectados con *M. tuberculosis* (Tabla 3, Figura 6). Se obtuvieron resultados similares empleando ratones de 14 ó 21 días de infección con la cepa H37Rv. Lo anterior demuestra claramente que el

DAT suprime la respuesta celular Th1 en el contexto de la infección por *M. tuberculosis*.

b) ¿Cuáles son los eventos moleculares implicados en la inmunosupresión por DAT?

En células T, el reconocimiento de antígeno activa una cascada de señalamiento intracelular que inicia con la fosforilación en tirosina de varios residuos de la porción intracelular del componente CD3, así como de la cadena γ del TCR, principalmente por la cinasa de tirosina Lck [179], lo que genera sitios de anclaje -SH2 para el reclutamiento y posterior activación por fosforilación en tirosina de la cinasa ZAP-70 [180, 181]. A través de sus propios dominios -SH2, ZAP-70 recluta, y fosforila a las proteínas adaptadoras LAT y SLP-76 [182, 183].

LAT y SLP-76 son requeridas para la fosforilación de la PLC- γ por la cinasa de tirosina itk [184]. La activación de la PLC- γ genera los segundos mensajeros di-acilglicerol (DAG) e inositol-trisfosfato (IP3) a partir del fosfatidil-inositol 4'5'-bisfosfato (PIP2) localizado en la membrana celular [163]. La liberación de calcio intracelular en respuesta a la unión del IP3 a sus receptores en el retículo endoplásmico, así como la producción de DAG conducen a la activación de dos vías de señalamiento implicadas en la diferenciación y activación de las células T: la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la vía de la proteína cinasa C (PKC).

Estas dos vías de señalamiento por debajo de la activación de la PLC- γ pueden ser activadas en ausencia de los eventos tempranos que siguen al reconocimiento de antígeno por el TCR, mediante el uso de un análogo estructural del di-acilglicerol, el PMA, y la administración conjunta de un ionóforo de Ca^{++} , como la ionomicina [185]. En el presente estudio se demostró que el DAT inhibe la proliferación celular inducida con una combinación de PMA (10 nM) + ionomicina (0.5 μM) de manera equiparable a la obtenida usando Con A como activador

policlonal. Lo anterior sugiere que los eventos inmediatos en el señalamiento intracelular desde el reclutamiento de ZAP-70 hasta la activación de la PLC- γ se encuentran intactos, y demuestra que el glicolípido ejerce su actividad inmunosupresora en condiciones óptimas de activación de la PLC- γ (producción de DAG e IP3 suficiente para inducir proliferación celular), de lo que se deduce que sus efectos podrían tener como blanco la activación de la vía de las MAPK y/o la activación de la PKC.

La vía de señalamiento de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) es la principalmente involucrada en la proliferación celular, así como en la diferenciación Th1/Th2 mediante la activación en cascada del módulo Ras/Raf/MEK/ERK [164-166]. Aunque la vía canónica de activación de Ras mediante Grb2/SOS también se ha descrito [186, 187], se ha demostrado que la vía prioritaria de activación de Ras en células T es mediada por otro factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEFs) específico de Ras (RasGRP1), el cual es dependiente de la activación de la PLC- γ , ya que requiere de la unión de DAG a su dominio activador C1, estructuralmente relacionado al localizado en la PKC [167, 188, 189].

Considerando que el efecto inmunosupresor del DAT afecta las vías de señalamiento intracelular acopladas a la activación de la PLC- γ , se decidió probar si el glicolípido micobacteriano podría inhibir la activación de la vía de las MAPK (la vía de activación de ERK que requiere de la producción de DAG). Para ello se estimularon las células de bazo de ratones BALB/c con PMA (25 nM) durante 15 y 30 minutos en presencia del glicolípido (100 μ M). Al término de la incubación las células se lisaron y se cuantificó la activación de ERK por Western Blot empleando anticuerpos específicos para el reconocimiento de la forma fosforilada de la cinasa. El DAT inhibió la activación de ERK hasta el nivel basal, lo que demuestra que la inhibición de

la vía de señalamiento PLC- γ /DAG/GRP1/Ras/MAPK es al menos uno de los mecanismos mediante los cuales el DAT se comporta como inmunosupresor. Esta vía de señalamiento es la que conduce a la expresión del perfil de citocinas Th1, ya que la expresión del RNAm de IL-2 e IFN- γ , pero no el de IL-4 se inhiben completamente con el inhibidor específico de MEK (PD98059, 50 μ M) en esplenocitos estimulados con PMA + ionomicina (Figura 8c).

Es bien conocido que los segundos mensajeros Ca⁺⁺ y DAG, productos de la actividad bioquímica de la PLC- γ , además de activar a la vía de las MAPK, se requieren para la completa activación/translocación de las isoformas clásicas de la PKC (α , β I, β II, γ), una subfamilia de cinasas de serina/treonina [190]. Se ha reportado que la PKC- α trans-activa la vía de señalamiento de las MAPK mediante la fosforilación directa de la MAPKKK Raf-1 [168] así como mediante la activación de la MAPKK MEK [169]. Por lo anterior se consideró relevante determinar si el efecto inhibitor del DAT sobre la activación de la vía de las MAPK era debido a un posible efecto sobre la actividad bioquímica de la PKC. Para ello se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de activación de la PKC, midiendo la fosforilación de su sustrato específico en presencia del DAT. Como puede apreciarse en la Figura 9, el DAT no inhibió la actividad de cinasa de las isoformas clásicas de la PKC (α , β I, β II, γ), lo que demuestra que el DAT inhibe específicamente solo a una de las dos vías de señalamiento acopladas a la activación de la PLC- γ .

En apoyo a lo anterior, se demostró que la fosforilación/degradación de I κ B- α , uno de los eventos por debajo de la activación de PKC- α que conducen a la vía canónica de activación de NF- κ B en células T [170, 171, 191] tampoco es afectado por el DAT, en esplenocitos estimulados con el mitógeno Con A (Figura 10).

Lo anterior demuestra que el DAT inhibe la expresión del perfil de citocinas Th1 mediante el bloqueo de la vía de señalamiento PLC- γ /DAG/RasGRP1/Ras/MAPK. Estos datos permiten hipotetizar que dicha inhibición en la activación de ERK, podría también ser la causa de la inhibición de la proliferación de las células T al bloquear la activación del factor transcripcional AP-1 (*c-jun/c-fos*) (ya que la expresión de *c-fos* depende de la activación de ERK), el cual es requerido para inducir la expresión del gen de ciclina D1, factor limitante para la progresión del ciclo celular a la fase S.

De los numerosos lípidos de *M. tuberculosis* con actividad inmunosupresora que se han reportado [177], solamente se ha descrito a nivel molecular las bases bioquímicas de la inmunosupresión ejercida por el lipoarabinomano (LAM), en cuyo caso el efecto inmunosupresor sobre los macrófagos se debe a la activación directa de la fosfatasa de tirocina SHP-1 [192], lo cual atenúa la expresión de IL-12, TNF- α , y la expresión de las moléculas presentadoras de antígeno de clase II.

Los datos aquí presentados sugieren que los glicolípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* podrían estar jugando un papel mas determinante en la fisiopatología de la tuberculosis, en particular en el desarrollo de la inmunosupresión que caracteriza las etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que el desarrollo de cepas knockout para genes relevantes en la biosíntesis de glicolípidos, y/o el aislamiento de cepas de *M. tuberculosis* que sobre expresen DAT y otros lípidos con actividad inmunosupresora, serán relevantes en el futuro para definir el papel que juegan los lípidos de la micobacteria en la fisiopatología de la tuberculosis.

9. REFERENCIAS

1. WHO, *World Health Organization REPORT 2008. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing.* 2008.
2. SSA, *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Secretaría de Salud. Epidemiología,* 2008. **26**(1): p. 10.
3. Inderlied, C.B., C.A. Kemper, and L.E. Bermudez, *The Mycobacterium avium complex.* Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(3): p. 266-310.
4. Barrow, W.W., *Processing of mycobacterial lipids and effects on host responsiveness.* Front Biosci, 1997. **2**: p. d387-400.
5. Hirsch, C.S., et al., *Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages.* J Immunol, 1994. **152**(2): p. 743-53.
6. Kaufmann, S.H., *How can immunology contribute to the control of tuberculosis?* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 20-30.
7. Vanham, G., et al., *Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection.* Clin Exp Immunol, 1996. **103**(1): p. 30-4.
8. Kato, K., et al., *IgG antibody level to mycobacterial glycoprotein in pulmonary tuberculosis by ELISA.* Eur J Respir Dis, 1987. **71**(1): p. 37-41.
9. Glatman-Freedman, A. and A. Casadevall, *Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against Mycobacterium tuberculosis.* Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(3): p. 514-32.
10. Palma-Nicolas, J.P. and V. Bocanegra-Garcia, *[Innovative strategies to diagnose and monitor tuberculosis patients].* Arch Bronconeumol, 2007. **43**(4): p. 225-32.
11. Orme, I.M. and F.M. Collins, *Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T cell-deficient recipients.* J Exp Med, 1983. **158**(1): p. 74-83.
12. Orme, I.M. and F.M. Collins, *Adoptive protection of the Mycobacterium tuberculosis-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin.* Cell Immunol, 1984. **84**(1): p. 113-20.
13. Muller, I., et al., *Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells.* Infect Immun, 1987. **55**(9): p. 2037-41.
14. Pedrazzini, T., K. Hug, and J.A. Louis, *Importance of L3T4+ and Lyt-2+ cells in the immunologic control of infection with Mycobacterium bovis strain bacillus Calmette-Guerin in mice. Assessment by elimination of T cell subsets in vivo.* J Immunol, 1987. **139**(6): p. 2032-7.
15. Ladel, C.H., S. Daugelat, and S.H. Kaufmann, *Immune response to Mycobacterium bovis bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance.* Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 377-84.

16. Barnes, P.F., et al., *Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med, 1991. **324**(23): p. 1644-50.
17. Hopewell, P.C., *Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management, and control of tuberculosis*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(3): p. 540-7.
18. Raviglione, M.C., D.E. Snider, Jr., and A. Kochi, *Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic*. JAMA, 1995. **273**(3): p. 220-6.
19. Flynn, J.L., et al., *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2249-54.
20. Cooper, A.M., et al., *Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2243-7.
21. Newport, M.J., et al., *A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection*. N Engl J Med, 1996. **335**(26): p. 1941-9.
22. Jouanguy, E., et al., *Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection*. N Engl J Med, 1996. **335**(26): p. 1956-61.
23. Jouanguy, E., et al., *Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2658-64.
24. Lorgat, F., et al., *Evidence for in vivo generation of cytotoxic T cells. PPD-stimulated lymphocytes from tuberculous pleural effusions demonstrate enhanced cytotoxicity with accelerated kinetics of induction*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(2 Pt 1): p. 418-23.
25. Keane, J., et al., *Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis*. Infect Immun, 1997. **65**(1): p. 298-304.
26. Molloy, A., P. Laochumroonvorapong, and G. Kaplan, *Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1499-509.
27. Flynn, J.L., et al., *Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 12013-7.
28. Sousa, A.O., et al., *Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4204-8.
29. Tan, J.S., et al., *Human alveolar T lymphocyte responses to Mycobacterium tuberculosis antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis*. J Immunol, 1997. **159**(1): p. 290-7.
30. Lalvani, A., et al., *Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 270-5.
31. Canaday, D.H., et al., *Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by Mycobacterium tuberculosis via an alternate class I MHC antigen-processing pathway*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 372-9.
32. Serbina, N.V. and J.L. Flynn, *Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 3980-8.

33. Canaday, D.H., et al., *CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2734-42.
34. Zhu, X., et al., *Specificity of CD8+ T cells from subunit-vaccinated and infected H-2b mice recognizing the 38 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis*. Int Immunol, 1997. **9**(11): p. 1669-76.
35. Silva, C.L. and D.B. Lowrie, *Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3269-74.
36. Mohagheghpour, N., et al., *CTL response to Mycobacterium tuberculosis: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2400-6.
37. Mazzaccaro, R.J., et al., *Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by Mycobacterium tuberculosis infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11786-91.
38. Houde, M., et al., *Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 402-6.
39. Ulrichs, T. and S.A. Porcelli, *CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity*. Rev Immunogenet, 2000. **2**(3): p. 416-32.
40. Beckman, E.M., et al., *Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells*. Nature, 1994. **372**(6507): p. 691-4.
41. Sieling, P.A., et al., *CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens*. Science, 1995. **269**(5221): p. 227-30.
42. Moody, D.B., et al., *Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells*. Science, 1997. **278**(5336): p. 283-6.
43. Moody, D.B., et al., *CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in Mycobacterium tuberculosis infection*. Nature, 2000. **404**(6780): p. 884-8.
44. Gilleron, M., et al., *Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med, 2004. **199**(5): p. 649-59.
45. Sieling, P.A., et al., *CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1851-8.
46. Henderson, R.A., S.C. Watkins, and J.L. Flynn, *Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1997. **159**(2): p. 635-43.
47. Havlir, D.V., et al., *Selective expansion of human gamma delta T cells by monocytes infected with live Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 729-33.
48. Barnes, P.F., et al., *Gamma delta T lymphocytes in human tuberculosis*. J Infect Dis, 1992. **165**(3): p. 506-12.
49. Li, B., et al., *Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 4222-9.
50. Constant, P., et al., *Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands*. Science, 1994. **264**(5156): p. 267-70.
51. Garcia, V.E., et al., *Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1328-35.

52. Sireci, G., et al., *Patterns of phosphoantigen stimulation of human Vgamma9/Vdelta2 T cell clones include Th0 cytokines*. Hum Immunol, 1997. **58**(2): p. 70-82.
53. Dieli, F., et al., *Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes*. J Infect Dis, 2001. **184**(8): p. 1082-5.
54. Cooper, A.M. and J.L. Flynn, *The protective immune response to Mycobacterium tuberculosis*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(4): p. 512-6.
55. Ladel, C.H., et al., *Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages*. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1936-8.
56. Chackerian, A.A., T.V. Perera, and S.M. Behar, *Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2666-74.
57. Saunders, B.M., et al., *CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis*. Cell Immunol, 2002. **216**(1-2): p. 65-72.
58. North, R.J., *Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(1): p. 55-8.
59. Sander, B., et al., *Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin*. Immunology, 1995. **86**(4): p. 512-8.
60. Lin, Y., et al., *Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis*. Infect Immun, 1996. **64**(4): p. 1351-6.
61. Jung, Y.J., et al., *Increased interleukin-10 expression is not responsible for failure of T helper 1 immunity to resolve airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice*. Immunology, 2003. **109**(2): p. 295-9.
62. Hernandez-Pando, R., et al., *Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis*. Eur J Immunol, 2004. **34**(1): p. 174-83.
63. Rook, G.A., et al., *IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design*. Trends Immunol, 2004. **25**(9): p. 483-8.
64. Shiratsuchi, H., Y. Okuda, and I. Tsuyuguchi, *Recombinant human interleukin-2 reverses in vitro-deficient cell-mediated immune responses to tuberculin purified protein derivative by lymphocytes of tuberculous patients*. Infect Immun, 1987. **55**(9): p. 2126-31.
65. Gercken, J., et al., *Defective antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3472-8.
66. Noss, E.H., C.V. Harding, and W.H. Boom, *Mycobacterium tuberculosis inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages*. Cell Immunol, 2000. **201**(1): p. 63-74.
67. Toossi, Z., et al., *Expression of functional interleukin 2 receptors by peripheral blood monocytes from patients with active pulmonary tuberculosis*. J Clin Invest, 1990. **85**(6): p. 1777-84.
68. Toossi, Z., et al., *Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 465-73.

69. Delvig, A.A., et al., *TGF-beta1 and IFN-gamma cross-regulate antigen presentation to CD4 T cells by macrophages*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 163-6.
70. Lee, Y.J., et al., *TGF-beta suppresses IFN-gamma induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2065-75.
71. Toossi, Z., et al., *Modulation of IL-12 by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in Mycobacterium tuberculosis-infected mononuclear phagocytes and in patients with active tuberculosis*. J Clin Lab Immunol, 1997. **49**(2): p. 59-75.
72. Warwick-Davies, J., D.B. Lowrie, and P.J. Cole, *Selective deactivation of human monocyte functions by TGF-beta*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3186-93.
73. Espinoza-Delgado, I., et al., *Inhibitory cytokine circuits involving transforming growth factor-beta, interferon-gamma, and interleukin-2 in human monocyte activation*. Blood, 1994. **83**(11): p. 3332-8.
74. Hirsch, C.S., et al., *Enhancement of intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in human monocytes by transforming growth factor-beta 1*. J Infect Dis, 1994. **170**(5): p. 1229-37.
75. Torres, M., et al., *Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1998. **66**(1): p. 176-80.
76. Hirsch, C.S., et al., *In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against Mycobacterium tuberculosis by natural inhibitors of transforming growth factor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3926-31.
77. Ellner, J.J., *Immunosuppression in tuberculosis*. Infect Agents Dis, 1996. **5**(2): p. 62-72.
78. Ellner, J.J., *Regulation of the human immune response during tuberculosis*. J Lab Clin Med, 1997. **130**(5): p. 469-75.
79. Hoheisel, G.B., et al., *Bronchoalveolar lavage cytology and immunocytology in pulmonary tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(2 Pt 1): p. 460-3.
80. Workman, C.J., et al., *The development and function of regulatory T cells*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(16): p. 2603-22.
81. Hougardy, J.M., et al., *Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(4): p. 409-16.
82. Scott-Browne, J.P., et al., *Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis*. J Exp Med, 2007. **204**(9): p. 2159-69.
83. Kursar, M., et al., *Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2661-5.
84. Hirsch, C.S., et al., *Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis*. J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 945-53.
85. van Crevel, R., 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**(3): p. 1194-7.
86. Surcel, H.M., et al., *Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens*. Immunology, 1994. **81**(2): p. 171-6.

87. Wallis, R.S., R. Paranjape, and M. Phillips, *Identification by two-dimensional gel electrophoresis of a 58-kilodalton tumor necrosis factor-inducing protein of Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1993. **61**(2): p. 627-32.
88. Aung, H., et al., *Induction of monocyte expression of tumor necrosis factor alpha by the 30-kD alpha antigen of Mycobacterium tuberculosis and synergism with fibronectin*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(5): p. 1261-8.
89. Noss, E.H., et al., *Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 2001. **167**(2): p. 910-8.
90. Gehring, A.J., et al., *Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing*. *J Immunol*, 2004. **173**(4): p. 2660-8.
91. Goren, M.B. and P.J. Brennan, *TUBERCULOSIS. Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities*. 1979: Ed. Youmans GP, WB Saunders company, Philadelphia.
92. Beatty, W.L. and D.G. Russell, *Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages*. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 6997-7002.
93. Beatty, W.L., H.J. Ullrich, and D.G. Russell, *Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event*. *Eur J Cell Biol*, 2001. **80**(1): p. 31-40.
94. Rhoades, E., et al., *Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular Mycobacterium bovis BCG*. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(4): p. 875-88.
95. Xu, S., et al., *Intracellular trafficking in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages*. *J Immunol*, 1994. **153**(6): p. 2568-78.
96. Beatty, W.L., et al., *Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages*. *Traffic*, 2000. **1**(3): p. 235-47.
97. Julian, E., et al., *Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens*. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(10): p. 3782-8.
98. Laneelle, G. and M. Daffe, *Mycobacterial cell wall and pathogenicity: a lipidologist's view*. *Res Microbiol*, 1991. **142**(4): p. 433-7.
99. Hunter, S.W., H. Gaylord, and P.J. Brennan, *Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(26): p. 12345-51.
100. Chatterjee, D., et al., *Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. Capping with mannosyl residues in some strains*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(9): p. 6234-9.
101. Prinzi, S., D. Chatterjee, and P.J. Brennan, *Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from Mycobacterium bovis BCG*. *J Gen Microbiol*, 1993. **139**(11): p. 2649-58.
102. Nigou, J., M. Gilleron, and G. Puzo, *Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis*. *Biochimie*, 2003. **85**(1-2): p. 153-66.

103. Guerardel, Y., et al., *Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from Mycobacterium chelonae. Presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains.* J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30635-48.
104. Barnes, P.F., et al., *Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure.* J Immunol, 1992. **149**(2): p. 541-7.
105. Roach, T.I., et al., *Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of Mycobacterium tuberculosis differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor-alpha.* J Immunol, 1993. **150**(5): p. 1886-96.
106. Zhang, Y., et al., *Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to Mycobacterium tuberculosis and its components.* J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 586-92.
107. Vouret-Craviari, V., et al., *Expression of monocyte chemotactic protein-3 in human monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan.* Cytokine, 1997. **9**(12): p. 992-8.
108. Vouret-Craviari, V., et al., *Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan.* Infect Immun, 1997. **65**(4): p. 1345-50.
109. Strohmeier, G.R. and M.J. Fenton, *Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis.* Microbes Infect, 1999. **1**(9): p. 709-17.
110. Emoto, M., et al., *Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin.* Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 650-9.
111. Knutson, K.L., et al., *Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1.* The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(1): p. 645-52.
112. Means, T.K., et al., *The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors.* J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6748-55.
113. Adams, L.B., Y. Fukutomi, and J.L. Krahenbuhl, *Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence.* Infect Immun, 1993. **61**(10): p. 4173-81.
114. Dahl, K.E., et al., *Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis.* Infect Immun, 1996. **64**(2): p. 399-405.
115. Nigou, J., et al., *Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor.* J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7477-85.
116. Geijtenbeek, T.B., et al., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function.* J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 7-17.
117. Schlesinger, L.S., S.R. Hull, and T.M. Kaufman, *Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis to human macrophages.* J Immunol, 1994. **152**(8): p. 4070-9.

118. Kang, B.K. and L.S. Schlesinger, *Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2769-77.
119. van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek, *DC-SIGN: escape mechanism for pathogens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 697-709.
120. Moreno, C., A. Mehlert, and J. Lamb, *The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation*. Clin Exp Immunol, 1988. **74**(2): p. 206-10.
121. Chujor, C.S., et al., *Specific inhibition of mRNA accumulation for lymphokines in human T cell line Jurkat by mycobacterial lipoarabinomannan antigen*. Clin Exp Immunol, 1992. **87**(3): p. 398-403.
122. Goren, M.B., O. Brokl, and B.C. Das, *Sulfatides of Mycobacterium tuberculosis: the structure of the principal sulfatide (SL-I)*. Biochemistry, 1976. **15**(13): p. 2728-35.
123. Goren, M.B., A.E. Vatter, and J. Fiscus, *Polyanionic agents as inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages: evolution of an alternative interpretation*. J Leukoc Biol, 1987. **41**(2): p. 111-21.
124. Zhang, L., D. English, and B.R. Andersen, *Activation of human neutrophils by Mycobacterium tuberculosis-derived sulfolipid-1*. J Immunol, 1991. **146**(8): p. 2730-6.
125. Pabst, M.J., et al., *Inhibition of macrophage priming by sulfatide from Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1988. **140**(2): p. 634-40.
126. Brozna, J.P., et al., *Monocyte responses to sulfatide from Mycobacterium tuberculosis: inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation*. Infect Immun, 1991. **59**(8): p. 2542-8.
127. Sirakova, T.D., et al., *The Mycobacterium tuberculosis pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16833-9.
128. Converse, S.E., et al., *MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and Mycobacterium tuberculosis virulence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6121-6.
129. Domenech, P., M.B. Reed, and C.E. Barry, 3rd, *Contribution of the Mycobacterium tuberculosis MmpL protein family to virulence and drug resistance*. Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3492-501.
130. Domenech, P., et al., *The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21257-65.
131. Daffe, M. and M.A. Laneelle, *Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria*. J Gen Microbiol, 1988. **134**(7): p. 2049-55.
132. Brennan, P.J., *Mycobacterium and other actinomycetes*, in *Microbial lipids*. 1988, Acad.Press.: London.
133. Besra, G.S., et al., *Structural elucidation and antigenicity of a novel phenolic glycolipid antigen from Mycobacterium haemophilum*. Biochemistry, 1991. **30**(31): p. 7772-7.
134. Daffe, M., A. Varnerot, and V.V. Levy-Frebault, *The phenolic mycoside of Mycobacterium ulcerans: structure and taxonomic implications*. J Gen Microbiol, 1992. **138**(1): p. 131-7.

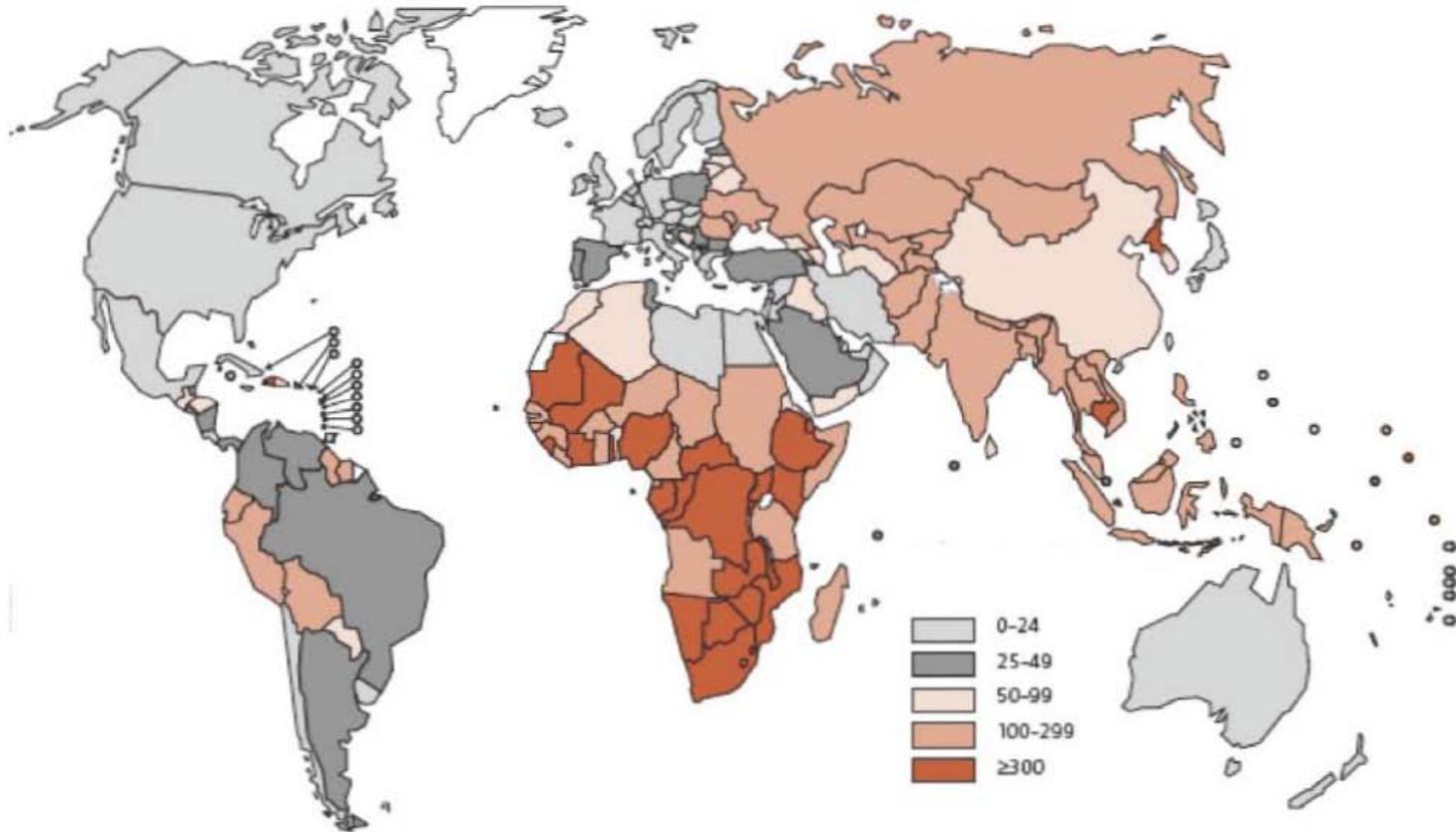
135. Fournie, J.J., et al., *Structural elucidation of the major phenolic glycolipid from Mycobacterium kansasii. II. Presence of a novel dideoxyhexose*. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 3180-4.
136. Fournie, J.J., M. Riviere, and G. Puzo, *Structural elucidation of the major phenolic glycolipid from Mycobacterium kansasii. I. Evidence for tetrasaccharide structure of the oligosaccharide moiety*. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 3174-9.
137. Gastambide-Odier, M. and P. Sarda, *Contributions à l'étude de la structure et de la biosynthèse de glycolipides spécifiques isolés de mycobactéries. Les mycosides A et B*. 1970. **Pneumologie**(142): p. 142-255.
138. Daffe, M., et al., *Structure of the major triglycosyl phenol-phthiocerol of Mycobacterium tuberculosis (strain Canetti)*. Eur J Biochem, 1987. **167**(1): p. 155-60.
139. Young, D.B. and T.M. Buchanan, *A serological test for leprosy with a glycolipid specific for Mycobacterium leprae*. Science, 1983. **221**(4615): p. 1057-9.
140. Cho, S.N., et al., *Serological specificity of phenolic glycolipid I from Mycobacterium leprae and use in serodiagnosis of leprosy*. Infect Immun, 1983. **41**(3): p. 1077-83.
141. Torgal-Garcia, J., H.L. David, and F. Papa, *Preliminary evaluation of a Mycobacterium tuberculosis phenolglycolipid antigen in the serologic diagnosis of tuberculosis*. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1988. **139**(3): p. 289-94.
142. Martin-Casabona, N., et al., *Time course of anti-SL-IV immunoglobulin G antibodies in patients with tuberculosis and tuberculosis-associated AIDS*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(5): p. 1089-93.
143. Launois, P., et al., *Phenolic glycolipid-I from M. leprae inhibits oxygen free radical production by human mononuclear cells*. Res Immunol, 1989. **140**(9): p. 847-55.
144. Vachula, M., T.J. Holzer, and B.R. Andersen, *Suppression of monocyte oxidative response by phenolic glycolipid I of Mycobacterium leprae*. J Immunol, 1989. **142**(5): p. 1696-701.
145. Vachula, M., et al., *Effect of Mycobacterium leprae's phenolic glycolipid-I on interferon-gamma augmentation of monocyte oxidative responses*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1990. **58**(2): p. 342-6.
146. Chan, J., et al., *Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2453-7.
147. Ng, V., et al., *Role of the cell wall phenolic glycolipid-I in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae*. Cell, 2000. **103**(3): p. 511-24.
148. Prasad, H.K., R.S. Mishra, and I. Nath, *Phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae induces general suppression of in vitro concanavalin A responses unrelated to leprosy type*. J Exp Med, 1987. **165**(1): p. 239-44.
149. Fournie, J.J., et al., *Inhibition of human lymphoproliferative responses by mycobacterial phenolic glycolipids*. Infect Immun, 1989. **57**(11): p. 3653-9.
150. Lemassu, A., M.A. Laneelle, and M. Daffe, *Revised structure of a trehalose-containing immunoreactive glycolipid of Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett, 1991. **62**(2-3): p. 171-5.
151. Munoz, M., et al., *Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett, 1997. **157**(2): p. 251-9.

152. Simonney, N., et al., *Analysis of the immunological humoral response to Mycobacterium tuberculosis glycolipid antigens (DAT, PGLTb1) for diagnosis of tuberculosis in HIV-seropositive and -seronegative patients.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1995. **14**(10): p. 883-91.
153. Escamilla, L., et al., *Mycobacterium fortuitum glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis.* Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(6 Pt 1): p. 1864-7.
154. Gautier, N., et al., *Structure of mycoside F, a family of trehalose-containing glycolipids of Mycobacterium fortuitum.* FEMS Microbiol Lett, 1992. **77**(1-3): p. 81-7.
155. Tortola, M.T., M.A. Laneelle, and N. Martin-Casabona, *Comparison of two 2,3-diacyl trehalose antigens from Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium fortuitum for serology in tuberculosis patients.* Clin Diagn Lab Immunol, 1996. **3**(5): p. 563-6.
156. Saavedra, R., et al., *Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro.* Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(6): p. 1081-8.
157. Maldonado-Garcia, G., et al., *High-polarity Mycobacterium avium-derived lipids interact with murine macrophage lipid rafts.* Scand J Immunol, 2004. **60**(5): p. 463-70.
158. Welin, A., et al., *Incorporation of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block.* Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 2882-7.
159. Blagosklonny, M.V. and A.B. Pardee, *The restriction point of the cell cycle.* Cell Cycle, 2002. **1**(2): p. 103-10.
160. Yang, K., M. Hitomi, and D.W. Stacey, *Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell.* Cell Div, 2006. **1**: p. 32.
161. Lukas, J., et al., *Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines.* Oncogene, 1994. **9**(3): p. 707-18.
162. Hernandez-Pando, R., et al., *Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis.* Immunology, 1996. **89**(1): p. 26-33.
163. Kim, M.J., et al., *The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation.* Exp Mol Med, 2000. **32**(3): p. 101-9.
164. Villalba, M., et al., *Vav modulation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a role in NFAT activation and CD69 up-regulation.* Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1587-96.
165. Franklin, R.A., et al., *Ligation of the T cell receptor complex results in activation of the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human T lymphocytes.* J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2134-40.
166. Yamashita, M., et al., *Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway.* J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29409-19.
167. Roose, J.P., et al., *A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4426-41.
168. Kolch, W., et al., *Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation.* Nature, 1993. **364**(6434): p. 249-52.

169. Wen-Sheng, W., *Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2*. *Cancer Lett*, 2006. **239**(1): p. 27-35.
170. Trushin, S.A., et al., *Protein kinase C and calcineurin synergize to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 22923-31.
171. Trushin, S.A., et al., *Protein kinase Calpha (PKCalpha) acts upstream of PKCtheta to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(19): p. 7068-81.
172. Delgado, J.C., 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**(11): p. 7576-81.
173. Ostanin, A.A., et al., *T Cell Functional Disturbances in Patients with Pulmonary Tuberculosis*. 2000. **5**(1): p. 53-62.
174. Sakhno, L.V., et al., *[T-cellular energy deficiency in the pathogenesis of immunodeficiency in pulmonary tuberculosis]*. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh*, 2004(5): p. 23-8.
175. Lee, J.S., et al., *Depressed interleukin-12 production by peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation with the 30-kDa antigen in recurrent pulmonary tuberculosis patients*. *Med Microbiol Immunol*, 2003. **192**(2): p. 61-9.
176. Lee, J.S., et al., *The production of tumour necrosis factor-alpha is decreased in peripheral blood mononuclear cells from multidrug-resistant tuberculosis patients following stimulation with the 30-kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **132**(3): p. 443-9.
177. Vergne, I. and M. Daffe, *Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells*. *Front Biosci*, 1998. **3**: p. d865-76.
178. Flynn, J.L. and J. Chan, *Immunology of tuberculosis*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 93-129.
179. Straus, D.B. and A. Weiss, *Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor*. *Cell*, 1992. **70**(4): p. 585-93.
180. Wange, R.L., et al., *Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(26): p. 19797-801.
181. Chan, A.C., et al., *Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function*. *EMBO J*, 1995. **14**(11): p. 2499-508.
182. Yablonski, D., T. Kadlecik, and A. Weiss, *Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(13): p. 4208-18.
183. Zhang, W., et al., *LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation*. *Cell*, 1998. **92**(1): p. 83-92.
184. Schaeffer, E.M., et al., *Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity*. *Science*, 1999. **284**(5414): p. 638-41.

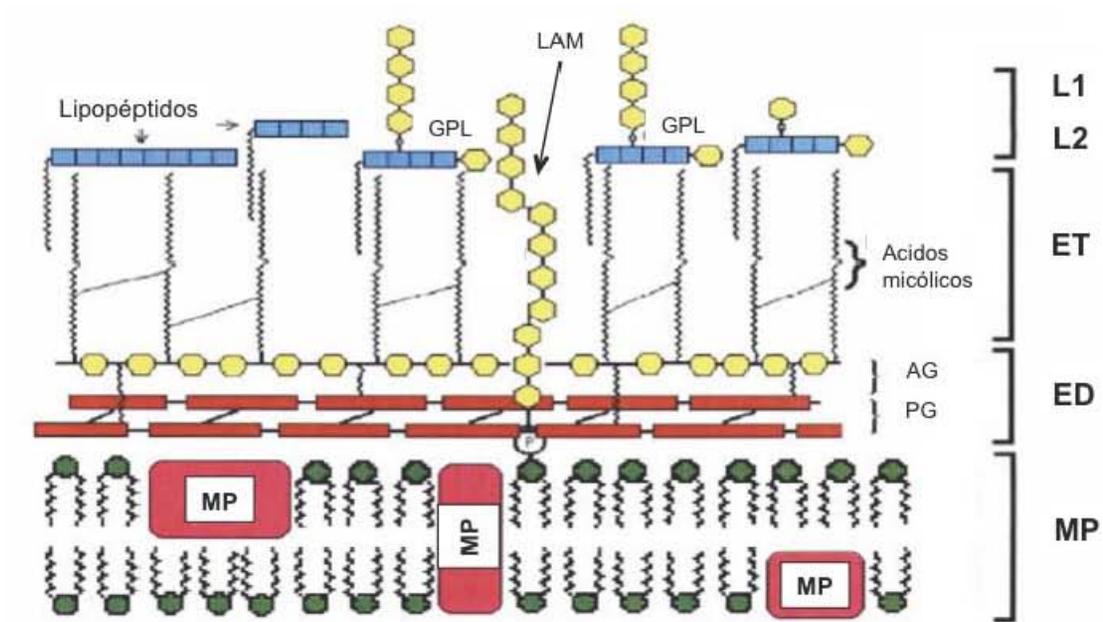
185. Altman, A., M.I. Mally, and N. Isakov, *Phorbol ester synergizes with Ca²⁺ ionophore in activation of protein kinase C (PKC)alpha and PKC beta isoenzymes in human T cells and in induction of related cellular functions*. Immunology, 1992. **76**(3): p. 465-71.
186. Egan, S.E., et al., *Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation*. Nature, 1993. **363**(6424): p. 45-51.
187. Lowenstein, E.J., et al., *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 431-42.
188. Bivona, T.G., et al., *Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1*. Nature, 2003. **424**(6949): p. 694-8.
189. Ebinu, J.O., et al., *RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3199-203.
190. Toker, A., *Signaling through protein kinase C*. Front Biosci, 1998. **3**: p. D1134-47.
191. Li, Y., et al., *Role for protein kinase Ctheta (PKCtheta) in TCR/CD28-mediated signaling through the canonical but not the non-canonical pathway for NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1217-23.
192. Knutson, K.L., et al., *Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase I*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 645-52.

Apéndice A. Incidencia estimada de tuberculosis pulmonar *



* Número de casos nuevos en el año 2007 por cada 100,000 habitantes. WHO REPORT 2009.

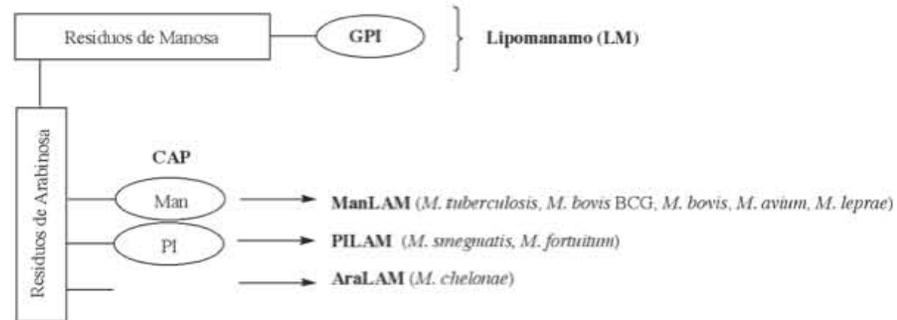
Apéndice B. Modelo esquemático de la pared celular de las micobacterias



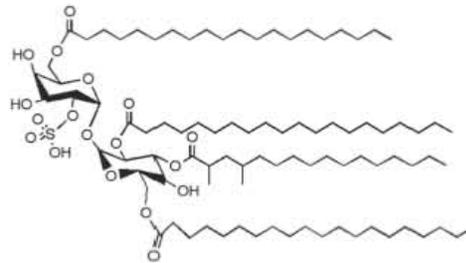
Modelo general de la pared celular de las micobacterias en el que se representa la membrana plasmática (MP), las capas electrotransparente (ET), electrodensa (ED), y las capas más externas L1 y L2 formadas por lípidos unidos no covalentemente.

Apéndice C. Representación esquemática de los principales lípidos inmunosupresores de *M. tuberculosis*.

I. LAM

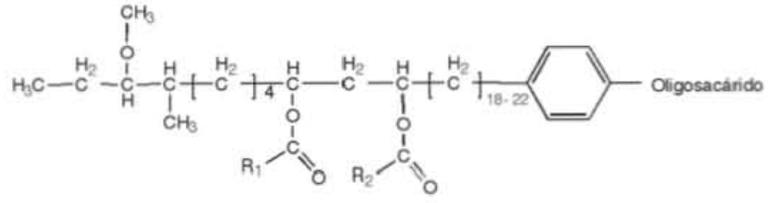


II. Sulfátido I

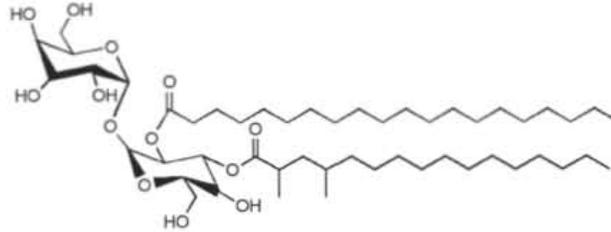


Apéndice C. Continuación

III. Glicolípido fenólico



IV. 2,3, DAT



Apéndice D. Síntesis Curricular

I. Formación académica

- a) **Licenciatura en Bioquímica.** Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Unidad Zona Huasteca. **Tesis:** “Estudio fisiológico y enzimático de tres géneros de hongos dematiáceos: *Aureobasidium*, *Cladosporium* y *Curvularia*”. Cd. Valles, S.L.P. México, de 1992 a 1996.
- b) **Maestría en Ciencias.** (*Biología Molecular e Ingeniería Genética*). Universidad Autónoma de Nuevo León. **Tesis:** “Clonación molecular y producción de la hormona variante del crecimiento humano (hGH-V) en *Pichia pastoris*”. Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México, de 1998 a 2001.
- c) **Doctorado en Ciencias** (*Inmunología*). Universidad Nacional Autónoma de México. **Tesis:** “Bases moleculares de la inmunosupresión por glicolípidos en la tuberculosis”. Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. México, D.F. Marzo de 2002 – Marzo de 2006.
- d) **Diplomado en Investigación Genómica.** Universidad Autónoma de la Ciudad de México. **Tesina:** “La genómica en el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis”. México, D.F. Septiembre de 2006 – Agosto de 2007.

II. Publicaciones arbitradas

1. **Palma-Nicolás JP**, López E, López-Colomé AM. Thrombin stimulates RPE cell motility by PKC- ζ and NF-kB –dependent gene expression of MCP-1 and CINC-1/GRO chemokines. *J Cell Biochem.* 2009. Aceptado.
2. Parrales A, **Palma-Nicolás JP**, López E, López-Colomé AM. Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression. *J Cell Physiol.* 2009. Doi:10.1002/jcp.21951.
3. **Palma-Nicolás JP**, Hernandez-Pando R, Estrada I, Zentella A, Segura E, López-Marin LM. Mycobacterial di-O-acyltrehalose inhibits Th-1 cytokine gene expression in murine cells through down modulation of MAPK signaling. *Immunobiology*, 2009. Doi:10.1016/j.imbio.2009.03.010

4. **Palma-Nicolás JP**, López E, López-Colomé AM. PKC isoenzymes differentially modulate thrombin effect on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci Rep*. 2008; 28(6):307-317
5. Lee-Rivera I, López E, **Palma JP**, López-Colomé AM. Serum differentially modifies the transcription and translation of NMDAR subunits in retinal neurons. *Neurochem Research*. 2008; 33(8):1442-1451.
6. Pacheco-Dominguez RL, **Palma-Nicolas JP**, López E, López-Colomé AM. The activation of MEK-ERK1/2 by glutamate receptor-stimulation is involved in the regulation of RPE cell proliferation and morphologic transformation. *Experimental Eye Research*. 2008; 86(2):207-219.
7. **Palma-Nicolás JP**, Bocanegra-García V. Innovative Strategies to Diagnose and Monitor Tuberculosis Patients. *Arch bronconeumol*. 2007;43(4):225-232.
8. Gevorkian G, Segura E, Acero G, **Palma JP**, Espitia C, Manoutcharian K, López-Marín LM. Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. *Biochem J*. 2005; 387(2):411-417.
9. **Palma-Nicolás JP**, Ascacio-Martinez JA, Revol A, Barrera-Saldaña HA. Production of recombinant human placental variant growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnol lett*. 2005; 27:1695-1700.

III. Capítulos en libro

- 1) Segura Salinas E., Hermida Escobedo C., Acero G., **Palma JP.**, Manotcharian, K., Gevorkian G. y López-Marín LM. Antígenos no proteicos para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis: importancia, problemas y nuevos planteamientos. Cap IV, pp 45-55. En: **Enfermedades infecciosas emergentes y perspectivas para su diagnóstico oportuno**. Editores: Jorge Paniagua Solis, Leopoldo Santos Argumedo y Vianney Ortiz Navarrete. Primera Edición, 2005; ISBN: 970-94592-0-1.

IV. Cursos y talleres

- 1) “CURSO GENERAL DE PROPIEDAD INTELECTUAL” 15 – 30 de Octubre de 2009. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México D.F.
- 2) “CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO DE PCR EN TIEMPO REAL” 07 - 09 de Septiembre de 2009. Applied Biosystems de México. México, D.F.

- 3) “PROTECCIÓN RADIOLÓGICA – NIVEL PERSONAL OCUPACIONALMENTE EXPUESTO QUE UTILICE FUENTES ABIERTAS” 2 – 27 de Octubre de 2006. Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, D.F., México.
- 4) “TALLER INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA AGENTES INFECCIOSOS Y NO INFECCIOSOS” 7 – 18 de Noviembre de 2005. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). México, D.F.
- 5) “MÉTODOS AVANZADOS DE ANÁLISIS DEL GENOMA” Septiembre de 2004. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, D.F., México.

V. Distinciones

- 1) SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): Candidato (Convocatoria 2007).
- 2) “PREMIO A LA MEJOR TESIS DE MAESTRÍA U.A.N.L 2002” con la tesis titulada “Clonación molecular y producción de la hormona variante del crecimiento humano (hGH-V) en *Pichia pastoris*”. Octubre de 2003, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. México.



ELSEVIER



ScienceDirect

Immunobiology ■ (■■■■) ■■■-■■■

Immunobiology

www.elsevier.de/imbio

Mycobacterial di-*O*-acyl trehalose inhibits Th-1 cytokine gene expression in murine cells by down-modulation of MAPK signaling

José Prisco Palma-Nicolás^a, Rogelio Hernández-Pando^b, Erika Segura^a,
María J. Ibarra-Sánchez^b, Iris Estrada-García^c, Alejandro Zentella-Dehesa^{a,b},
Luz M. López-Marín^{a,*},¹

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-228, Coyoacán 04510, DF México, Mexico

^bInstituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, DF México, Mexico

^cDepartamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., Carpio y Plan de Ayala s/n. Col. Santo Tomás, 11340, DF México, Mexico

Received 2 March 2009; received in revised form 23 March 2009; accepted 24 March 2009

Abstract

Protection against tuberculosis (TB) is based on cell-mediated immune responses. TB is often characterized by immunological dysfunction of peripheral blood mononuclear cells, especially at chronic stages. Lipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall have been shown to produce various suppressive effects on cell-mediated immunity. The cell-surface lipid di-*O*-acyl-trehalose (DAT) is able to inhibit T-cell proliferation and cytokine secretion in cells from naïve mice. In the present study, we addressed the mechanisms involved in the suppressive effect caused by DAT. We found that DAT decreased the proliferation of spleen cells induced with PMA-ionomycin, suggesting that the suppressive mechanisms target intracellular functions just after phospholipase C- γ activation. Addressing this possibility, the effect of DAT was found to involve down-modulation of the di-acyl glycerol-dependent activation of the MAPK-ERK1/2 pathway, one of the crucial signaling pathways leading to adaptive cell immune response against TB. Moreover, the inhibitory effect of DAT on proliferation was reproduced in antigen-stimulated T cells from *M. tuberculosis*-infected mice, involving the lowering of Th1-type cytokine transcription levels. The present findings thus reveal a new kind of bioactivity for a long-known *M. tuberculosis* cell wall lipid, DAT.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Tuberculosis; Glycolipids; MAPK; PKC; Immune suppression

Abbreviations: PKC, protein kinase C; ERK, p42/p44 extracellular-regulated kinase; DAT, 2,3-di-*O*-acyl-trehalose; PLC- γ , phospholipase C- γ .

*Corresponding author. Tel.: +52 55 56 23 4034.

E-mail address: lmlm@unam.mx (L.M. López-Marín).

¹Present address: Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Carr. Querétaro-SLP km 15, Querétaro 76230, México.

Introduction

Tuberculosis (TB) remains one of the most serious global health problems. One-third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, and 10% of these individuals progress to the clinical form of pulmonary TB during their lifetime (Kaufmann 2001).

0171-2985/\$ - see front matter © 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.
doi:10.1016/j.imbio.2009.03.010

Please cite this article as: Palma-Nicolás, J.P., et al., Mycobacterial di-*O*-acyl trehalose inhibits Th-1 cytokine gene expression in murine cells by down-modulation of MAPK signaling. *Immunobiology* (2009), doi:10.1016/j.imbio.2009.03.010

According to the 2007 WHO report, there are about 8.8 million new cases annually causing 1.6 million deaths worldwide. It has been established that a strong cellular immune response plays a central role in the defense against mycobacterial infection, mainly through the production of interferon- γ (IFN- γ) by the CD4⁺ T-cell subset and the release of cytotoxic granules from CD8⁺ T cells (Flynn and Chan 2001; Grotzke and Lewinsohn 2005). T-cell activation is strongly related to the priming/cross-priming of professional phagocytes, which have a central role in clearing the infection through phagocytosis and influence the establishment of the Th-1-type cellular response through the secretion of proinflammatory mediators, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-12 (van Crevel et al. 2002).

A consistent feature in TB patients has been the *in vitro* dysfunction of circulating T lymphocytes and mononuclear cells, especially at chronic stages of the disease (Delgado et al. 2002). T cells from chronically infected individuals show altered proliferative responses when they are primed *in vitro* with *M. tuberculosis* antigens, a phenomenon called clonal anergy. Also, the *in vitro* activation and antigen presentation in both human and murine *M. tuberculosis*-infected macrophages are known to be strongly inhibited (Chang et al. 2005; Gercken et al. 1994; Giacomini et al. 2001; Hmama et al. 1998; Noss et al. 2000; Saha et al. 1994).

Immune suppression in TB is a complex and poorly understood phenomenon, which involves multiple mechanisms that include regulatory T cells, immunosuppressive cytokines and T-cell exhaustion after chronic antigen exposure. Within this poorly understood process, it is thought that specific components of *M. tuberculosis* should contribute to T-cell dysfunction, since various immunosuppressive activities have been described for some of them (Ellner 1997; Lee et al. 2003a, b). For instance, total extractable lipids non-covalently attached to the mycoloyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex induce inhibitory effects on T-cell and macrophage functions (Manca et al. 2004). Some specific lipid compounds, such as lipoarabinomannan (LAM), acylated trehaloses, or phenolic glycolipids, have been found to be responsible for various immunosuppressive activities either in naïve T lymphocytes or in various immune cells obtained from *M. tuberculosis*-infected animals (Briken et al. 2004; Fournie et al. 1989; Reed et al. 2004; Saavedra et al. 2001). Similarly, total extractable lipids down-modulate activities in human macrophages (Rocha-Ramirez et al. 2008). However, few molecular bases of lipid immune suppression have been addressed, and more knowledge is required to better understand how lipid compounds influence pathogenesis.

Previously, we found that mycobacterial di-*O*-acyl-trehalose (DAT) suppressed murine and human immune

cells (Saavedra et al. 2001, 2006). To gain insights into the molecular aspects of immune suppression by DAT, we looked for alterations in intracellular pathways leading to protective response against intracellular pathogens, namely the Protein Kinase C (PKC) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Our results show that T-cell down-modulation by DAT involves the inhibition of the MAPK-ERK1/2 pathway, thereby inhibiting Th1-type cytokine gene transcription. Finally, we assessed the ability of DAT to impair immune activation *ex vivo* in cells from *M. tuberculosis*-infected mice.

Material and methods

Cell culture medium

All reagents were cell culture grade (Sigma, St. Louis, Mo). The complete culture medium consisted of RPMI 1640 supplemented with sodium pyruvate (1 mM), nonessential aminoacids (0.01 mM), HEPES (25 mM), L-glutamine (2 mM), β -mercaptoethanol (0.05 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), and 10% (vol/vol) fetal calf serum (FCS).

Di-*O*-acyltrehalose (DAT) purification

DAT was obtained, purified and characterized from *M. fortuitum* ATCC 6841 as described elsewhere (Escamilla et al. 1996). Briefly, heat-killed cells were extracted with chloroform-methanol, and the lipids fractionated by adsorption chromatography on Florisil and Silica-gel. Identity of the purified products was checked by gas chromatography of released sugars and fatty acids and by fast-atom-bombardment mass spectrometry analysis.

Cell proliferation assays

Increasing concentrations of DAT dissolved in hexane-ethanol (1:1[vol/vol]) were added (100 μ l/well) to triplicate wells of 96-well flat-bottom plates (Costar, Cambridge, Mass) and allowed to dry under sterile conditions. The control wells received solvent alone. Spleen cells (1×10^5) were added to the wells and incubated for 2 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air. Cells were then incubated for 72 h with Concanavalin A (Con A) (1.0 μ g/ml) dissolved in 100 μ l of culture medium, or phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) (10 nM) and ionomycin (0.25 μ M) in the same volume of culture medium. In cell proliferation assays with splenocytes from *M. tuberculosis*-infected mice, we used mycobacterial total proteins as antigen for 120 h. Alternatively, CD4⁺ T cells from splenocytes

were labeled with anti-CD4-allophycocyanin (Caltag Laboratories, Carlsbad, CA) and isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using an Aria instrument and the FACS Diva software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); a total of 5×10^4 purified CD4⁺ T cells were incubated with 2×10^5 irradiated (3000 rad) autologous splenocytes in the absence or presence of DAT and activated with Con A or PMA as described above. The cells were pulsed with 0.5 μ Ci of [³H]-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, England) for the last 18 h and were harvested onto glass fiber filters with an automatic cell harvester (Skatron, Sterling, Va.). The radioactivity uptake was measured by liquid scintillation spectroscopy on a Betaplate counter (Wallac, Turku, Finland).

Experimental model of pulmonary tuberculosis

The experimental model of progressive pulmonary tuberculosis in mice by intratracheal inoculation (ITT) has been previously described in detail (Hernández-Pando et al. 1996). Briefly, the *M. tuberculosis* strain H37Rv was cultured in Proskauer and Beck medium modified by Youmans. After 1 month of culture, bacilli were harvested and adjusted to 1×10^6 cells in 100 μ l of endotoxin-free sterile saline solution, aliquoted and maintained at -70°C until use. Immediately before use, bacteria were counted and their viability checked. To induce the infection, 8-week-old BALB/c mice were anaesthetized with 56 mg/kg of intraperitoneal Pentothal. The trachea was carefully exposed via a small middle incision, and was inoculated with 100 μ l of PBS containing 250,000 viable bacteria. The incision was then closed with sterile silk, and the mice were maintained in a vertical position until the effect of anaesthesia wore off. Infections were performed in a BSL III biosafety facility at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición "Salvador Zubirán", in accordance with institutional guidelines for animal care and experimentation. At least five mice were sacrificed at 14 days post-infection in each experiment.

Quantification of cytokines by ELISA

To quantify IL-2, IL-4 and IFN- γ , the OptEIA™ assay was used following the manufacturer's instructions (PharMingen, San Diego, CA). Briefly, the 96-well ELISA plates were coated with monoclonal anti-mouse IL-2, IL-4 or IFN- γ dissolved in 50 μ l of 0.1 M carbonate buffer, pH 8.2, and incubated overnight at 4°C . After washing with 0.05% PBS-Tween-20, wells were blocked with 3% BSA in PBS for 2 h at room temperature. Recombinant cytokines or serial dilutions of culture supernatants in 100 μ l of supplemented

culture medium were added, and the plates incubated overnight at 4°C . After washing, biotinylated monoclonal anti-mouse antibodies dissolved in PBS-BSA (1%) were added and incubated for 1 h at room temperature. After rinsing, plates were incubated with streptavidin-peroxidase diluted 1/500 in PBS-BSA (1%) for 30 min at room temperature. After addition of the ABTS reagent (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), the plates were read at 405 nm.

RT-PCR analysis of cytokine gene expression

Total spleen cells or purified CD4⁺ T cells from BALB/c mice were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS for 2 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air, in the presence or absence of 100 μ M DAT. After 24 h of stimulation with Con A (1 μ g/ml), cells were harvested, and total RNA extraction was carried out by using the TRI reagent (Sigma, St. Louis, MO).

First-strand cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT) and oligo dT₁₂₋₁₈ primer, following the recommendations of the supplier (Invitrogen, Carlsbad, CA). Then, 5 μ l of the reverse transcriptase reaction was amplified in a final volume of 20 μ l including 1.5 mM MgCl₂, 300 nM dNTPs, 375 nM of each primer, 1.25 U of Taq DNA polymerase, and its corresponding buffer.

The primer sequences were as follows: IL-2 (5'-ATG-TACAGCATGCAGCTAGCATC-3' and 5'-GGCTT-GTTGAGATGATGCTTTGACA-3'), IL-4 (5'-CCAG-CTAGTTGTCATCCTGCTCT TCTTTCTCG-3' and 5'-CAGTGATGTGGACTTGGACTCATTTCATGGT-GC-3'), IL-12p40 (5'-CAGAAGCTAACCATCTCCT-GGTTT-3' and 5'-TCCGGAGTAATTTGGTGCTT-CAC AC-3'), IFN- γ (5'-TGAACGCTACACACTGCA-TCTTGG-3' and 5'-CGACTCCTTTCCGC TTCCT-GAG-3'), TNF- α (5'-ATGAGCACAGAAAGCATGA-TCCGC-3' and 5'-CCAAAGT AGACCTGCCCGGA-CTC-3') and for the housekeeping glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) (5'-ACCACAG-TCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTG T-TGCTGT-3'). The program of the thermocycler (Gene Amp PCR System 2400, Wellesley, MA) consisted of an initial step at 94°C for 5 min, 30 cycles (each consisting of a denaturation step at 94°C for 30 s, an annealing step at 60°C for 30 s, and an extension step at 72°C for 1 min), and a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR products were resolved by agarose electrophoresis, and the relative gene expression was quantified by optical densitometry (Fluor-S, Biorad, Hercules, CA). When indicated, PD98059 inhibitor (50 μ M) was added 1 h before mitogenic activation.

Western blotting assays

Total spleen cells from BALB/c mice were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS for 2 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air, in the presence or absence of 100 μM DAT. The FCS in the culture medium was reduced to 5% by dilution with fresh, non-FCS-supplemented RPMI 1640, and incubated under identical conditions for 2 more hours. Total spleen cells were then stimulated with 25 nM PMA for 15 and 30 min at 37 °C, and subsequently resuspended in 150 μl of lysis buffer [20 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.5 mM EGTA; 1.0 mM EDTA; 10 mM 2-mercaptoethanol; 1.0 mM PMSF; 40 mM β-glycerophosphate; 10 mM sodium pyrophosphate; and 0.5% Triton X-100]. Total proteins (30 μg) were resolved by SDS-PAGE in 15% acrylamide gels and electrotransferred to PVDF membranes in a semi-dry system (Biorad, Hercules, CA).

PVDF membranes were probed with total ERK1/2 (1:4000), phosphospecific-ERK1/2 antibody (pThr²⁰²/Tyr²⁰⁴, 1:1000) and total IκB-α (H-4, 1:1000). The integrated intensity of the immunoreactive bands was determined by semi-quantitative densitometry, normalized to the expression of mouse β-actin (detected by anti-actin 1:5000), and plotted as percent of expression in non-stimulated control cells (mean ± SEM). The MEK inhibitor, PD98059 (Sigma, St. Louis MO) at 50 μM final concentration was used as control of MEK-dependent ERK1/2 activation by PMA.

In vitro non-radioactive kinase assay for PKC

Standard classical PKC isoenzymes (0.1 μg α,β,γ, Promega Co., Madison, WI) were incubated with PKC reaction buffer [100 mM HEPES, pH 7.4; 6.5 mM CaCl₂; 5 mM DTT; 50 mM MgCl₂; and 5 mM ATP], the fluorescent, PKC-specific, C1 substrate (P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K, 0.4 μg/μl), DAG or PMA (1.0 μg/ml), and the co-activator phosphatidylserine (1.0 mg/ml) at 30 °C for 30 min. Finally, 150 μM of mycobacterial DAT was added to the reaction tubes. Myristolated protein kinase C peptide inhibitor (Myr-R-F-A-R-K-G-A-L-R-Q-K-N-V; Promega Co. Madison WI), which specifically inhibits calcium- and phospholipid-dependent protein kinase C, was used as control for specificity (150 μM). Phosphorylation of C1 peptide was terminated by denaturing the PKC in a water bath at 100 °C for 15 min. Phosphorylated and non-phosphorylated forms of C1 peptide in the reactions were resolved by electrophoresis in agarose (0.8%), and the integrated intensity of the tagged C1-fluorescent spots was quantified by semi-quantitative densitometry and plotted as percent of the positive control.

Data analysis

Raw data from at least three independent experiments were collected and plotted with Graph Pad PrismTM 4.0 (SEM ± SD). Images of ethidium bromide-stained agarose gels or chemiluminiscent immunoblots were obtained with Fluor-S MultiImager (BioRad), and densitometric analyses were carried out with Quantity One SoftwareTM. Student's *t*-test was used for statistical analysis (* if *p* < 0.05, ** if *p* < 0.01, *** if *p* < 0.001).

Results

Inhibitory effects of mycobacterial DAT involve Ca²⁺ - and DAG-dependent pathways

Mycobacterial DAT is known to down-modulate mitogen- and antigen-driven blastogenesis of T cells as well as cytokine production (Saavedra et al. 2006). In order to study the molecular events involved in inhibition, we used the DAG analog phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and the calcium ionophore ionomycin, to bypass the requirements for early signals derived from TCR ligation. Total spleen cells were preincubated with 100 μM DAT for 2 h, and stimulated with PMA (10 nM) and ionomycin (0.25 μM) for an additional period of 72 h and cell proliferation was quantified by [³H]-thymidine uptake. Activation with these agents was sufficient to induce *il-2*, *il-4* and *ifn-γ* expressions (data not shown). Under these conditions, mycobacterial DAT did inhibit cell proliferation in a dose-dependent manner (Fig. 1), indicating that down-modulation involves Ca²⁺- and DAG-dependent signaling pathways, just after phospholipase

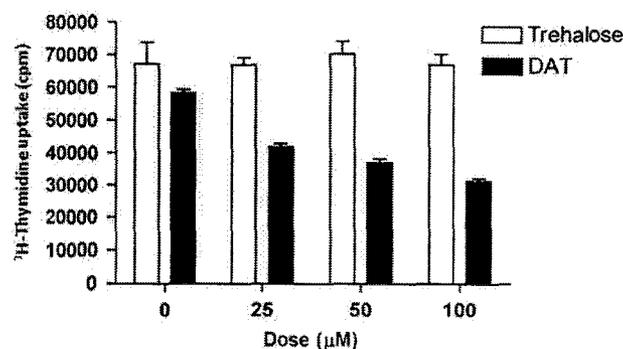


Fig. 1. Ca²⁺- and DAG-dependent signaling pathways are targeted by DAT. Spleen cells from BALB/c mice were exposed to increasing doses of DAT or its free-lipid moiety, trehalose, for 2 h prior to mitogenic stimulation with ionomycin (0.25 μM) plus PMA (10 nM). Cell proliferation was quantified by [³H]-thymidine incorporation 72 h after activation.

C- γ activation (PLC- γ). The effect was dependent on the lipid moiety of DAT since the lipid-free sugar (trehalose) did not alter T-cell proliferation.

Mycobacterial di-*O*-acyltrehalose targets the DAG-dependent MAPK-ERK1/2 activation

The mitogen-activated protein kinases are the main signaling pathways involved in cell proliferation and Th1/Th2 differentiation (Franklin et al. 1994). Recently, Ras-GTPases have been reported to contain C1 domains, and the members of this family of Ras-specific guanyl nucleotide exchange factors (RasGRPs) can be activated by DAG and phorbol ester analogs, like PMA. In T lymphocytes, the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway can be activated directly by RasGRP1 in a DAG-dependent manner (Roose et al. 2005). In order to search whether mycobacterial DAT inhibits the DAG-dependent MAPK signaling pathway, we stimulated total spleen cells from naïve BALB/c mice with PMA alone (25 nM) for 15 and 30 min in the presence of 100 μ M DAT. Total cell lysates were resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to PVDF membranes, and probed with phosphospecific anti-pERK1/2 antibodies. Mycobacterial DAT inhibited the DAG-dependent activation of ERK1/2 MAP kinases at the basal levels (Fig. 2a and b). By using the MEK-specific inhibitor, PD98059 (50 μ M), a causal relationship between ERK1/2 activation and Th-1 (IL-2 and IFN- γ) cytokine expression was demonstrated (Fig. 2c). In contrast, no inhibition of the Th-2 cytokine (IL-4) was observed even at higher PD98059 doses (data not shown).

Down-modulation of classical PKC is not involved in ERK1/2 targeting by DAT

DAG is also well known to be required for full activation of the classical α , β , and γ isoforms of PKC, a subfamily of serine/threonine kinases, which are dependent on phospholipase C gamma (PLC- γ) activity through the synthesis of inositol triphosphate (IP₃) and DAG. On the other hand, classic PKC- α has also been shown to activate MEK kinase (RAF-1) by direct phosphorylation (Kolch et al. 1993), contributing to total ERK1/2 activation. MAPK-ERK down-modulation by DAT could thus be related to down-modulation of DAG-dependent activation of PKC isoenzymes. To address this question we carried out an *in vitro* PKC activation assay in the presence of DAT. As shown in Fig. 3, phosphate transfer to the specific substrate, Pep-Tag C1 peptide (P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K), by purified classical PKC (α , β , and γ isoforms) was not affected by DAT. These results showed that ERK1/2 MAPK inhibition caused by DAT is not related to

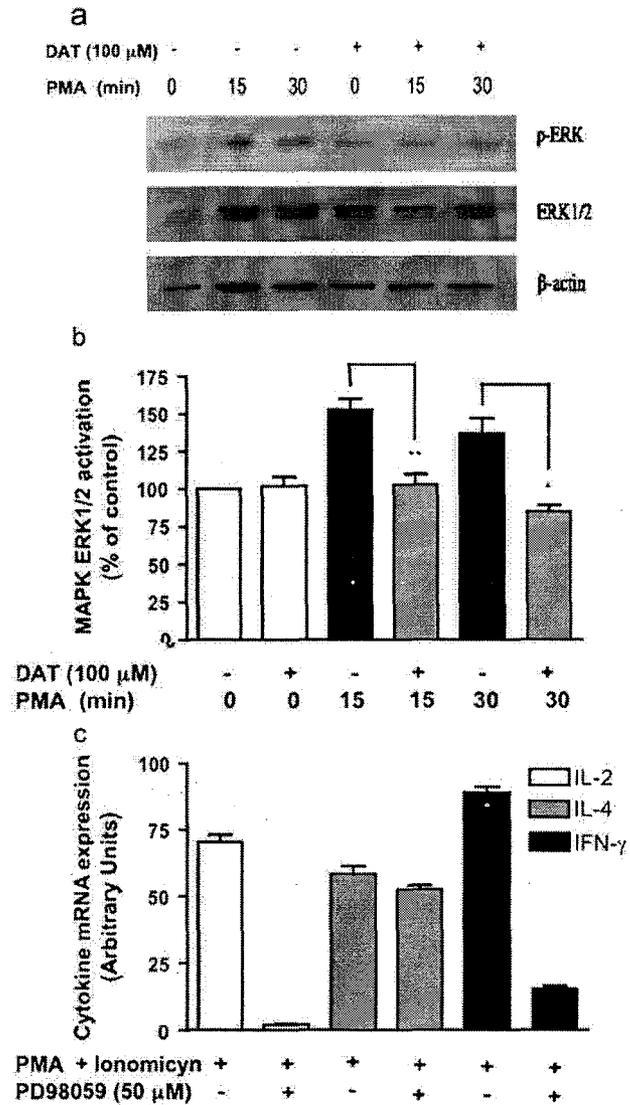


Fig. 2. Mycobacterial DAT targets the DAG-dependent ERK-MAPK activation. Total spleen cells previously exposed to DAT (100 μ M, 2 h) were stimulated with PMA (25 nM) for 15 and 30 min. Total proteins in cell lysates were resolved by SDS-PAGE and probed with anti-pERK and ERK antibodies. Expression of the β -actin housekeeping gene was used to normalize protein loading in gels (2a). The p-ERK immunoreactive band densities are plotted as a percentage of those of unstimulated control cells (2b). Cytokine expression of *il-2*, *il-4* and *ifn- γ* was measured by RT-PCR 24 h after mitogenic activation of spleen cells by PMA/Ionomycin in the presence of MEK inhibitor (PD98059, 50 μ M), (2c).

down-modulation of classic PKC activity. Consistent with this conclusion, the kinetic of phosphorylation/degradation of I κ B- α , one of the main PKC α -dependent signaling pathways leading to canonical NF- κ B activation (Trushin et al. 1999, 2003), was also unaffected by DAT in Con A-stimulated spleen cells from naïve BALB/c mice (Fig. 4).

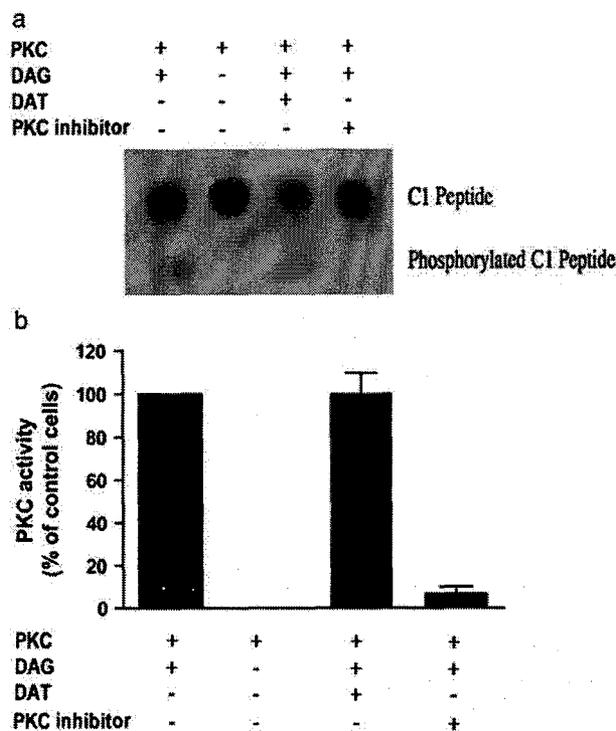


Fig. 3. Classical PKC activity is not down-modulated by mycobacterial DAT. The *in vitro* non-radioactive PKC kinase assay was carried out in the presence of DAT (150 μ M) in PKC reaction buffer supplemented with DAG (1.0 μ g/ml) and phosphatidylserine (1.0 mg/ml). After incubation for 30 min at 30 °C, the PKC-catalyzed phosphorylation of fluorescent C1 substrate (P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K, 0.4 μ g/ μ l) was analyzed by SDS-PAGE (3a) and the band intensities were measured by optical densitometry (Fluor-S, BioRad) (3b). Myristolated PKC peptide inhibitor (Myr-R-F-A-R-K-G-A-L-R-Q-K-N-V) was used as control for PKC specificity (150 μ M).

DAT inhibits cytokine gene expression in antigen-stimulated cells from *M. tuberculosis*-infected mice

Inhibitory effects of DAT on proliferation and cytokine production had been previously observed in both naïve mice and tuberculin-sensitive healthy individuals (Saavedra et al. 2001, 2006). We herein show that DAT is able to inhibit one of the main pathways, leading to protective response against intracellular pathogens. Thus, we investigated whether the modulatory effect of DAT is reproduced in cells responding against *M. tuberculosis* challenge. BALB/c mice were intratracheally challenged with *M. tuberculosis* H37Rv and cytokine mRNAs were measured at 14 days post-infection, when a Th1-type response is known to be dominant in this model (Hernández-Pando et al. 1996). All sacrificed animals showed Ziehl-Neelsen-positive staining in lung sections, indicating bacterial growth (data not shown). Splenocytes were isolated from

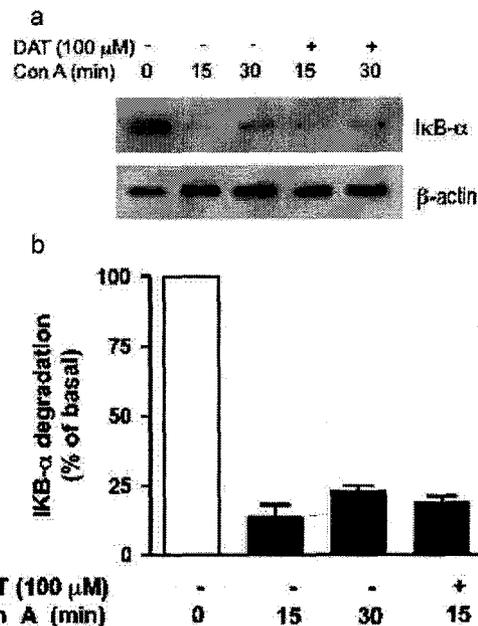


Fig. 4. Phosphorylation/degradation rate of I κ B- α is not affected by DAT. Spleen cells from BALB/c mice were exposed to DAT (100 μ M, 2 h), then stimulated with Con A (3.0 μ g/ml) for 15 or 30 min. Total proteins in cell lysates were resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to PVDF membranes, and probed with anti-I κ B α antibody; expression of the β -actin housekeeping gene was used as control (4a). Basal I κ B- α content from unstimulated control cells was arbitrarily set to 100%, and data from densitometry analyses of three independent experiments are plotted in 4b (mean \pm SD).

infected mice and stimulated *in vitro* with *M. tuberculosis* total proteins (1.25, 2.5, and 5.0 μ g/ml) or Con A (1.0 μ g/ml), and T-cell proliferation was assessed by [3 H]-thymidine incorporation at 120 and 72 h post-activation, respectively. After DAT treatment (100 μ M), no effects were found on Con A-stimulated T-cell proliferation (Fig. 5a). The lack of antigen-driven proliferation *in vitro*, as expected for anergized cells, prevented any effect of DAT on specific T-cell blastogenesis in this model (Fig. 5b). In contrast, cytokine mRNAs were measurable, and control gene transcription levels can be obtained. In spleen cells from *M. tuberculosis*-infected mice, DAT strongly inhibited mRNA expression of T-cell cytokines *il-2* and *ifn- γ* , by 90% and 94%, respectively, in comparison with antigen-activated control cells (Fig. 5c). No *il-4* mRNA was detected at this time of infection, as predicted for a Th1-biased cellular immune response. Expression of the monocyte/macrophage-derived cytokine genes *il-12p40* and *tnf- α* was also strongly inhibited by DAT (Fig. 5d). To search whether the lowering on cytokine mRNA synthesis is due to inhibition of T-cell functions, we evaluated mRNA expression of *il-2*, *il-4* and *ifn- γ* in isolated CD4 $^+$ T cells after DAT treatment. Due to

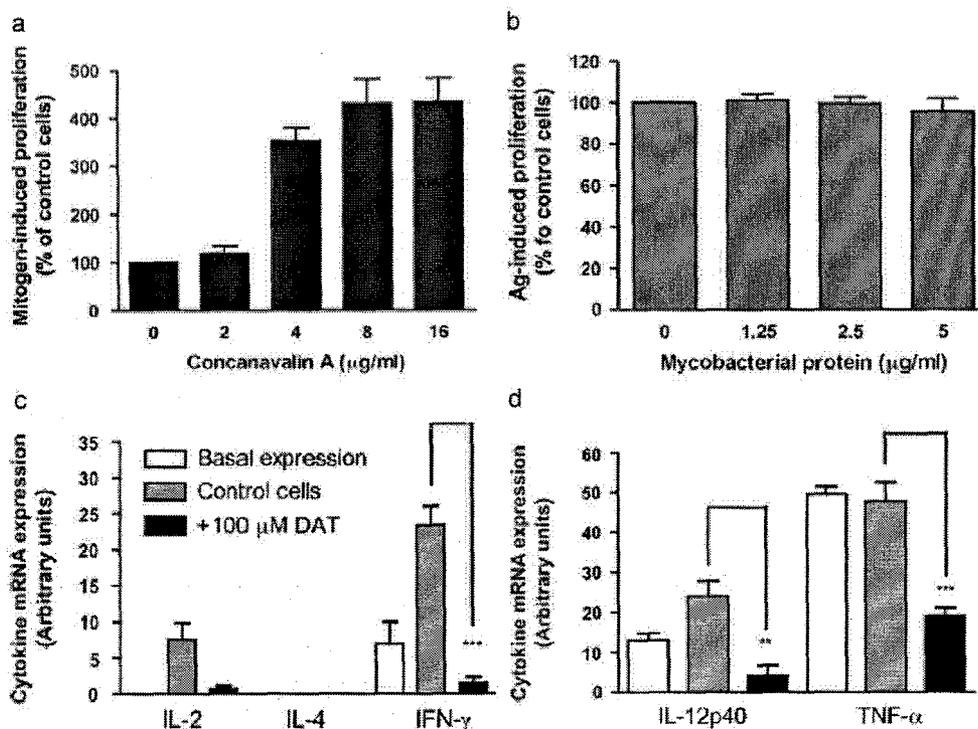


Fig. 5. DAT inhibits cytokine gene expression in *M. tuberculosis*-infected mice. BALB/c mice were intratracheally infected with *M. tuberculosis* H37Rv and sacrificed at day 14 *p.i.* Spleen cells were activated *in vitro* with Con A (5a) or mycobacterial proteins (5b), and cell proliferation in the presence of DAT was measured by [3 H]-thymidine incorporation. Cytokine mRNA content from T cells (5c) and monocyte/macrophage cells (5d) was quantified by RT-PCR 24 h after stimulation with *M. tuberculosis* total proteins (5.0 µg/ml) in the presence of DAT (100 µM). The gapdh-normalized expression is plotted as arbitrary units (mean \pm SD). Open bars show the basal expression of cytokine genes prior to antigenic stimulation *in vitro*.

biosafety reasons, Con A-stimulated naïve mice were used for this experiment. After stimulation for 24 h with Con A (1.0 µg/ml) in the presence of 100 µM DAT, mRNA levels were found to be inhibited at similar levels in both total spleen cells (Fig. 6a) and isolated CD4⁺ T cells in the presence of γ -irradiated adherent cells (Fig. 6b). Accordingly, a similar extent of inhibition on T-cell proliferation was observed in both preparations (Fig. 6c and d). Taken together, these results suggest that immunosuppressive activities of mycobacterial DAT may have a central role in suppressing cellular immune response during *M. tuberculosis* infection, involving down-modulation of gene expression through inhibition of MAPK-ERK signaling.

Discussion

The outcome of TB mainly depends on T-cell response, which is altered through multiple but poorly understood mechanisms. One of the main interests in TB research is the elucidation of bacterial molecules and mechanisms contributing to *M. tuberculosis* virulence. Lipids and complex carbohydrates from the *M. tuber-*

culosis cell wall have appeared as central immunosuppressive actors; however, few mycobacterial lipids have been studied in detail for their immune modulatory activities. We previously reported that DAT, a cell-surface lipid of tubercle bacilli, inhibits mitogen- and antigen-driven activation of T cells from both naïve mice and healthy human donors. These effects of DAT were devoid of cytotoxic activity (Saavedra et al. 2001). Mycobacterial lipids have long been thought to interact nonspecifically with membranes, modifying their biophysical properties and thereby modulating biological responses. In addition, lipids can act through direct interactions with intracellular signaling networks (Braken et al. 2004). Herein, we determined whether DAT is able to alter the direct activation of PKC with phorbol ester (PMA) plus ionomycin, thus bypassing the membrane-associated early signals triggered by TCR/CD3 ligation. Our results showed that DAT is still able to impair the PMA/Ionomycin-induced proliferation in spleen cells, suggesting the involvement of intracellular alterations in the inhibitory effect. We therefore looked for possible alterations caused by DAT on two major signaling pathways involved in T-cell proliferation, cytokine expression, and Th1/Th2 differentiation: the MAPK signaling pathway and the PKC activation.

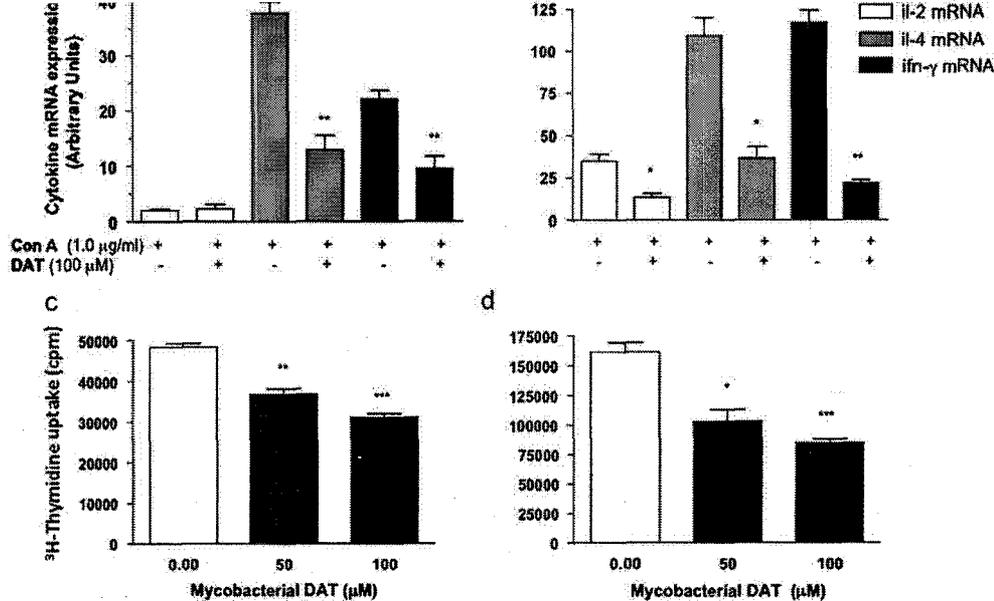


Fig. 6. DAT inhibits cytokine expression through inhibition of CD4⁺ T-cell functions. Total spleen cells or purified CD4⁺ T cells from naïve BALB/c mice were incubated with 50 or 100 µM DAT for 2 h. After activation with Con A (1.0 µg/ml) for 24 h, the mRNA content was measured by semi-quantitative RT-PCR for *il-2*, *il-4* and *ifn-γ*, normalizing with GAPDH expression (Fig. 6a and b). Results are plotted as arbitrary units (mean ± SD). Cell proliferation was measured by ³H-Thymidine uptake 72 h after mitogen activation of total spleen cells (6c) or CD4⁺ T cells (6d). Statistical significance in Student's *t*-test was calculated with respect to DAT-free control cells (white bars).

Activation of TCR/CD3 by receptor-associated tyrosine kinases proceeds to MAPK activation through the Ras/Raf/MEK/ERK linear module (Franklin et al. 1994). Recently it has been shown that the Ras-specific guanine nucleotide exchange factor (GEF) RasGRP1 is the missing link between SLP-76/LAT and Ras activation in T cells (Dower et al. 2000; Ebinu et al. 2000). Ras activation by RasGRP1 is mediated through a DAG-binding domain (C1 module), and proceeds to ERK1/2 activation (Ebinu et al. 2000). In order to trigger the DAG-dependent MAPK activation, we used PMA alone (25 nM) to obtain a transient ERK activity. Under these conditions, DAT induced a significant decrease of ERK activation (Fig. 2), showing that DAT-induced inhibition of the immune response is due, at least in part, to down-modulation of the MAPK/ERK signaling pathway. MAPK activation in T cells partially depends on PKC activation (Puente et al. 2000), particularly PKC- α , which activates Raf-1 by direct phosphorylation (Kolch et al. 1993). Typically the PKC isoenzymes are known to have C1 domains, and the full activation requires both DAG and Ca²⁺ for classic PKCs (α , β , γ). In this work we found no effect of mycobacterial DAT on the kinase activities of classic PKC isoenzymes. This suggests that down-modulation of the DAG-dependent activation of ERK1/2 caused by

DAT does not involve the suppression of kinase activity of classical PKCs. Moreover, we found that phosphorylation/degradation of the I κ B- α inhibitor of the canonical NF- κ B pathway, one of the alternative cascades involving PKC activity, is unaffected by mycobacterial DAT. However, possible alterations of DAT on membrane PKC translocation or different PKC-mediated signaling pathways remain to be explored. It is to be noted that inhibition on T-cell proliferation has also been found in mycobacterial phenolic glycolipids, a set of compounds distributed in distinct mycobacterial species, including *M. leprae*, *M. marinum*, *M. bovis* and some *M. tuberculosis* strains (Fournie et al. 1989; Reed et al. 2004; Robinson et al. 2008). Similar to DAT, phenolic glycolipids cause a non-toxic and non-specific inhibition of immune cells by targeting intracellular pathways, as suggested by the ability of *M. leprae* lipid to impair oxidative respiratory burst in PMA-activated macrophages (Launois et al. 1989), or *M. marinum* phenolic glycolipid for inhibiting phagosome maturation (Robinson et al. 2008). Targeting of intracellular pathways leading to immune suppression had only been reported for one *M. tuberculosis* lipid (Briken et al. 2004). Interestingly, the present results showing the ability of DAT to alter a widely distributed intracellular pathway, *i.e.* the

MAPK–ERK cascade, encourage further research addressing possible effects of DAT on additional immune cell types.

Up to now, no *M. tuberculosis* single compound has been found to confer virulence by itself, but probably acts in concert with other multiple factors. Yet, the dissection of potential virulence components in different genetic backgrounds would be crucial to better understand TB pathogenesis. Whereas DAT could have a little contribution to T-cell suppression during *M. tuberculosis* infection, it is to be noted that DAT has been reported in all virulent *M. tuberculosis* strains (Besra et al. 1992), but is absent in low-virulence-related mycobacterial strains (*M. bovis* BCG, *M. microti* and *M. tuberculosis* phoP^{-/-} mutant (Asensio et al. 2008; Besra et al. 1992)). In this context, other studies will be required to shed more light on the relevance of DAT in host–pathogen interactions.

Acknowledgements

We thank Carlos Castellanos-Barba for technical assistance in cell sorting of mouse CD4⁺ T cells and Dorothy D. Pless for revising the manuscript. This work was supported by grants 48509 (CONACyT) and IN218506 PAPIIT-DGAPA (UNAM) to L.M.L.M. J.P.P.N was supported by a doctoral fellowship by CONACyT, and was a fellow of the Ph.D. program in Biomedical Sciences at the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Asensio, J.A., Arbués, A., Perez, E., Gicquel, B., Martin, C., 2008. Live tuberculosis vaccines based on phoP mutants: a step towards clinical trials. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 201–211.
- Besra, G.S., Bolton, R.C., McNeil, M.R., Ridell, M., Simpson, K.E., Glushka, J., van Halbeek, H., Brennan, P.J., Minnikin, D.E., 1992. Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 31, 9832–9837.
- Briken, V., Porcelli, S.A., Besra, G.S., Kremer, L., 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol. Microbiol.* 53, 391–403.
- Chang, S.T., Linderman, J.J., Kirschner, D.E., 2005. Multiple mechanisms allow *Mycobacterium tuberculosis* to continuously inhibit MHC class II-mediated antigen presentation by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4530–4535.
- Delgado, J.C., Tsai, E.Y., Thim, S., Baena, A., Boussiotis, V.A., Reynes, J.M., Sath, S., Grosjean, P., Yunis, E.J., Goldfeld, A.E., 2002. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7576–7581.
- Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., Stone, J.C., 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat. Immunol.* 1, 317–321.
- Ebinu, J.O., Stang, S.L., Teixeira, C., Bottorff, D.A., Hooton, J., Blumberg, P.M., Barry, M., Bleakley, R.C., Ostergaard, H.L., Stone, J.C., 2000. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 95, 3199–3203.
- Ellner, J.J., 1997. Regulation of the human immune response during tuberculosis. *J. Lab. Clin. Med.* 130, 469–475.
- Escamilla, L., Mancilla, R., Glender, W., Lopez-Marin, L.M., 1996. *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 1864–1867.
- Flynn, J.L., Chan, J., 2001. Immunology of tuberculosis. *Ann. Rev. Immunol.* 19, 93–129.
- Fournie, J.J., Adams, E., Mullins, R.J., Basten, A., 1989. Inhibition of human lymphoproliferative responses by mycobacterial phenolic glycolipids. *Infect. Immun.* 57, 3653–3659.
- Franklin, R.A., Tordai, A., Patel, H., Gardner, A.M., Johnson, G.L., Gelfand, E.W., 1994. Ligation of the T cell receptor complex results in activation of the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 93, 2134–2140.
- Gercken, J., Pryjma, J., Ernst, M., Flad, H.D., 1994. Defective antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect. Immun.* 62, 3472–3478.
- Giacomini, E., Iona, E., Ferroni, L., Miettinen, M., Fattorini, L., Orefici, G., Julkunen, I., Coccia, E.M., 2001. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J. Immunol.* 166, 7033–7041.
- Grotzke, J.E., Lewinsohn, D.M., 2005. Role of CD8⁺ T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microb. Infect.* 7, 776–788.
- Hernández-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, A., Pavon, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., Alcocer, J.M., Madrid, M.V., 1996. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89, 26–33.
- Hmama, Z., Gabathuler, R., Jefferies, W.A., de Jong, G., Reiner, N.E., 1998. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J. Immunol.* 161, 4882–4893.
- Kaufmann, S.H., 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev.* 1, 20–30.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., Rapp, U.R., 1993. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249–252.
- Lee, J.S., Song, C.H., Kim, C.H., Kong, S.J., Shon, M.H., Suhr, J.W., Jung, S.S., Lim, J.H., Kim, H.J., Park, J.K., Paik, T.H., Jo, E.K., 2003a. Depressed interleukin-12 production by peripheral blood mononuclear cells after in

- vitro stimulation with the 30-kDa antigen in recurrent pulmonary tuberculosis patients. *Med. Microbiol. Immunol.* 192, 61–69.
- Lee, J.S., Song, C.H., Lim, J.H., Kim, H.J., Park, J.K., Paik, T.H., Kim, C.H., Kong, S.J., Shon, M.H., Jung, S.S., Jo, E.K., 2003b. The production of tumour necrosis factor- α is decreased in peripheral blood mononuclear cells from multidrug-resistant tuberculosis patients following stimulation with the 30-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* 132, 443–449.
- Launois, P., Blum, L., Dieye, A., Millan, J., Sarthou, J.L., Bach, M.A., 1989. Phenolic glycolipid-1 from *M. leprae* inhibits oxygen free radical production by human mononuclear cells. *Res. Immunol.* 140, 847–855.
- Manca, C., Reed, M.B., Freeman, S., Mathema, B., Kreiswirth, B., Barry 3rd, C.E., Kaplan, G., 2004. Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect. Immun.* 72, 5511–5514.
- Noss, E.H., Harding, C.V., Boom, W.H., 2000. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages. *Cell Immunol.* 201, 63–74.
- Puente, L.G., Stone, J.C., Ostergaard, H.L., 2000. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinase in T cells: potential role of additional diacylglycerol binding proteins. *J. Immunol.* 165, 6865–6871.
- Reed, M.B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N., Kaplan, G., Barry 3rd, C.E., 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431, 84–87.
- Robinson, N., Kolter, T., Wolke, M., Rybniker, J., Hartmann, P., Plum, G., 2008. Mycobacterial phenolic glycolipid inhibits phagosome maturation and subverts the pro-inflammatory cytokine response. *Traffic* 9, 1936–1947.
- Rocha-Ramirez, L.M., Estrada-Garcia, I., Lopez-Marin, L.M., Segura-Salinas, E., Mendez-Aragon, P., Van Soolingen, D., Torres-Gonzalez, R., Chacon-Salinas, R., Estrada-Parra, S., Maldonado-Bernal, C., Lopez-Macias, C., Isibasi, A., 2008. *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis* 88, 212–220.
- Roose, J.P., Mollenauer, M., Gupta, V.A., Stone, J., Weiss, A., 2005. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 4426–4441.
- Saavedra, R., Segura, E., Leyva, R., Esparza, L.A., Lopez-Marin, L.M., 2001. Mycobacterial di-*O*-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clin. Diagn Lab. Immunol.* 8, 1081–1088.
- Saavedra, R., Segura, E., Tenorio, E.P., Lopez-Marin, L.M., 2006. Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. *Microb. Infect.* 8, 533–540.
- Saha, B., Das, G., Vohra, H., Ganguly, N.K., Mishra, G.C., 1994. Macrophage-T cell interaction in experimental mycobacterial infection. Selective regulation of co-stimulatory molecules on *Mycobacterium*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immune response. *Eur. J. Immunol.* 24, 2618–2624.
- Trushin, S.A., Pennington, K.N., Algeciras-Schimmich, A., Paya, C.V., 1999. Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 22923–22931.
- Trushin, S.A., Pennington, K.N., Carmona, E.M., Asin, S., Savoy, D.N., Billadeau, D.D., Paya, C.V., 2003. Protein kinase C α (PKC α) acts upstream of PKC θ to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* 23, 7068–7081.
- van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., van der Meer, J.W., 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 294–309.