



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

Activación *ex vivo* de células dendríticas
por macrófagos muertos por apoptosis
inducida por la lipoproteína Lp_qH de
Mycobacterium tuberculosis y sus efectos
inmunoestimuladores sobre linfocitos T

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

BIÓL. ROCIO JIMENA JIMÉNEZ VALDÉS



TUTOR: DR. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F.

Noviembre 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Activación *ex vivo* de células dendríticas por macrófagos muertos por apoptosis inducida por la lipoproteína LpqH de *Mycobacterium tuberculosis* y sus efectos inmunoestimuladores sobre linfocitos T

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Raúl Mancilla Jiménez en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

| | |
|------------------------------------|---|
| Dr. Raúl Mancilla Jiménez | Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM |
| Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán | Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM |
| Dr. Rogelio Hernández Pando | Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán |

Se reconoce la asesoría técnica de la Biól. Patricia Espinosa Cueto.

Se reconoce la asesoría en el análisis estadístico de la Dra. Tzipe Govezensky.

Se reconoce la donación de células CHO productoras de mGM-CSF por la Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (154208). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT (290254/240030) para la realización de la presente tesis.

El Jurado del Examen de Maestría estuvo constituido por:

| | | |
|------------|------------------------------------|---|
| Presidente | Dra. Yolanda López Vidal | Facultad de Medicina, UNAM |
| Vocal | Dr. Alejandro Zentella Dehesa | Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán |
| Vocal | Dr. Enrique Ortega Soto | Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM |
| Vocal | Dra. Clara Inés Espitia Pinzón | Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM |
| Secretario | Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso | Centro Médico Nacional Siglo XXI |

**Para mi mamá Josefina Valdés Mejía
Para mi papá Cesáreo Jiménez Garcés
Para mi hermana Nubia Nurit Jiménez Valdés
Los AMO**

A la vida porque siempre ha sido benévola conmigo

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mis padres Josefina Valdés Mejía y Cesáreo Jiménez Garcés, su amor, enseñanzas y apoyo infinitos me impulsan a crecer día a día.

A mi hermana, Nubia Nurit Jiménez Valdés por su cariño, apoyo y por ser mi compañera y cómplice.

A mi novio Alejandro Sánchez González, tu amor y tu presencia hacen de mí una mejor persona, te amo.

A la nueva integrante de la familia, Almendrita, porque tus travesuras siempre nos brindan alegría.

Al Dr. Raúl Mancilla Jiménez por sus enseñanzas y por haberme recibido en su laboratorio durante mis estudios de Maestría.

También agradezco al Dr. Rafael S. Saavedra Durán, así como al Dr. Rogelio Hernández Pando por haber sido parte del Comité Tutorial que me asesoró a lo largo del desarrollo de mi tesis.

A la técnico del laboratorio, Patricia Espinosa Cueto por su asesoría técnica en los experimentos realizados en esta tesis; y a la Dra. Tzipe Govezensky por su ayuda en el análisis estadístico de los datos obtenidos.

A los compañeros del laboratorio y especialmente a Alice, tu amistad ha sido invaluable.

A los amigos y familiares que de una u otra manera han estado a mi lado.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABREVIATURAS | 2 |
| 3. ANTECEDENTES | 3 |
| 3.1. Epidemiología de la tuberculosis (TB). | 3 |
| 3.2. Patogenia y respuesta inmune en contra de Mtb. | 3 |
| 3.3. Citocinas en respuesta a Mtb. | 5 |
| 3.4. Función de las células T en la TB. | 8 |
| 3.5. Inmunosupresión en la TB. | 10 |
| 3.6. Muerte Celular. | 11 |
| 3.7. Apoptosis. | 12 |
| 3.8. Fagocitosis de cuerpos apoptóticos (CAp). | 15 |
| 3.9. Apoptosis en la TB. | 16 |
| 3.10. Células Dendríticas (CDs). | 18 |
| 3.11. El papel de la CD en la TB. | 20 |
| 3.12. La apoptosis como un mecanismo de inmunidad innata en contra de la TB. Papel de las CDs. | 21 |
| 4. FUNDAMENTACIÓN | 23 |
| 5. HIPÓTESIS | 24 |
| 6. OBJETIVOS | 25 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| 7.1. Micobacterias y fracciones proteicas. | 26 |
| 7.2. Obtención de macrófagos (MØs) murinos. | 26 |
| 7.3. Inducción de apoptosis en MØs murinos. | 27 |
| 7.4. Purificación de CAp. | 28 |
| 7.5. Incorporación de proteínas micobacterianas en los CAp. | 28 |
| 7.6. Extracción de núcleos de células incubadas con la pared de <i>M. smegmatis</i> transformada (Msmeg-LpqH). | 30 |
| 7.7. Obtención de CDs. | 30 |
| 7.8. Producción de mGM-CSF en células CHO. | 31 |
| 7.9. Ensayos de fagocitosis de CAp por CDs. | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 7.10. Ensayos para analizar la maduración de CDs que han fagocitado CAp. | 32 |
| 7.11. Ensayos para analizar la producción de citocinas por CDs activadas con CAp. | 33 |
| 7.12. Ensayos para determinar la capacidad de CDs cargadas con CAp de inducir la proliferación de linfocitos T. | 34 |
| 7.13. Análisis estadístico. | 36 |
| 8. RESULTADOS | 37 |
| 8.1. La cepa de <i>M. smegmatis</i> transformada (Msmeg-LpqH) sobreexpresa la lipoproteína LpqH de Mtb. | 37 |
| 8.2. Msmeg-LpqH induce niveles altos de apoptosis en MØs diferenciados de precursores de la médula ósea de ratones Balb/cJ. | 38 |
| 8.3. Incorporación de antígenos micobacterianos en MØs apoptóticos. Demostración por Western blot. | 40 |
| 8.4. Incorporación de antígenos micobacterianos en MØs apoptóticos. Demostración por inmunofluorescencia. | 42 |
| 8.5. Obtención de CDs a partir de células precursoras de la médula ósea de ratones Balb/cJ. Estandarización del método de cultivo. | 46 |
| 8.6. Las CDs fagocitan CAp. | 47 |
| 8.7. La fagocitosis de MØs apoptóticos induce la maduración de CDs y la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). | 52 |
| 8.8. Producción de citocinas por CDs activadas con MØs apoptóticos. | 60 |
| 8.9. Proliferación de linfocitos T incubados con CDs activadas con CAp. | 64 |
| 9. DISCUSIÓN | 67 |
| 10. CONCLUSIONES | 76 |
| 11. PERSPECTIVAS | 77 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 78 |

1. RESUMEN

La tuberculosis (TB) es aún un problema de salud de gran envergadura, ya que en 2010 la OMS reportó 8.8 millones de nuevos casos y hubieron 1.4 millones de decesos. Se considera que para poder controlar la TB se requieren nuevas vacunas, entender mejor la patogenia de la infección y desarrollar nuevos métodos de tratamiento. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un patógeno intracelular que utiliza como su nicho preferido al macrófago, el cual en respuesta a la infección activa sus programas de muerte, en especial la apoptosis que recientemente ha sido considerada como una forma de respuesta inmune innata, pues se ha observado que la viabilidad del bacilo disminuye en células en apoptosis y que la fagocitosis de cuerpos apoptóticos favorece la presentación de antígeno y la activación de los linfocitos T, que son la respuesta más efectiva en contra de Mtb. En base a lo anterior, en esta tesis se estudió en ratones la capacidad de las células dendríticas activadas por la fagocitosis de cuerpos apoptóticos inducidos por la lipoproteína apoptogénica LpqH (Rv3763) de Mtb para activar linfocitos T. La activación de las CDs se caracterizó por un incremento significativo en las moléculas de coestimulación CD40, CD80 y CD86, así como un incremento específico en la expresión de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II. De manera interesante se observó un incremento en la producción de las citocinas pro-inflamatorias TNF e IL-12, lo cual es relevante al ser estas citocinas fundamentales en la respuesta inmune innata y en la transición hacia la respuesta inmune adquirida. Por el contrario, no se observó cambio alguno en la producción de las citocinas anti-inflamatorias TGF-beta e IL-10. Finalmente, se demostró que las CDs cargadas con cuerpos apoptóticos estimularon una respuesta antígeno-específica de linfocitos T CD4⁺. Estas observaciones son una primera base prometedora para investigaciones futuras que permitan establecer a la inmunoterapia con CDs activadas *ex vivo* con cuerpos apoptóticos como una medida adyuvante en el tratamiento de la TB, sobretodo en pacientes inmunosuprimidos o infectados con cepas de Mtb resistentes a la quimioterapia.

2. ABREVIATURAS

AcMn: Anticuerpo Monoclonal

CAP: Cuerpos Apoptóticos

CAP-N: Cuerpos apoptóticos inducidos con Msmeg-N

CAP-LpqH: Cuerpos apoptóticos inducidos con Msmeg-LpqH

CAP-UV: Cuerpos apoptóticos inducidos con luz ultravioleta

CD: Célula Dendrítica

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

IL-4: Interleucina 4

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IMF: Índice Medio de Fluorescencia

LPS: Lipopolisacárido

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MØ: Macrófago

Msmeg-N: *Mycobacterium smegmatis* nativa

Msmeg-LpqH: *Mycobacterium smegmatis* transformada

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

TB: Tuberculosis

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante beta

TLR: Receptores tipo Toll

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

OMS: Organización Mundial de la Salud

3. ANTECEDENTES

3.1. Epidemiología de la tuberculosis (TB).

En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la tuberculosis (TB) representa una emergencia mundial. Se estima que *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) o bacilo de Koch, el agente causal de dicha enfermedad, se encuentra presente en dos tercios de la población mundial. La OMS ha calculado que en el 2010 hubo 8.5-9.2 millones de casos incidentes de tuberculosis, y murieron 1.2-1.5 millones de personas. La TB es la segunda causa de muerte por enfermedad infecciosa en el mundo después del VIH; además, de manera alarmante se predice un incremento en el número de casos ya que dichas enfermedades se han convertido en epidemias ligadas (1).

En la actualidad es preocupante el surgimiento progresivo de casos de tuberculosis producidos por cepas resistentes a múltiples fármacos antimicobacterianos y un subgrupo de cepas extremadamente resistentes. Los primeros son un tipo de TB que no responde a los tratamientos convencionales con fármacos de primera línea y están presentes en prácticamente la totalidad de los países estudiados por la OMS. En cuanto a las cepas extremadamente resistentes, éstas se originan en cepas con resistencia a los fármacos de segunda línea; estos casos que son de muy difícil tratamiento han estado apareciendo con creciente frecuencia en muchos países (1).

3.2. Patogenia y respuesta inmune en contra de Mtb.

Mtb es un patógeno intracelular aerobio facultativo, el cual tiene predilección por el tejido pulmonar rico en oxígeno y es un ejemplo clásico de un patógeno para el cual la respuesta protectora recae en la inmunidad mediada por células, esto se debe principalmente a que el organismo vive dentro de las células, usualmente macrófagos (2). El bacilo entra al cuerpo principalmente por la vía aérea, siendo la fagocitosis por macrófagos alveolares el primer evento en la relación hospedero-patógeno que podría definir el curso de la infección (3). El

paso inicial en la respuesta inmune celular es la captura, procesamiento y presentación de antígenos a linfocitos T por células especializadas, principalmente por la célula dendrítica (CD) y los macrófagos (MØ) (4). Generalmente, las células fagocíticas profesionales son capaces de eliminar patógenos intracelulares exponiéndolos a microbicidas celulares en el fagolisosoma; sin embargo, se sabe que las micobacterias patógenas son capaces de bloquear la maduración del fagosoma para asegurar su sobrevivencia y replicación intracelular (5, 6). De manera interesante se ha observado que dicho mecanismo puede ser subvertido en macrófagos activados con INF- γ , los cuales son capaces de sobrepasar dicho bloqueo en la maduración del fagosoma (7, 8). En el fagolisosoma la micobacteria es deprivada de nutrientes esenciales como el hierro, y es expuesta a efectores microbicidas generados por macrófagos activados por INF- γ , tales como péptidos antimicrobianos e intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, los productos de la NADPH oxidasa y la sintasa de óxido nítrico (NOS2), respectivamente (9). Una vez en el lisosoma, los antígenos micobacterianos son degradados en péptidos antigénicos, algunos de los cuales se unen a moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II) que los transportan a la superficie celular donde son presentados a los receptores para antígeno presentes en la superficie de linfocitos T CD4⁺ (10). En este proceso de presentación de antígeno participan moléculas de coestimulación como CD80, CD86 y CD40, las que en conjunto con las moléculas presentadoras de antígeno y los receptores para antígeno del linfocito constituyen la llamada sinapsis inmunológica (11). Los linfocitos T CD4⁺ activados llevan a cabo funciones efectoras como la producción de citocinas que regulan la respuesta inmune, por ejemplo IFN- γ el cual activa la capacidad microbicida del macrófago (2). Hay observaciones que muestran que los antígenos y aún la micobacteria pueden ser trasladados del fagosoma al citosol, explicando de esta manera la participación de los linfocitos T CD8⁺ en la respuesta antimicobacteriana produciendo IFN- γ y lisando células cargadas con micobacterias (12-14). La presentación de antígeno a linfocitos CD8⁺ se lleva a cabo a través de moléculas de Clase I del MHC, que presentan péptidos antigénicos y de moléculas CD1 que presentan antígenos glicolipídicos (13, 15).

La activación de células T específicas promueve su expansión y migración hacia el sitio de la infección en los pulmones, en respuesta a factores quimiotácticos producidos por las células infectadas. Este fenómeno de migración celular hacia el foco de la infección culmina en la formación de un granuloma, el rasgo distintivo de la TB, formado por células T, macrófagos, células B, células dendríticas, células endoteliales y epiteliales, entre otras, en una proporción que varía dependiendo de su madurez; dicha estructura previene la dispersión de los bacilos que residen en los macrófagos y genera un microambiente que facilita la interacción entre citocinas secretadas por macrófagos y células T (16, 17). Sin embargo, el granuloma también puede funcionar como reservorio para Mtb durante un periodo largo de tiempo y se sabe que el bacilo latente puede ser liberado después si el balance de citocinas se rompe permitiendo la reactivación de la enfermedad.

3.3. Citocinas en respuesta a Mtb.

La respuesta inmune a los patógenos es al menos en parte dependiente de citocinas, las cuales regulan la función de la mayoría de las células del sistema inmune. En el caso de Mtb hay una fuerte inducción de citocinas durante la infección y se sabe que la respuesta inflamatoria a éste patógeno es crucial para el control de la enfermedad pero también puede contribuir a la infección crónica y la patología asociada (2). Las citocinas mejor caracterizadas en la respuesta contra Mtb se mencionan a continuación.

Interleucina-12 (IL-12). Esta citocina es inducida después de la fagocitosis del bacilo por macrófagos y células dendríticas (18, 19). La función de IL-12 es activar células NK y células T, así como dirigir a las células CD4⁺ y CD8⁺ hacia la vía de secreción de INF- γ y TNF. En este sentido, IL-12 funciona como puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa en contra de patógenos intracelulares. La estimulación de la producción de IL-12 por CDs en respuesta a antígenos micobacterianos puede polarizar el proceso hacia respuestas inmunes tipo Th-1, y de esa manera, a un mejor control de la enfermedad (20).

Interferon gamma (INF- γ). Es una citocina clave en el control de la infección, y es producida por células CD4⁺ y CD8⁺ en la tuberculosis, así como por células NK (2). INF- γ puede incrementar la presentación de antígeno llevando al reclutamiento de linfocitos CD4⁺ y de linfocitos citotóxicos, que participan en la inmunidad antimicobacteriana. INF- γ es el principal activador de los macrófagos e inhibe el crecimiento de Mtb *in vitro* (3).

Factor de Necrosis Tumoral (TNF, antes denominado TNF- α). La micobacteria induce su secreción por macrófagos, células dendríticas y células T (18, 19, 21). Se requiere de esta citocina para el control de la infección aguda por el bacilo de la tuberculosis (22). El desempeño del TNF en el control de Mtb es complejo, pero en parte puede deberse a la inducción de apoptosis en células infectadas y a su función como mediador de la activación de macrófagos/monocitos, pues actúa en sinergia con IFN- γ para inducir la actividad antimicrobiana estimulando la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (23). Esta citocina estimula el reclutamiento celular hacia los tejidos en donde se localiza la infección por Mtb, por ello es importante para la formación de lesiones granulomatosas, las cuales funcionan como barreras de la infección y como sitios de destrucción y prevención de la diseminación del bacilo (24). Por otro lado, TNF induce la expresión de moléculas de adhesión, de quimiocinas y receptores de quimiocinas, afectando así la formación de granulomas funcionales en tejidos infectados (25). Esta citocina contribuye a limitar la respuesta patológica en la tuberculosis, por lo que juega un papel importante como modulador de la inflamación (26); sin embargo, TNF también ha sido implicado en la patología de la TB y se considera un factor importante en la destrucción del tejido pulmonar (27, 28). Claramente, los papeles de TNF en la protección e inmunopatología en una infección tuberculosa son complejos y multifacéticos, y es el balance entre TNF e IL-10 lo que determina en gran medida el nivel de resistencia y el resultado de la infección.

Interleucina-1 (IL-1). IL-1 junto con TNF, juega un papel importante en la fase aguda de la respuesta como fiebre y caquexia en la TB. Facilita la expresión del receptor de IL-2 en linfocitos T, así como la liberación de su forma soluble (3).

Interleucina-2 (IL-2). Es una citocina esencial para inducir $\text{INF-}\gamma$ y para promover la proliferación de células CD8^+ activadas, así como para el mantenimiento y diferenciación de células T y células NK (29, 30). IL-2 junto con $\text{INF-}\gamma$, pueden representar parámetros para la discriminación entre TB latente y TB activa, estudios muestran que IL-2 es secretada después de un tratamiento con antibiótico, probablemente esto se debe a la disminución de la carga antigénica de Mtb, estimulando la expansión de células T de memoria predominantes en la tuberculosis latente (31, 32).

Interleucina-4 (IL-4). Las respuestas Th2 e IL-4 en TB son sujetos de controversia. La detección de IL-4 es variable; sin embargo, su presencia o ausencia no se ha correlacionado con el resultado clínico, ni tampoco se han encontrado diferencias en las etapas del granuloma o en la patología de la enfermedad (2).

Interleucina-6 (IL-6). Esta citocina ha sido implicada en la respuesta innata inicial contra Mtb; también desempeña múltiples funciones en la respuesta inmune, incluyendo inflamación, hematopoyesis y diferenciación de células T (2).

Interleucina-10 (IL-10). Es generalmente considerada como una citocina anti-inflamatoria. Es producida por células mieloides y células T durante la infección por Mtb e inhibe las respuestas inmunes protectoras desactivando a los macrófagos y bloqueando la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF e IL-12, contrarrestando las propiedades activadoras de $\text{INF-}\gamma$, y bloqueando su producción por células T. IL-10 inhibe las respuestas T CD4^+ y la fagocitosis, bloquea la maduración del fagosoma evitando así la eliminación micobacteriana y también inhibe la función de presentación de antígenos regulando negativamente las moléculas MHC de las células infectadas con la micobacteria; además también interfiere en la migración de las células dendríticas hacia los nódulos linfáticos, limitando el reclutamiento de células Th1 hacia los sitios infectados (2, 33).

Factor de Crecimiento Transformante beta ($\text{TGF-}\beta$). Citocina anti-inflamatoria implicada en la supresión de las respuestas mediadas por células T en pacientes tuberculosos. $\text{TGF-}\beta$ está presente en lesiones granulomatosas y es producida por monocitos después de la estimulación con Mtb. Participa en la

desactivación de macrófagos inhibiendo la producción de NOS2 inducida por INF- γ . Inhibe la proliferación de células T e interfiere con la función de las células NK y con la de las células T CD8⁺ (2).

3.4. Función de las células T en la TB.

La inmunidad protectora en contra de Mtb involucra a las células T CD4⁺ y CD8⁺, como lo demuestran estudios con ratones deficientes en alguno de éstos subgrupos o en ambos subgrupos de linfocitos, los que son más susceptibles a la infección que los ratones silvestres (34-39). Mtb reside principalmente en vacuolas fagocíticas, por lo que la presentación de antígenos micobacterianos a linfocitos CD4⁺ es habitualmente a través de moléculas MHC de clase II (2). La respuesta T CD4⁺ inicial ocurre en los nódulos linfáticos de drenaje; sin embargo, hay datos que llevan a la hipótesis de que los linfocitos T CD4⁺ necesitan tener contacto adicional con el antígeno en el sitio de infección para expresar plenamente su función efectora. Algunos datos muestran que la expresión óptima de la actividad efectora de las células antígeno específicas T CD4⁺ en el granuloma está determinada por la disponibilidad de antígeno, la cual puede darse aún en la ausencia de citocinas (40). La principal función efectora de los linfocitos CD4⁺ es la producción de INF- γ , TNF y de otras citocinas que activan la capacidad micobactericida del macrófago (2). La frecuencia de células productoras de INF- γ es baja aún en el auge de la respuesta, siendo aún menor en la fase crónica. Hay estudios que correlacionan la frecuencia de células productoras de INF- γ con la disponibilidad del antígeno específico asociándose el reconocimiento de dicho péptido con una expresión incrementada de la citocina (41). La importancia de las células CD4⁺ en la respuesta contra Mtb se ha documentado además en estudios que muestran que los linfocitos CD4⁺ son capaces de inducir apoptosis o lisis de células infectadas por un mecanismo aún desconocido, y también pueden inducir el arresto del crecimiento de Mtb incluso cuando no son capaces de secretar INF- γ y/o TNF (2, 42). Adicionalmente se observó que en ratones con infecciones crónicas de Mtb hay una disminución de células T CD4⁺, éstos animales son incapaces de prevenir la reactivación de la

infección aún en presencia de niveles normales de $\text{INF-}\gamma$ y la producción de la sintasa de óxido nítrico (NOS2), sugiriendo que tienen otras funciones además de la producción de citocinas y la activación de macrófagos (43). Interesantemente se ha encontrado que las células CD4^+ también contribuyen a la protección contra Mtb ayudando a mantener las respuestas citotóxicas óptimas de las células T CD8^+ (44).

En cuanto a las células T CD8^+ , estas son activadas una vez que reconocen péptidos presentados en moléculas MHC clase I en la superficie de células infectadas. Estas moléculas presentan antígenos de patógenos localizados en el citosol; sin embargo, dada la localización intrafagosomal de Mtb, no se conoce el mecanismo exacto que permite la presentación de antígenos micobacterianos vía moléculas MHC I; se ha sugerido que hay translocación de la micobacteria del fagolisosoma al citosol, dando un acceso directo a la vía de procesamiento y presentación por MHC I; no obstante, dicha teoría es aún materia de debate y se han propuesto otros mecanismos de presentación cruzada (45). El papel de las células T CD8^+ en la inmunidad en la infección por Mtb ha sido controversial; sin embargo, hay varios estudios que apoyan la idea de que estas células juegan un papel importante en la inmunidad protectora en la tuberculosis (46-49). Se ha demostrado que las células T CD8^+ son inducidas en respuesta a la infección por el bacilo y que esas células pueden reconocer y ejercer su actividad citotóxica sobre macrófagos infectados por al menos dos mecanismos diferentes: inducción de apoptosis por la vía Fas-FasL y la muerte vía perforina y granulisina (47-51). En humanos las células T CD8^+ pueden eliminar de manera indirecta a la micobacteria intracelular por la liberación del péptido antimicrobiano granulisina que induce la muerte de la célula infectada (52). El hecho de que no exista un análogo murino de la granulisina, puede en parte explicar porque las células T CD8^+ no son importantes en el control de la infección en modelos murinos de tuberculosis (37). Las células T CD8^+ específicas para Mtb también han sido involucradas en la producción de citocinas, en particular $\text{INF-}\gamma$ y TNF (53, 54). Hay datos que indican que existen diferentes funciones efectoras de las células T CD8^+ dependiendo de la etapa de

la infección de Mtb (20); además, se ha demostrado que la función de la mayor parte de las células T CD8⁺ Mtb- específicas generadas durante una infección primaria se limita a la secreción de INF- γ o a una función citotóxica, siendo mayor la fracción celular con potencial citotóxico (55). Por otra parte, se ha observado que la carga antigénica influye en la determinación del fenotipo, ya sea citotóxico o productor de citocinas (56, 57).

3.5. Inmunosupresión en la TB.

A pesar de la gran inmunogenicidad de los antígenos micobacterianos es frecuente que el sistema inmune del paciente tuberculoso sea incompetente para contender con el bacilo; se calcula que de 17 al 25% de los pacientes son anérgicos en la prueba de la tuberculina, lo cual se considera una evidencia de que en estos pacientes la respuesta de linfocitos T esta disminuida (58). Lo anterior podría relacionarse con múltiples factores como son linfopenia de células T CD4⁺ (59, 60), producción disminuida de IL-2 e IFN- γ , defectos en receptores para IFN- γ e IL-12 (61-63) y apoptosis aumentada de linfocitos T (64, 65). Además se han descrito glicolípidos en la pared de Mtb que interfieren directamente con la activación de los linfocitos T (66, 67). En el laboratorio, recientemente se ha reportado una expresión disminuida de CD28 en células T CD4⁺ y CD8⁺ (68). CD28 es una molécula coestimuladora cuya ausencia puede resultar en anergia, un hallazgo frecuente en pacientes con tuberculosis (58). Adicionalmente, hay observaciones que muestran que el bacilo de Koch es capaz de inhibir la presentación de antígeno a linfocitos y por lo tanto la respuesta inmune celular. Se tienen reportes de que las lipoproteínas de Mtb LprG, así como LprA y LpqH, mediante la interacción con receptores TLR-2, inhiben el procesamiento y la presentación de antígeno via MHC II a linfocitos CD4⁺ (69-72). Se ha reportado también que LpqH inhibe la presentación de antígeno a través de moléculas del MHC I a linfocitos CD8⁺ (73). Por otra parte, se ha observado que lípidos de la pared de Mtb de la cepa Beijing inhiben la expresión del MHC II (73, 74). Finalmente, también se ha mostrado una inhibición de presentación de antígeno por la vía CD1 (75). Las observaciones anteriores son de gran interés

pues indican que el bacilo de la TB es capaz de desplegar una variedad de estrategias para bloquear la respuesta inmune del individuo infectado. Otra estrategia que puede representar un mecanismo adaptativo para la sobrevivencia del bacilo de la tuberculosis es su habilidad para intervenir y modificar los programas de muerte de su célula hospedera (76), pudiendo tener implicaciones importantes en la patogenia de la enfermedad. Una mejor comprensión de la muerte celular inducida por la micobacteria y de su habilidad para modular la respuesta inmune, puede ofrecer nuevas estrategias para descifrar el complejo "cross-talk" de la micobacteria con el humano.

3.6. Muerte Celular.

El estado normal o fisiológico de un organismo se logra con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos; sin embargo, un daño definitivo puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales induciendo la muerte celular. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes (77). La muerte celular se ha englobado en dos grandes grupos: la muerte que transcurre por mecanismos regulados y/o programados (apoptosis); y la muerte que transcurre por mecanismos no regulados (necrosis) (78). El término necrosis reúne los procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva, sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de daño por factores físicos o por la exposición a toxinas (79). La necrosis se caracteriza morfológicamente por la vacuolación del citoplasma, el rompimiento de la membrana celular y la inducción de inflamación alrededor de la célula atribuible a liberación de contenido celular y moléculas pro-inflamatorias (80). Este fenómeno conduce a las células vecinas hacia la muerte, atrayendo a las células

inflamatorias y originando una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado (79).

Por otro lado, la apoptosis representa la muerte que transcurre por mecanismos regulados y/o programados; sin embargo, no es el único tipo de muerte que se lleva a cabo bajo estos mecanismos (78). En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas o dañadas, desempeñando así un papel protector frente a posibles enfermedades como el cáncer (79).

3.7. Apoptosis.

El término apoptosis (a-po-toe-sis) fue utilizado por primera vez en un artículo de Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir una forma de muerte celular morfológicamente distinta a la necrosis (81). La apoptosis es considerada un componente vital de varios procesos, incluyendo el recambio celular normal, el desarrollo y funcionamiento correcto del sistema inmune, la atrofia dependiente de hormonas, el desarrollo embrionario y la muerte inducida por compuestos químicos. Durante el proceso temprano de la apoptosis ocurre una disminución en el tamaño celular, el citoplasma es más denso y los organelos están estrechamente empaquetados. También se observa picnosis, la cual es resultado de la condensación de la cromatina, y éste es el rasgo más característico de la apoptosis. Posteriormente, ocurre vacuolización o “blebbing” de la membrana plasmática seguida de cariorrexis y separación de fragmentos celulares en cuerpos apoptóticos, los cuales consisten de citoplasma con fragmentos de organelos estrechamente empaquetados con o sin fragmentos nucleares envueltos en una membrana plasmática intacta (82). Otra característica de este tipo de muerte es que no hay una reacción inflamatoria asociada ni tampoco con la remoción de células apoptóticas; esto es debido a que las células apoptóticas no liberan sus constituyentes intracelulares al tejido intersticial, además son

rápidamente fagocitadas por células vecinas que no producen citocinas pro-inflamatorias (83-85).

Hay dos vías principales de la apoptosis: la vía extrínseca o mediada por receptores de muerte, y la vía intrínseca o mitocondrial; no obstante, se ha encontrado evidencia de que las dos vías pueden unirse y de que moléculas en una vía pueden influenciar a la otra (86). Recientemente se caracterizó la existencia de una vía de apoptosis adicional que involucra la citotoxicidad mediada por células T y la muerte dependiente de perforina-granzima (61). La vía perforina-granzima puede inducir apoptosis vía granzima B o granzima A. De manera interesante se observó que las vías extrínseca, intrínseca y la de la granzima B convergen en la misma vía terminal o de ejecución, la cual se inicia por la activación de la caspasa 3 y, resulta en la fragmentación del DNA, la degradación de proteínas nucleares y del citoesqueleto, el entrecruzamiento de proteínas, la formación de los cuerpos apoptóticos y la expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas, mientras que la vía de la granzima A activa una vía de muerte celular paralela independiente de caspasas por daño al DNA (87).

Vía extrínseca. Las vías de señalización extrínseca que inician la apoptosis involucran interacciones mediadas por receptores de muerte transmembranales que son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (88). Los miembros de la familia de receptores TNF comparten dominios extracelulares similares ricos en cisteínas y tienen un dominio citoplasmático de alrededor de 80 aminoácidos llamado dominio de muerte. Éste dominio transmite la señal de muerte de la superficie celular a las vías de señalización intracelular. Los ligandos mejor caracterizados y sus receptores correspondientes son: FasL/Fas, TNF/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (82).

Vía perforina/granzima. La citotoxicidad mediada por células T es una variante de la hipersensibilidad tipo IV, donde las células CD8⁺ son capaces de eliminar a las células que contienen antígenos. Estos linfocitos T citotóxicos son capaces de matar células blanco por la vía extrínseca y, la interacción FasL/Fas es el método predominante de la apoptosis inducida por CTLs (89). Sin embargo, también son capaces de inducir apoptosis por la vía de la exocitosis de gránulos,

mediada por la molécula perforina, formadora de poros transmembranales, y las dos principales granzimas, granzima A y granzima B. Estos componentes son almacenados en gránulos citoplasmáticos y son liberados en la sinapsis inmunológica formada entre las células efectoras y sus células blanco (90).

Vía intrínseca. Los estímulos que inician la vía intrínseca incluyen la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citocinas, así como la radiación, toxinas, hipertermia, infecciones virales y radicales libres (82). Esta vía coloca a la mitocondria en el foco de la cascada de señalización que conduce a la apoptosis intrínseca, en la cual tres familias de proteínas están involucradas en el centro de la maquinaria apoptótica: i) las caspasas, que pertenecen a la familia de cisteín-proteasas que hidrolizan los enlaces peptídicos que se encuentran después de residuos de ácido aspártico; ii) los activadores de las caspasas (como la proteína Apaf-1), y iii) las proteínas de la familia Bcl-2 (B Cell Lymphoma 2) que regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial (91). Todos los estímulos que inician la vía causan cambios en la membrana mitocondrial interna, lo que conduce a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y a la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria, lo que aunado a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa permiten la liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembranal al citosol (82).

Vía de ejecución. Tanto la vía intrínseca como la extrínseca terminan en el punto de ejecución que comienza con la activación de las caspasas efectoras, como la caspasa -3, -6 y -7, las cuales activan endonucleasas citoplasmáticas que degradan material nuclear y proteasas que degradan proteínas nucleares y del citoesqueleto, incluyendo citoqueratinas, PARP-1, la proteína alfa-fodrin del citoesqueleto, la proteína nuclear NuMA y otras, que finalmente causan los cambios morfológicos y bioquímicos observados en las células apoptóticas (82).

Además de las vías apoptóticas que involucran a las caspasas también hay vías caspasa-independientes en las que participa primordialmente AIF (factor inductor de apoptosis), el cual es una flavoproteína mitocondrial con función dual, dentro de la mitocondria participa en la fosforilación oxidativa una función vital, pero una vez fuera de ésta, propicia la muerte celular (92, 93).

3.8. Fagocitosis de cuerpos apoptóticos (CAp).

En condiciones normales, cuando las células mueren, son fagocitadas por sus células vecinas o por células fagocíticas especializadas, incluyendo macrófagos y células dendríticas. La remoción de células apoptóticas mediante fagocitosis juega un papel vital en procesos biológicos fundamentales, tales como el reemplazo celular en los tejidos, la remodelación de tejidos embrionarios, el desarrollo del sistema inmune y la resolución de una inflamación (94).

Las células fagocíticas son capaces de reconocer cambios en la superficie de las células apoptóticas que las distingue de las células vivas; estudios utilizando ligandos y anticuerpos monoclonales han implicado algunos receptores fagocíticos para células apoptóticas, entre los cuales se encuentran: las integrinas, el receptor de vitronectina $\alpha v\beta 3$ (95) y $\alpha v\beta 5$ (96), el receptor de complemento 3 (CD11b/CD18) $\alpha m\beta 2$ y el receptor de complemento 4 (CD11c/CD18) $\alpha x\beta 2$ (97); CD36 (98, 99), el receptor de fosfatidilserina (PS) (100), varias lectinas (101), CD91-calreticulina (102), receptores scavenger (103, 104), CD14 (105), el cassette transportador que une ATP (106), LOX-1 (107) y CD68 (108). Varios reportes muestran que alteraciones específicas en la composición de carbohidratos y proteínas de la membrana plasmática se asocian con procesos de apoptosis (109, 110); también se ha reportado que alteraciones de la membrana celular promueven la generación de neo-epitopos que pueden ser reconocidos de manera específica por opsoninas solubles como anticuerpos y proteínas del complemento para iniciar la fagocitosis, proveyendo un mecanismo que no requiere de receptores específicos para células apoptóticas (111, 112).

Se ha reportado que los efectos de la fagocitosis de células y/o cuerpos apoptóticos en el sistema inmune pueden ser variables ya que son dependientes de diversos factores como el tipo celular, el estatus celular (si la célula está o no activada, si está o no transformada), los antígenos asociados con las células apoptóticas, las causas de la muerte, entre otros (113). En condiciones fisiológicas la fagocitosis de las células apoptóticas se asocian a inducción de tolerancia, efectos anti-inflamatorios e inmunosupresivos relacionados con la liberación de citocinas anti-inflamatorias, como IL-10, TGF- β , PAF (factor

activador de plaquetas) y prostaglandina E₂ (PGE₂), además de la inhibición de las citocinas pro-inflamatorias TNF, GM-CSF, IL-12, IL-1β e IL-18 (85, 114-119). La remoción deficiente de células apoptóticas ha sido vinculada con enfermedades inflamatorias persistentes y con enfermedades autoinmunes (120-122). De manera interesante se ha reportado que la fagocitosis de células apoptóticas bajo ciertas circunstancias, como por ejemplo, la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) puede inducir respuestas inmunes e inflamación (123, 124).

3.9. Apoptosis en la TB.

Recientemente se ha observado que en respuesta a la infección por Mtb, el macrófago activa programas de muerte, principalmente apoptosis (76). La manera en la que el macrófago responde a la infección por Mtb es crucial en la respuesta inmune del hospedero. Después de la infección *in vitro* de macrófagos humanos o murinos por el bacilo, se pueden dar tres tipos de respuestas principales: necrosis, apoptosis, o la sobrevivencia de los macrófagos infectados (125). Las cepas altamente virulentas de Mtb inducen predominantemente necrosis, un mecanismo que usa la bacteria para salir del macrófago, evadir las respuestas del hospedero y diseminarse (126). En contraste, la apoptosis permite el control de la replicación bacteriana y son sobre todo las cepas no virulentas y las cepas atenuadas las que inducen predominantemente apoptosis (127-129). Aún mas, las cepas virulentas inhiben la apoptosis, dando lugar a la idea de que existe una relación entre virulencia y apoptosis (125, 129). De ésta manera, la inhibición de la apoptosis representa un mecanismo de virulencia usado por el patógeno para escapar a las defensas del hospedero y de esta manera retrasar la inmunidad adaptativa. La inhibición de la apoptosis ha sido asociada con la sobre expresión de las moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1, con la reducción en la expresión de la molécula pro-apoptótica Bax (130-132), así como con la liberación de TNFR2 soluble, el cual bloquea la unión de TNF a TNFR1 (133). Otra estrategia usada por Mtb para evitar la apoptosis consiste en la alteración de las vías biosintéticas de eicosanoides del hospedero, tal como lo demuestran

estudios en los que la cepa atenuada H37Ra induce la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), la cual protege a la membrana interna mitocondrial e induce la reparación de microdisrupciones de la membrana plasmática ocasionadas por el patógeno. Estos eventos protegen a los macrófagos de la necrosis y promueven la apoptosis. En contraste, la infección intracelular con la cepa virulenta H37Rv induce la producción de lipoxina A₄ (LXA₄), la cual inhibe la producción de ciclooxigenasa 2 y la biosíntesis de PGE₂. En un microambiente pobre en PGE₂, los macrófagos no pueden prevenir el daño mitocondrial o reparar las disrupciones de la membrana plasmática causadas por Mtb, y esto los lleva a la necrosis (126, 134, 135).

Con respecto a los mecanismos de apoptosis en la TB, se ha establecido la participación de las caspasas (8, 3/7 y 9), así como TNF y FasL, TLR-2 y los receptores de muerte TNFR1, TNFR2, y Fas (133, 136, 137). Además, recientemente se ha demostrado que la activación con IFN- γ de macrófagos infectados con la micobacteria los conduce a apoptosis mediada por óxido nítrico (138). Adicionalmente al mecanismo caspasa-dependiente también se tienen reportes de muerte celular caspasa-independiente, involucrando a la mitocondria (producción de Bid truncado) y a los lisosomas (fragmentación de DNA mediada por catepsinas). En éste tipo de muerte no se observa fragmentación nuclear, y no se reporta una efectiva eliminación del bacilo, lo que sugiere que difiere en algunos aspectos de la apoptosis clásica (139, 140).

En la micobacteria se han identificado sólo algunas moléculas apoptogénicas, entre las que se encuentran LpqH (lipoproteína de 19 kDa; Rv3763) (141-143), ESAT-6 (Rv3875) (144), PE_PGRS33 (Rv1818c) (145) y PstS-1, phoS o phoS1 (lipoproteína de 38 kDa; Rv0934) (137).

In vivo, en casos clínicos de TB se ha estimado que más del 50% de las células presentes en áreas caseosas están en apoptosis (76); además en biopsias de pacientes con TB pulmonar y extra-pulmonar se ha analizado el fenotipo de las células en proceso de muerte. Interesantemente, la mayoría de los macrófagos CD68⁺ en granulomas productivos expresan la proteína pro-apoptótica Bax, y muestran características típicas de apoptosis, incluyendo la expresión de Fas. Igualmente, células T de memoria adyacentes que expresan la

citocina pro-inflamatoria IFN- γ , y las señales de muerte Fas y FasL son propensas a morir por apoptosis (146). Estos datos sugieren que al menos la interacción Fas-FasL puede estar involucrada *in vivo* en la apoptosis de macrófagos y células T en granulomas de TB. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otros agentes como TNF y/o granzima A o B pueden estar involucrados en la apoptosis de macrófagos y/o células T en el granuloma. Asimismo, también se observaron células apoptóticas en granulomas activos, pero no en lesiones regresivas (146), lo cual sugiere que la apoptosis es un proceso activo que modula el intercambio celular local limitando el daño del tejido, la diseminación de la infección y que además reduce la viabilidad micobacteriana en macrófagos apoptóticos que pueden representar una fuente de antígenos bacterianos favoreciendo la presentación de antígenos por células dendríticas.

3.10. Células Dendríticas (CDs).

Las CDs son componentes cruciales del sistema inmune debido a su papel esencial en la inducción y control de la inmunidad de células T, así como en la modulación de respuestas por células B y células NK (147). Las CDs fueron descritas por primera vez a mediados de los 70's por Ralph Steinman, quien observó en el bazo una subpoblación de células con morfología similar a dendritas cerebrales. Estas células se encuentran en todos los tejidos linfáticos, en las mucosas y en tejidos intersticiales (148-151). Las CDs son un grupo celular heterogéneo que muestra diferencias en localización anatómica, fenotipo, y función; sin embargo, las CDs tienen varias características en común. Se originan de células madre CD34+ de la médula ósea, las que llegan a los tejidos periféricos por el flujo sanguíneo, donde dan origen a CDs inmaduras. Posteriormente las CDs inmaduras adquieren la capacidad de tomar antígeno por mecanismos mediados o no mediados por receptores, degradarlo y presentarlo en su superficie. Enseguida, en respuesta a señales de daño tisular, productos derivados de patógenos o citocinas inflamatorias, las CDs maduran y migran a órganos linfoides donde interactúan con células T antígeno-específicas para

iniciar una respuesta inmune. Las CD^s inmaduras expresan quimiorreceptores en mayor medida que las CD^s maduras, los cuáles regulan su tránsito a los diferentes tejidos en respuesta a gradientes de quimiocinas inflamatorias. Conforme las CD^s maduran, expresan una alta densidad de moléculas presentadoras de antígeno y de moléculas coestimuladoras, lo que permite la activación y proliferación de linfocitos T. Finalmente, factores en el microambiente en el momento de la maduración determinarán si las CD^s producirán IL-12 e iniciarán una respuesta Th1 o si al no haber producción de IL-12, se promoverá una respuesta de linfocitos T de tipo Th2 (152).

Se han caracterizado cuatro tipos de CD^s humanas. Un primer tipo son las CD^s mieloides convencionales CD14⁺, derivadas de monocitos de sangre periférica. El segundo tipo son las CD^s intersticiales o dérmicas, el tercero constituido por las células de Langerhans de la epidermis y en el cuarto grupo se incluyen las CD^s plasmacitoides. Las plasmacitoides son las únicas de origen linfoide, siendo el resto de origen mieloides (153).

En cuanto a las CD^s murinas, se ha descrito una gran variedad en órganos linfoides y no linfoides; algunas de estas parecen ser tejido-específicas por criterios fenotípicos y funcionales. Así, las CD^s murinas se agrupan en seis subpoblaciones principales: CD^s CD8⁻, CD^s CD8⁺, CD^s CD8^{intermedio}, células de Langerhans, CD^s dérmicas y CD^s B220⁺ (147). Observaciones experimentales sustentan fuertemente la idea de que las CD^s se generan por una contribución dual de precursores de CD^s que derivan de las vías de diferenciación tanto mieloides como linfoides (154, 155). Muchos sistemas experimentales que usan CD^s murinas diferenciadas *in vitro*, utilizan CD^s generadas en cultivos de médula ósea en presencia de GM-CSF con o sin IL-4 (156). Este método permite la diferenciación de CD^s con características fenotípicas y funcionales similares a las descritas para CD^s derivadas de monocitos humanos, es decir, células que son positivas para CD11c, moléculas MHC y moléculas coestimuladoras pero negativas para marcadores de células B y con una alta capacidad para estimular células T (147, 157, 158).

3.11. El papel de la CD en la TB.

Las CDs pueden fagocitar micobacterias y antígenos micobacterianos, resultando en la modificación de su función y fenotipo (159). Junto con los macrófagos, las CDs que revisten la tráquea y en general, las vías respiratorias, pueden ser las primeras células que entran en contacto con la micobacteria, siendo así las responsables de iniciar la respuesta inmune (160). Las CDs tienen receptores de superficie tipo lectina como DC-SIGN (CD209), el cual ha sido ampliamente caracterizado como el receptor principal para Mtb (161). Además de DC-SIGN, hay otros receptores que interaccionan con componentes micobacterianos, como son los receptores tipo Toll (TLR). La lipoarabinomannana (LAM) y la lipoproteína de pared LpqH, interactúan con TLR2, CpG de DNA no metilado interactúa con TLR9 y el peptidoglicano que es reconocido por TLR2 y TLR4 (70, 162, 163). La fagocitosis de Mtb por las CDs usualmente resulta en la activación de la familia de factores de transcripción del factor nuclear kappa B (NF- κ B), promoviendo la secreción de citocinas y quimiocinas inflamatorias, la liberación de intermediarios reactivos de nitrógeno y de oxígeno, así como la sobreexpresión de diversos marcadores de superficie (160, 164). En los granulomas hay reclutamiento de CDs, las cuales fagocitan a la micobacteria y migran a los dominios T de los ganglios linfáticos de drenaje para ahí procesar y presentar antígenos micobacterianos a linfocitos T que no han tenido previo contacto con dichos antígenos, induciendo subsecuentemente células Th1. Las células Th1 generadas en nódulos linfáticos pueden llegar a las lesiones tuberculosas a través de los vasos sanguíneos y participar en las reacciones inflamatorias, iniciándose así fase efectora de la respuesta inmune adaptativa (16, 165).

3.12. La apoptosis como un mecanismo de inmunidad innata en contra de la TB. Papel de las CDs.

Las CDs inmaduras son capaces de fagocitar células apoptóticas por un mecanismo que involucra a la integrina $\alpha v \beta 5$, el receptor scavenger CD36 y el receptor CR3 (96, 166-168). CDs cargadas con cuerpos apoptóticos representan un mecanismo que puede ser relevante para la promoción de respuestas inmunes contra organismos capaces de inducir apoptosis en sus células hospederas, como en el caso de Mtb.

La relevancia de la adquisición de antígenos micobacterianos mediante la fagocitosis de macrófagos apoptóticos por las CDs fué investigada por primera vez por Schaible *et al.* (169). En éste estudio se mostró que CDs no infectadas que fagocitan vesículas apoptóticas que liberan las células en apoptosis (blebs) y que contienen antígenos micobacterianos son capaces de activar linfocitos T CD8⁺ previamente expuestos a la micobacteria en un proceso de presentación cruzada de antígenos a través de MHC-I y CD1b. La presentación es dependiente de TAP-1 y requiere de una vía de presentación de antígeno en moléculas MHC-I intacta (169). A ésta vía de presentación de antígeno y activación de células T CD8⁺ a partir de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos de macrófagos infectados, se le ha denominado vía de desviación o "Detour Pathway" (170). Posteriormente, en un estudio similar se demostró que las vesículas o cuerpos apoptóticos de macrófagos infectados con BCG, estimulan células T CD8⁺ *in vivo*. En este trabajo se encontró además que el procesamiento de las vesículas apoptóticas dentro de las células fagocíticas es fundamentalmente por mecanismos endosomales y depende de la presencia de saposinas para desintegrar las membranas apoptóticas. Dichas vesículas exhiben gran capacidad adyuvante estimulando receptores de tipo Toll además de inducir protección en ratones retados con una cepa virulenta de Mtb (124). Con este estudio, se fundamentó que la "Detour Pathway" representa un mecanismo inmunológico genuino para mediar el activación cruzada de células T CD8⁺ *in vivo*. Para determinar si los macrófagos apoptóticos contribuyen a la inmunidad adaptativa, Divangahi *et al.* establecieron un modelo de transferencia adoptiva en

el que macrófagos silvestres o knockout para la 5-lipoxigenasa (*Alox5^{-/-}*; no pueden sintetizar LXA₄ y por tanto son propensos a apoptosis) o para la sintasa de prostaglandina E (*Ptges^{-/-}*; propensos a necrosis) fueron infectados *in vitro* con Mtb y después fueron transferidos por vía intra-traqueal hacia ratones receptores normales. Los resultados mostraron que para promover una respuesta celular antígeno específica CD8⁺, era necesaria la presentación de antígenos derivados de macrófagos apoptóticos por la "Detour Pathway", la cual es TAP-1 dependiente y hay presentación cruzada vía MHC-I por las células dendríticas. Además de las respuestas T CD8⁺, las respuestas T CD4⁺ también se incrementaron (171).

4. FUNDAMENTACIÓN

Para el control de la tuberculosis, además de medidas profilácticas se requiere entender mejor la respuesta inmune innata dentro de la que se incluye la apoptosis del macrófago. Así mismo, se hace necesario el desarrollo de medidas adyuvantes del tratamiento para pacientes inmunosuprimidos o que no responden a la quimioterapia. Por lo anterior y basados en observaciones que demuestran que vesículas apoptóticas inducidas por micobacterias son capaces de inducir una respuesta antimicobacteriana (124), en este estudio nos propusimos investigar si las células dendríticas podrían ser activadas *ex vivo* con cuerpos apoptóticos inducidos por una proteína altamente apoptogénica de Mtb. Así mismo estudiamos si las CDs activadas de esa manera eran capaces de inducir una respuesta proliferativa antígeno-específica de linfocitos T. Estas investigaciones podrían ser un paso inicial en el desarrollo de inmunoterapia adyuvante basada en la activación *ex vivo* de CDs con cuerpos apoptóticos inducidos por Mtb.

5. HIPÓTESIS

Las células dendríticas cargadas con macrófagos apoptóticos inducidos por proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* adquieren la capacidad para inducir una respuesta específica de linfocitos T.

6. OBJETIVOS

General:

Determinar si CDs diferenciadas *in vitro* que han fagocitado cuerpos apoptóticos de macrófagos muertos en apoptosis inducida por proteínas micobacterianas estimulan una respuesta T inmunoprotectora.

Particulares:

- Inducir *in vitro* la apoptosis de macrófagos con proteínas apoptogénicas de Mtb para obtener cuerpos apoptóticos.
- Investigar si se incorporan antígenos micobacterianos en los cuerpos apoptóticos.
- Desarrollar ensayos de activación *ex vivo* de CDs con cuerpos apoptóticos.
- Determinar si las CDs son capaces de activar a los linfocitos T.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Micobacterias y fracciones proteicas.

Para la obtención de paredes micobacterianas se utilizaron dos cepas de *Mycobacterium smegmatis*, una cepa nativa y una cepa transformada por electroporación con el plásmido p16R1, que contiene un fragmento Smal de 1.8 kb, que incluye el gen estructural que codifica para el antígeno de 19-kDa de Mtb, también conocido como LpqH (donadas por Y. Zhang (MRC Tuberculosis and Related Infections Unit, Hammersmith Hospital, London, UK). Ambas cepas se cultivaron a 37° C durante 4-5 días en medio Middlebrook 7H9 suplementado con glucosa 2% e higromicina B (50 µg/ml). Las micobacterias se recolectaron por centrifugación y se lavaron en solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM en frío; posteriormente los bacilos se mataron por sonicación a 20 kHz en agua fría (20 ciclos de un minuto con intervalos de descanso de un minuto). La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry, utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA). Para hacer una identificación cualitativa de las proteínas presentes en las paredes obtenidas, éstas se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS), y a continuación se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Las proteínas fueron identificadas por Western blot con suero hiperinmune (SHI), dilución 1:200 y reveladas con diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich). Para confirmar la presencia de la lipoproteína LpqH en la pared de la micobacteria transformada se hizo un Western blot con el anticuerpo monoclonal (AcMn) anti-LpqH (IT-19), el cual fue revelado por DAB.

7.2. Obtención de macrófagos (MØs) murinos.

Para diferenciar a los macrófagos se usaron ratones de 6 a 7 semanas de edad de la cepa Balb/cJ; se obtuvieron fémures y tibias que fueron perfundidos para extraer las células de la médula ósea, las cuales se cultivaron en cajas de Petri (100 mm x 20 mm) con medio RPMI 1640 20% Suero Fetal Bovino (SFB),

suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antimicótico y 1% de piruvato de sodio. Las cajas se colocaron en una incubadora con ambiente semihúmedo a 37 °C/5% CO₂. En el quinto día de cultivo, se les cambió el medio y se incubaron por 5 días adicionales hasta observar una morfología correspondiente a la de los macrófagos activados. Estos macrófagos se despegaron de las cajas de Petri con EDTA 0.05 M y con una espátula plástica estéril. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, se determinó el número y la viabilidad celular con azul tripano y se colocaron en placas de 12 pozos (1x10⁶ células/pozo). Se dejaron reposar un día a 37 °C/5% CO₂ para posteriormente inducir apoptosis.

7.3. Inducción de apoptosis en MØs murinos.

La apoptosis fue inducida con las paredes de *M. smegmatis* nativa (Msmeg-N) y transformada (Msmeg-LpqH) con 50 µg/5X10⁵ células; el periodo de incubación fue de 24 h. Como control negativo se dejaron células sin tratamiento y como control positivo se indujo apoptosis con luz UV durante 12 h. La inducción y cuantificación de la apoptosis se analizó con Anexina V acoplada a FITC (BioLegend) por citometría de flujo (FACS) y/o por microscopía de epifluorescencia mediante TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red, Roche Applied Science) preparado como se muestra en la hoja técnica. En breve, las células se permeabilizaron con saponina 0.05% durante 3 min e inmediatamente después se lavaron con PBS, se preparó una mezcla 1:5 de la enzima con la solución de tinción y se adicionó a las células, incubándose durante 60 min a 37 °C, después se lavó con PBS y se centrifugó 5 min a 1500 rpm. Finalmente se hizo una centrifugación sobre portaobjetos del pellet celular y se montó con una solución antifade/DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Invitrogen Molecular Probes).

7.4. Purificación de CAp.

Una vez que se indujo apoptosis, las células apoptóticas se recuperaron de los pozos y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se purificaron mediante perlas magnéticas acopladas a Anexina V (Miltenyi Biotec). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la hoja técnica de las columnas MS de Miltenyi Biotec (capacidad de 2×10^8 células totales) utilizadas para la separación magnética. En breve, a cada tubo con células tratadas para inducción de apoptosis se les agregaron 80 μ l de solución amortiguadora de unión 1X (stock 10X: 0.1 M Hepes, pH 7.4; 1.4 M NaCl, y 25 mM CaCl_2 en agua destilada) y se incubó durante 15 min con 20 μ l de perlas acopladas a Anexina V. En el transcurso del tiempo de incubación, la columna fue colocada en el campo magnético de un separador MACS (Miltenyi Biotec) y ésta se equilibró agregando 500 μ l de solución amortiguadora de unión tres veces. Las células apoptóticas se eluyeron por gravedad a través de la columna magnética reteniéndose solamente los cuerpos apoptóticos. Se realizaron nuevamente tres lavados con buffer binding de 500 μ l cada uno para eliminar los pegajes inespecíficos, finalmente la columna se retiró del separador, se añadieron 300 μ l de solución amortiguadora de unión e inmediatamente los cuerpos apoptóticos fueron empujados con el émbolo, siendo recolectados en un tubo eppendorf de 15 ml. El rendimiento de la purificación se analizó con Anexina V acoplada a FITC por citometría de flujo y/o por microscopía de epifluorescencia.

La concentración de proteína en los cuerpos apoptóticos se estimó por el método de Lowry, utilizando una curva estándar de BSA.

7.5. Incorporación de proteínas micobacterianas en los CAp.

Para la identificación de las proteínas encontradas en los cuerpos apoptóticos, éstos se resolvieron por PAGE-SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas presentes en las membranas fueron identificadas por Western blot, para ello se incubó con suero hiperinmune (SHI) en contra de Mtb al no contar con un suero anti-*M. smegmatis* dilución 1:200, y con el AcMn

IT-19 dilución 1:1000 para identificar la presencia de LpqH. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia y DAB. Además, también se incubó con los ACMn anti-histonas anti H1(30 kDa), anti-H2B (19-20 kDa) y anti-H4 (35-36 kDa) para identificar la presencia de proteínas nucleares en los cuerpos apoptóticos.

Para estudiar por microscopía de epifluorescencia y confocal la incorporación de proteínas micobacterianas en los cuerpos apoptóticos, se emplearon macrófagos murinos Balb/cJ y la línea celular macrófaga J774. La pared de Msmeg-LpqH se marcó con CFSE 5 μ M (5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester 5(6)-CFDA, SE; Invitrogen Molecular Probes), se incubó a 37 °C durante 15-20 min y después se lavó 2 veces con PBS 1X. Los macrófagos se colocaron en placas de 12 pozos y se dejaron reposar durante un día. Posteriormente, se incubaron con la pared (50 μ g/5 $\times 10^5$ macrófagos Balb/cJ y 200 μ g/5 $\times 10^5$ células J774) durante 1, 4 y 24h. Una vez pasado el tiempo de incubación, las células se despegaron con una espátula de plástico estéril y se centrifugaron 5 min a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante y se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 10 min, en seguida se lavaron con PBS 1X y se dejaron con PBS-BSA 3% hasta el día siguiente. Para retirar el PBS-BSA 3% se centrifugó 5 min a 1500 rpm y se permeabilizó con saponina 0.05% durante 3min, inmediatamente después se lavó con PBS y se le agregó la mezcla del TUNEL, ésta se incubó durante 60 min a 37 °C, después se lavó con PBS y se centrifugó 5 min a 1500 rpm. Se hizo una centrifugación sobre portaobjetos del pellet celular y se montó con una solución DAPI/Antifade. Adicionalmente se realizaron experimentos en los que las células se incubaron durante 30 min con el inhibidor general de caspasas zVAD-fmk previo al tratamiento con la pared micobacteriana. El procedimiento posterior fue igual ya descrito para su posterior análisis por epifluorescencia.

7.6. Extracción de núcleos de células incubadas con la pared de *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH).

Se extrajeron los núcleos de células J774 incubadas durante 1 y 12 h con pared de Msmeg-LpqH marcada con CFSE, la metodología fue la siguiente: las células se resuspendieron en 5 ml de solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8), se agregaron 125 μ l de un cocktail de inhibidores de proteasas (stock 40X) y 50 μ l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), inhibidor de serin-proteasas (stock 100X). Se agitó con vortex y se mezcló con pipetas durante 10 min hasta romper las células. Después de este periodo, se tomó una muestra y se revisó el estado de las células en el microscopio invertido. Se repitió la misma operación hasta no observarse células completas. En seguida se centrifugó a 3000 rpm por 5 min para obtener el pellet de los núcleos, se marcaron con DAPI, y se analizaron por FACS, posteriormente se hizo una centrifugación sobre portaobjetos. Todos los portaobjetos se analizaron por microscopía de epifluorescencia.

7.7. Obtención de CDs.

Para la obtención de células dendríticas se utilizó un protocolo modificado de Lutz *et al.* (157), en breve, de ratones de 6 a 7 semanas de edad BALB/cJ se obtuvieron fémures y tibias que se perfundieron para obtener las células de la médula ósea, se tomó una alícuota en la que se lisaron eritrocitos con una solución de cloruro de amonio (Tris-Cl, 0.02 M y NH₄Cl 0.14 M, pH 7.2) y a partir de esa alícuota se contaron las células viables con azul tripano. Se sembraron 5x10⁶ células (sin contar a los eritrocitos) en cajas bacteriológicas (Thermo Fisher de 100 mm x 20 mm) con medio RPMI 1640 suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), L-glutamina (2 nM), 2-mercaptoetanol (100 μ l 0.1M), piruvato de sodio (10 ml/L 100 mM), HEPES (25ml/L 1M) y 10% de SFB. Adicionalmente a éste medio se le agregó sobrenadante de células CHO (Chinese Hamster Ovary) productoras de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos murino (mGM-CSF) en una concentración de 15%, o

se le agregaron 20 ng/ml de mGM-CSF recombinante (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Al tercer día de cultivo se le adicionó medio RPMI suplementado de igual manera, y al sexto día se recuperaron las células no adherentes por centrifugación (1500 rpm/5 min), correspondientes a células dendríticas inmaduras. El fenotipo de las CDs fue analizado por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales en contra de CD11c (PerCP/Cy5.5, BioLegend) y MHC II (FITC, Miltenyi Biotec).

7.8. Producción de mGM-CSF en células CHO.

Las células CHO productoras de mGM-CSF fueron donadas por la Dra. Laura C. Bonifaz Alfonso (Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes, Instituto Mexicano del Seguro Social, México) y se obtuvieron de ATCC(CCL61). Para producir el factor de crecimiento las células fueron transfectadas con el vector de expresión de clonación pcDNA3, que tiene 426pb cDNA correspondiente a la región codificante de mGM-CSF en los sitios de Hind III/Xho I.

7.9. Ensayos de fagocitosis de CAp por CDs.

Para verificar la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por las CDs el siguiente ensayo se llevó a cabo: se indujo apoptosis por 24 h con la pared de *M. smegmatis* recombinante, así como con luz UV a macrófagos derivados de la médula ósea de ratón teñidos previamente con el colorante lipofílico PKH26 que da una coloración roja (Sigma-Aldrich), purificando posteriormente los cuerpos apoptóticos como se mencionó anteriormente. Por otra parte las CDs fueron marcadas con el colorante lipofílico PKH67 que da una coloración en verde (Sigma-Aldrich) y se colocaron en placas de 12 pozos (5×10^5 células/pozo), a éstas se les agregaron 25 μ g de los cuerpos apoptóticos y se coincubaron durante 0.5, 1, 4 y 24 h. Para sincronizar la fagocitosis se centrifugó la placa 5 min a 1000 rpm a 4 °C y se incubó a 37 °C. Una vez cumplidos los tiempos de incubación las células se despegaron mediante pipeteo y se centrifugaron a 1500

rpm por 5 min. Se fijaron con paraformaldehído al 1%, se analizaron por FACS y con las células sobrantes se hicieron centrifugaciones sobre portaobjetos, los portaobjetos fueron analizados por microscopía de epifluorescencia y confocal.

Adicionalmente se realizaron experimentos para observar la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células que presentan el marcador CD11c. El procedimiento de incubación fue el mismo descrito anteriormente, pero en este caso los macrófagos a los que se les iba a inducir apoptosis se tiñeron con CFSE (5 μ M) durante 10 min a 37 °C. Posterior a los tiempos de incubación (1, 4 y 24 h) de las células fagocíticas con los cuerpos apoptóticos, las células se tiñeron con el AcMn anti-CD11c (PerCP/Cy5.5, BioLegend) durante 30 min y se hicieron centrifugaciones sobre portaobjetos para su análisis por microscopía de epifluorescencia.

7.10. Ensayos para analizar de la maduración de CDs que han fagocitado CAP.

Al sexto día de cultivo, se recuperaron las células no adherentes por centrifugación (1500 rpm/5 min), se contaron las células viables por azul tripano en cámara de Neubauer y se colocaron en cajas experimentales dejándolas reposar un día antes de los diversos tratamientos. Las CDs fueron incubadas por 24 h con los siguientes tratamientos: pared de Msmeg-LpqH (5 μ g por 1×10^6 células), cuerpos apoptóticos inducidos con la pared Msmeg-LpqH (50 μ g por 1×10^6 células), cuerpos apoptóticos inducidos con luz ultravioleta (50 μ g por 1×10^6 células), LPS (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich) como control positivo de activación y como control negativo células sin tratamiento. Se determinó incubar con 5 μ g de pared de Msmeg-LpqH después de que en varios estudios de inmunoblot se demostró por densitometría que la expresión de LpqH en los cuerpos apoptóticos era 10 veces menor que en la pared Msmeg-LpqH. El fenotipo de maduración se determinó por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales en contra de CD11c (PerCP/Cy5.5, BioLegend), MHC II (FITC, Miltenyi Biotec), MHC I (FITC, BioLegend), CD40 (APC, BioLegend), CD80 (Alexa Fluor 488, BioLegend) y CD86 (APC, BioLegend).

7.11. Ensayos para analizar la producción de citocinas por CDs activadas con CAp.

Para detectar las citocinas intracelulares, se utilizó un protocolo modificado de Foster *et al.*(172) y se realizó como se menciona a continuación: al sexto día del cultivo de las células dendríticas, éstas se contaron, se colocaron en cajas experimentales (10×10^6 células/caja) y se dejaron reposar toda la noche. Al día siguiente las CDs se estimularon con pared de Msmeg-N ($5 \mu\text{g}$ por 1×10^6 células), pared de Msmeg-LpqH ($5 \mu\text{g}$ por 1×10^6 células), cuerpos apoptóticos inducidos con Msmeg-N ($50 \mu\text{g}$ por 1×10^6 células), cuerpos apoptóticos inducidos con Msmeg-LpqH ($50 \mu\text{g}$ por 1×10^6 células), cuerpos apoptóticos inducidos con luz UV ($50 \mu\text{g}$ por 1×10^6 células) y con LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) como control positivo por 6 h. A cada caja experimental se le agregó monensina $2 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich), lo que permite la retención de proteínas, incluyendo las citocinas, en el complejo de Golgi/Retículo endoplasmático. Una vez pasado el tiempo de incubación, las células se sacaron de los pozos, se centrifugaron 5 min a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante y se tiñeron con el anticuerpo anti-CD11c (FITC, BioLegend) durante 30 min a 4°C en la oscuridad. A continuación las células fueron lavadas con PBS para tinción de citocinas (NaH_2PO_4 anhidro 1.9 mM, Na_2HPO_4 anhidro 8.1 mM, NaCl 154 mM, se ajusta el pH a 7.2-7.4 y se afora con H_2O a 1 litro); y se fijaron durante 15 min con paraformaldehído al 1%, lavándose en seguida con PBS para citocinas. Las células se almacenaron a 4°C toda la noche y al día siguiente se llevó a cabo la tinción de citocinas intracelulares de la siguiente manera: las muestras se lavaron con 1 ml de PBS-S (HEPES 10 mM, CaCl_2 1 mM, MgSO_4 1 mM, NaN_3 0.05%, BSA 0.1% y saponina 0.1% disueltos en PBS para citocinas) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C , el sobrenadante se desechó y se agregaron $50 \mu\text{l}$ del sobrenadante de PBS/leche (PBS para citocinas con leche al 5% el cual se centrifuga 30 min a 15 000 g a temperatura ambiente); las células se resuspendieron con pipeta y se incubaron 30 min a 4°C ; se centrifugaron 5 min a 1500 rpm a 4°C y se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en sobrenadante de PBS-S/leche (PBS-S con leche al 5%, se centrifuga 30 min a 15 000 g a temperatura ambiente) con un bloqueador de Fc (BioLegend) con el que se incubó durante 10 min a 4°C y

posteriormente a cada muestra se le puso la cantidad apropiada de anticuerpo anti-citocina: anti-TNF- α (PE/Cy7, BioLegend), anti-TGF- β (PE, BD Pharmingen), anti-IL-10 (Alexa Fluor 647, BioLegend), anti-IL-12/IL-23p40 (APC, BioLegend), así como de sus respectivos isotipos. Se incubaron durante 30 min a 4 °C en oscuridad y después se lavó con 1 ml de PBS-S, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante, el pellet se deshizo con ligera agitación y se lavó con 1 ml de PBS para citocinas; se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en la cantidad apropiada de buffer para FACS para su posterior análisis por citometría de flujo.

7.12. Ensayos para determinar la capacidad de CDs cargadas con CAp de inducir la proliferación de linfocitos T.

Para estos ensayos se formaron tres grupos de ratones Balb/cJ de 9 a 10 semanas de edad (cada grupo compuesto por tres ratones) tratados como se detalla a continuación. Grupo 1, ratones control, no inmunizados que recibieron solo PBS; grupo 2, ratones inmunizados con 40 μ g de pared de Msmeg-N; grupo 3, ratones inmunizados con 40 μ g de pared de Msmeg-LpqH. La inmunización se llevó a cabo con antígenos disueltos en 200 μ l PBS, sin adyuvantes y por vía subcutánea en la parte posterior del cuello. De 8 a 10 días después de la inmunización se extrajeron los bazos para obtener los linfocitos T. El procedimiento fue el siguiente: se colocaron los bazos en una caja Petri con 10 ml de medio RPMI sin suplementar. Enseguida se perfundió el bazo con el medio de cultivo para obtener las células, las que se colocaron en un tubo de Falcon para sedimentar los fragmentos de tejido durante 5 min. Posteriormente se centrifugaron las células por 5 min a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió durante 5 min en 1 ml de solución de lisis 1X (solución stock 10X: Na₄EDTA 10⁻³ M, KHCO₃ 10⁻² M, NH₄Cl 1.7 M en H₂O, pH=7.3) a temperatura ambiente con pipeteo constante. Enseguida se hicieron dos lavados con 10 ml de RPMI sin suplementar. Después de los lavados las células se resuspendieron en 10 ml de DPBS (NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM,

Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.2 mM en H_2O). Las células se contaron, se colocaron en tubos falcon de 15 ml (20×10^6 células/tubo) y se centrifugaron a 1800 rpm por 5 min retirándose el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 2 ml de una solución con el anticuerpo anti-Thy (PE, BioLegend) para marcar los linfocitos T; la incubación se llevó a cabo durante 30 min a 4 °C, en la oscuridad. Posteriormente se lavó 2 veces con 10 ml de DPBS suplementado con 1% SFB + 1% antimicótico y se centrifugó 5 min a 1800 rpm; el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en DPBS suplementado con 1% antimicótico de manera que las células quedaran a una concentración de 10×10^6 células/ml para llevarlas a la unidad de FACS y purificar los linfocitos T. Los linfocitos fueron recolectados en tubos que contenían 1 ml de RPMI completo con 10% SFB, 1% 2-mercaptoetanol 100X, 1% piruvato de sodio 100 mM, 1% antimicótico y 1% aminoácidos esenciales. Al obtener 10×10^6 células T con más del 95% de pureza, se eliminó el sobrenadante por centrifugación y se resuspendieron en 200 μl de DPBS; a éste volumen se le agregaron 200 μl adicionales de DPBS que contenía 1 μl de CFSE 5 μM para marcar las células, se mezcló y se incubó 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Pasado este tiempo las células se lavaron dos veces con 1 ml DPBS suplementado con 10% SFB y se adicionó 1 ml de medio RPMI completo para detener la reacción el marcaje con CFSE. Las células se contaron y sembraron en una placa de 48 pozos (5×10^5 células/pozo) y se añadieron las CDs sin tratamiento y, las activadas con las paredes de Msmeg-N y Msmeg-LpqH, con los cuerpos apoptóticos inducidos con Msmeg-N, Msmeg-LpqH y luz UV en una proporción de 5:1 linfocito:CD. Como control positivo de proliferación se incubaron linfocitos con anticuerpos solubles anti-CD3 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BioLegend) y anti-CD28 (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BioLegend); como control negativo, se dejaron linfocitos sin estímulo. Los linfocitos T se incubaron con las CDs, durante 72 h, al término de las cuales se cosecharon, se marcaron con los AcMn anti-CD4 (PE/Cy5, BioLegend) y anti-CD8 (APC, BioLegend). La proliferación celular fue determinada por citometría de flujo por la dilución del marcador CFSE. Los datos fueron analizados con el software Flow jo y la proliferación de expresó como índice de división, el cual representa el número de divisiones promedio para todas las células a partir de la población inicial.

7.13. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos necesarios se hicieron por medio de la prueba ANOVA de una vía de diseño en bloques. Una $P \leq 0.05$ se consideró significativa.

8. RESULTADOS

8.1. La cepa de *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH) sobreexpresa la lipoproteína LpqH de Mtb.

En estudios previos en nuestro laboratorio hemos demostrado que la lipoproteína LpqH de la pared micobacteriana induce niveles altos de apoptosis en macrófagos y que se incorpora en los cuerpos apoptóticos que induce (143). Por otra parte se sabe que LpqH es un antígeno que induce una respuesta proliferativa de linfocitos T (173). Por todo lo anterior en este estudio para activar las CD8 decidimos utilizar cuerpos apoptóticos de MØs obtenidos de la médula ósea de ratones Balb/cJ tratados con la pared de una cepa de *M. smegmatis* transformada que sobreexpresa LpqH (Msmeg-LpqH). Se demostró la presencia de la lipoproteína en la cepa transformada y no en su contraparte nativa mediante Western-blot utilizando un suero hiperinmune (SHI), el cual detecta las proteínas totales de la micobacteria. Se observó una banda abundante en la zona de migración correspondiente a 19 kDa (flecha) en la cepa transformada así como una banda menos intensa en la cepa nativa (Fig. 1A). Para confirmar la identidad de la proteína, el blot se reveló con el AcMn anti-LpqH (IT-19) el cual reaccionó con la banda de 19-kDa en la cepa transformada pero no en la nativa (Fig. 1B).

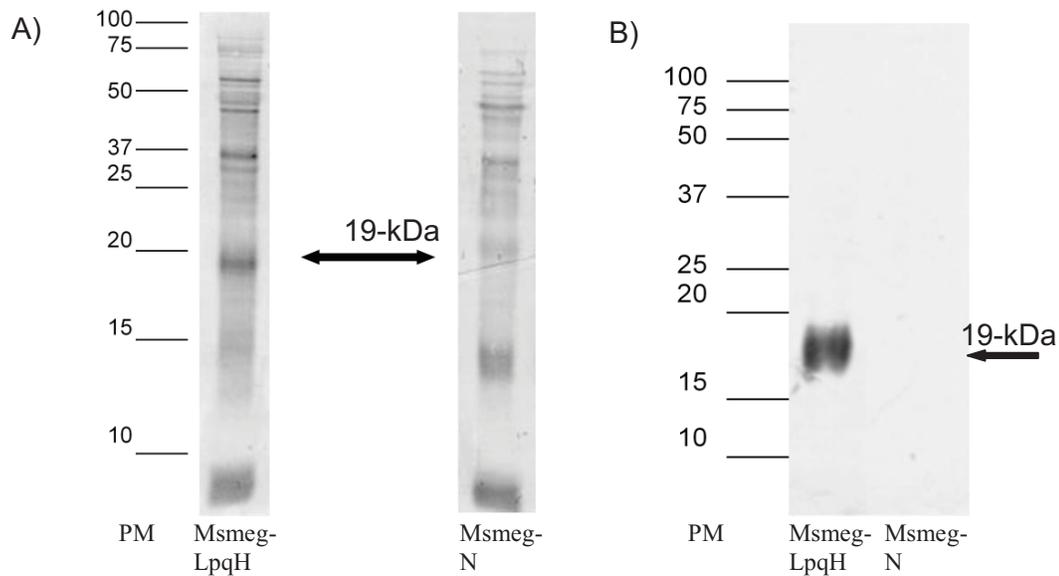


Figura 1. La cepa de *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH) sobreexpresa la lipoproteína LpqH de *Mtb.* A) Western-blot de paredes de Msmeg-LpqH y *M. smegmatis* nativa (Msmeg-N) incubado con suero hiperinmune (SHI) anti-*M. tuberculosis*; la flecha indica la zona de 19-kDa. B) Western-blot de paredes de Msmeg-LpqH y Msmeg-N incubado con un AcMn anti-LpqH; la flecha indica la banda correspondiente a LpqH. PM, pesos moleculares.

8.2. Msmeg-LpqH induce niveles altos de apoptosis en MØs diferenciados de precursores de la médula ósea de ratones Balb/cJ.

El nivel de apoptosis obtenido en macrófagos murinos tratados con las paredes de Msmeg-N y Msmeg-LpqH durante 24 horas fue muy alto (más de 60%; Fig. 2). El análisis de la apoptosis se realizó por FACS, técnica para el análisis de múltiples parámetros celulares en poblaciones heterogéneas, como tamaño, complejidad, fenotipo y viabilidad celular. Para el análisis de la apoptosis las células se marcaron con Anexina V, proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina, fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y que es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis (174).

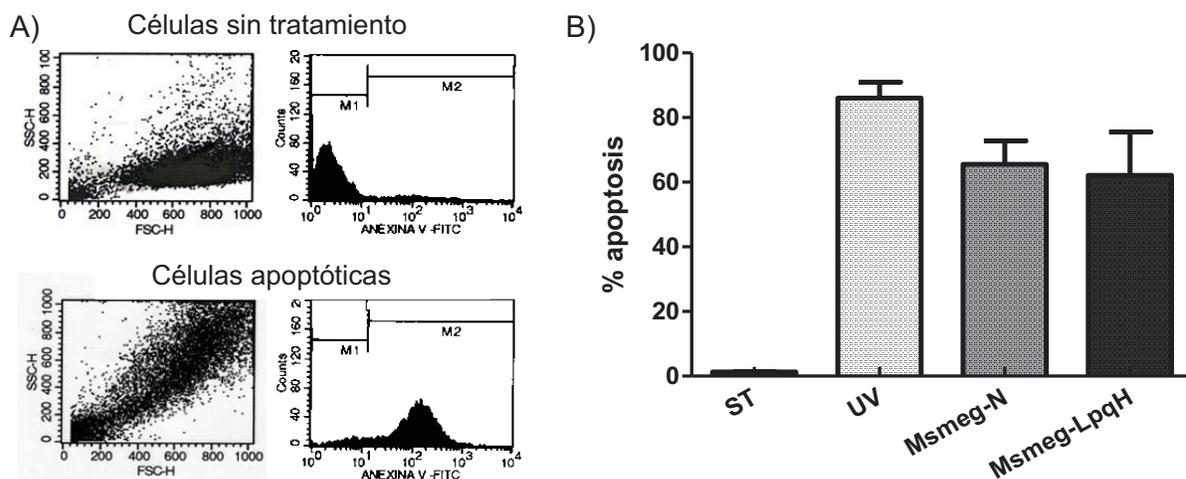


Figura 2. Msmeg-LpqH induce niveles altos de apoptosis. Análisis por citometría de flujo con Anexina V. A) Dot plots representativos de múltiples ensayos de MØs tratados o no con la pared de Msmeg-LpqH. B) Los resultados mostrados en el histograma representan el promedio del porcentaje de células apoptóticas en tres experimentos independientes \pm ES. La inducción de apoptosis se realizó con las paredes micobacterianas de *M. smegmatis* nativa y transformada (Msmeg-N y Msmeg-LpqH respectivamente). Como control positivo de apoptosis se trataron células con luz ultravioleta (UV) y como control negativo se dejaron células sin tratamiento (ST).

Adicionalmente se cuantificó la inducción de apoptosis mediante microscopía de epifluorescencia con la reacción de TUNEL. Esta reacción marca los fragmentos de DNA, en el extremo hidroxilo (3'-OH) generados durante la apoptosis (175, 176). En la Fig. 3 se pueden observar los núcleos apoptóticos en color magenta debido a la co-localización del DNA teñido con DAPI en azul y la reacción de TUNEL en rojo. La inmunofluorescencia detectó apoptosis en un 90-95 % de las células a las 24 h.

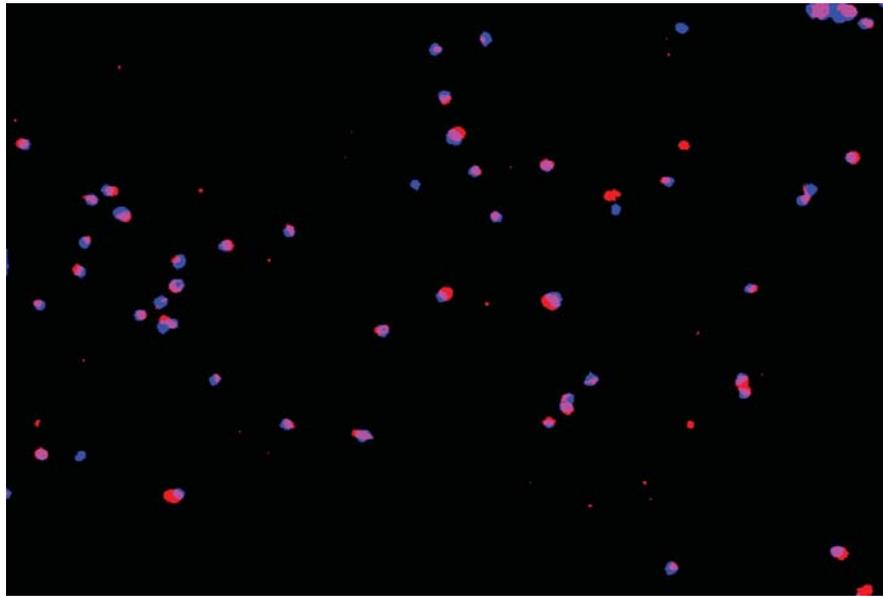


Figura 3. Análisis por microscopía de epifluorescencia de la apoptosis inducida en MØs con paredes de Msmeg-LpqH. En varios experimentos la apoptosis detectada por microscopía varió de 90 a 95 %; original x 10; TUNEL rojo; DAPI azul; núcleos apoptóticos magenta.

8.3. Incorporación de antígenos micobacterianos en MØs apoptóticos. Demostración por Western blot.

La presencia de proteínas micobacterianas en células apoptóticas purificadas con Anexina V acoplada a perlas magnéticas se investigó por Western blot con un suero hiperinmune en contra de Mtb al no contar con un suero anti-*M. smegmatis*; la presencia de LpqH se investigó con un AcMn. En el Western blot incubado con suero hiperinmune se detectaron por inmunidad cruzada varias bandas antigénicas en los cuerpos apoptóticos inducidos con la pared Msmeg-LpqH (CAp-LpqH) por arriba de los 50-kDa (Fig. 4A). Así mismo, en varios ensayos se demostró con el AcMn la presencia de una banda de 19-kDa que corresponde a LpqH (Fig. 4B). Además se hicieron estudios para comparar la magnitud de la expresión de LpqH en la pared de Msmeg-LpqH con la expresada en los cuerpos apoptóticos. En varios experimentos se observó por densitometría de los blots, técnica que permite cuantificar la cantidad de proteína

presente en una banda determinada en un gel, que en la pared micobacteriana había al menos 10 veces más LpqH que en los cuerpos apoptóticos (Fig. 4B).

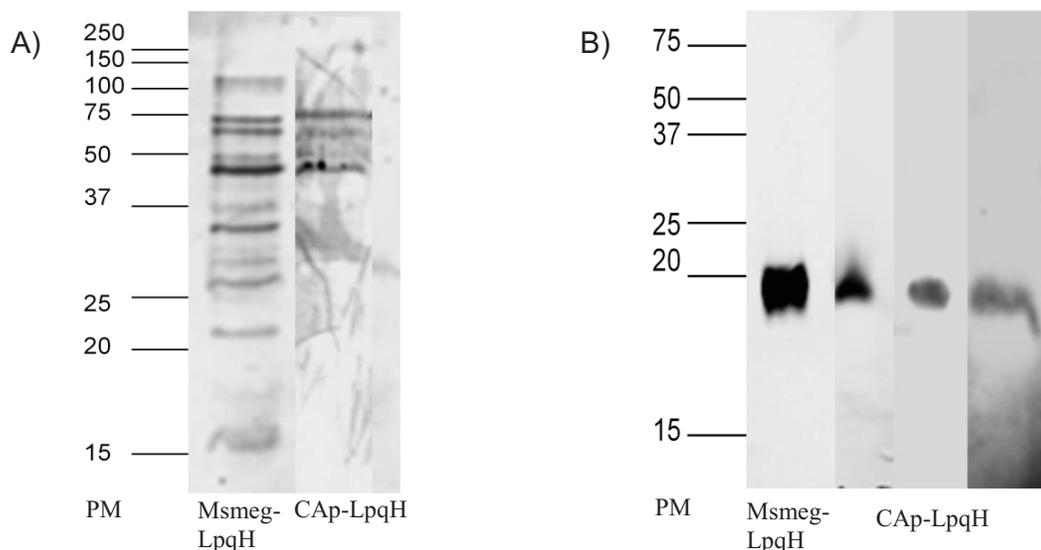


Figura 4. Los cuerpos apoptóticos inducidos con la pared Msmeg-LpqH incorporan antígenos micobacterianos. A) Western blot de la pared de Msmeg-LpqH y de cuerpos apoptóticos inducidos por ésta (CAp-LpqH) incubado con suero hiperinmune (SHI) anti-*M. tuberculosis* y revelado por DAB. B) Western blots de la pared de Msmeg-LpqH y de CAp-LpqH incubados con el AcMn anti-LpqH revelados por quimioluminiscencia. Las bandas de los CAp-LpqH representan tres experimentos independientes. PM, pesos moleculares.

Además de las proteínas micobacterianas se investigó la presencia de histonas con AcMn anti-histonas H1, H2B, y H4; esto se consideró de interés pues se ha observado que en los cuerpos apoptóticos se incrementa el contenido de auto-antígenos nucleares como la histonas (177). En este estudio se demostró la presencia de las histonas H4 y H2B, la primera representada por una banda cercana los 37-kDa y la segunda a los 20-kDa (Fig. 5).

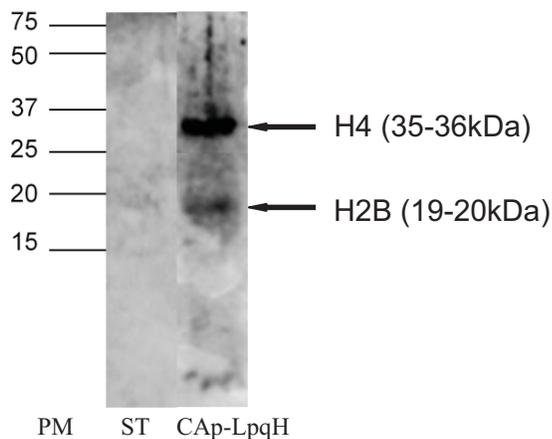


Figura 5. Los cuerpos apoptóticos contienen auto-antígenos nucleares. Western-blot de CAp-LpqH incubado con AcMn contra las histonas H1, H2B, y H4. Las flechas muestran la presencia de las histonas H4 y H2B respectivamente. Revelado por quimioluminiscencia. PM, pesos moleculares. ST, células sin tratamiento.

8.4. Incorporación de antígenos micobacterianos en MØs apoptóticos. Demostración por inmunofluorescencia.

En vista de las observaciones anteriores se buscó la localización subcelular de las proteínas micobacterianas administradas a los MØs para inducir apoptosis. Para lo anterior las células se incubaron por tiempos variables con las paredes micobacterianas de Msmeg-LpqH previamente marcadas con el fluorocromo vital CFSE (fluorescencia verde). Por microscopía de epifluorescencia en los tres tiempos experimentales (1, 4 y 24 h) se observó una abundancia de material granular CFSE positivo en el citoplasma de numerosas células (Tabla 1; Fig 6A). De mucho interés fue observar que después de 1 h de incubación, el 44 % de los núcleos emitían una fluorescencia azul-verde, indicando la colocación de las proteínas micobacterianas marcadas con CFSE y el DNA nuclear marcado con DAPI (Tabla 1, Fig. 6B). Estas observaciones se corroboraron por microscopia confocal en numerosas células examinadas en cortes ecuatoriales (Fig, 7). Además, una proporción importante de las células con CFSE nuclear tenían núcleos en apoptosis revelados con la tinción de TUNEL, lo que era mayor a 1 h de incubación (81.2 %; Tabla 1). En vista de que se ha reportado que durante la

apoptosis puede alterarse drásticamente la estructura del poro nuclear haciéndolo permisivo el paso de proteínas (178), llevamos a cabo ensayos preincubando las células con el inhibidor general de caspasas (zVAD-fmk). Este tratamiento resultó en una disminución muy alta de la incorporación de las proteínas marcadas con CFSE al núcleo, así como de la apoptosis nuclear, indicando un papel para la apoptosis caspasas-dependiente en dichos fenómenos (Tabla 1).

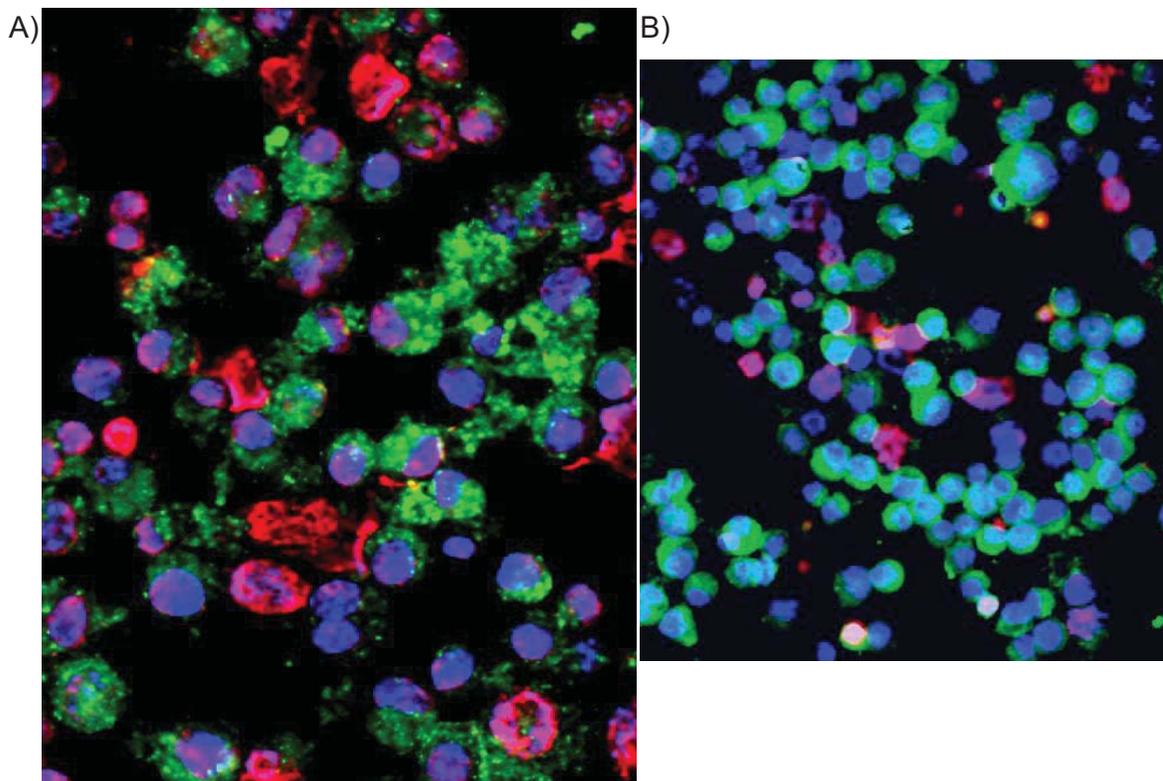


Figura 6. Incorporación de antígenos micobacterianos en MØs apoptóticos inducidos con paredes de Msmeg-LpqH. Análisis por microscopía de epifluorescencia. A) La proteína marcada con CFSE (verde) es abundante en el citoplasma de las células; 24 h de incubación, original x 40. B) La proteína CFSE positiva entra al núcleo de los MØs; 24 h de incubación, original x 20. Células TUNEL positivas magenta. Núcleos teñidos de azul con DAPI.

| Tiempo | % 1 h | % 4 h | % 24 h |
|----------------|-------|-------|--------|
| CFSE | 44 | 21.9 | 16.7 |
| TUNEL | 81.2 | 48 | 37.6 |
| TUNEL/CFSE* | 40.4 | 98 | 96.1 |
| zVAD-fmk CFSE | 2 | 4.4 | 1.4 |
| zVAD-fmk TUNEL | 1.2 | 0.9 | 0.8 |

Tabla 1. Análisis de la incorporación de antígenos micobacterianos en núcleos de MØs (de la línea celular J774) incubados con proteínas micobacterianas marcadas con CFSE. La muerte celular se determinó mediante el ensayo de TUNEL. zVAD-fmk, inhibidor general de caspasas. *Indica el porcentaje de células CFSE⁺ en apoptosis (TUNEL⁺).

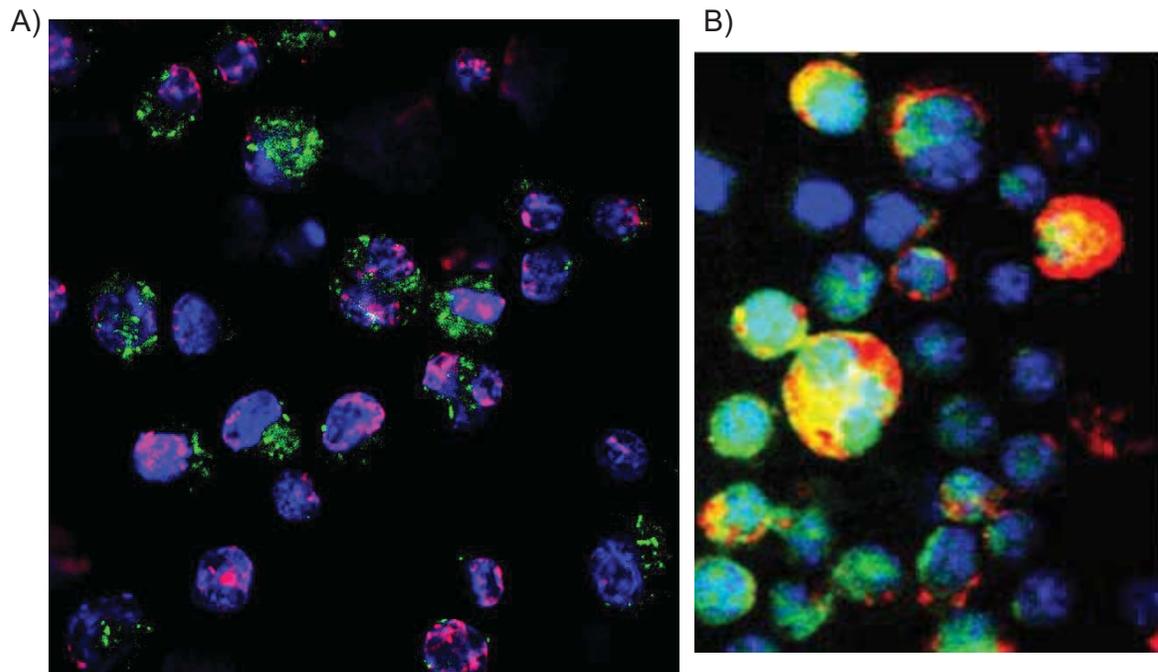


Figura 7. Microscopía confocal de MØs incubados con la pared de Msmeg-LpqH. A) Los antígenos micobacterianos marcados con CFSE (fluorescencia verde) se encuentran en el citoplasma de MØs apoptóticos (TUNEL positivos, coloración magenta); original x 60. B) Se hace evidente la incorporación de proteínas micobacterianas al núcleo por la fluorescencia azul-verde que resulta de la colocalización de CFSE con el DNA nuclear marcado con DAPI (azul). La coloración amarilla es resultado de la colocalización de TUNEL (en rojo) con antígenos micobacterianos CFSE positivos; original x 60.

La incorporación de las proteínas micobacterianas al núcleo de las células apoptóticas se corroboró por citometría de flujo de la siguiente manera, se aislaron los núcleos de células que habían sido incubadas por 1 y 12 h con las proteínas de pared Msmeg-LpqH marcadas con CFSE como se detalla antes. Además el DNA nuclear se marcó con DAPI (Fig. 8B). A 1 h se observó la fluorescencia emitida por las proteínas marcadas con CFSE en 74.41% de los núcleos que subió a 87.65% en células incubadas por 12 h. Lo anterior se confirmó por epifluorescencia al observarse fluorescencia azul-verde desde la primer hora en 50.4% de los núcleos, 61% de los cuales estaban en apoptosis demostrado con la tinción de TUNEL (Fig. 8C y 8D).

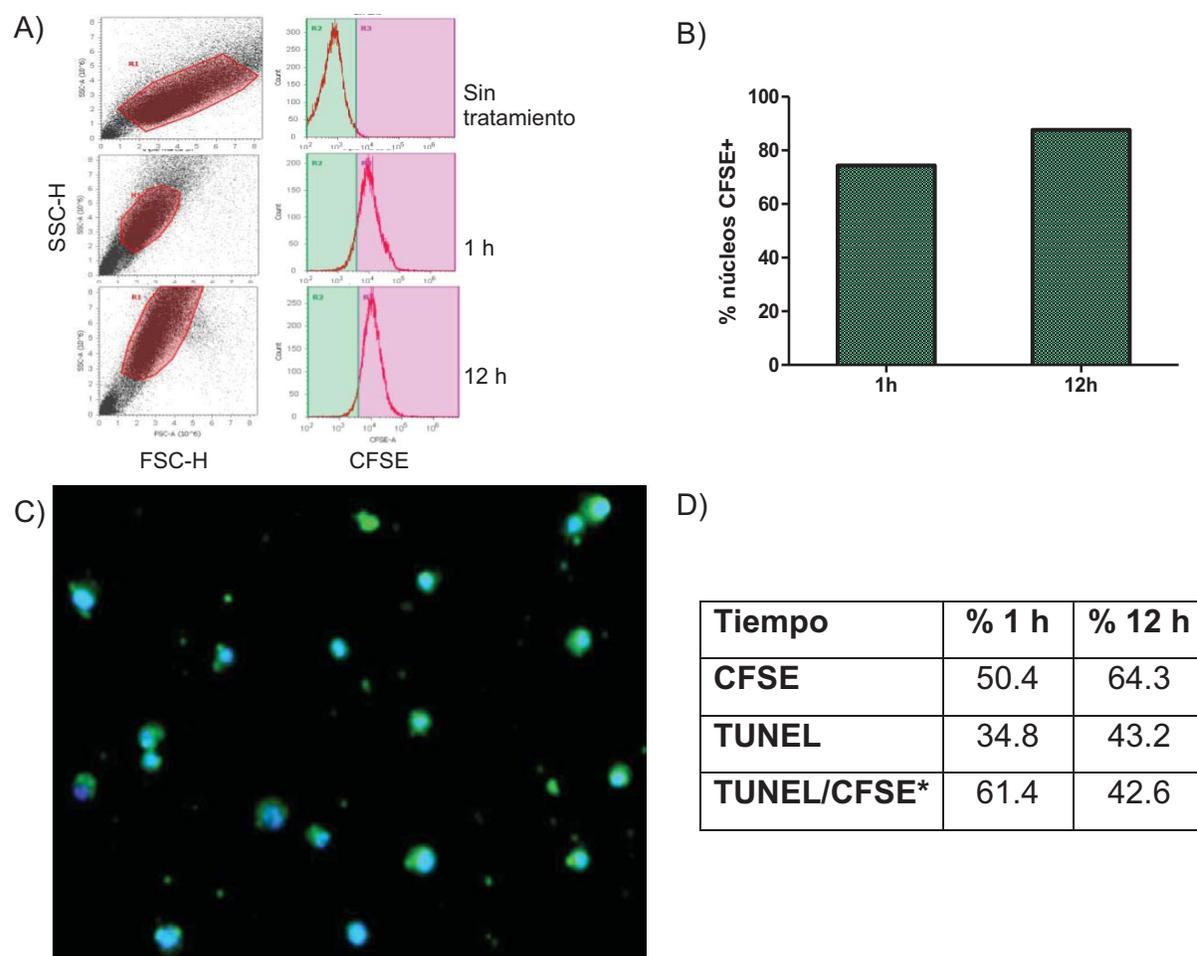


Figura 8. Núcleos purificados de MØs (células J774) que fueron incubados con paredes de Msmeg-LpqH (marcadas con CFSE) incorporan proteínas micobacterianas. A) Dot plots e histogramas del análisis por FACS para CFSE. B) Histograma que muestra el porcentaje de núcleos CFSE⁺. Análisis por FACS a la

hora y a las 12 horas de incubación. C) La mayoría de los núcleos (DAPI en azul) muestra fluorescencia azul-verde indicando incorporación de la proteína micobacteriana marcada con CFSE (verde). Análisis por microscopía de epifluorescencia, original x 20. D)Tabla que muestra los resultados del análisis por microscopía de epifluorescencia. *Indica el porcentaje de células CFSE⁺ en apoptosis.

8.5. Obtención de CDs a partir de células precursoras de la médula ósea de ratones Balb/cJ. Estandarización del método de cultivo.

Para la obtención de células dendríticas se utilizó un método modificado del reportado por Lutz *et al.* (157) con algunas modificaciones menores dirigidas a encontrar las mejores condiciones para el cultivo. Las variaciones fueron con el género de los ratones donadores, las cajas de cultivo, el tipo de suero y la adición de IL-4. Los resultados mostraron que para obtener un rendimiento aproximado de un 50% de células CD11c⁺ se requieren células precursoras de la médula ósea de ratones hembras, cajas bacteriológicas de Thermo Fisher de 100 mm x 20 mm, medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y 20 ng/ml de rmGM-CSF o 15-20% de sobrenadante de células CHO productoras de mGM-CSF (dependiendo del lote de producción) y sin adicionar IL-4. El análisis y cuantificación de CDs se llevó a cabo por citometría de flujo, tomando como marcador de estirpe celular la molécula CD11c y como marcador de activación la molécula MHC II (Tabla 2).

| | Variaciones | % CD11c ⁺ | %MHC II ⁺ |
|---------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| Género | Hembras | 33.15 | 6.76 |
| | Machos | 11.7 | 5.8 |
| Cajas | Fisher | 42.42 | 12.7 |
| | Caja1 | 21.2 | 9.36 |
| | Caja2 | 11.14 | 4.87 |
| Suero | SFB | 42.42 | 12.7 |
| | SNT | 24.47 | 6.39 |
| | SNB | 11.7 | 5.8 |
| IL-4 | Sin IL-4 | 38.56 | 5.155 |
| | Con IL-4 | 36.81 | 25.99 |
| | Hembras, Fisher, SFB, sin IL-4 | 46.5 | 26 |

Tabla 2. Estandarización del método de cultivo de las CDs. Los resultados se reflejan como el porcentaje de células que expresan los marcadores CD11c y MHC II. Cajas 1 y 2 se refieren a cajas bacteriológicas diferentes a la marca Thermo Fisher. SFB: suero fetal bovino. SNT: suero neonato de ternera. SNB: suero neonato de bovino. IL-4: interleucina 4.

Como se puede ver una proporción de las células diferenciadas a partir de precursores de la médula no muestra el marcador de estirpe CD11c, a pesar de no ser adherentes, y de ser morfológicamente semejantes a las células CD11c⁺. En los estudios que describiremos a continuación se hará referencia a CDs CD11c⁺ y a células totales, grupo que incluye las CDs CD11c⁺.

8.6. Las CDs fagocitan CAp.

Se consideró importante analizar la capacidad de las CDs para fagocitar cuerpos apoptóticos cargados con antígenos micobacterianos ya que puede influir en su potencial de activación y presentación de antígeno a linfocitos T. Se ha observado que CDs que fagocitan cuerpos apoptóticos que incorporan antígenos de parásitos, bacterias y virus inducen una respuesta inmune protectora (123, 179-183).

Los ensayos de fagocitosis se llevaron a cabo de dos maneras. En la primera, a los 7 días de cultivo se marcaron las CDs totales con el fluorocromo vital PHK67 (excitación 490 nm, emisión 502 nm) y se incubaron con cuerpos apoptóticos, los que fueron marcados antes de la inducción de apoptosis con PKH26 (excitación 551 nm, emisión 567 nm). Las células se incubaron con los cuerpos apoptóticos (CAp) por 0.5, 1, 4 y 24 h. Además se hicieron ensayos de fagocitosis con cuerpos apoptóticos inducidos con luz ultravioleta (CAp-UV) esto con el fin de comparar el efecto de CAp que contienen componentes

micobacterianos con otros que no los contienen. El análisis de la fagocitosis por FACS (Fig. 9) mostró que la fagocitosis de CAP era tiempo-dependiente siendo mayor a las 24 h (50%). El índice medio de fluorescencia (IMF) siguió un curso semejante. La fagocitosis de CAP inducidos con luz ultravioleta fue semejante en curso y magnitud con una tendencia a ser menor.

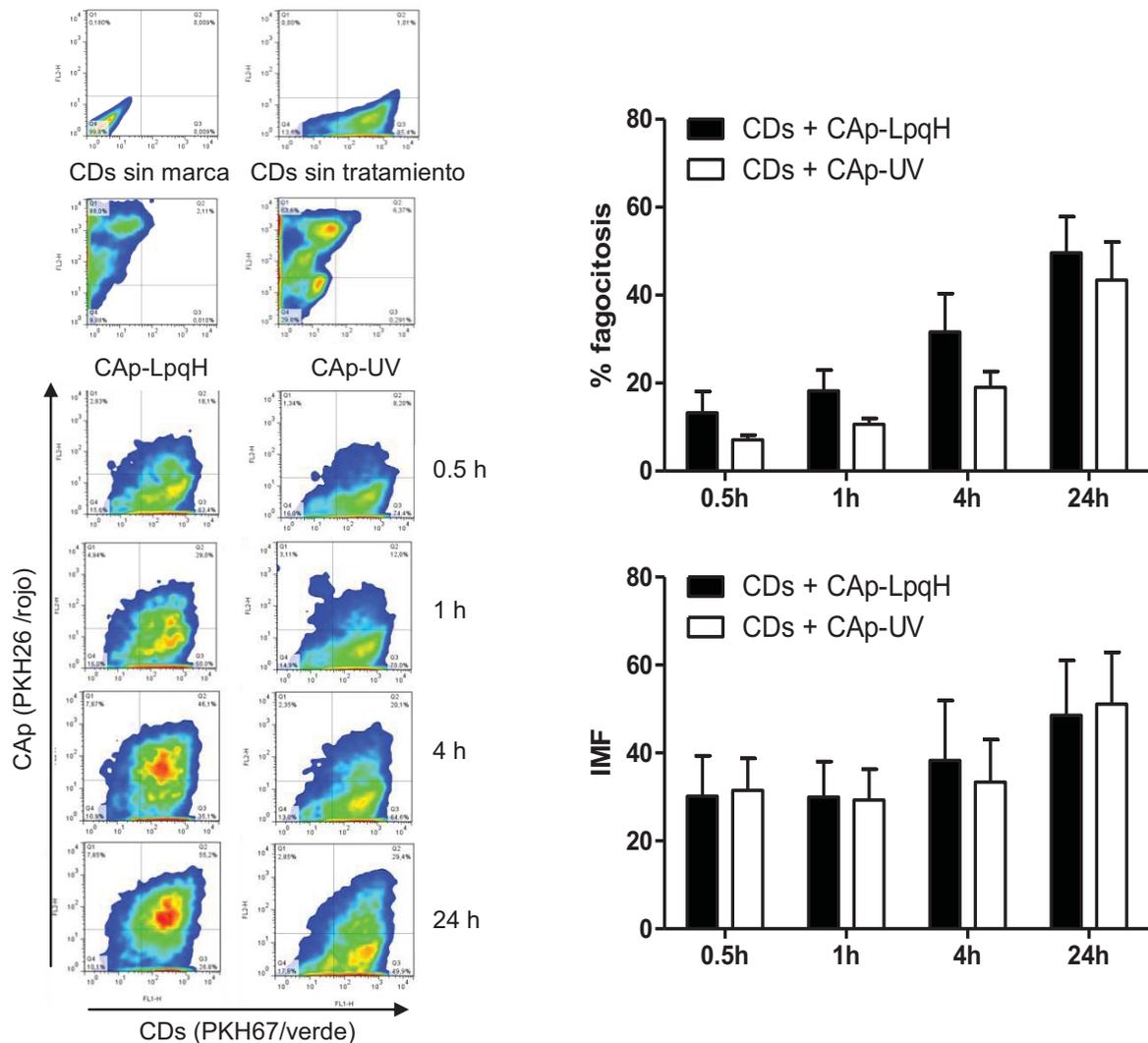


Figura 9. Las CDs derivadas de ratones Balb/cJ fagocitan cuerpos apoptóticos (CAP). Análisis por FACS. Los dot plots son representativos de tres experimentos; en el eje X se presentan las CDs, y en el eje Y los CAP. Los histogramas muestran el porcentaje de células que fagocitaron y el índice medio de fluorescencia (IMF) en los diferentes tiempos de incubación. Las barras negras indican la fagocitosis de CAP inducidos con Msmeg-LpqH y las blancas los inducidos con luz ultravioleta (CAP-UV). Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes.

El análisis por microscopía de epifluorescencia corroboró los hallazgos anteriores. Después del FACS se hicieron centrifugaciones sobre portaobjetos, los cuales fueron analizadas por epifluorescencia y confocal. Al igual que el análisis por FACS, la inmunofluorescencia mostró un incremento de la fagocitosis tiempo-dependiente siendo la fagocitosis de CAp inducidos con MsmegLpqH más intensa a las 24 h (73%). La fagocitosis de CAp inducidos con luz ultravioleta fue menor en todos los tiempos (Fig. 10).

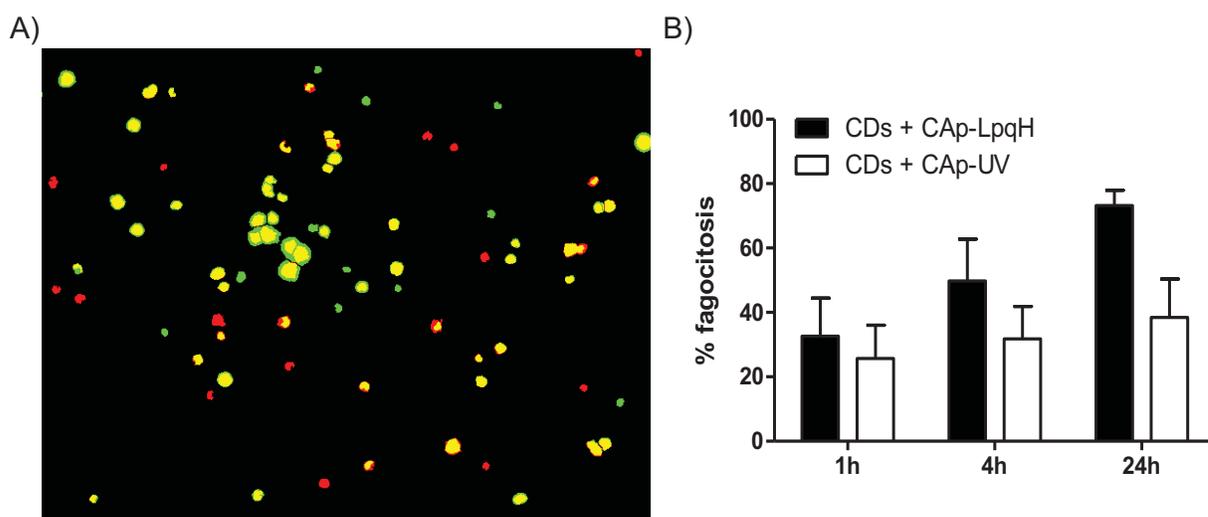


Figura 10. Análisis por microscopía de epifluorescencia de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (CAp) por CDs totales. A) Fagocitosis a las 24h de incubación, original x 20. Las CDs están marcadas con PKH67 (verde) y los CAp con PKH-26 (rojo). Las células que fagocitaron emiten una señal amarilla que resulta de la colocalización de los marcadores mencionados. B) La gráfica muestra el porcentaje de células que fagocitaron en los diferentes tiempos de incubación. Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes.

El análisis por microscopía confocal que incluyó numerosas células analizadas en el plano ecuatorial, permitió constatar la localización subcelular de los CAp. En las células incubadas por 1 o 4h, fue frecuente observar CAp pequeños PKH67 positivos adheridos a la membrana plasmática (Fig. 11A). En

cambio a las 24 h, los CAp fueron generalmente observados al interior de la células, demostrado esto por la colocación de las señales emitidas por PKH67 y PKH26, lo que genera CAp con fluorescencia amarilla (Fig. 11B).

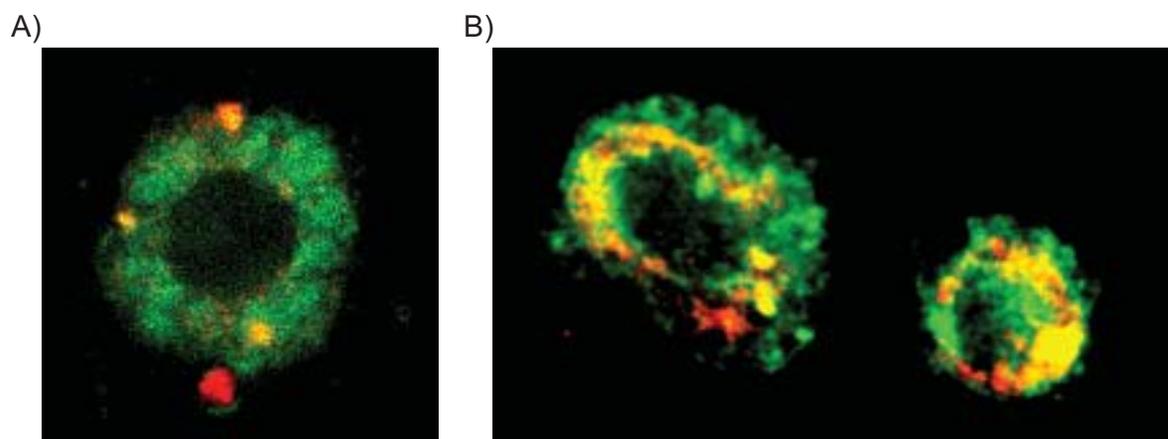


Figura 11. Las CDs fagocitan cuerpos apoptóticos (CAp). Análisis por microscopía confocal. A) Fagocitosis a las 4h de incubación, original x 60. B) Fagocitosis a las 24h de incubación, original x 60. Las CDs están marcadas con PKH67-verde, los CAp con PKH26-rojo, y los CAp fagocitados en amarillo.

Ya que en los cultivos de médula ósea, para diferenciar CDs suplementados con GM-CSF pueden observarse otras células de estirpe mieloide, se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis en los cuales se cuantificó la fagocitosis por CDs $CD11c^+$. En estos ensayos antes de la inducción de apoptosis se marcaron los MØs con el colorante vital CFSE (verde) y posterior a la incubación con CAp las CDs se fijaron, y se incubaron con un AcMn en contra del marcador de estirpe para células dendríticas $CD11c$ marcado con PerCp-Cy5.5. El análisis se llevó a cabo por microscopía de epifluorescencia, observándose que la fagocitosis de CAp inducidos por Msmeg-LpqH es muy intensa desde la primera hora, alcanzando su mayor nivel a las 4h (90.4%). Estos resultados muestran que la magnitud de la fagocitosis por CDs $CD11c^+$ es mayor que la observada en ensayos utilizando células totales (Fig. 12).

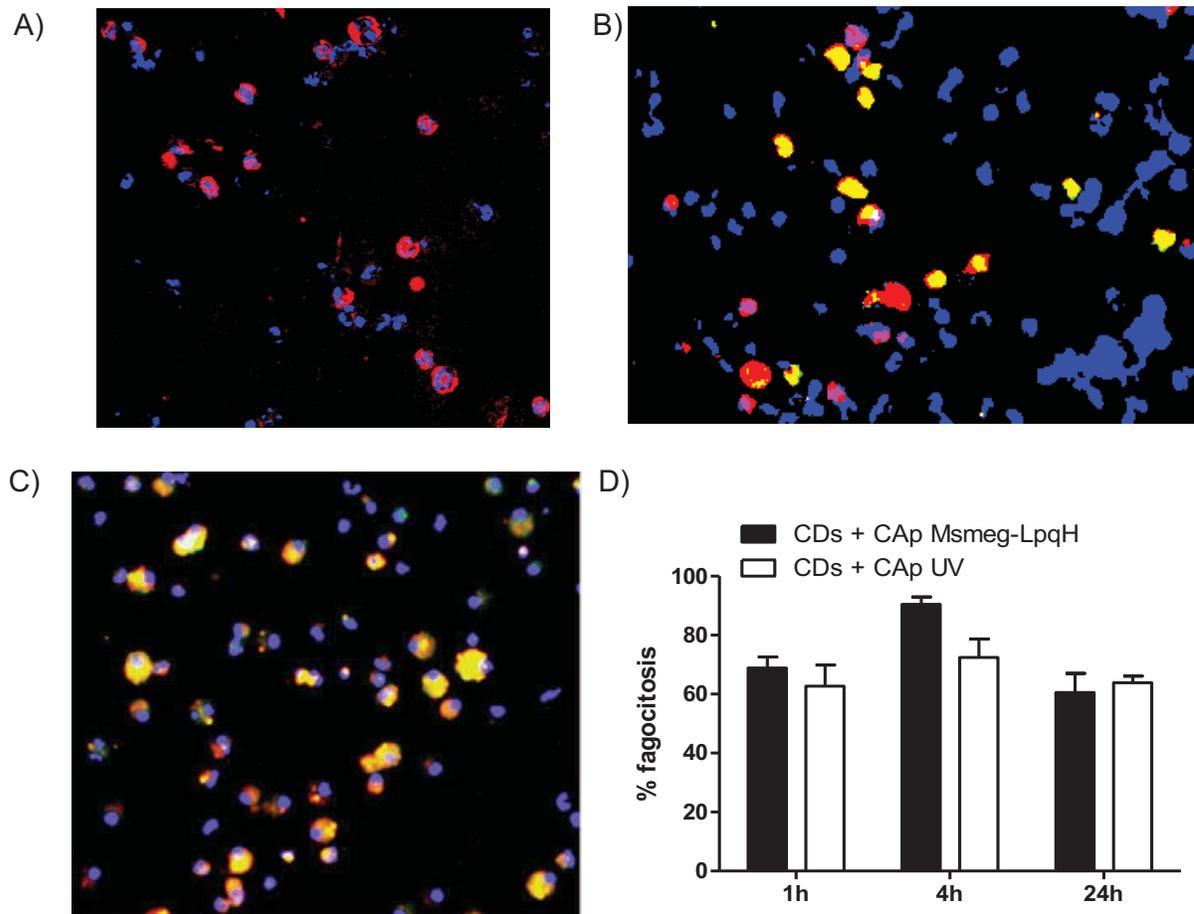


Figura 12. La población de CDs CD11c⁺ fagocita cuerpos apoptóticos (CAp) en mayor medida que las Células Totales. Análisis por microscopía de epifluorescencia. A) CDs sin tratamiento marcadas con el AcMn anti-CD11c (PerCp-Cy5.5), original x 20. B) Fagocitosis de CAp marcados con CFSE (verde) a la hora de incubación, original x 20. C) Fagocitosis de CAp a las 4h de incubación, original x 20. CAp incorporados en las CDs en amarillo por la colocalización del CFSE y del AcMn anti-CD11c (PerCp-Cy5.5). Los núcleos de las células fagocíticas están marcados con DAPI en azul. D) El histograma muestra el promedio \pm ES de tres experimentos independientes.

8.7. La fagocitosis de MØs apoptóticos induce la maduración de CDs y la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

El objetivo principal de esta investigación es el desarrollo de esquemas de activación de CDs con cuerpos apoptóticos de macrófagos inducidos en apoptosis con una lipoproteína de Mtb reconocida por su gran capacidad apoptogénica (141-143). Desde luego, este estudio incluye la caracterización del fenotipo de maduración y de la capacidad de las CDs maduras para inducir una respuesta específica de linfocitos T. Después de establecer las condiciones óptimas para la obtención de CDs a partir de precursores de la médula ósea de ratones Balb/cJ (Tabla 2) se llevaron a cabo los ensayos para inducir su maduración como se detalla en Materiales y Métodos. Se trataron las células con 50 µg de CAp-LpqH, 5 ug de la pared de MsmegLpqH, 50 ug de CAp-UV y con 1 µg/ml de LPS como control positivo de maduración, el cual es reconocido por TLR-4 activando NF-kB, MAPK, SAPK y p38, incrementando las moléculas de presentación de antígeno y de coestimulación, así como la producción de citocinas proinflamatorias (184). El fenotipo de maduración se analizó por FACS con AcMn en contra de las moléculas de presentación de antígeno MHCI y MHCII y las moléculas de coestimulación CD40, CD80 y CD86. En experimentos independientes se examinaron las respuestas de Células Totales, definidas como el total de las no adherentes en el cultivo y las células CD11c⁺ incluidas en el grupo anterior. Los parámetros analizados fueron porcentaje de células marcadas, índice medio de fluorescencia y porcentaje de células con fluorescencia alta. El porcentaje se establece detectando las células que presentan las moléculas de superficie correspondientes. El índice medio de fluorescencia (IMF) se refiere a la media de la fluorescencia emitida por la población analizada. En la fluorescencia alta se incluyen eventos con fluorescencia mayor que la emitida por las células sin tratamiento (sub-población HF). En las Figs. 13 y 14 se muestran los resultados del análisis de las moléculas de presentación de antígeno. En cuanto a MHCI, no hubo diferencias significativas con todos los tratamientos en lo que concierne a porcentaje, IMF y fluorescencia alta (HF). En lo que corresponde a la expresión de las moléculas

MHCII se notó una tendencia al incremento en células tratadas con CAp-LpqH, mayor que la observada con LPS y Msmeg-LpqH, tanto en Células Totales como en células CD11c⁺. Hay que hacer notar que la expresión de MHCI y MHCII inducida por los CAp-LpqH fue semejante o mayor a lo observado con LPS y con las paredes de la cepa de *M. smegmatis* con la que se indujo la apoptosis, la cual como se ha mostrado antes contiene LpqH en abundancia. Estos datos sugieren que son los cuerpos apoptóticos los responsables de los cambios descritos. Hay que hacer notar que los CAp-UV tuvieron poco o ningún efecto en la expresión de las moléculas de presentación de antígeno analizadas.

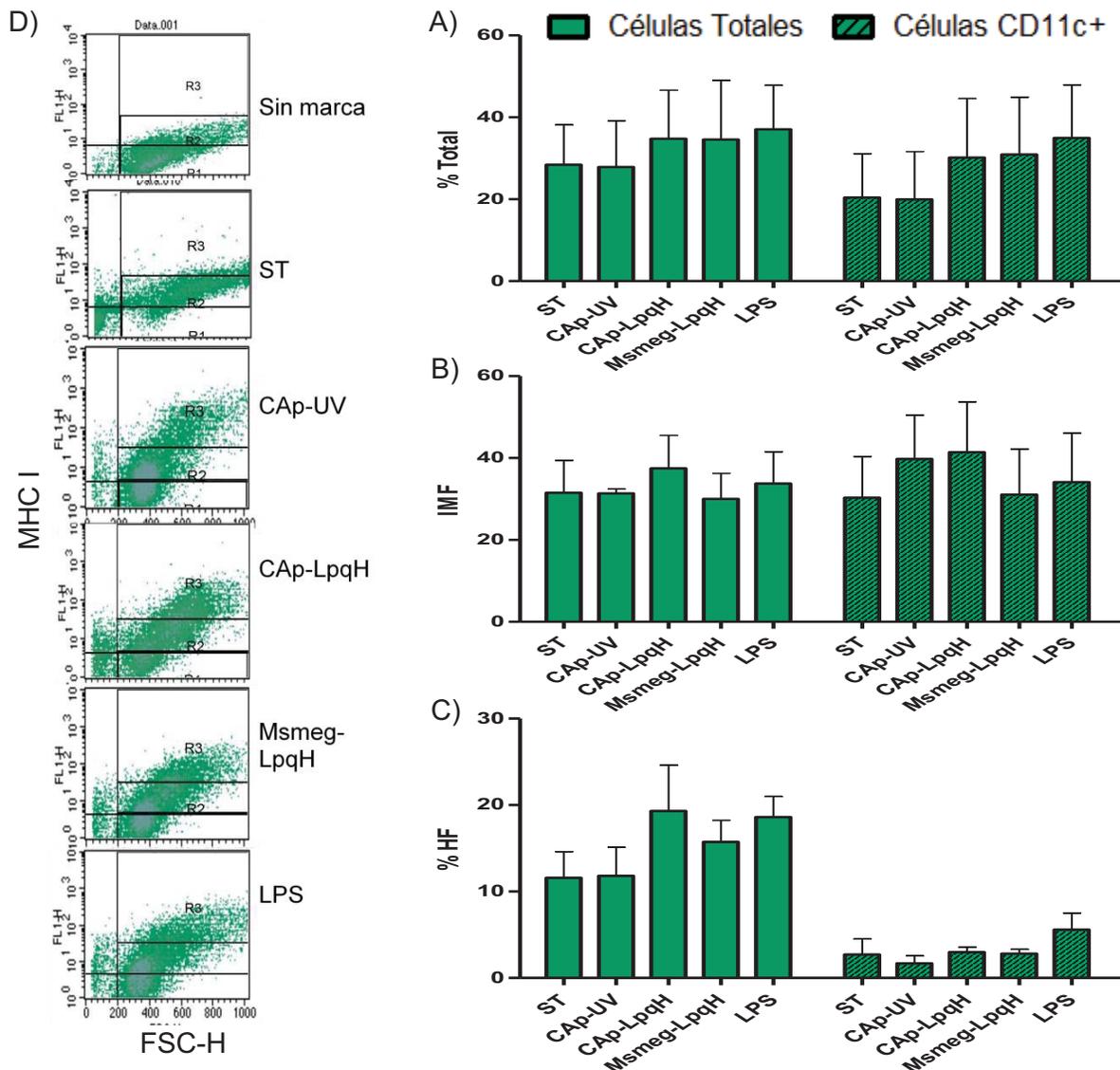


Figura 13. La expresión de MHC I no se incrementa significativamente con los diversos tratamientos. A la izquierda se muestra el análisis por FACS de las Células Totales y a la derecha el de las Células CD11c⁺. Las CDs fueron tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH), *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH) y como control positivo lipopolisacárido (LPS). A) Porcentaje total de células que presentan la molécula en su superficie. B) Datos expresados como el índice medio de fluorescencia (IMF). C) Porcentaje de células con alta densidad de moléculas MHC I presentes en su superficie (HF). D) Dot plots para indicar como se estableció la región HF. Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs células sin tratamiento (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

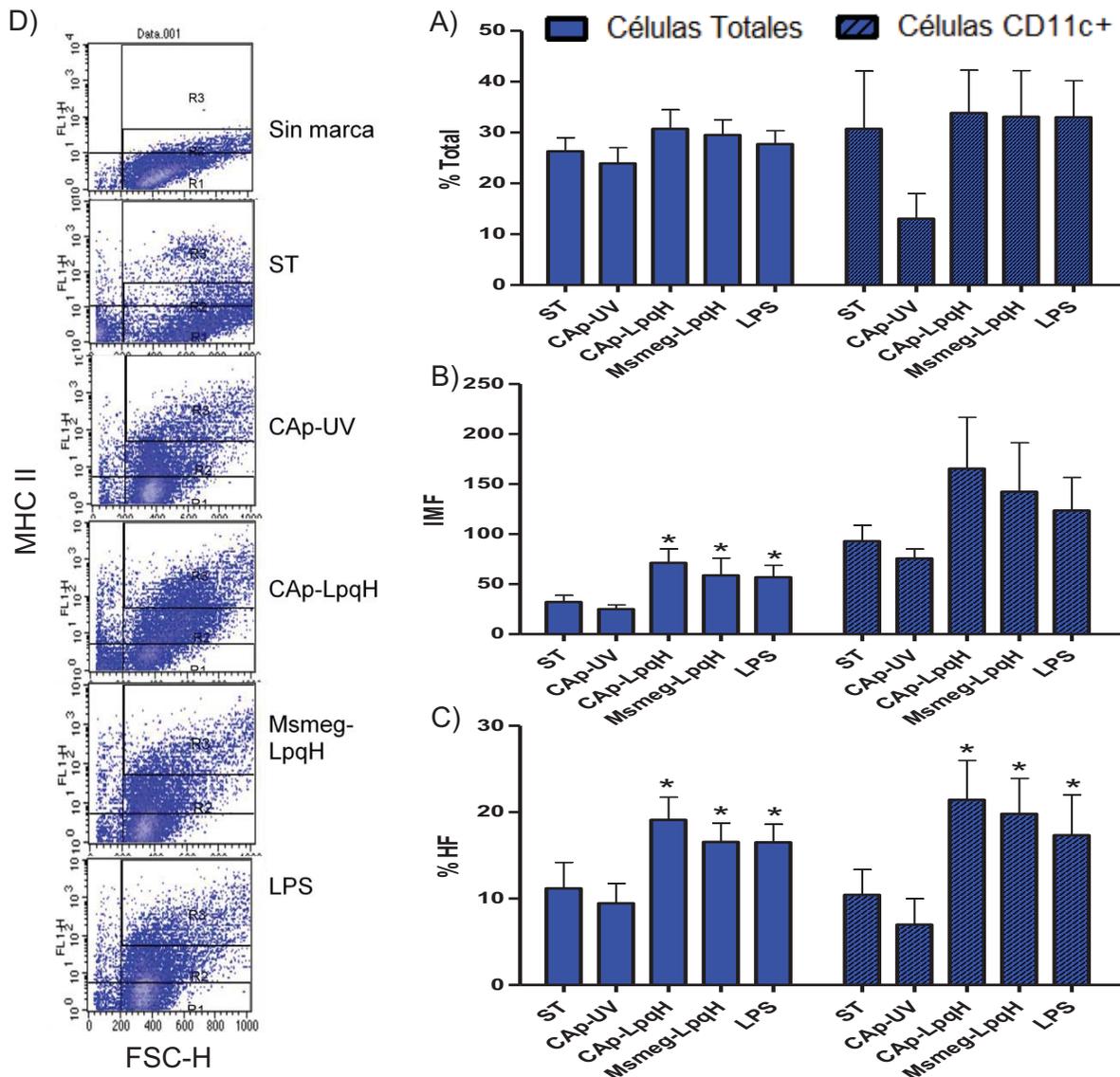


Figura 14. Los cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH) incrementan la expresión de la molécula MHC II. A la izquierda se muestra el análisis por FACS de las Células Totales y a la derecha el de las Células CD11c⁺. Las CDs fueron tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH), *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH) y como control positivo lipopolisacárido (LPS). A) Porcentaje total de células que presentan la molécula en su superficie. B) Datos expresados como el índice medio de fluorescencia (IMF). C) Porcentaje de células con alta densidad de moléculas MHC II presentes en su superficie (HF). D) Dot plots para indicar como se estableció la región HF. Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs células sin tratamiento (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

Los resultados de las moléculas de coestimulación CD40, CD80 y CD86 se muestran en las Figs. 15-17. El análisis por FACS de la expresión de la molécula de coestimulación CD40 mostró que a excepción de los cuerpos apoptóticos inducidos con UV, de manera semejante los otros tres tratamientos (LPS, Msmeg-LpqH y CAp-LpqH) resultaron en un incremento marcado, tanto en las Células Totales como en las CD11c⁺. Lo anterior en el porcentaje, IMF y células HF. En cuanto a CD80, su expresión en relación a la basal se incrementó notablemente al tratar las CDs con los CAp-LpqH; este incremento fue semejante al observado con LPS y con la pared de Msmeg-LpqH, esto ocurrió tanto en la Células Totales como en la población CD11c⁺. La otra molécula de coestimulación estudiada CD86 mostró un comportamiento semejante al ya mencionado para la molécula CD80. Nuevamente hay que hacer notar que los cuerpos apoptóticos inducidos con luz ultravioleta (CAp-UV) tienen prácticamente un efecto nulo en la inducción de las moléculas coestimuladoras.

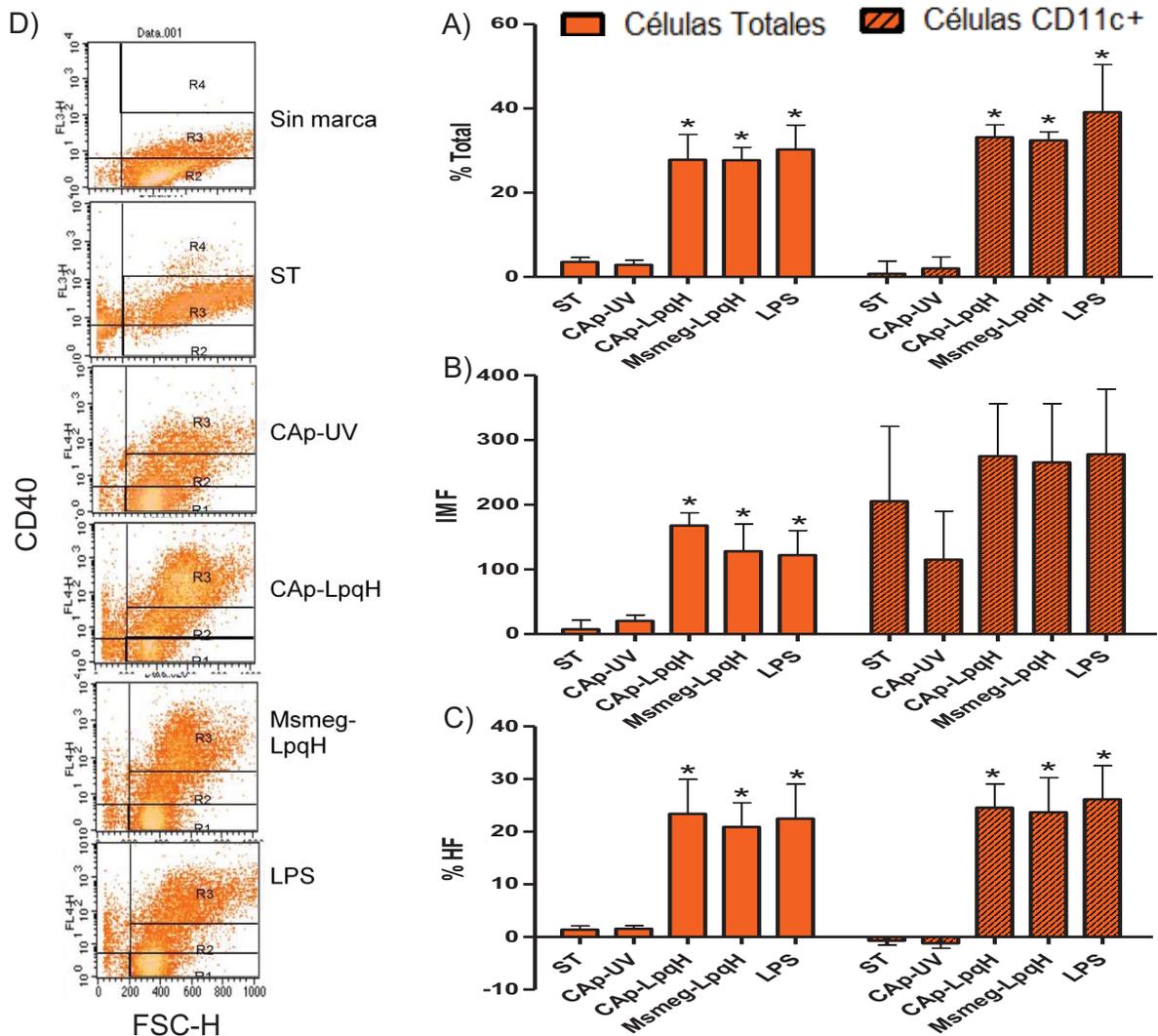


Figura 15. Los cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH) incrementan la expresión de la molécula de coestimulación CD40. A la izquierda se muestra el análisis por FACS de las Células Totales y a la derecha el de las Células CD11c⁺. Las CDs fueron tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH), *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH) y como control positivo lipopolisacárido (LPS). A) Porcentaje total de células que presentan la molécula en su superficie. B) Datos expresados como el índice medio de fluorescencia (IMF). C) Porcentaje de células con alta densidad de moléculas CD40 presentes en su superficie (HF). D) Dot plots para indicar como se estableció la región HF. Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs células sin tratamiento (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

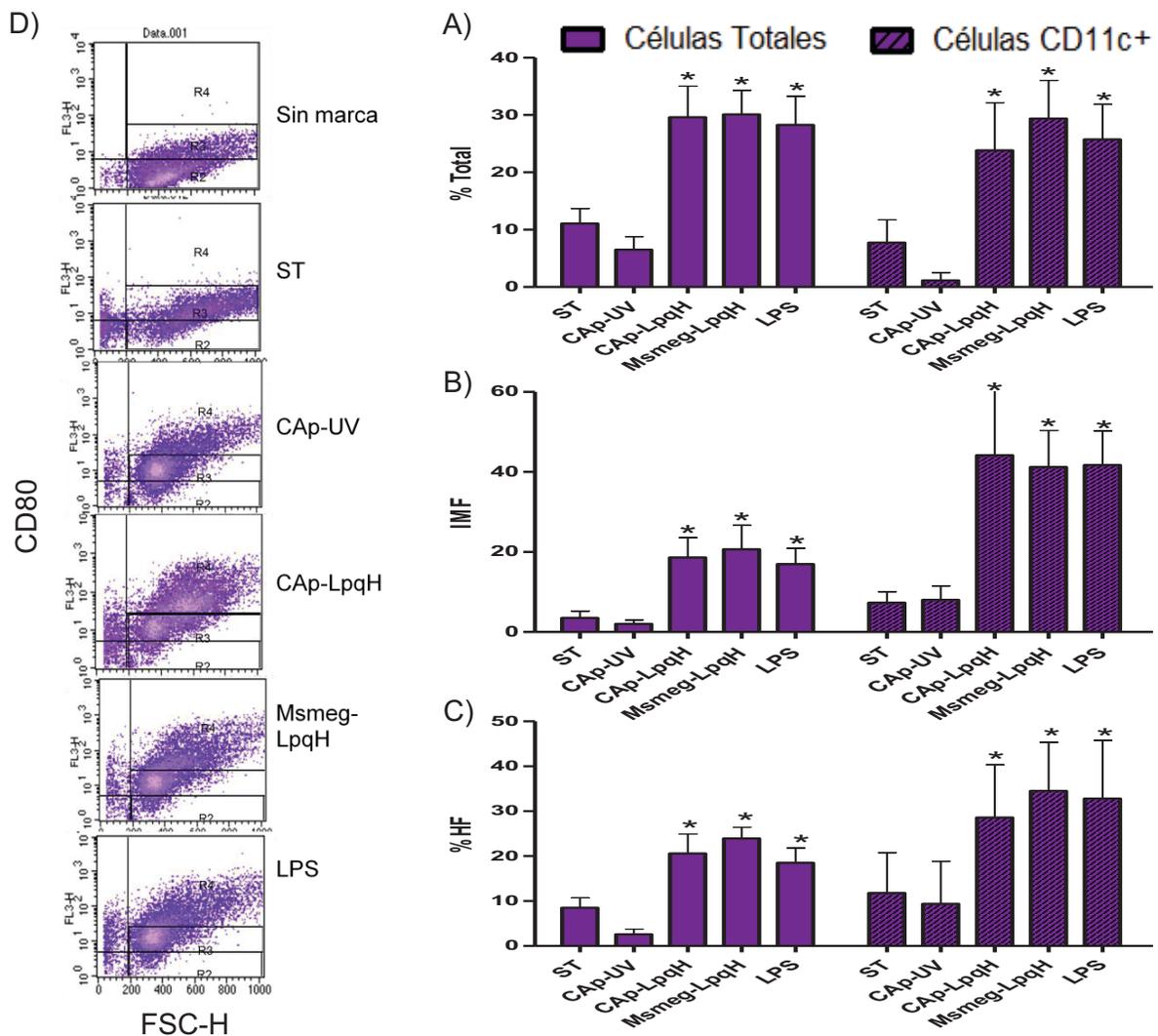


Figura 16. Los cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH) incrementan la expresión de la molécula de coestimulación CD80. A la izquierda se muestra el análisis por FACS de las Células Totales y a la derecha el de las Células CD11c⁺. Las CDs fueron tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH), *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH) y como control positivo lipopolisacárido (LPS). A) Porcentaje total de células que presentan la molécula en su superficie. B) Datos expresados como el índice medio de fluorescencia (IMF). C) Porcentaje de células con alta densidad de moléculas CD80 presentes en su superficie (HF). D) Dot plots para indicar como se estableció la región HF. Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs células sin tratamiento (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

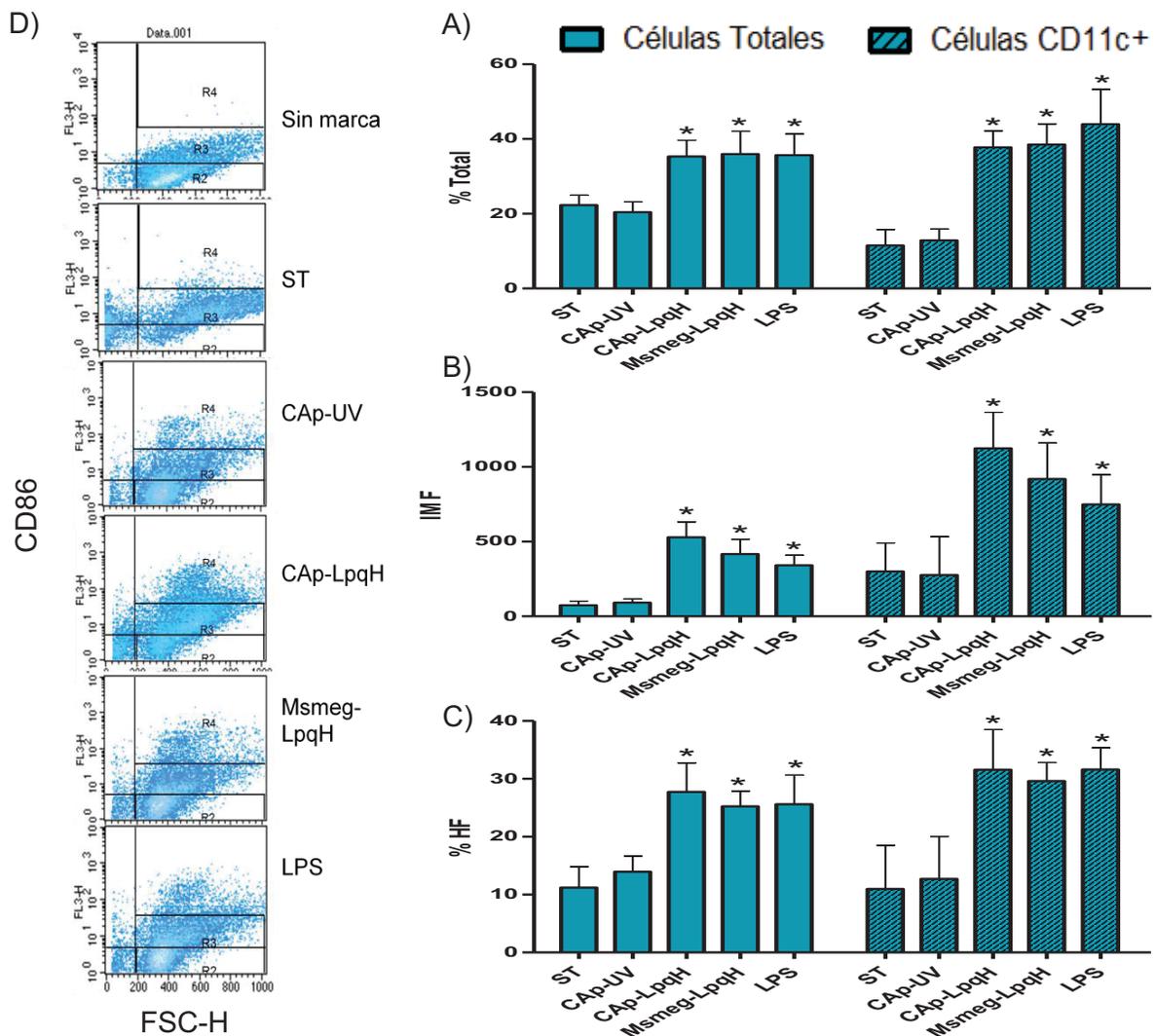


Figura 17. Los cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH) incrementan la expresión de la molécula de coestimulación CD86. A la izquierda se muestra el análisis por FACS de las Células Totales y a la derecha el de las Células CD11c⁺. Las CDs fueron tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH), *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH) y como control positivo lipopolisacárido (LPS). A) Porcentaje total de células que presentan la molécula en su superficie. B) Datos expresados como el índice medio de fluorescencia (IMF). C) Porcentaje de células con alta densidad de moléculas CD86 presentes en su superficie (HF). D) Dot plots para indicar como se estableció la región HF. Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs células sin tratamiento (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

8.8. Producción de citocinas por CD4s activadas con MØs apoptóticos.

La respuesta inmune requiere de mecanismos autócrinos y parácrinos que regulen la función celular para el control de las infecciones. Algunos de estos mecanismos son las citocinas, dentro de las cuales se encuentran aquellas que poseen funciones anti-inflamatorias y aquellas que se ocupan de promover una respuesta pro-inflamatoria (2). Entre las citocinas anti-inflamatorias, se encuentran la interleucina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); una característica de éstas citocinas es que tienen la capacidad de inhibir las respuestas T (2, 33), por ello es importante analizar su producción por las células presentadoras de antígeno; así mismo, también resulta interesante estudiar la producción de citocinas pro-inflamatorias, como la interleucina-12 (IL-12) y el factor de necrosis tumoral (TNF), pues son citocinas que promueven una respuesta celular y que ayudan en el control de la enfermedad de la tuberculosis (20, 29).

En este estudio se analizó la producción de citocinas por las CD4s que fueron estimuladas con CAp-LpqH, pared de Msmeg-LpqH, CAp-UV, LPS y en estos ensayos se consideró conveniente utilizar la pared de *M. smegmatis* nativa (Msmeg-N) y cuerpos apoptóticos inducidos por ésta (CAp-N), pues para los siguientes experimentos de proliferación de células T también fungen como controles. La producción de citocinas intracelulares se determinó por FACS con AcMn en contra de IL-10, TGF- β , TNF e IL-12. Los resultados presentados como porcentaje total de células productoras e IMF, muestran que no hay diferencias significativas en cuanto a la producción de citocinas anti-inflamatorias en ninguna de las condiciones utilizadas (Fig. 18).

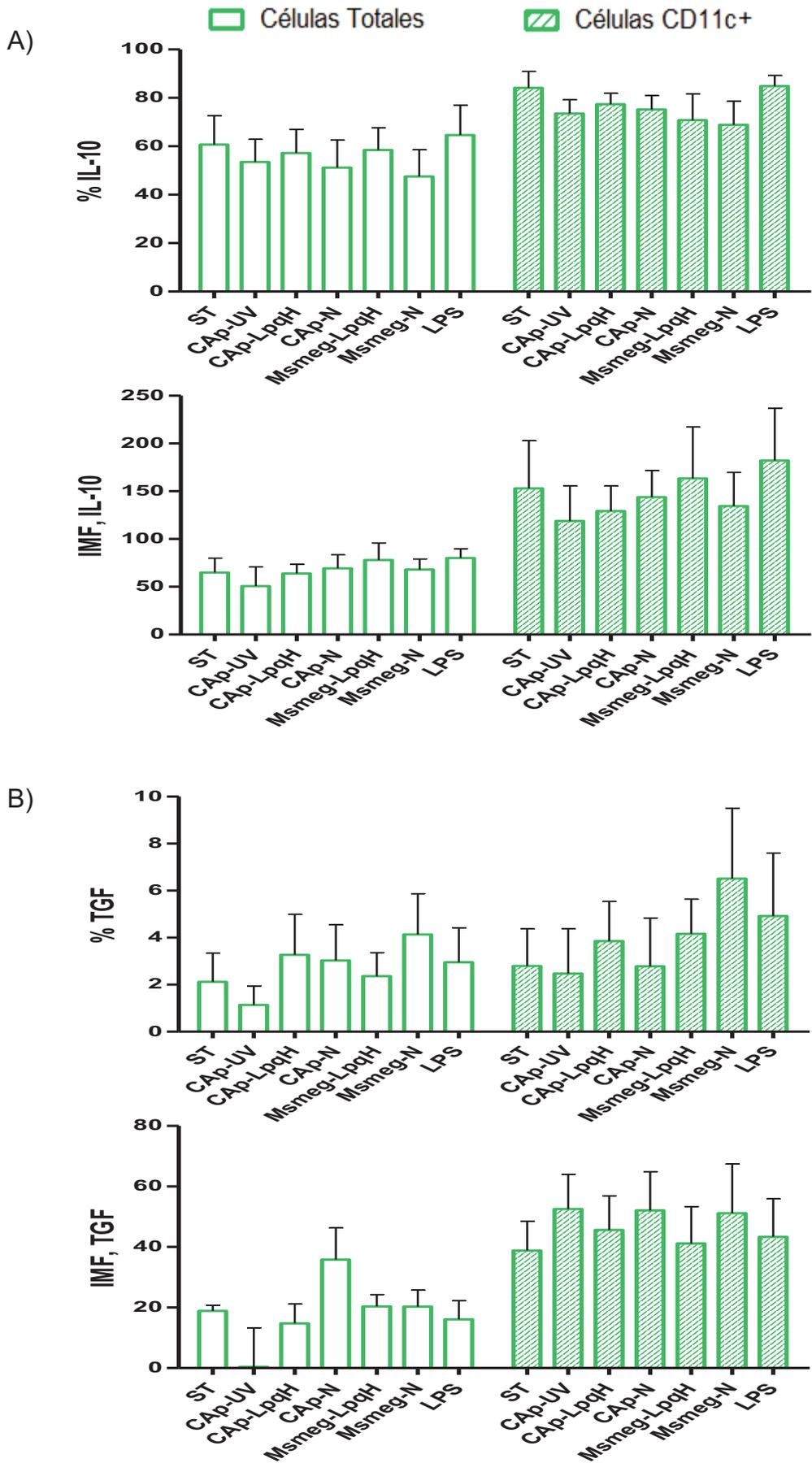


Figura 18. La producción de citocinas anti-inflamatorias por las CDs no se incrementa significativamente con los diversos tratamientos. Análisis por FACS. Los valores se presentan en porcentaje e IMF. A la izquierda se muestra el análisis de las Células Totales y a la derecha el de las Células CD11c⁺. Las CDs fueron tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-N (CAp-N), *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH), *M. smegmatis* nativa (Msmeg-N) y como control positivo lipopolisacárido (LPS). A) Citocina IL-10. B) Citocina TGF- β . Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs células sin tratamiento (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

Por otro lado, la citocina pro-inflamatoria TNF sí muestra diferencias respecto al porcentaje de células que la producen, tanto en las Células Totales como en las Células CD11c⁺. Las células que promueven un incremento mayor son las tratadas con Msmeg-LpqH y Msmeg-N. De igual manera, los cuerpos apoptóticos inducidos por las paredes micobacterianas (CAp-LpqH y CAp-N) mostraron incremento en la expresión de dicha citocina. En el caso de la citocina IL-12 los resultados de ambas poblaciones (Total y CD11c⁺) muestran comportamiento similar al del TNF; es decir, las células activadas con las paredes micobacterianas muestran mayor producción de citocina, seguidas por las activadas por cuerpos apoptóticos que incorporaron antígenos micobacterianos, mientras que los cuerpos apoptóticos inducidos con luz UV no estimulan la producción de citocinas inflamatorias (Fig. 19).

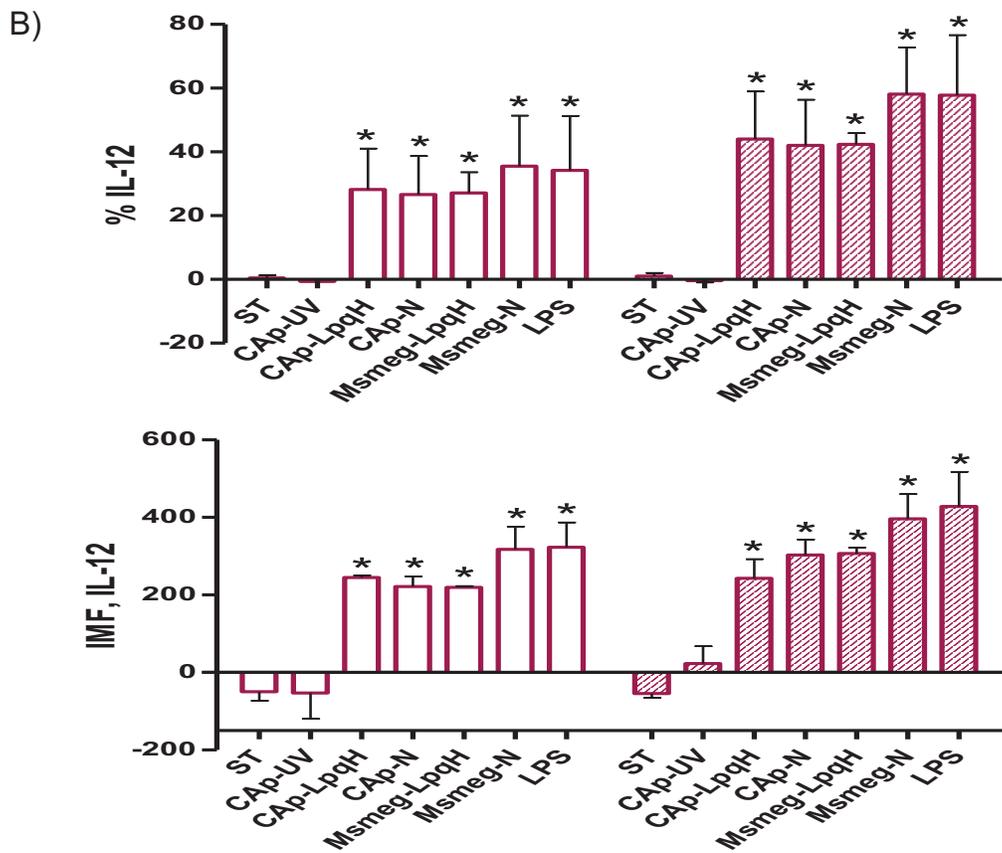
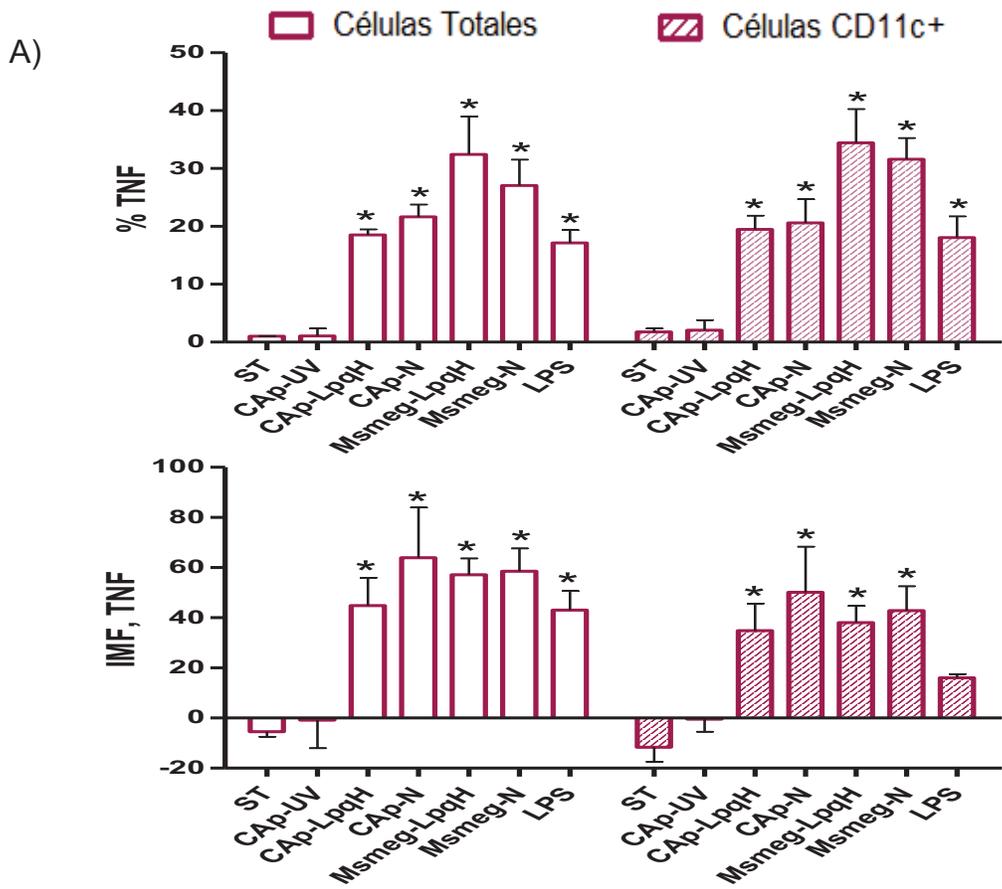


Figura 19. Los cuerpos apoptóticos inducidos con la pared de Msmeg-LpqH (CAp-LpqH) inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias. Análisis por FACS. Los valores se presentan en porcentaje e IMF. A la izquierda se muestra el análisis de las Células Totales y a la derecha el de las Células CD11c⁺. Las CDs fueron tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CAp-LpqH), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-N (CAp-N), *M. smegmatis* transformada (Msmeg-LpqH), *M. smegmatis* nativa (Msmeg-N) y como control positivo lipopolisacárido (LPS). A) Citocina TNF. B) Citocina IL-12. Los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs células sin tratamiento (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

8.9. Proliferación de linfocitos T incubados con CDs activadas con CAp.

Finalmente, se estudió si las CDs que han fagocitado los cuerpos apoptóticos de MØs muertos por apoptosis inducida con proteínas micobacterianas, estimulan la proliferación de linfocitos T que pudieran ser capaces inducir una respuesta inmunoprotectora. Para realizar estos experimentos se obtuvieron los linfocitos T de bazo de ratones BALB/cJ previamente inmunizados con PBS (como control negativo), con paredes de Msmeg-N y Msmeg-LpqH. Además como control positivo de proliferación se incubó con AcMn anti-CD3 y anti CD-28 y como control negativo se dejaron linfocitos sin estímulo. Las CDs se coincubaron con los linfocitos T que fueron purificados por "cell sorting" con el AcMn anti-Thy. Después de 72 h las células se marcaron con anti-CD4 y anti-CD8 para su análisis por FACS.

Los resultados se muestran en la Fig. 20. Con excepción de la incubación con los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 ninguno de los otros tratamientos indujo la proliferación de linfocitos CD8⁺. Esta observación está de acuerdo con el hecho de que ninguno de los tratamientos indujo un aumento en la expresión de MHC I.

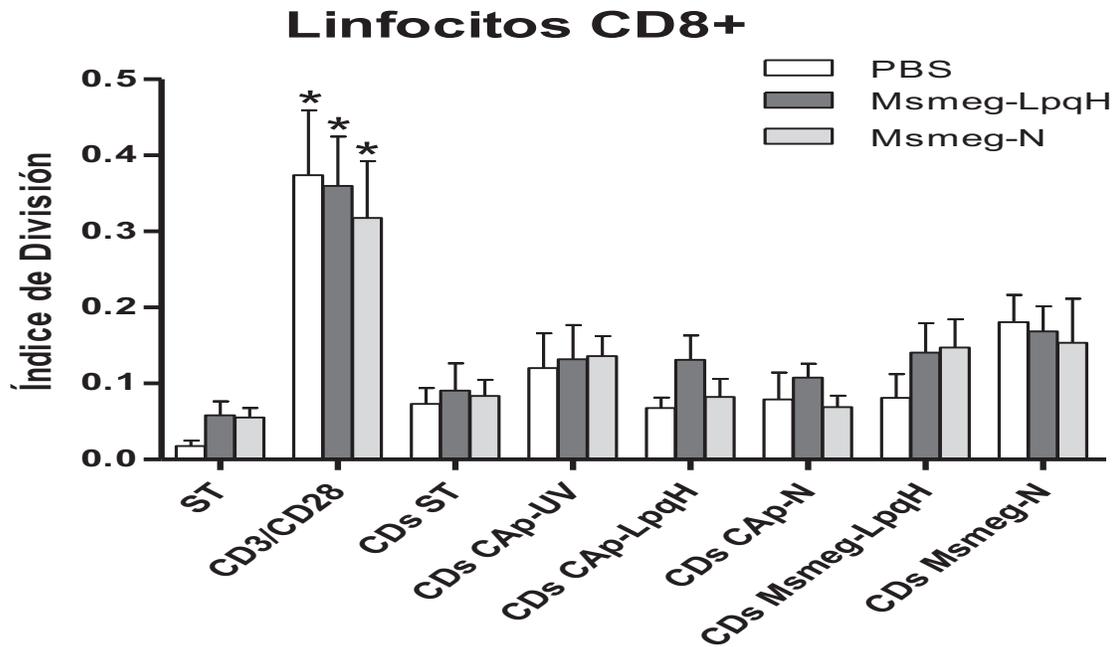


Figura 20. Análisis por FACS de la proliferación de linfocitos CD8⁺. Los linfocitos purificados fueron co-incubados con CDs tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CDs CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CDs CAp-LpqH), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-N (CDs CAp-N), *M. smegmatis* transformada (CDs Msmeg-LpqH) y *M. smegmatis* nativa (CDs Msmeg-N); así como con CDs que no tuvieron tratamiento (CDs ST). Como control positivo de proliferación, las células T se incubaron con los AcMn α -CD3 y α -CD28. Los datos están expresados como el índice de división (ID), y los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs el grupo de linfocitos sin tratamiento correspondiente (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

En cuanto a las células T CD4⁺, interesantemente sólo proliferaron los linfocitos de ratones que previamente fueron inmunizados con la pared micobacteriana que sobreexpresa la lipoproteína LpqH, exceptuando el caso del control positivo de proliferación (incubación con AcMn antiCD3/anti-CD28). La expansión más significativa fue la de los linfocitos incubados con CDs cargadas con los macrófagos apoptóticos que contienen antígenos de la cepa transformada que sobreexpresa la lipoproteína apoptogénica LpqH (CAp-LpqH). Un efecto

similar se observó cuando se usaron CDs activadas con las paredes de la cepa transformada (Msmeg-LpqH) y de la cepa nativa (Msmeg-N).

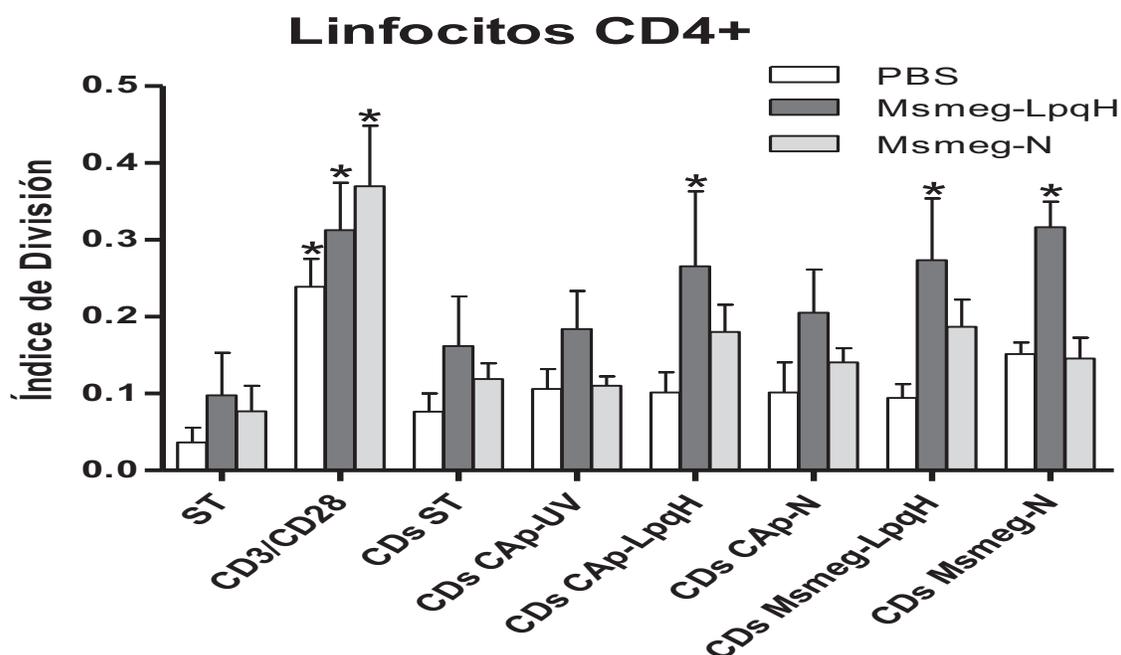


Figura 21. Análisis por FACS de la proliferación de linfocitos CD4⁺. Los linfocitos purificados fueron co-incubados con CDs tratadas con: cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV (CDs CAp-UV), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH (CDs CAp-LpqH), cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-N (CDs CAp-N), *M. smegmatis* transformada (CDs Msmeg-LpqH) y *M. smegmatis* nativa (CDs Msmeg-N); así como con CDs que no tuvieron tratamiento (CDs ST). Como control positivo de proliferación, las células T se incubaron con los AcMn α -CD3 y α -CD28. Los datos están expresados como el índice de división (ID), y los resultados representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs el grupo de linfocitos sin tratamiento correspondiente (ST) (ANOVA de una vía, diseño en bloques).

9. DISCUSIÓN

Las CD8 son un grupo heterogéneo de células que muestran diferencias en localización anatómica, fenotipo de superficie celular y función (152); y aunque en ratones no existen los mismos subtipos que en los humanos (147, 153), las CD8 murinas proveen un modelo apropiado para el estudio de la función de las CD8 humanas en muchos casos. De la misma manera que las CD8 humanas, las CD8 murinas se originan de células madre de médula ósea CD34⁺, se encuentran en la sangre y en tejidos, son capaces de tomar y degradar antígeno en péptidos antigénicos, expresan moléculas MHC para presentar antígenos, expresan moléculas de coestimulación y son perceptivas al microambiente con una controlada producción de quimiocinas y citocinas (152). Por lo tanto en este trabajo se utilizaron células murinas como modelo de estudio para entender de mejor manera la interacción de las CD8 con antígenos micobacterianos, lo cual permitirá en un futuro el desarrollo de protocolos de terapia adyuvante para pacientes con tuberculosis basados en CD8 activadas *ex vivo* con paredes micobacterianas y/o con macrófagos apoptóticos inducidos con proteínas micobacterianas.

A partir de los estudios de Albert *et al.* (185), se han hecho múltiples investigaciones con fines terapéuticos. En dichos trabajos, CD8 diferenciadas de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con una variedad de tumores malignos son maduradas *ex vivo*. La maduración se ha inducido de diversas maneras, una de ellas con células neoplásicas apoptóticas autólogas (186). En nuestra revisión de la literatura sólo hemos encontrado un estudio previo dirigido a inducir la maduración de CD8 con cuerpos apoptóticos inducidos por el bacilo de la tuberculosis (187). Sin embargo, se ha demostrado que la inmunización de ratones con vesículas apoptóticas (blebs) de células inducidas a la apoptosis con una cepa recombinante de *M. bovis*/BCG desencadenan una respuesta anti-micobacteriana específica de linfocitos CD8 citotóxicos (124). Hay que señalar sin embargo, estudios en los cuales se ha intentado con resultados poco alentadores activar CD8 *ex vivo* con antígenos micobacterianos diversos incluyendo paredes micobacterianas y antígenos individuales (188). Así mismo se

han ensayado CDs genéticamente modificadas que producen el antígeno inmunoprotector A85 (189).

En este estudio se diferenciaron CDs a partir de precursores de la médula ósea de ratones Balb/cJ utilizando GM-CSF. Para activar las CDs se utilizaron macrófagos autólogos muertos en apoptosis inducida por la incubación con paredes de la cepa *M. smegmatis*, la cual induce apoptosis vía caspasa 3 (190), pero que además esta transformada con plásmidos que codifican para LpqH, una glicolipoproteína de la pared de Mtb que se ha demostrado es altamente apoptogénica (141-143). En la decisión de utilizar los macrófagos apoptóticos mencionados se consideraron otros factores como la presencia de LpqH en vesículas apoptóticas de macrófagos inducidos a la apoptosis con BCG (124). Así mismo, tomamos en cuenta las observaciones de nuestro laboratorio que demuestran la presencia de dicha lipoproteína en la superficie de macrófagos apoptóticos que habían fagocitado Msmeg-LpqH y por microscopia confocal la presencia de LpqH en cuerpos apoptóticos inducidos por la misma cepa. Por otra parte también se tomó en cuenta que LpqH induce una respuesta antimicobacteriana de linfocitos T (173).

En la presente tesis se consideró de interés identificar los componentes de los cuerpos apoptóticos con los cuales se indujo la maduración de las CDs. En el análisis por Western blot se notó la presencia de las histonas H2B y H4, mostrando que en los cuerpos apoptóticos se incrementa el contenido de componentes nucleares, hallazgos que coinciden con estudios describiendo la presencia de ribonucleoproteínas e histonas en cuerpos apoptóticos a los que se les atribuyó potencial inmunogénico (177). Otro hallazgo de interés al analizar la composición de los CAp-LpqH fue la presencia de LpqH, la lipoproteína apoptogénica; la presencia de esta lipoproteína podría tener relación con los efectos activadores de los cuerpos apoptóticos sobre las CDs, ya que las lipoproteínas bacterianas son reconocidas agonistas de TLR2 (191). Ésto es de interés pues la señalización a través de este receptor podría contribuir al incremento en la expresión de las moléculas de presentación de antígeno y de coestimulación observado en este estudio.

Nuestros estudios se hicieron con células apoptóticas completas aisladas con perlas magnéticas recubiertas con Anexina V, los que no permiten conocer la localización subcelular de las proteínas micobacterianas. Por lo anterior, se investigó el tráfico de las proteínas de la pared después de su administración a las células, marcándolas con CFSE y observándolas por microscopía de epifluorescencia y confocal. Como era de esperarse, la proteína marcada fue abundante en el citoplasma en forma granular o nodular sugestivo de su incorporación en fagosomas. Sin embargo, lo interesante del estudio fue la demostración de la traslocación muy rápida y frecuente de las proteínas al núcleo de células, que con frecuencia eran apoptóticas a juzgar por el ensayo de TUNEL. La significancia de estas observaciones en el desarrollo del proceso de muerte celular inducida por LpqH está por establecerse. Sin embargo, su relación con el proceso de apoptosis es evidente, pues un inhibidor general de caspasas disminuyó marcadamente la incorporación de las proteínas micobacterianas. Los hallazgos anteriores podrían relacionarse con estudios que muestran que durante la apoptosis la caspasa 7 puede alterar drásticamente la estructura del poro nuclear (178), lo que pensamos podría permitir el paso de moléculas propias o extrañas como se ha observado en este estudio. En la interpretación de estos hallazgos deben considerarse estudios que muestran que moléculas bacterianas que han recibido el nombre de nucleomodulinas son capaces de entrar al núcleo de células viables y manipular el ciclo celular, factores de transcripción, factores reguladores de la cromatina y factores reguladores de expresión genética (192).

Después de su caracterización por Steinman en la década de los 70's (148-151), las CDs emergieron como células con características distintivas con un papel central en la respuesta inmune. El interés sobre las CDs se mantiene vivo pues aún cuando se sabe mucho acerca de ella hay aún muchas incógnitas por resolver. Un aspecto fundamental en el estudio de las CDs ha sido el desarrollo de métodos de cultivo orientados a encontrar condiciones óptimas para su diferenciación a partir de precursores en la médula ósea o en sangre periférica. Influyen múltiples factores como son el origen de las células precursoras, los medios de cultivo, los factores de crecimiento, los sueros fetales, el material

plástico etc. (193). Un requisito importante para estudios como el nuestro es evitar la maduración espontánea de las células durante su cultivo. Está bien establecido que son las células inmaduras las que exhiben una buena capacidad fagocítica y que responden a señales de activación conducentes a adquirir la capacidad para procesar y presentar antígeno a linfocitos T (194).

Los resultados de los ensayos de fagocitosis mostraron la eficiencia del método de cultivo utilizado en este estudio. Las CDs siendo células fagocíticas especializadas fagocitan cuerpos apoptóticos principalmente a través de la integrina $\alpha\beta5$, el receptor scavenger CD36 y el receptor CR3 (96, 166-168). En este estudio se demostró que bajo nuestras condiciones de cultivo las CDs poseen una alta capacidad para fagocitar cuerpos apoptóticos que contienen antígenos micobacterianos, la cual es mayor que la fagocitosis de cuerpos apoptóticos inducidos con luz UV; esto podría relacionarse con la presencia en los primeros de componentes micobacterianos que podrían interaccionar con un repertorio mayor de receptores en las CDs. Los resultados analizados por FACS y por microscopía de fluorescencia y confocal demostraron que hay fagocitosis de ambos tipos de cuerpos apoptóticos, y que ésta se incrementa de manera tiempo-dependiente. Otro hallazgo de interés fue que las CDs con el marcador de estirpe CD11c fagocitaban cuerpos apoptóticos en mayor cantidad que el total de las células de los cultivos. A las 4 h de incubación las CD11c⁺ habían fagocitado casi dos veces más cuerpos apoptóticos que las células totales que incluyen también a las CD11c⁺.

Después de demostrar que bajo nuestro método de cultivo las CDs desarrollaban una gran capacidad fagocítica, se procedió a investigar si el tratamiento de las CDs con cuerpos apoptóticos inducidos con LpqH daba lugar a un fenotipo de maduración. El proceso de maduración se asocia una variedad de eventos como son la pérdida de receptores endocíticos y fagocíticos, la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras tales como CD40, CD58, CD80 y CD86, cambio en la morfología celular, y en los compartimientos lisosomales, así como en la expresión de la molécula MHCII (195). Una de las principales funciones de las células dendríticas, es la presentación de antígeno, es por ello que en este estudio se analizaron las moléculas de presentación de antígeno

MHC II y MHC I, así como las moléculas de co-estimulación CD40, CD80 y CD86. En el caso de la molécula MHC clase I no se muestran diferencias entre las condiciones experimentales en ninguno de los tres tipos de análisis realizados; por el contrario, la molécula MHC clase II, sí muestra diferencias con respecto a las células que fueron incubadas con los dos tipos de cuerpos apoptóticos, lo cual sugiere que en este estudio la presentación de antígeno solamente se dió por la vía fagolisosomal. Anteriormente se ha demostrado el incremento en la superficie celular de las CDs de moléculas MHC I y II posterior a la infección por Mtb (18, 196); sin embargo, éste tipo de análisis no se han realizado de manera subsecuente a la fagocitosis de cuerpos apoptóticos inducidos por especies micobacterianas. También se estudiaron las moléculas de coestimulación, cuyos resultados mostraron que tanto en las células totales como en las células CD11c⁺, las células activadas con los cuerpos apoptóticos que contienen antígenos micobacterianos incrementan de manera significativa la expresión de estas moléculas, mientras que el efecto contrario puede observarse en las células que fueron incubadas con los cuerpos apoptóticos inducidos con luz UV. En la literatura los resultados en cuanto a la activación y maduración de células fagocíticas con cuerpos apoptóticos son contradictorios, ya que algunos estudios muestran que la fagocitosis de cuerpos apoptóticos de células en reposo inhiben la expresión de las moléculas de co-estimulación (197, 198), mientras que otros estudios en los que se induce apoptosis en células previamente activadas muestran un considerable incremento en éste tipo de moléculas (199, 200). En esta tesis en particular, podría decirse que las células que fueron inducidas a apoptosis por luz UV se encontraban en reposo, mientras que las células que fueron inducidas en apoptosis con proteínas micobacterianas, fueron activadas por las mismas proteínas de manera previa a su muerte a través de receptores de superficie como TLR2. Adicionalmente, los resultados expuestos en este trabajo corroboran lo informado en un estudio previo en el que se observa la maduración de las células dendríticas al ser incubadas con neutrófilos inducidos a apoptosis por el bacilo de la tuberculosis (187), aunque en dicho estudio no se muestra evidencia de que el bacilo haya sido completamente eliminado y tampoco se hace

ningún proceso de purificación de cuerpos o células apoptóticas como se hace en la presente tesis.

El análisis de las poblaciones estudiadas (Células Totales y Células CD11c+) demostró que se comportan de manera similar, con el fin de estudiar a fondo este aspecto, los resultados se analizaron de tres maneras diferentes, en el primero se analizó solamente si los tratamientos incrementaban el porcentaje total de células que presentaban las diferentes moléculas incluidas en el estudio, mientras que el propósito del segundo método de análisis fue el de determinar adicionalmente aquellas poblaciones que incrementaran la cantidad de estas moléculas en su superficie, finalmente el propósito del tercer parámetro de análisis el cual se basó en el índice medio de fluorescencia (IMF) fue indagar la cantidad de receptores por células dentro de las poblaciones individuales. Este último análisis resulta de suma importancia, ya que las dos señales cruciales requeridas para la activación y diferenciación de células T efectoras, es el reconocimiento de los complejos MHC-péptido por receptores de células T antígeno-específicos, y la interacción entre las moléculas coestimuladoras expresadas por las CDs y sus ligandos expresados por las células T, pues en la ausencia de coestimulación suficiente, las células T exhiben anergia o sufren apoptosis (152).

Además se ha descrito que la secreción de factores como las citocinas por las CDs es indispensable en la diferenciación de las células T efectoras. Muchos estudios han mostrado que la presencia de células apoptóticas durante la activación de células fagocíticas promueve el incremento en la secreción de citocinas anti-inflamatorias como: IL-10, TGF- β , PAF (platelet activating factor) y prostaglandina E₂ (PGE₂) y que además reducen o inhiben la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF, GM-CSF, IL-12, IL-1 β e IL-18 (85, 114-119, 201, 202), lo cual puede contribuir a una inmunidad mediada por células disminuida. En la presente tesis se analizó la producción de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β por las CDs ya que además de haber sido reportadas como citocinas promovidas por cuerpos apoptóticos, también han sido implicadas en la inhibición de respuestas inmunes durante la infección por Mtb (2, 33, 203, 204). Los resultados obtenidos en el presente estudio para estas citocinas no

muestran diferencias estadísticamente significativas con ninguno de los tratamientos con los que fueron incubadas las células dendríticas; sin embargo, al analizar la producción de las citocinas pro-inflamatorias TNF e IL-12, se observó que las CDs incubadas con CAp-Lp_qH inducen la expresión de dichas citocinas, esto en línea con reportes previos en los que se ha informado que hay secreción de estas citocinas cuando las CDs se incuban con células o vesículas apoptóticas inducidas por micobacterias (124, 187). Por otra parte, los cuerpos apoptóticos inducidos por luz UV no muestran incremento en la producción de TNF ni de IL-12, por el contrario, muestran una tendencia a disminuir su expresión en comparación con las células no tratadas, lo cual va de acuerdo con las publicaciones en las que se describe que este tipo de cuerpos apoptóticos promueven un fenotipo anti-inflamatorio (114, 118, 201, 205). Debido a su propiedad pro-inflamatoria, TNF ha sido implicada tanto en la protección como en la inmunopatología durante una infección tuberculosa (23-28); sin embargo, se requiere de esta citocina para el control de la infección aguda por el bacilo causante de la enfermedad (22). Por otro lado, IL-12 no presenta la dicotomía ejercida por TNF, pues sus funciones están enfocadas a controlar la enfermedad fungiendo como puente entre la resistencia innata y la inmunidad adaptativa en contra de patógenos intracelulares favoreciendo una respuesta tipo Th1 (20, 206). Previamente se ha demostrado que la estimulación de CD40 por Mtb en células presentadoras de antígeno induce la producción de IL-12 (207), coincidiendo con los resultados expuestos en este trabajo en el que se observa que cuando incrementa la expresión de CD40 hay producción de IL-12, sucediendo lo opuesto en el caso de las células dendríticas tratadas con cuerpos apoptóticos inducidos con luz UV.

En la última década se ha investigado si el proceso de apoptosis puede promover una respuesta celular T proveyendo a las CDs con antígenos bacterianos contenidos en cuerpos apoptóticos, y especialmente enfocada a las células T CD8⁺, a lo cual se le ha denominado "Detour Pathway" (170). Los estudios previos muestran que hay presentación cruzada de antígenos a través de MHC-I y CD1b a linfocitos T CD8⁺ *in vitro* (169) y también *in vivo* (124, 171); sin embargo, los resultados de proliferación de linfocitos T CD8⁺ obtenidos en el

presente estudio no muestran la expansión de éste tipo celular, ni con las CDs incubadas con las paredes micobacterianas, o con los cuerpos apoptóticos que contienen antígenos micobacterianos; sin embargo, esto podría deberse a que en el presente estudio de acuerdo a los datos derivados del análisis de la molécula de presentación de antígeno clase I no se encontró un incremento significativo en la expresión de esta molécula en la superficie de las células que fagocitaron cuerpos apoptóticos inducidos con las paredes micobacterianas, ni con ninguna de las otras condiciones probadas.

Es bien sabido que el control de la tuberculosis depende de manera importante de las células T CD4⁺, pues promueven el arresto del crecimiento de Mtb a través de la producción de citocinas como TNF e INF- γ y además son capaces de inducir apoptosis o lisis de células infectadas (2, 42). El análisis del presente estudio con respecto estas células arrojó datos interesantes, pues se encontró que los linfocitos T de ratones previamente inmunizados con la pared de *M. smegmatis* que expresa la lipoproteína LpqH proliferaron, mientras que no ocurrió ésto con los linfocitos de ratones que fueron inmunizados con la pared de *M. smegmatis* nativa; esta observación sugiere que las CDs están activando linfocitos T específicos para LpqH. Estos hallazgos son significativos ya que se ha reportado que LpqH activa mecanismos microbicidas y la inmunidad innata, impactando además en la inmunidad específica (141, 142, 191, 208). Hay que señalar sin embargo, observaciones que muestran que esta proteína inhibe la expresión de la molécula presentadora de antígeno clase II y el procesamiento de antígeno (70, 72), lo cual contrasta con éste estudio. Por otro lado, también se ha demostrado la activación de células T CD4⁺ antígeno-específicas por vesículas apoptóticas demostrando que éstas células son activadas por antígenos exógenos a través de la vía endosomal, los cuales entran en la vía de procesamiento MHC clase II, incrementando la proliferación de las células T CD4⁺ (124, 171). Los resultados obtenidos en ésta tesis muestran que las CDs que indujeron mayor proliferación, fueron las incubadas con CAp-LpqH, indicando que los cuerpos apoptóticos que incorporaron la lipoproteína LpqH pueden proveer un mecanismo de activación de la inmunidad adquirida. Un efecto similar se observó con las CDs incubadas con Msmeg-LpqH y con Msmeg-N.

En conclusión, la demostración de que CDs cargadas con cuerpos apoptóticos que contienen antígenos micobacterianos inmunoprotectores, así como las activadas con paredes micobacterianas son capaces de inducir una respuesta de linfocitos T antígeno-específica contra la bacteria, permite pensar en un escenario prometedor en el que la inmunoterapia con éstas células podría ser de utilidad como medida adyuvante en el tratamiento de la TB humana, sobretodo en pacientes inmunosuprimidos o infectados con cepas de Mtb resistentes a la quimioterapia, un problema que es cada vez más frecuente.

10. CONCLUSIONES

- Las cepas *M. smegmatis* nativa y la que sobreexpresa LpqH inducen altos porcentajes de apoptosis en macrófagos murinos derivados de la médula ósea.
- Los cuerpos apoptóticos inducidos en apoptosis por Msmeg-LpqH contienen proteínas micobacterianas, incluida la lipoproteína de 19-kDa de Mtb.
- Las células dendríticas fagocitan en gran cantidad cuerpos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH.
- Las células dendríticas que fagocitan macrófagos apoptóticos inducidos por Msmeg-LpqH:
 - Incrementan la expresión de las moléculas de presentación de antígeno clase II así como de las moléculas de coestimulación CD40, CD80 y CD86.
 - Incrementan la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF e IL-12.
 - Inducen la proliferación antígeno- específica de linfocitos T CD4⁺.

11. PERSPECTIVAS

- Investigar el mecanismo mediante el cual los antígenos micobacterianos son incorporados en cuerpos apoptóticos y su significancia.
- Estudiar los mecanismos de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células dendríticas.
- Analizar en detalle los mecanismos de activación de los linfocitos T.
- Explorar si las CDs activadas *ex vivo* administradas a ratones o humanos pueden contribuir al tratamiento de la tuberculosis.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. 2011. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO/HTM/TB2011.16, Geneva: *World Health Organization, 2011.*
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf
2. Flynn JL, Chan J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19: 93-129
3. Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120: 213-32
4. Demangel C, Britton WJ. 2000. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol* 78: 318-24
5. Clemens DL, Horwitz MA. 1995. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 181: 257-70
6. de Chastellier C. 2009. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiology* 214: 526-42
7. Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 160: 1290-6
8. Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. 1998. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci* 111 (Pt 7): 897-905
9. Purdy GE, Russell DG. 2007. Lysosomal ubiquitin and the demise of Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol* 9: 2768-74
10. Russell DG. 2001. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 569-77
11. Salazar-Fontana LI, Bierer BE. 2001. T-lymphocyte coactivator molecules. *Curr Opin Hematol* 8: 5-11
12. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. 2007. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129: 1287-98
13. Lewinsohn DM, Grotzke JE, Heinzl AS, Zhu L, Owendale PJ, Johnson M, Alderson MR. 2006. Secreted proteins from Mycobacterium tuberculosis gain access to the cytosolic MHC class-I antigen-processing pathway. *J Immunol* 177: 437-42

14. Grotzke JE, Lewinsohn DM. 2005. Role of CD8+ T lymphocytes in control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes Infect* 7: 776-88
15. Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, Stenger S, Serbina N, Mazzaccaro RJ, Flynn JL, Barnes PF, Southwood S, Celis E, Bloom BR, Modlin RL, Sette A. 2000. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12210-5
16. Herrmann JL, Lagrange PH. 2005. Dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis: which is the Trojan horse? *Pathol Biol (Paris)* 53: 35-40
17. Jordao L, Vieira OV. 2011. Tuberculosis: new aspects of an old disease. *Int J Cell Biol* 2011: 403623
18. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 159: 635-43
19. Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH. 1997. Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Infect Immun* 65: 1936-8
20. Lazarevic V, Nolt D, Flynn JL. 2005. Long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection is mediated by dynamic immune responses. *J Immunol* 175: 1107-17
21. Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. 1993. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect Immun* 61: 197-203
22. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 2: 561-72
23. Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. 1999. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol* 66: 763-4
24. Saunders BM, Tran S, Ruuls S, Sedgwick JD, Briscoe H, Britton WJ. 2005. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 174: 4852-9
25. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620-7

26. Florido M, Appelberg R. 2007. Characterization of the deregulated immune activation occurring at late stages of mycobacterial infection in TNF-deficient mice. *J Immunol* 179: 7702-8
27. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M. 1989. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 337: 661-3
28. Solis-Herruzo JA, Brenner DA, Chojkier M. 1988. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 263: 5841-5
29. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162: 3256-62
30. Wong P, Pamer EG. 2004. Disparate in vitro and in vivo requirements for IL-2 during antigen-independent CD8 T cell expansion. *J Immunol* 172: 2171-6
31. Biselli R, Mariotti S, Sargentini V, Sauzullo I, Lastilla M, Mengoni F, Vanini V, Girardi E, Goletti D, R DA, Nisini R. 2010. Detection of interleukin-2 in addition to interferon-gamma discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin Microbiol Infect* 16: 1282-4
32. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, Guyot-Revol V, Gunatheesan R, Klenerman P, Lalvani A. 2007. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 178: 5217-26
33. Redford PS, Murray PJ, O'Garra A. 2011. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal Immunol* 4: 261-70
34. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. 1999. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 189: 1973-80
35. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol* 162: 5407-16
36. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 12013-7
37. Mogues T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. 2001. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Exp Med* 193: 271-80

38. van Pinxteren LA, Cassidy JP, Smedegaard BH, Agger EM, Andersen P. 2000. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol* 30: 3689-98
39. Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ. 1998. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. *Infect Immun* 66: 830-4
40. Torrado E, Cooper AM. 2011. What do we really know about how CD4 T cells control *Mycobacterium tuberculosis*? *PLoS Pathog* 7: e1002196
41. Bold TD, Banaei N, Wolf AJ, Ernst JD. 2011. Suboptimal activation of antigen-specific CD4+ effector cells enables persistence of *M. tuberculosis* in vivo. *PLoS Pathog* 7: e1002063
42. Gallegos AM, van Heijst JW, Samstein M, Su X, Pamer EG, Glickman MS. 2011. A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of *M. tuberculosis* infection in vivo. *PLoS Pathog* 7: e1002052
43. Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, Flynn JL. 2000. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med* 192: 347-58
44. Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL. 2001. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 167: 6991-7000
45. Weerdenburg EM, Peters PJ, van der Wel NN. 2010. How do mycobacteria activate CD8+ T cells? *Trends Microbiol* 18: 1-10
46. Serbina NV, Flynn JL. 2001. CD8(+) T cells participate in the memory immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 69: 4320-8
47. Lazarevic V, Flynn J. 2002. CD8+ T cells in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1116-21
48. Pathan AA, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Latif M, McShane H, Pasvol G, Hill AV, Lalvani A. 2000. High frequencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted *Mycobacterium tuberculosis* epitope in *M. tuberculosis*-infected subjects without disease. *Eur J Immunol* 30: 2713-21
49. Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B, Weis SE, Samten B, Safi H, Shams H, Barnes PF. 2004. NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 172: 130-7

50. Kamath AB, Woodworth J, Xiong X, Taylor C, Weng Y, Behar SM. 2004. Cytolytic CD8+ T cells recognizing CFP10 are recruited to the lung after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 200: 1479-89
51. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modlin RL. 1997. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 276: 1684-7
52. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-5
53. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, Dockrell H, Pasvol G, Hill AV. 1998. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 270-5
54. Li L, Sad S, Kagi D, Mosmann TR. 1997. CD8Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo but induce similar inflammatory reactions. *J Immunol* 158: 4152-61
55. Einarsdottir T, Lockhart E, Flynn JL. 2009. Cytotoxicity and secretion of gamma interferon are carried out by distinct CD8 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun* 77: 4621-30
56. Sad S, Kagi D, Mosmann TR. 1996. Perforin and Fas killing by CD8+ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. *J Exp Med* 184: 1543-7
57. Valitutti S, Muller S, Dessing M, Lanzavecchia A. 1996. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* 183: 1917-21
58. Delgado JC, Tsai EY, Thim S, Baena A, Boussiotis VA, Reynes JM, Sath S, Grosjean P, Yunis EJ, Goldfeld AE. 2002. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7576-81
59. Pilheu JA, De Salvo MC, Gonzalez J, Rey D, Elias MC, Ruppel MC. 1997. CD4+ T-lymphocytopenia in severe pulmonary tuberculosis without evidence of human immunodeficiency virus infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1: 422-6
60. Kony SJ, Hane AA, Larouze B, Samb A, Cissoko S, Sow PS, Sane M, Maynard M, Diouf G, Murray JF. 2000. Tuberculosis-associated severe CD4+ T-

- lymphocytopenia in HIV-seronegative patients from Dakar. SIDAK Research Group. *J Infect* 41: 167-71
61. de Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J, Cobat A, Boisson-Dupuis S, et al. 2010. Revisiting human IL-12Rbeta1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine (Baltimore)* 89: 381-402
 62. Doffinger R, Jouanguy E, Dupuis S, Fondaneche MC, Stephan JL, Emile JF, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Pallier A, Barcenas-Morales G, Meinel E, Krause C, Pestka S, Schreiber RD, Novelli F, Casanova JL. 2000. Partial interferon-gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with bacille Calmette-Guerin and Mycobacterium abscessus infection. *J Infect Dis* 181: 379-84
 63. Tabarsi P, Marjani M, Mansouri N, Farnia P, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Abel L, Adimi P, Casanova JL, Mansouri D. 2011. Lethal tuberculosis in a previously healthy adult with IL-12 receptor deficiency. *J Clin Immunol* 31: 537-9
 64. Hirsch CS, Toossi Z, Johnson JL, Luzze H, Ntambi L, Peters P, McHugh M, Okwera A, Joloba M, Mugenyi P, Mugerwa RD, Terebuh P, Ellner JJ. 2001. Augmentation of apoptosis and interferon-gamma production at sites of active Mycobacterium tuberculosis infection in human tuberculosis. *J Infect Dis* 183: 779-88
 65. Hirsch CS, Johnson JL, Okwera A, Kanost RA, Wu M, Peters P, Muhumuza M, Mayanja-Kizza H, Mugerwa RD, Mugenyi P, Ellner JJ, Toossi Z. 2005. Mechanisms of apoptosis of T-cells in human tuberculosis. *J Clin Immunol* 25: 353-64
 66. Mahon RN, Rojas RE, Fulton SA, Franko JL, Harding CV, Boom WH. 2009. Mycobacterium tuberculosis cell wall glycolipids directly inhibit CD4+ T-cell activation by interfering with proximal T-cell-receptor signaling. *Infect Immun* 77: 4574-83
 67. Mahon RN, Sande OJ, Rojas RE, Levine AD, Harding CV, Boom WH. 2012. Mycobacterium tuberculosis ManLAM inhibits T-cell-receptor signaling by interference with ZAP-70, Lck and LAT phosphorylation. *Cell Immunol* 275: 98-105
 68. Bernal-Fernandez G, Espinosa-Cueto P, Leyva-Meza R, Mancilla N, Mancilla R. 2010. Decreased expression of T-cell costimulatory molecule CD28 on CD4 and CD8 T cells of mexican patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberc Res Treat* 2010: 517547

69. Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. 2006. Mycobacterium tuberculosis LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol* 177: 422-9
70. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 167: 910-8
71. Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. 2004. Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 173: 2660-8
72. Fulton SA, Reba SM, Pai RK, Pennini M, Torres M, Harding CV, Boom WH. 2004. Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by Mycobacterium bovis BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infect Immun* 72: 2101-10
73. Tobian AA, Potter NS, Ramachandra L, Pai RK, Convery M, Boom WH, Harding CV. 2003. Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *J Immunol* 171: 1413-22
74. Rocha-Ramirez LM, Estrada-Garcia I, Lopez-Marin LM, 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 (Edinb)* 88: 212-20
75. Stenger S, Niazi KR, Modlin RL. 1998. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 161: 3582-8
76. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H. 1997. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 65: 298-304
77. Lizarbe-Iracheta MA. 2007. El suicidio y la muerte celular. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 101: 1-33
78. Degterev A, Yuan J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 378-90

79. Jordán J. 2003. Apoptosis, muerte celular programada. *Ámbito Farmacéutico* 22: 100-6
80. Edinger AL, Thompson CB. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16: 663-9
81. Kerr JF. 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471-4
82. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516
83. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171: 4672-9
84. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2: 965-75
85. Savill J, Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-8
86. Igney FH, Krammer PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2: 277-88
87. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22: 355-70
88. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501
89. Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N. 2003. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 15: 167-76
90. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Mullbacher A, Anel A, Simon MM. 2004. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* 167: 457-68
91. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. 2012. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 942: 157-83
92. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23: 2785-96
93. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. 2001.

- Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-54
94. Hart SP, Dransfield I, Rossi AG. 2008. Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods* 44: 280-5
 95. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343: 170-3
 96. Albert ML, Kim JI, Birge RB. 2000. α v β 5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2: 899-905
 97. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* 188: 2313-20
 98. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90: 1513-22
 99. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. 1998. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (α v β 3). *J Immunol* 161: 6250-7
 100. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5: 551-62
 101. Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. 1985. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56: 351-8
 102. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 194: 781-95
 103. Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. 1996. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12456-60
 104. Imachi H, Murao K, Hiramane C, Sayo Y, Sato M, Hosokawa H, Ishida T, Kodama T, Quehenberger O, Steinberg D, Takahara J. 2000. Human scavenger receptor B1 is involved in recognition of apoptotic thymocytes by thymic nurse cells. *Lab Invest* 80: 263-70

105. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505-9
106. Luciani MF, Chimini G. 1996. The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *EMBO J* 15: 226-35
107. Oka K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T, Masaki T. 1998. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9535-40
108. Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. 1995. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9580-4
109. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. 1994. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol* 153: 1254-63
110. Hart SP, Ross JA, Ross K, Haslett C, Dransfield I. 2000. Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death Differ* 7: 493-503
111. Hart SP, Smith JR, Dransfield I. 2004. Phagocytosis of opsonized apoptotic cells: roles for 'old-fashioned' receptors for antibody and complement. *Clin Exp Immunol* 135: 181-5
112. Hart SP, Alexander KM, Dransfield I. 2004. Immune complexes bind preferentially to Fc gamma RIIA (CD32) on apoptotic neutrophils, leading to augmented phagocytosis by macrophages and release of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 172: 1882-7
113. Griffith TS, Ferguson TA. 2011. Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells. *Immunity* 35: 456-66
114. Mitchell JE, Cvetanovic M, Tibrewal N, Patel V, Colamonici OR, Li MO, Flavell RA, Levine JS, Birge RB, Ucker DS. 2006. The presumptive phosphatidylserine receptor is dispensable for innate anti-inflammatory recognition and clearance of apoptotic cells. *J Biol Chem* 281: 5718-25
115. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350-1

116. Ferguson TA, Herndon J, Elzey B, Griffith TS, Schoenberger S, Green DR. 2002. Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness. *J Immunol* 168: 5589-95
117. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191: 411-6
118. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890-8
119. Sun EW, Shi YF. 2001. Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol Ther* 92: 135-45
120. Fransen JH, Hilbrands LB, Jacobs CW, Adema GJ, Berden JH, Van der Vlag J. 2009. Both early and late apoptotic blebs are taken up by DC and induce IL-6 production. *Autoimmunity* 42: 325-7
121. Fransen JH, Hilbrands LB, Ruben J, Stoffels M, Adema GJ, van der Vlag J, Berden JH. 2009. Mouse dendritic cells matured by ingestion of apoptotic blebs induce T cells to produce interleukin-17. *Arthritis Rheum* 60: 2304-13
122. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ. 2000. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med* 192: 359-66
123. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. 2009. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* 458: 78-82
124. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, Sandhoff K, Brinkmann V, Kaufmann SH, Schaible UE. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24: 105-17
125. Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan HX, Divangahi M, Remold HG. 2011. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol* 4: 279-87
126. Chen M, Gan H, Remold HG. 2006. A mechanism of virulence: virulent Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J Immunol* 176: 3707-16

127. Hinchey J, Lee S, Jeon BY, Basaraba RJ, Venkataswamy MM, Chen B, Chan J, Braunstein M, Orme IM, Derrick SC, Morris SL, Jacobs WR, Jr., Porcelli SA. 2007. Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 117: 2279-88
128. Velmurugan K, Chen B, Miller JL, Azogue S, Gurses S, Hsu T, Glickman M, Jacobs WR, Jr., Porcelli SA, Briken V. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog* 3: e110
129. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 164: 2016-20
130. Zhang J, Jiang R, Takayama H, Tanaka Y. 2005. Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. *Microbiol Immunol* 49: 845-52
131. Mogga SJ, Mustafa T, Sviland L, Nilsen R. 2002. Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol* 56: 383-91
132. Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, McMaster WR. 2003. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* 170: 430-7
133. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 161: 2636-41
134. Divangahi M, Chen M, Gan H, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM, Fortune S, Behar SM, Remold HG. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol* 10: 899-906
135. Chen M, Divangahi M, Gan H, Shin DS, Hong S, Lee DM, Serhan CN, Behar SM, Remold HG. 2008. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J Exp Med* 205: 2791-801
136. Kundu M, Pathak SK, Kumawat K, Basu S, Chatterjee G, Pathak S, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H, Thien CB, Langdon WY, Basu J. 2009. A TNF- and c-Cbl-

- dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis. *Nat Immunol* 10: 918-26
137. Sanchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scand J Immunol* 69: 20-8
 138. Herbst S, Schaible UE, Schneider BE. 2011. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One* 6: e19105
 139. O'Sullivan MP, O'Leary S, Kelly DM, Keane J. 2007. A caspase-independent pathway mediates macrophage cell death in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 75: 1984-93
 140. Lee J, Remold HG, Jeong MH, Kornfeld H. 2006. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *J Immunol* 176: 4267-74
 141. Ciaramella A, Martino A, Cicconi R, Colizzi V, Fraziano M. 2000. Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection. *Cell Death Differ* 7: 1270-2
 142. Lopez M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. 2003. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol* 170: 2409-16
 143. Sánchez-González A. 2010. Estudio sobre la capacidad apoptogénica para macrófagos de *Mycobacterium tuberculosis* y de sus lipoproteínas LpqH (19kDa) y PstS-1 (38kDa). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Doctorado: 1-87
 144. Derrick SC, Morris SL. 2007. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol* 9: 1547-55
 145. Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, Talarico S, Kundu M, Basu J. 2007. Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 282: 1039-50
 146. Fayyazi A, Eichmeyer B, Soruri A, Schweyer S, Herms J, Schwarz P, Radzun HJ. 2000. Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J Pathol* 191: 417-25
 147. Ardavin C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3: 582-90

148. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. 1979. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 149: 1-16
149. Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. 1975. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 141: 804-20
150. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 139: 1431-45
151. Steinman RM, Cohn ZA. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 139: 380-97
152. Lipscomb MF, Masten BJ. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82: 97-130
153. Rossi M, Young JW. 2005. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 175: 1373-81
154. Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, Lucas K. 2001. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98: 3376-82
155. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97: 3333-41
156. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693-702
157. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77-92
158. Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G, Brinster C. 2009. Isolation of dendritic cells. *Curr Protoc Immunol* Chapter 3: Unit 3 7
159. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. 2000. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 68: 6883-90

160. Sinha A, Salam N, Gupta S, Natarajan K. 2007. Mycobacterium tuberculosis and dendritic cells: recognition, activation and functional implications. *Indian J Biochem Biophys* 44: 279-88
161. Carroll MV, Sim RB, Bigi F, Jakel A, Antrobus R, Mitchell DA. 2010. Identification of four novel DC-SIGN ligands on Mycobacterium bovis BCG. *Protein Cell* 1: 859-70
162. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-5
163. Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol* 163: 6748-55
164. Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188: 2175-80
165. Uehira K, Amakawa R, Ito T, Tajima K, Naitoh S, Ozaki Y, Shimizu T, Yamaguchi K, Uemura Y, Kitajima H, Yonezu S, Fukuhara S. 2002. Dendritic cells are decreased in blood and accumulated in granuloma in tuberculosis. *Clin Immunol* 105: 296-303
166. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1359-68
167. Wu Y, Singh S, Georgescu MM, Birge RB. 2005. A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Cell Sci* 118: 539-53
168. Skoberne M, Somersan S, Almodovar W, Truong T, Petrova K, Henson PM, Bhardwaj N. 2006. The apoptotic-cell receptor CR3, but not alphavbeta5, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function. *Blood* 108: 947-55
169. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 9: 1039-46
170. Winau F, Kaufmann SH, Schaible UE. 2004. Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. *Cell Microbiol* 6: 599-607

171. Divangahi M, Desjardins D, Nunes-Alves C, Remold HG, Behar SM. 2010. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Nat Immunol* 11: 751-8
172. Foster B, Prussin C, Liu F, Whitmire JK, Whitton JL. 2007. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* Chapter 6: Unit 6 24
173. Harris DP, Vordermeier HM, Roman E, Lathigra R, Brett SJ, Moreno C, Ivanyi J. 1991. Murine T cell-stimulatory peptides from the 19-kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis. Epitope-restricted homology with the 28-kDa protein of Mycobacterium leprae. *J Immunol* 147: 2706-12
174. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-20
175. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501
176. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53: 1945-51
177. Schiller M, Bekeredjian-Ding I, Heyder P, Blank N, Ho AD, Lorenz HM. 2008. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ* 15: 183-91
178. Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC. 1999. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 11): 1743-53
179. Leiriao P, Mota MM, Rodriguez A. 2005. Apoptotic Plasmodium-infected hepatocytes provide antigens to liver dendritic cells. *J Infect Dis* 191: 1576-81
180. Bertaux L, Mevelec MN, Dion S, Suraud V, Gregoire M, Berthon P, Dimier-Poisson I. 2008. Apoptotic pulsed dendritic cells induce a protective immune response against Toxoplasma gondii. *Parasite Immunol* 30: 620-9
181. Yrlid U, Wick MJ. 2000. Salmonella-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. *J Exp Med* 191: 613-24
182. Ignatius R, Marovich M, Mehlhop E, Villamide L, Mahnke K, Cox WI, Isdell F, Frankel SS, Mascola JR, Steinman RM, Pope M. 2000. Canarypox virus-induced

- maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion. *J Virol* 74: 11329-38
183. Bosnjak L, Miranda-Saksena M, Koelle DM, Boadle RA, Jones CA, Cunningham AL. 2005. Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. *J Immunol* 174: 2220-7
 184. Triantafilou M, Triantafilou K. 2005. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 11: 5-11
 185. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-9
 186. Goldszmid RS, Idoyaga J, Bravo AI, Steinman R, Mordoh J, Wainstok R. 2003. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol* 171: 5940-7
 187. Hedlund S, Persson A, Vujic A, Che KF, Stendahl O, Larsson M. 2010. Dendritic cell activation by sensing Mycobacterium tuberculosis-induced apoptotic neutrophils via DC-SIGN. *Hum Immunol* 71: 535-40
 188. Rubakova E, Petrovskaya S, Pichugin A, Khlebnikov V, McMurray D, Kondratieva E, Baturina I, Kondratieva T, Apt A. 2007. Specificity and efficacy of dendritic cell-based vaccination against tuberculosis with complex mycobacterial antigens in a mouse model. *Tuberculosis (Edinb)* 87: 134-44
 189. Malowany JI, McCormick S, Santosuosso M, Zhang X, Aoki N, Ngai P, Wang J, Leitch J, Bramson J, Wan Y, Xing Z. 2006. Development of cell-based tuberculosis vaccines: genetically modified dendritic cell vaccine is a much more potent activator of CD4 and CD8 T cells than peptide- or protein-loaded counterparts. *Mol Ther* 13: 766-75
 190. Bohsali A, Abdalla H, Velmurugan K, Briken V. 2010. The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway. *BMC Microbiol* 10: 237
 191. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732-6
 192. Bierne H, Cossart P. 2012. When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins. *Cell Microbiol* 14: 622-33

193. Lutz MB, Rossner S. 2007. Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum. *Immunobiology* 212: 855-62
194. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178: 479-88
195. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811
196. Bodnar KA, Serbina NV, Flynn JL. 2001. Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells. *Infect Immun* 69: 800-9
197. Clayton AR, Prue RL, Harper L, Drayson MT, Savage CO. 2003. Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis. *Arthritis Rheum* 48: 2362-74
198. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. 2000. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191: 423-34
199. Pathak SK, Skold AE, Mohanram V, Persson C, Johansson U, Spetz AL. 2012. Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and beta2 integrins. *J Biol Chem* 287: 13731-42
200. Johansson U, Walther-Jallow L, Smed-Sorensen A, Spetz AL. 2007. Triggering of dendritic cell responses after exposure to activated, but not resting, apoptotic PBMCs. *J Immunol* 179: 1711-20
201. Zhang WJ, Zheng SS. 2005. In vitro study of immunosuppressive effect of apoptotic cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 6: 919-25
202. Kim S, Elkon KB, Ma X. 2004. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 21: 643-53
203. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. 1999. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infect Immun* 67: 6461-72

204. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. 1995. 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* 154: 465-73
205. Ozawa M, Ferenczi K, Kikuchi T, Cardinale I, Austin LM, Coven TR, Burack LH, Krueger JG. 1999. 312-nanometer ultraviolet B light (narrow-band UVB) induces apoptosis of T cells within psoriatic lesions. *J Exp Med* 189: 711-8
206. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177: 1199-204
207. Lazarevic V, Myers AJ, Scanga CA, Flynn JL. 2003. CD40, but not CD40L, is required for the optimal priming of T cells and control of aerosol M. tuberculosis infection. *Immunity* 19: 823-35
208. Hertz CJ, Kiertcher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 166: 2444-50