



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTOS INMUNOREGULADORES DEL GLICOLÍPIDO MICOBACTERIANO DI-
O-ACIL TREHALOSA SOBRE LA MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
ALEJANDRO MAGALLANES PUEBLA**

**TUTOR:
RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Raúl Mancilla Jiménez por darme la oportunidad de involucrarme en este proyecto; al igual que a Patricia Espinosa Cueto, su invaluable ayuda y consejos fueron esenciales en el desarrollo de este trabajo.

Adicionalmente quiero agradecer a Carlos Castellanos Barba, por su apoyo en el área de citometría, a Erika Segura Salinas en la purificación del glicolípido y a la Dra. Luz Maria López Marin por su apoyo en la caracterización del glicolípido mediante espectrometría infraroja.

Finalmente quiero agradecer a las personas que han estado a mi lado en esta etapa de mi vida; a mi familia y a mis queridos amigos.

Muchas gracias.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Índice de figuras	2
I. Resumen	3
II. Antecedentes	4
1. Introducción	4
2. Epidemiología de la tuberculosis	4
3. Agente etiológico	5
4. Estructura de la pared de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
5. Patogénesis de la tuberculosis	9
6. Respuesta inmune en la tuberculosis	11
7. Evasión de la respuesta inmune por <i>M. tuberculosis</i>	15
8. Células dendríticas	16
8.1 Origen de las células dendríticas	17
8.2 Subtipos y organización de las células dendríticas	17
8.3 Función de las células dendríticas en la respuesta inmune	19
8.3.1 Migración de las células dendríticas	20
8.3.2 Procesamiento y presentación de antígeno	21
8.4 Células dendríticas en la tolerancia inmunológica	24
9. Las células dendríticas en la tuberculosis	26
III. Justificación	28
IV. Hipótesis	28
V. Objetivos	29
VI. Materiales y métodos	
1. Purificación de DAT	30
2. Obtención de DCs inmaduras a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6L	32
3. Ensayos para estudiar el efecto del DAT sobre la maduración de las células dendríticas	33
4. Efectos de DAT sobre la producción de citocinas por las DCs	33
5. Análisis estadístico	34

VII.	Resultados	
1.	Purificación de DAT	35
2.	Obtención de cultivos de células dendríticas inmaduras	38
3.	Efecto de DAT sobre la maduración de las células dendríticas	39
4.	Efecto de DAT sobre la producción autócrina de citocinas en células dendríticas	46
VIII.	Discusión	49
IX.	Conclusiones	55
X.	Perspectivas	56
XI.	Referencias	57

Abreviaturas

TB	Tuberculosis
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PIM	Fosfatidil mioinositol
LM	Lipomananas
LAM	Lipoarabinomananas
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
IFN	Interferón
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
DC	Célula dendrítica
IL	Interleucina
NK	Natural killer
TGF	Factor de crecimiento transformante
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
DAT	Di-O-Acil Trehalosa
LPS	Lipopolisacárido
iDC	Célula dendrítica inmadura
mDC	Célula dendrítica madura
CCF	Cromatografía en capa fina
Rf	Tiempo de retención
FTIR	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier
mAb	Anticuerpo monoclonal
IMF	Intensidad media de fluorescencia
h	Horas
DC-SIGN	Molécula no-integrina de adhesión intercelular específica de las células dendríticas
$\tilde{\nu}$	número de onda

Índice de figuras

Figura 1. Tasa de incidencia de la TB	5
Figura 2. Morfología microscópica de la TB	6
Figura 3. Esquema evolutivo de las especies del complejo <i>M. tuberculosis</i>	6
Figura 4. Esquema de la cubierta celular de Mtb	9
Figura 5. Establecimiento de la infección por Mtb	10
Figura 6. Granuloma formado en el pulmón	10
Figura 7. Localización de las DCs en el pulmón	14
Figura 8. Morfología de las DCs	16
Figura 9. Comparación morfológica de las DCs y las CLs	19
Figura 10. Moléculas coestimuladoras expresadas en la superficie de las DCs	24
Figura 11. Señales de inducción de las DCs a perfiles inmunogénicos o tolerigénicos	25
Figura 12. Enriquecimiento de DAT por cromatografía en columna	36
Figura 13. Purificación de DAT con placas de cromatografía preparativas	37
Figura 14. Caracterización de DAT mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier	38
Figura 15. Morfología microscópica de cultivos celulares de iDCs	39
Figura 16. Diferenciación de las iDCs a los 6 días de cultivo	39
Figura 17. Análisis del efecto de la concentración de DAT sobre la expresión de las moléculas MHC I y II en iDCs	40
Figura 18. Efecto de la concentración de DAT sobre la expresión de moléculas de MHC I y II en iCDs	41
Figura 19. Efecto de DAT sobre la expresión basal e inducida por LPS de MHC I y II en CDs	42
Figura 20. Efecto de DAT sobre la expresión basal e inducida de moléculas coestimuladoras en CDs	44
Figura 21. Efecto de DAT sobre la expresión basal e inducida de CD25 en la membrana de las DCs	46
Figura 22. Efecto de DAT sobre la producción de citocinas	48

I. RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. La respuesta antimicobacteriana se lleva a cabo mediante una serie de mecanismos del sistema inmune iniciados por macrófagos y las células dendríticas (DCs), las cuales fagocitan a la bacteria y procesan sus antígenos, para así presentarlos a los linfocitos T, los que se diferenciarán a linfocitos T efectores que producen citocinas o ejercen funciones citotóxicas para eliminar células infectadas por el bacilo. Se sabe que la bacteria puede evadir los mecanismos del sistema inmune por medio de factores de virulencia que se encuentran localizados en su pared celular. Uno de ellos es el glicolípidido Di-O-Acil Trehalosa (DAT), el cual puede disminuir la expresión de la sintasa de óxido nítrico en macrófagos lo que resulta en una disminución en la producción de óxido nítrico, una molécula importante en la respuesta efectora. En la actualidad, son pocos los estudios realizados para analizar el efecto de los componentes de la pared micobacteriana sobre las DCs, es por ello que en este trabajo se estudió el efecto de DAT sobre la maduración de estas células. Se evaluaron la expresión de moléculas de presentación de antígeno, moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas. Los resultados muestran que DAT es capaz de interferir en la maduración de las DCs, disminuyendo la expresión basal e inducida por el lipopolisacárido (LPS), de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y clase II, que son moléculas de presentación de antígeno. Además, DAT disminuye la expresión inducida de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86 y CD25 por LPS. Adicionalmente, DAT provoca una disminución en la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-12 y TNF-alfa e induce la producción de IL-10, una citocina anti-inflamatoria. Los hallazgos anteriores sugieren que DAT induce en las DCs un perfil tolerogénico, lo que debería comprobarse con estudios de presentación de antígeno.

II. ANTECEDENTES

1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), un patógeno intracelular facultativo que se adquiere por la vía aérea al inhalar aerosoles que lo contienen [1]. La sintomatología habitual de la TB pulmonar incluye: tos crónica, producción de esputo, pérdida de apetito, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna y hemoptisis [2]. Se cree que Mtb se originó hace cerca de 20,000 años [3].

El estudio de la patogénesis de la tuberculosis comienza con los trabajos de Théophile Laennec a inicios del siglo XIX; posteriormente Jean-Antoine Villemin demuestra en 1865 la transmisión de la enfermedad y en un momento cumbre en la historia de la medicina, Robert Koch identificó a Mtb como el agente etiológico de la TB en 1882 [4].

2. Epidemiología de la tuberculosis

La Organización Mundial de la Salud reportó que durante 2013, 9 millones de personas contrajeron la enfermedad y 1.5 millones murieron a causa de la misma. La TB es la segunda causa de muerte en el humano provocada por un agente infeccioso después del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En la actualidad, su frecuencia se ha incrementado con la aparición de cepas multi-resistentes a los fármacos antifímicos [1]. La población afectada por esta enfermedad es muy variada, siendo la desnutrición y el hacinamiento factores de riesgo importantes para adquirir la infección. También son susceptibles la población infantil, los reclusos, indigentes y personas infectadas con el VIH [5]. Los esfuerzos realizados para el control de la TB mediante la vacunación

utilizando la cepa atenuada *Mycobacterium bovis* denominada bacilo Calmette-Guérin (BCG), ha demostrado dar una protección muy alta para las formas de diseminación hematógica; la protección varía en la forma pulmonar de la enfermedad, con porcentajes de efectividad que van de 0 al 86% [6]. Estos esfuerzos no han sido suficientes ya que la TB es muy frecuente en regiones pobres del mundo, debido al hacinamiento y la desnutrición, así como la falta de recursos económicos para controlar y combatir la enfermedad (Fig. 1) [7].

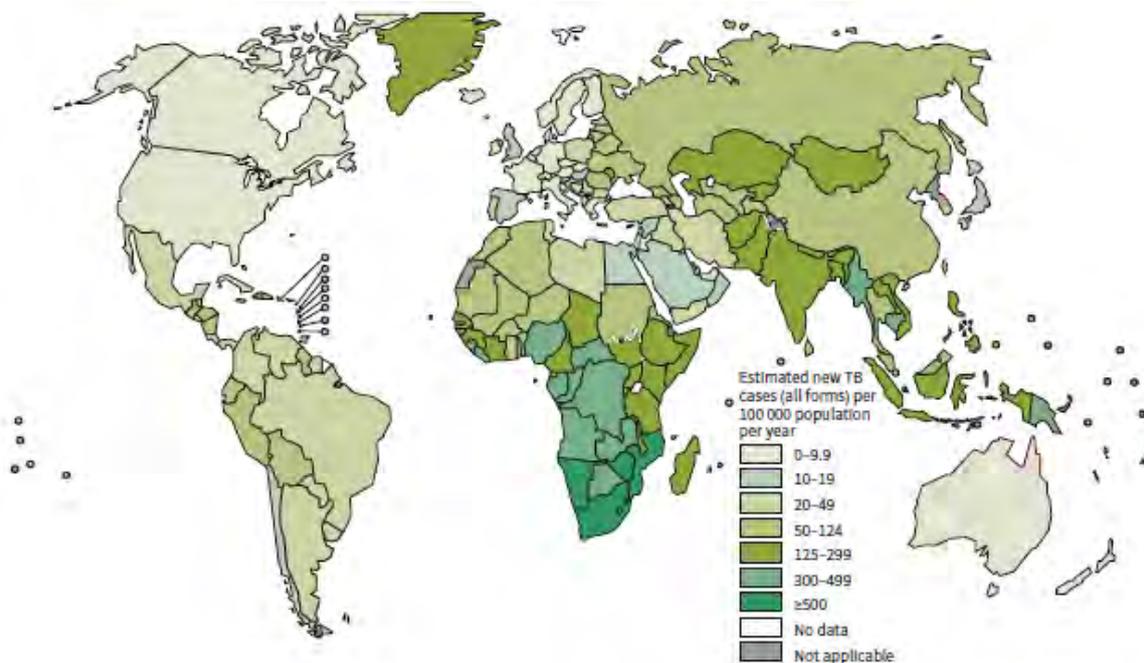


Figura 1. Tasa de incidencia de la TB. Globalmente la tasa de incidencia se mantuvo relativamente estable desde 1990 hasta mediados del 2000, desde ese entonces la incidencia ha empezado a declinar, debido a las estrategias para controlar la enfermedad que la Organización Mundial de la Salud ha llevado a cabo

3. Agente etiológico

M. tuberculosis es un bacilo Gram positivo, intracelular facultativo positivo a la tinción de Zhiel-Nielsen (Fig. 2) El genoma de este bacilo ha sido de uno los más estudiados; se compone de 4,411,529 pares de bases, con alta proporción de guanina + citocina. Una gran proporción de los genes de Mtb codifican enzimas

utilizadas en la lipogénesis y lipólisis; además el genoma contiene información que codifica para una alta proporción de proteínas ricas en glicina con una estructura repetitiva que representan una fuente de variación antigénica [8].

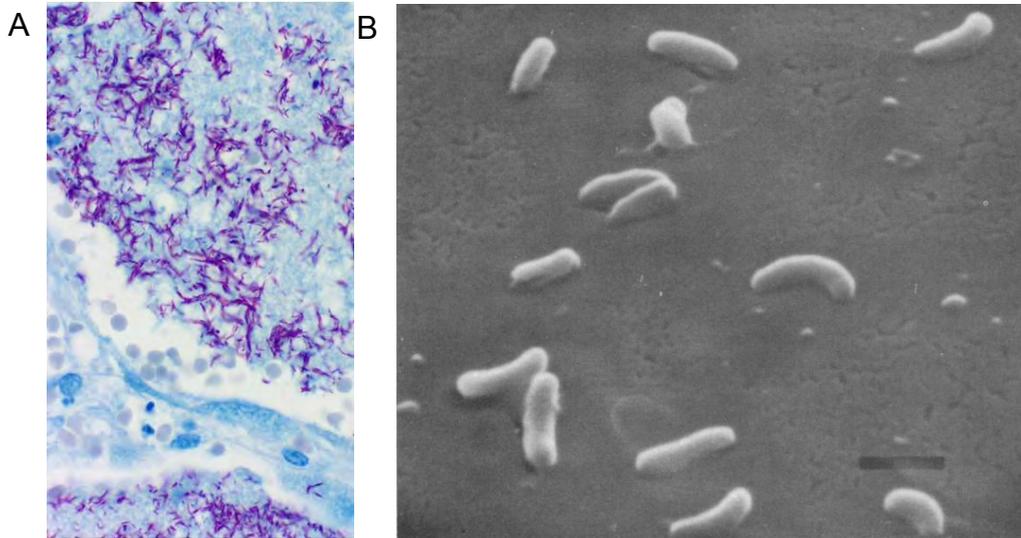


Figura 2. Morfología microscópica de Mtb. Corte de pulmón con bacilos teñidos por la técnica de Ziel-Neelsen (A). Mtb visto por microscopía de electrones (B)

El complejo *M. tuberculosis* incluye a *Mtb*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canettii* (Fig. 3) [9]. Hay micobacterias consideradas saprófitas como *M. avium*, *M. marinum*, y *M. kansasii* las cuales pueden causar enfermedad en individuos inmunosuprimidos (Fig. 3) [10].

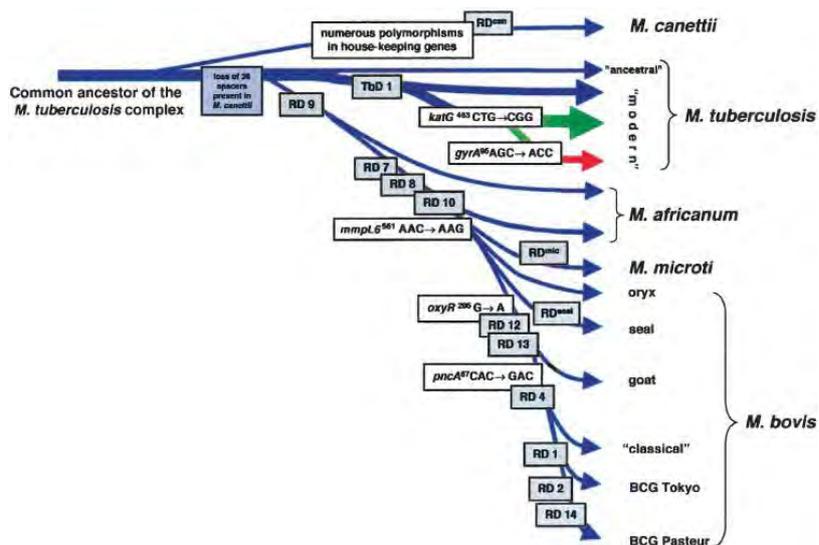


Figura 3. Esquema evolutivo de las especies del complejo *M. tuberculosis*. El esquema está basado en el polimorfismo de regiones conservadas en los genes *katG*, *gyrA*.

La clasificación taxonómica de Mtb es la siguiente:

- Dominio: Bacteria
- Clase: Actinobacteria
- Orden: Actinomycetales
- Familia: Mycobacteriaceae
- Género: Mycobacterium
- Complejo: *Mycobacterium tuberculosis*
- Especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* *M. caprae*

4. Estructura de la pared de *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb posee una pared muy compleja la cual representa una barrera que juega un papel importante en la resistencia a fármacos [11]. Después de la membrana plasmática se encuentra un complejo formado por peptidoglicana y arabinogalactana, al cual se unen ácidos micólicos mediante cadenas largas de meromicolato y cadenas- α cortas. Este complejo peptidoglicana-arabinogalactana es considerado como el núcleo de la pared celular [12]. Enseguida se encuentra una capa de glicolípidos, polisacáridos y proteínas unidas de manera no covalente [13,14].

En 1982, Minnikin propuso que la pared de Mtb tenía una segunda capa lipídica formada por una capa de ácidos micólicos unidos de manera covalente a la peptidoglicana y una capa externa de lípidos libres (Fig. 4) [15]. Por medio de la microscopía de crió-electrones se reveló que la membrana externa tiene un grosor de aproximadamente 8 nm y que es morfológicamente simétrica [16]. En la pared existen manósidos de fosfatidil inositol (PIM), lípidos que contienen ftiocerol, lipomananas (LM) y lipoarabinomananas (LAM) [17]. El tratamiento de la pared

con solventes solubiliza lípidos libres, proteínas, LAMs, y PIMs, mientras que el complejo formado por los ácidos micólicos, la arabinogalactana y la peptidoglicana permanece intacto [18]. Lo anterior ha dado lugar a la idea de que las moléculas solubles estén involucradas en la infección participando como efectores y como moléculas de señalización, mientras que el núcleo insoluble es esencial para la viabilidad de la célula [12]. Las LAMs se consideran las moléculas más potentes en la modulación de la respuesta inmune del hospedero, particularmente las que se encuentran manosiladas (ManLAM) [19]. También se pueden localizar proteínas que se encuentran ancladas gracias a la adición de lípidos en su estructura, las que además juegan un papel importante en las interacciones entre el bacilo y el hospedero [20, 21].

En la pared de Mtb también hay una variedad de glicolípidos, de los cuales algunos contienen trehalosas que son disacáridos de glucosa no reductores (α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp) encontrados en bacterias, levaduras, hongos, plantas e invertebrados, pero no en células de mamíferos. Se encuentran libres en el citosol de la micobacteria o esterificados en una variedad de grupos grasos y sirven como una fuente de almacenamiento de energía y protectores de estrés. Las aciltrehalosas de la cubierta celular de Mtb incluyen sulfátidos, diaciltrehalosas, triaciltrehalosas, poliaciltrehalosas, monomicolato de trealosas y dimicolato de trehalosa [22], esta última también conocida como Factor Cuerda, la cual se encuentra en la superficie de la cubierta y provoca que Mtb crezca en forma de serpentín *in vitro* [23].

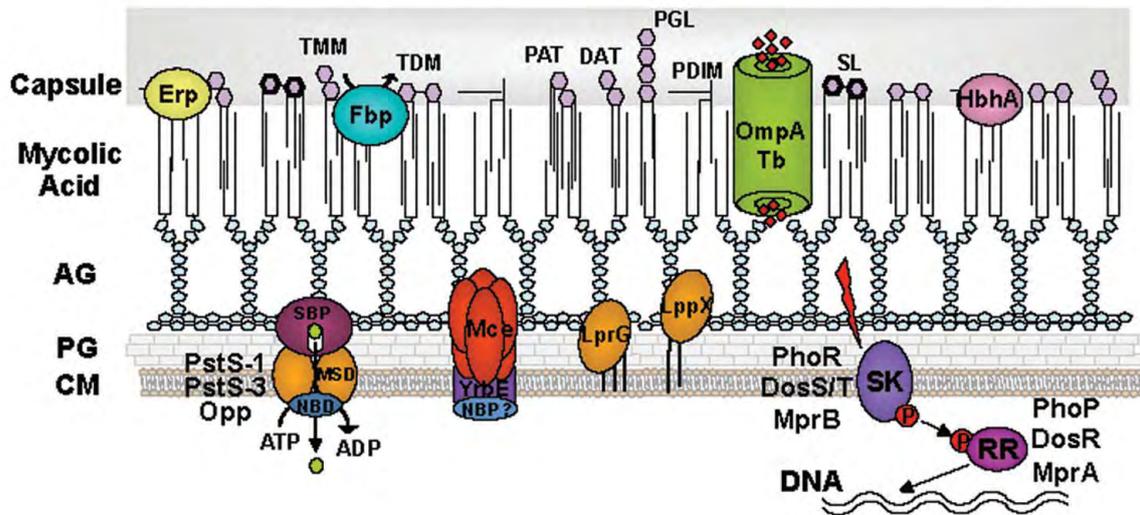


Figura 4. Esquema de la cubierta celular de Mtb. Distribución de los componentes de la cubierta celular de Mtb, en donde se pueden observar proteínas y la porina OmpATb expuesta en la superficie; los transportadores ABC: PstS-1, PstS-3, Opp. El sistema de dos componentes PhoP/PhoR en la membrana plasmática. Membrana plasmática (CM); peptidoglicano (PG); arabinogalactano (AG); monomicolato y dimicolato de trehalosa (TMM y TDM); di y poliacil trehalosas (DAT y PAT); dimicoserosato de ftiocerol (PDIM); glicolípido fenólico (PGL); sulfolípidos (SL).

5 Patogénesis de la tuberculosis

La patogénesis de la TB se relaciona con la virulencia de la bacteria y la resistencia inmune del hospedero. La infección ocurre cuando la persona inhala al bacilo por medio de gotas, provenientes de personas infectadas [24]. Se ha reportado que la dosis de infección se encuentra entre 1 y 200 bacilos, aunque una gota puede contener de 1 a 400 bacilos. El bacilo entra por vía respiratoria y al llegar a los alveolos se encuentra con los macrófagos alveolares; los alveolos representan la parte terminal del árbol traqueobronquial constituyendo la interfase entre el aire y el tejido pulmonar. Los macrófagos responden a la infección secretando factores antimicrobianos, incluyendo intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno, lisozimas, péptidos antimicrobianos y proteasas; así mismo, estos producen citocinas y quimiocinas, los cuales sirven como señales

para iniciar la respuesta inflamatoria y reclutar a neutrófilos activados al sitio de infección (Fig. 5) [25].

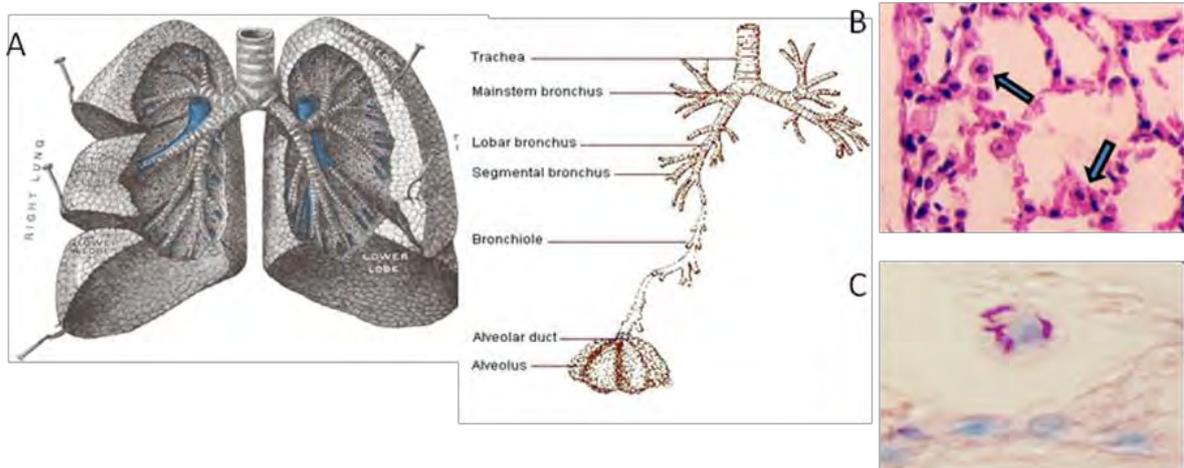


Figura 5. Establecimiento de la infección por Mtb. El bacilo entra por el tracto respiratorio y se dirige hacia los alveolos (A) en donde se encuentra con macrófagos alveolares (flechas) (B). Los macrófagos fagocitan al bacilo y lo mantienen dentro de fagosomas (C).

Los primeros en llegar son los neutrófilos y los monocitos, los que fagocitan a la bacteria, secretan más citocinas y quimiocinas y comienzan a formar el granuloma compuesto de macrófagos infectados, rodeados por macrófagos epiteloideos, células gigantes multinucleadas y linfocitos reclutados en la periferia formando una cápsula fibrosa (Fig. 6) [26]. El granuloma persiste debido a la hipersensibilidad retardada causada por la presencia de antígenos y lípidos inmunostimulatorios provenientes de los bacilos que se encuentran dentro de los macrófagos o extracelularmente dentro del granuloma [27].

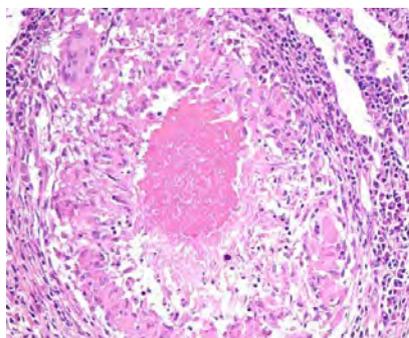


Figura 6. Granuloma formado en el pulmón. El centro caseoso se encuentra rodeado de macrófagos epiteloideos, células gigantes multinucleadas, linfocitos periféricos. Tinción: Hematoxilina Eosina.

A pesar de la diseminación del bacilo durante la infección primaria, 90% de las personas infectadas superan la enfermedad sin mostrar síntomas; el 10% restante desarrollará la enfermedad debido a la combinación de factores como: alta carga bacteriana, factores de virulencia, inmunosupresión y susceptibilidad genética [28].

En ausencia de enfermedad progresiva, la persona infectada puede permanecer sin síntomas durante décadas en las que el bacilo se mantiene en un estado latente; la reactivación de éste es causada por factores que comprometen al sistema inmune como infecciones por VIH, vejez, desnutrición, cáncer, tratamientos inmunosupresivos o una nueva infección [29].

6. Respuesta inmune en la tuberculosis

Después de la fagocitosis de los bacilos inhalados, los macrófagos alveolares internan a Mtb en fagosomas, los cuales maduran en fagolisosomas a través de la fusión con vesículas que contienen proteasas, péptidos antimicrobianos y lisozimas; es aquí donde se producen especies reactivas del oxígeno y nitrógeno [30]; además los macrófagos secretan citocinas pro-inflamatorias cuando estas interactúan con el bacilo por medio de los receptores TLR-2 y TLR-4 [31]. En la infección de Mtb se pueden encontrar las siguientes citocinas:

TNF- α el cual es secretado por macrófagos, DCs y linfocitos T [32]. Esta citocina actúa en sinergia con IFN- γ para inducir intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno [33]; induce la formación de granulomas, mediante el reclutamiento de células hacia el sitio de infección que tiene la función de contener al bacilo [34]. Esta citocina también induce la apoptosis de células infectadas con el bacilo; este mecanismo es importante ya que además de

eliminar al bacilo, promueve la respuesta inmune adaptativa [35], En combinación con GM-CSF, puede inducir la maduración de las DCs [36].

La IL-1 β tiene un papel importante en la formación del granuloma y se le ha relacionado con la inducción de fiebre en el paciente tuberculoso [37]. La IL-1 actúa sobre los macrófagos induciendo la producción de TNF- α e IL-6, además de aumentar la producción de IL-2 y la expresión de su receptor en los linfocitos T [38].

La IL-6 se encuentra presente en los lavados broncoalveolares de pacientes enfermos, sin embargo, esta citocina tiende a antagonizar los efectos de TNF- α [39], y también limita la proliferación de los linfocitos T y la producción de IL-2 en respuesta a un estímulo antigénico [40].

La IL-12 es producida por macrófagos y DCs después de haber fagocitado al bacilo [41]. Orienta a los linfocitos T cooperadores hacia una respuesta del tipo Th1 e induce la producción de IFN- γ en estas células [42]; también aumenta la citotoxicidad promoviendo la proliferación de linfocitos T citotóxicos y células NK [43].

El IFN- γ es una citocina producida por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y células NK; la cual activa a los macrófagos e induce la producción de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno en estas células; ratones deficientes de esta citocina o su receptor tienen una alta susceptibilidad a Mtb y BCG, mueren más rápido y tienen una carga elevada de bacilos [44].

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que reduce la capacidad de los macrófagos y las DCs de activar a los linfocitos Th1 [45]. Esta citocina es producida por células mieloides y linfocitos T, siendo los linfocitos T reguladores los mayores productores de esta citocina. Se ha demostrado que en la infección

con Mtb la presencia de esta citocina disminuye la producción de IFN- γ , GM-CSF y TNF- α , así como el reclutamiento de linfocitos T. La IL-10 bloquea la maduración del fagosoma evitando así la eliminación del bacilo y también inhibe la función de las moléculas de presentación de antígeno en células infectadas; además también interfiere en la migración de las DCs hacia los nódulos linfáticos, limitando el reclutamiento de células Th1 hacia los sitios infectados [46].

El TGF- β es una citocina anti-inflamatoria presente en lesiones granulomatosas que puede alterar la producción de IL-1 y TNF- α , disminuye la expresión del receptor de IL-12, y de MHC II inducida por IFN- γ ; así como la activación de los macrófagos. Inhibe la proliferación de células T, también interfiere con la función de las células NK y las células T CD8⁺ [47].

La IL-23 es producida por DCs que son expuestas a Mtb y es importante para la generación de linfocitos Th17 productores de IL-17. También puede inducir la producción de IFN- γ en linfocitos T. La IL-17 es una citocina pro-inflamatoria capaz de inducir un ambiente de quimiocinas e iniciar procesos inflamatorios y tiene la capacidad de reclutar neutrófilos al sitio de infección. La ausencia de estas citocinas provoca una inflamación severa en el pulmón [48].

Mtb se encuentra con DCs localizadas en el parénquima pulmonar, las cuales fagocitan al bacilo y procesan sus antígenos mientras migran hacia los ganglios linfáticos, para así presentar los antígenos procesados a los linfocitos T naive por medio de moléculas del MHC y así activar a los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, siendo los primeros, las principales células efectoras en contra de la bacteria (Fig. 7) [49, 50]. Los linfocitos T CD4⁺ se dividen en subtipos, dependiendo de su perfil de citocinas, como linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1)

tipo 2 (Th2), Th17 y reguladores (Treg). Las células Th1 producen IFN- γ , TNF- α e IL-2 y contribuyen a la activación de macrófagos y a la formación de granulomas. Por otra parte, las células Th2 producen IL-4, IL-5, y/o IL-10 y contribuyen a desarrollar la inmunidad mediada por anticuerpos, la que se considera tiene efectos inhibitorios sobre la respuesta inmune en contra de Mtb [51]. La interacción de Mtb con el receptor delectina-1 de las CD genera linfocitos Th17, los cuales producen IL-17 [52].

Por otra parte, en las primeras semanas en las que Mtb ingresa a los pulmones hay un reclutamiento de linfocitos Treg no específicos, que son guiados por moléculas de superficie y receptores de quimiocinas que facilitan su desplazamiento a tejidos inflamados [53]. La infección por Mtb induce la expresión de PD-L1 en las DCs, la interacción de esta molécula con PD-1 expresado en las Tregs promueve su proliferación [54].

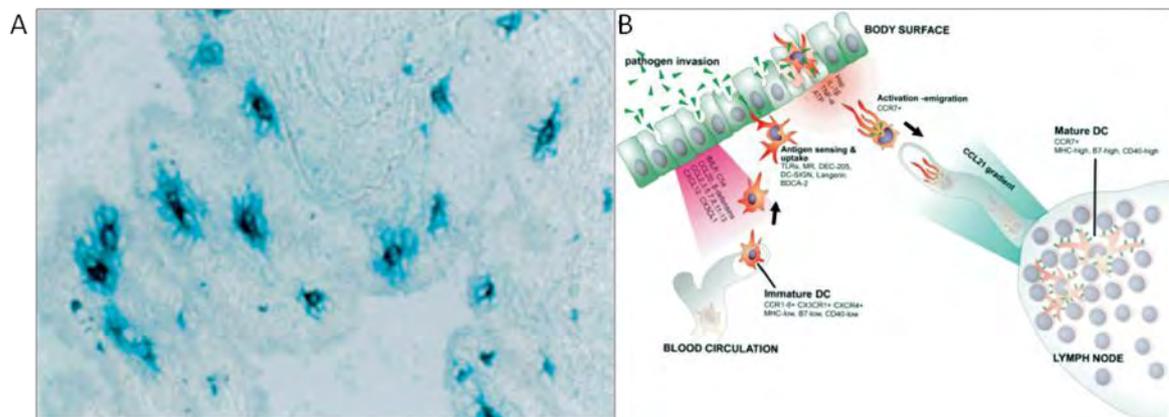


Figura 7. Localización de las DCs en el pulmón. Epitelio broncoalveolar mostrando DCs positivas a Langerina (A). Representación esquemática de la función de las DCs en el pulmón. Las células se encuentran residentes en los tejidos donde pueden capturar fácilmente los antígenos que llegan al pulmón, después de hacer la captura las DCs procesan los antígenos y migran hacia los ganglios linfáticos donde activarán a los linfocitos T (B).

Los linfocitos T CD8⁺ también han mostrado tener un papel importante en la inmunidad protectora. Se ha reportado la presentación cruzada de antígenos de Mtb a los linfocitos T CD8⁺ vía MHC I [55]. Estas células contribuyen secretando

las citocinas IFN- γ y TNF- α [56], y pueden lisar las células infectadas a través de la secreción de perforina y granzima B [57].

7. Evasión de la respuesta inmune por *M. tuberculosis*

Mtb ha desarrollado diversas estrategias para sobrevivir dentro de los macrófagos. Una de las más importantes es impedir la maduración del fagosoma [58]; se han reportado componentes en la pared de Mtb que impiden la maduración del fagosoma como LAM, [59], PIM [60] y TDM [61] por lo que la bacteria no es eliminada.

Otro glicolípido de interés en los procesos de regulación de la respuesta inmune es la Di-O-acil trehalosa (DAT), que está presente en la pared celular de cepas virulentas del complejo Mtb [62]. El DAT junto con los sulfolípidos y las poliacyltrehalosas son regulados por un sistema de dos componentes denominado PhoP/PhoR [63] los cuales sirven para mediar señales de transducción para funciones metabólicas o relacionadas con el crecimiento de Mtb [64]; estos se encuentran regulados por el gen *phoP* cuya delección provoca disminución de la virulencia, sin embargo, la viabilidad del bacilo no se ve afectada [65]. Se sabe que DAT y la Tri-O-acil trehalosa (TAT) inducen una respuesta inmune humoral, ya que en pacientes infectados con cepas virulentas de Mtb se han encontrado títulos altos de anticuerpos dirigidos contra estos glicolípidos [66]. También se ha demostrado que DAT y TAT inhiben la proliferación de linfocitos T inducida por concanavalina A [67], interfiriendo en la vía de señalización MAPK-ERK 1/2 [68]. Recientemente se ha descrito, que estos glicolípidos disminuyen la expresión de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) y por lo tanto la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos [69].

8. Células dendríticas

Las DCs fueron identificadas por Ralph Steinman en 1973 mientras observaba células provenientes del bazo de ratón; él notó células con características morfológicas únicas; un citoplasma arreglado en pseudópodos de grosor, longitud, forma y número variable. (Fig 8) [70]. Se ha demostrado que estas células son las más importantes en la captura y presentación de antígenos, así como en la inducción de una respuesta específica por linfocitos T efectores [71].

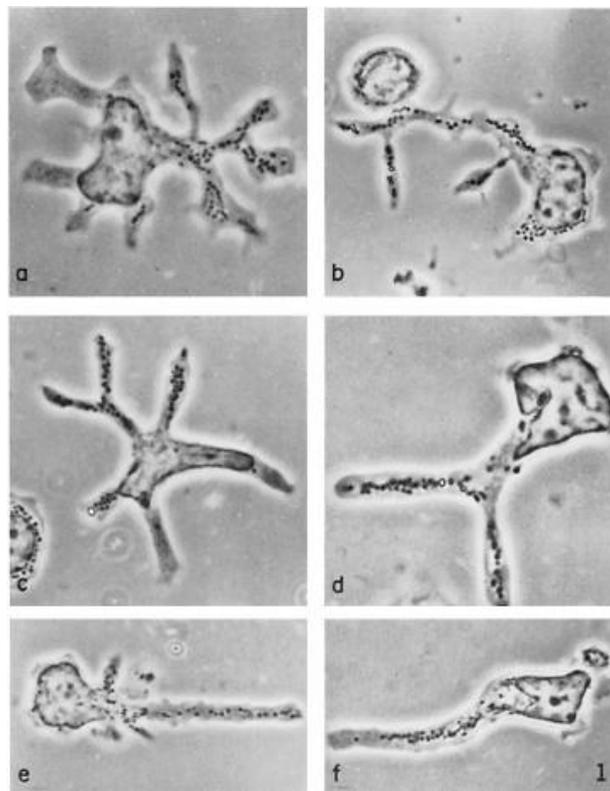


Figura 8. Morfología de las DCs. Microscopía en contraste de fases de células dendríticas aisladas de órganos linfoides. Células obtenidas del bazo (a-d), ganglio linfático cervical (e) y de placas de Peyer (f).

Las DCs poseen marcadores celulares de superficie, los cuales han sido utilizados para su caracterización [72, 73, 74]. No hay un marcador de superficie que identifique a todas las DCs, debido a que son un grupo heterogéneo de células [75].

8.1 Origen de las células dendríticas

Las DCs provienen de las células progenitoras mieloides, de las cuales también se derivan macrófagos, granulocitos, megacariocitos y eritrocitos. Se ha demostrado tanto en humanos como en ratones que las DCs también se originan de monocitos CD14⁺ [76]. Se ha comprendido el origen de las DCs gracias a la observación de los precursores de estas células y su producción del factor de crecimiento FMS-like tirosin cinasa 3 (Flt3). Esta información hizo posible identificar al precursor común de monocitos, macrófagos y DCs clásicas, denominado precursor de macrófagos-DCs (MDP) [77]. Cuando las MDPs son cultivadas con GM-CSF *in vitro*, estas células producen macrófagos y DCs, pero no células polimorfonucleares, linfocitos B, T o células NK. [76]. También se ha descrito un progenitor capaz de producir DCs clásicas y DCs plasmacitoides pero no monocitos *in vitro* [78] o *in vivo* [79], conocido como el progenitor común de DCs (DCP), cuya marca es Lin⁻CD115⁺Flt3⁺CD11^{lo}.

En cultivos de monocitos humanos y células obtenidas de la medula ósea de ratón incubados con GM-CSF/IL-4 y GM-CSF respectivamente, se produce una mezcla de granulocitos, macrófagos y DCs, estas últimas expresan altos niveles de CD11c y de MHC II, y tienen la facultad de actuar como células presentadoras de antígeno [80].

8.2 Subtipos y organización de las células dendríticas

En el bazo del ratón se han descrito dos principales subpoblaciones de DCs. Una de ellas expresa CD8⁺CD205⁺ y está localizada en la zona marginal del bazo [81]. El otro subtipo es el CD8⁺33D1⁺ y se ubica en la pulpa roja. Estas DCs migran al área de los linfocitos T después de su activación [82]. Las DCs

CD8⁺CD205⁺ llevan a cabo presentación cruzada de antígenos de células apoptóticas [71]. Las células CD8⁻33D1⁺ son más eficientes en la presentación de antígenos por medio de MHC II [74]. Los ganglios linfáticos contienen dos tipos de DCs residentes que son CD11c^{hi}MHCII⁺ que se originan de progenitores CD8⁺CD205⁺ y CD8⁻CD11b⁺; también tienen DCs migratorias que provienen de otros tejidos, las que son transportadas por la linfa [83]; estas células transportan antígenos de tejidos periféricos desde la periferia a las DCs CD8⁺ en el ganglio linfático de drenaje para realizar la presentación cruzada de antígenos [84].

En la dermis hay dos subtipos de DCs, CD103⁺CD11b^{lo}Langerina⁺ y CD103⁻CD11b^{hi}Langerina⁻ [75]; las primeras participan en la respuesta a antígenos virales y auto-antígenos, mientras que la función de las células CD103⁻CD11b^{hi}Langerina⁻ aún no se conoce bien [85]. También existen células de Langerhans (CLs) que comparten muchas características con las DCs, incluyendo su morfología, capacidad de re-distribuir grandes cantidades del MHC II de su sistema endocítico a la superficie de la célula y la capacidad de estimular linfocitos T alogénicos *in vitro*, posterior a su activación (Fig. 9) [86, 87]. Estas células difieren de manera importante de las DCs en que son resistentes a la irradiación y que se renuevan *in situ*, y al igual que los monocitos y los macrófagos, su desarrollo depende del factor estimulante de colonias para macrófagos (M-CSF) [87].

En el intestino se han identificado tres subpoblaciones de DCs: células CD103⁺CD11b^{lo} en las placas de Peyer y en la lamina propia DCs CD103⁻CD11b^{hi} y CD103⁺CD11b⁺. Las células CD103⁺CD11b⁺ pueden transportar bacterias desde el tracto intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos; estas células

corresponden a las $CD8^+CD205^+$ del bazo [89]. En el pulmón, hígado y riñón se identifican dos subtipos de DCs: las $CD103^+CD11b^+$ y las $CD103^-CD11b^{hi}$ [90].

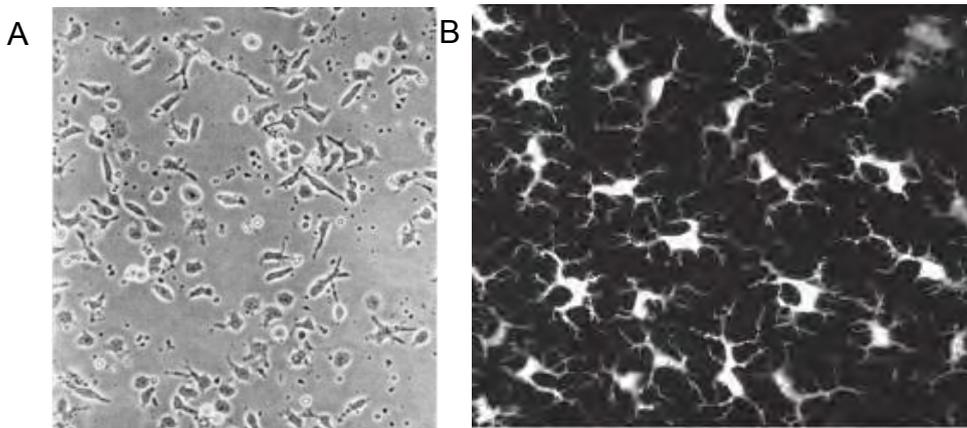


Figura 9. Comparación morfológica de las DCs y las CLs. Fotografía en contraste de fases de DCs obtenidas de bazo de ratón (A). Corte de epidermis en piel de oreja de ratones con la proteína verde fluorescente acoplada a Langerina (B).

Al igual que en la piel, en órganos no linfoides hay dos subtipos de DCs caracterizadas por la expresión de CD103 [90]. Hay estudios que sugieren que las DCs de tejidos no linfoides se originan de monocitos, sin embargo, expresan Flt3, un marcador ausente de monocitos [91]. Al igual que las DCs de órganos linfoides, las precursoras de las DCs (pre-DCs) también contribuyen al desarrollo de DCs $CD103^+$ en órganos no linfoides. Las DCs $CD103^-$ parecen ser heterogéneas en su origen; algunas se originan de pre-DCs y otras de monocitos.

8.3 Función de las células dendríticas en la respuesta inmune

La importancia de las DCs en la respuesta inmune radica en que son responsables de inducir una respuesta inmune primaria [92]. La entrada de un antígeno provoca una respuesta inflamatoria local, provocando una liberación de quimiocinas, las cuales atraen a DCs inmaduras en un lapso de una hora [93]. Las DCs inmaduras son muy eficientes en la captura de antígenos por varias vías, las cuales incluyen la fagocitosis mediada por receptores de tipo lectina-C, por

receptores tipo Fcγ de tipo I (CD64) y II (CD32), que permiten la internalización de fragmentos celulares resultado de procesos apoptóticos y necróticos causados por virus y bacterias, incluidas las micobacterias [94].

La exposición a los agentes microbianos induce cambios en las DCs que conducen a su maduración, caracterizada por la expresión de moléculas de presentación de antígeno, moléculas coestimuladoras, receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión, así como la pérdida de la capacidad para fagocitar partículas [95].

Existen numerosos factores que regulan la maduración de las DCs, como son las moléculas asociadas a patógenos como el lipopolisacárido (LPS) [96], DNA bacteriano [97], RNA de doble cadena [98], el balance de citocinas pro y anti-inflamatorias presentes en el microambiente celular [99] y señales derivadas de los linfocitos T [100]. Las DCs maduras activan a los linfocitos T vía sinapsis inmunológica compuesta por tres señales: la presentación de antígeno, interacción de moléculas de coestimulación y producción de citocinas, dando como resultado linfocitos T efectoras [101].

8.3.1 Migración de las células dendríticas

La migración de las DCs implica: la capacidad de las pre-DCs para salir de su lugar de origen y llegar al torrente sanguíneo; el reclutamiento de las células a los tejidos blanco; el alojamiento extravascular y la movilidad necesaria para obtener antígenos; la capacidad de entrar a los vasos linfáticos y dirigirse a los ganglios linfáticos o al torrente sanguíneo; y la capacidad de interactuar con linfocitos para poder presentarle antígenos a estos últimos [102].

Las pre-DCs que circulan por la sangre están en equilibrio con los precursores en órganos linfoides periféricos y tejidos. Estas células representan el 0.5% de los leucocitos en la médula ósea, 0.02% de los que hay en la sangre, 0.05% de los que hay en el bazo y 0.03% en los ganglios linfáticos [75], estos precursores se diferenciarán a DCs en los tejidos periféricos [103]

Cuando están localizadas en la piel, las DCs se abren paso a través del tejido conectivo por medio de metaloproteinasas de la matriz [104]; estas proteinasas pueden ser expresadas en la superficie de la célula, lo que le permite su movilidad gracias a la proteólisis localizada del tejido [105].

Para llegar a los ganglios linfáticos, las DCs expresan receptores de quimiocinas. Basado en el perfil de expresión de receptores de quimiocinas en las DCs, se ha propuesto que CCL22, CCL17, CCL20, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 juegan un papel importante en el reclutamiento de DCs inmaduras a sitios periféricos. La mayoría de estos receptores se expresan en las iDCs mientras que las mDCs expresan los receptores CCR7 y CXCR4, indicando que CCL19, CCL21 y posiblemente CXCL12 guían a las DCs de la zona de inflamación a la zona de los linfocitos T en el ganglio linfático [106].

8.3.2 Procesamiento y presentación de antígeno

Los antígenos son capturados por las iDCs y llevados a los lisosomas MHCII⁺, sin embargo, estas células no son eficientes para presentar el antígeno [107]. Las iDCs acumulan moléculas de MHC II en compartimentos intracelulares conocidos como compartimentos ricos en MHC II (MIICs). Los antígenos capturados son dirigidos a los MIICs que contienen HLA-DM el cual promueve la remoción del péptido CLIP del MHC II y promueve la unión de los péptidos a las

moléculas de MHC II [108]. Mientras que en las iDCs las moléculas del MHC II son internalizadas rápidamente y tienen una vida media corta, en las mDCs se aumenta su síntesis y translocación de los complejos péptido-MHC II a la superficie celular donde se mantienen estables durante días y se encuentran disponibles para su reconocimiento por linfocitos T CD4⁺ [109]. Las DCs pueden presentar antígenos intracelulares por medio del MHC I. Los péptidos antigénicos que se encuentran dentro de la célula son marcados por ubiquitinación, para ser degradados por en el proteasoma; estos péptidos son transportados por medio de la proteína transportadora asociada al procesamiento de antígenos (TAP) hacia el retículo endoplásmico, en donde se asocian con las moléculas de MHC I y β 2-microglobulina que están siendo producidas. Este complejo puede ser glicosilado y transportado a la superficie de la célula [110]. Se ha demostrado que las DCs son capaces de presentar antígenos externos por medio del MHC I, por medio de presentación cruzada [111], el cual se lleva a cabo por la vía independiente de la proteína TAP en la que los antígenos son hidrolizados en los endosomas [110] o por la ruta fagosome-citosol que es dependiente de TAP [113].

También se han identificado a la familia CD1 como moléculas presentadoras de antígeno; esta presentación se encuentra asociada a las respuestas de los linfocitos T hacia antígenos que contienen lípidos o glicolípidos. En humanos se han descrito cuatro proteínas (CD1 a-d) en las DCs mieloides, mientras que en ratón solo se ha identificado a CD1d [114]. En el retículo endoplásmico, después de ensamblarse con β 2-microglobulina, las cadenas pesadas de CD1b son transportadas a la superficie de la célula e internalizadas gracias a la interacción del complejo adaptador cubierto con clatrina AP-2 con la región citoplasmática la cual contiene tirosina. Posteriormente las moléculas

CD1b son transportadas al MHC, debido a la unión selectiva con el complejo AP-3, el cual es conocido por interactuar con proteínas residentes en el lisosoma [115]. CD1c y CD1d también contienen una región citoplasmática con tirosina, sin embargo, estas no se unen a AP-3 y se distribuyen en el sistema endocítico temprano, sin embargo algunas de estas moléculas pueden llegar a los lisosomas mediante rutas que no han sido establecidas. [116]. La región citoplasmática de CD1a carece de citocinas y dentro del sistema endocítico solo se expresa en los endosomas tempranos [117]. El tráfico de estas moléculas a la membrana disminuye cuando las DCs entran en estado de maduración [118].

En el proceso de presentación de antígeno se forma una compleja red de receptores/ligandos transmembranales que propician la activación de los linfocitos. En estas células CD28, ICOS, y CD40L tienen un papel importante. Al mismo tiempo los linfocitos expresan moléculas inhibitorias como CTLA-4 o PD-1 que disminuyen esta activación [119].

La expresión de moléculas de coestimulación en las DCs define el tipo de respuesta que tendrán los linfocitos activados. Entre las moléculas que producen las DCs se encuentran CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD83 y CD40. El nivel de expresión de estas moléculas puede jugar un papel importante durante el curso de la enfermedad, por lo tanto, la modulación de estas moléculas por los patógenos puede ayudar a su supervivencia (Fig. 10) [120].

El tipo de citocinas que se producen en la activación de los linfocitos T, define el tipo de respuesta que estos tendrán en la infección. En mDCs se observa la producción de citocinas como TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ , IL-8, MDC, RANTES e IL-6 [121]. Se ha descrito que la producción de citocinas pro-inflamatorias inducen una respuesta del tipo efectora en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ [122].

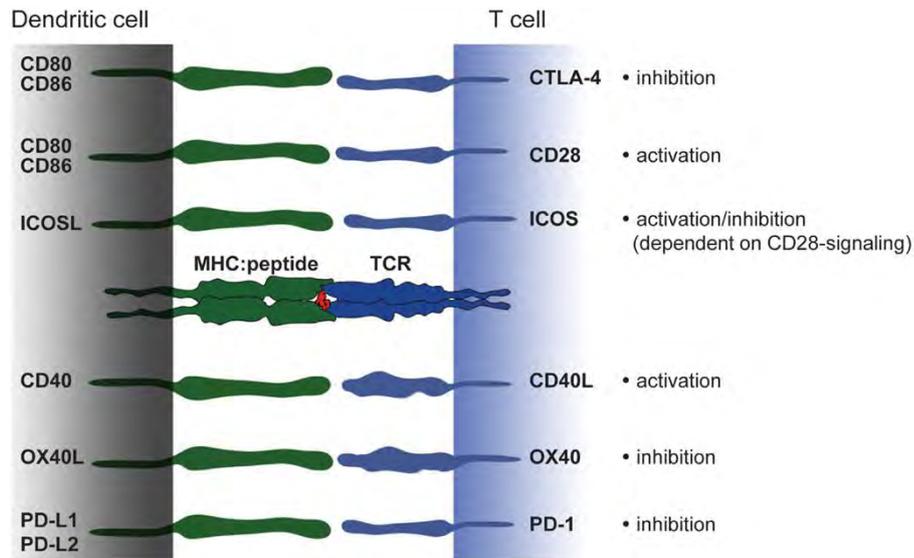


Figura 10. Moléculas coestimuladoras expresadas en la superficie de las DCs. La modulación de la activación de los linfocitos T está mediada por la interacción de moléculas coestimuladoras en las DCs.

8.4 Células dendríticas en la tolerancia inmunológica

Además de tener un papel importante en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa, las DCs pueden adquirir un perfil tolerogénico (tDCs) el cual está definido por diversos factores como IL-10, TGF- β , prostaglandina E2 o Vitamina D3. Estas células pueden prevenir, inhibir o modular las respuestas efectoras mediadas por los linfocitos T a través de una variedad de mecanismos como la producción de factores anti-inflamatorios que son capaces de atenuar los efectos de la respuesta inmune inducida o mediante la activación de linfocitos T reguladores (Fig 11) [123, 124]. En contraste a su papel en la inmunidad innata, no se ha comprendido del todo el papel de las DCs en la tolerancia.

Se ha propuesto que las DCs tienen un papel en la tolerancia central en la presentación de autoantígenos en la selección negativa de timocitos, mediante la presentación cruzada de antígenos adquiridos de las células epiteliales tímicas, las cuales expresan proteínas tejido-específicas. [125]. Otro mecanismo es mediante el reclutamiento de DCs periféricas en el timo, las cuales presentan

auto-antígenos para provocar la delección clonal o la generación de linfocitos T reguladores (Tregs) [126].

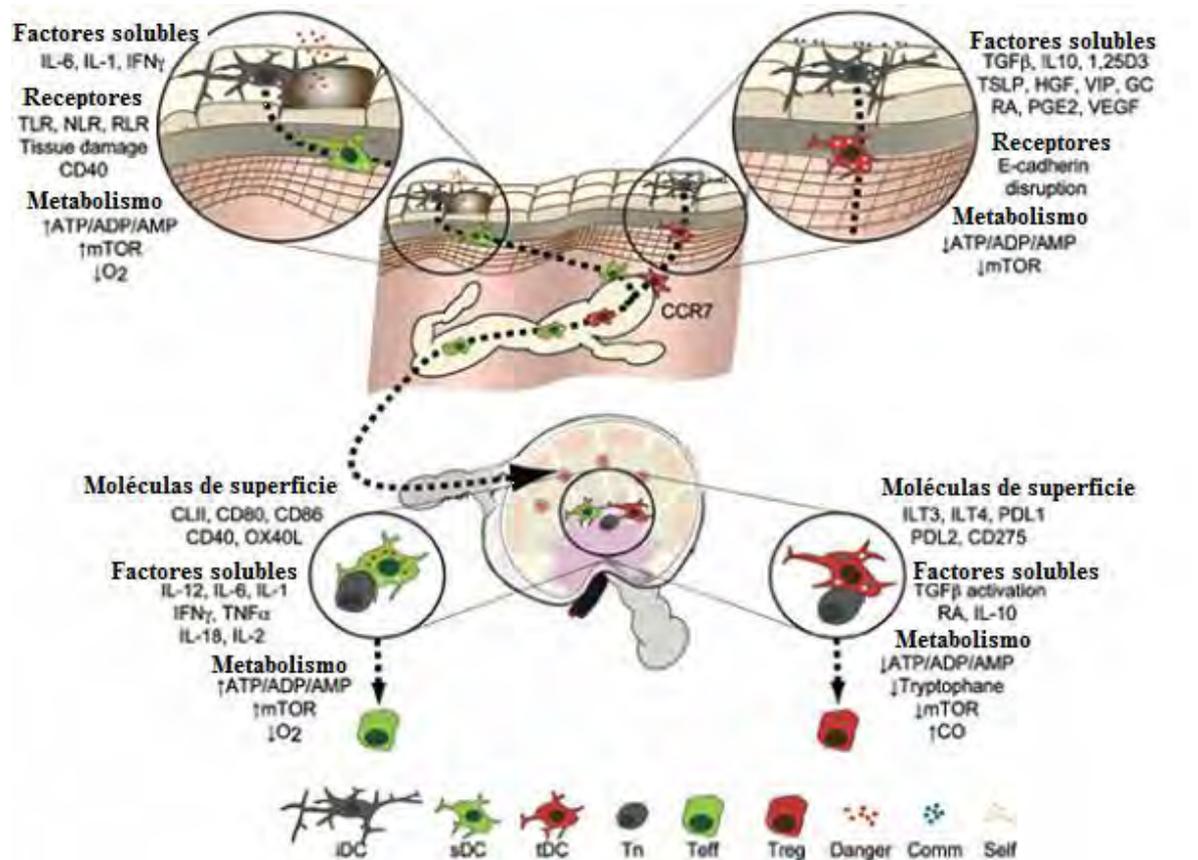


Figura 11. Señales de inducción de las DCs a perfiles inmuno-génicos o tolerogénicos. A través de la unión de receptores por componentes de microorganismos, el ambiente de citocinas, o cambios en la abundancia de ciertos metabolitos, las DCs maduran a mDCs que migran a los nódulos linfoides por medio de CCR7, a través de los procesos de presentación de antígeno, estas células inducen la activación de los linfocitos T efectores. Por otro lado, la presencia de citocinas anti-inflamatorias en combinación con niveles regulares de metabolitos induce la diferenciación a tDCs, las cuales migran a los ganglios linfáticos por medio de CCR7, en donde pueden inducir la producción de linfocitos T reguladores (Tregs).

Como parte de su función tolerogénica, las DCs son capaces de mediar la homeostasis de las Tregs en la periferia. Se ha demostrado que las tDCs pueden inducir linfocitos Tregs *in vitro*, especialmente si se combinan con un fuerte estimulador de las Tregs como el TGF- β y el ácido retinoico [127]. La contribución de las DCs al mantenimiento de las Tregs es mediado por las moléculas coestimuladoras CD80/CD86 expresadas en las DCs [128]. Por otro lado, el

número de DCs en circulación puede incrementar una vez que hay un decremento de las Tregs, lo que sugiere que estas células también participan en el control de las DCs [129]. Se ha demostrado que las DCs tolerogénicas expresan tanto la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa cuya función es convertir el triptófano en L-kinurenina [130] la cual se encuentra producida en sitios inmunológicamente privilegiados como en ojos o en la placenta [131], así como sCD25, descrito como la subunidad alfa del receptor de IL-2 [132]. Se ha sugerido un papel importante de esta molécula en el establecimiento de la tolerancia por parte de las DCs, sin embargo, aún no se ha establecido el mecanismo por el cual sCD25 participa en el control de la respuesta inmune. Se ha sugerido que sCD25 al ser secretado por las DCs podría secuestrar a IL-2 en el medio para suprimir la proliferación de los linfocitos T [133].

9. Las células dendríticas en la tuberculosis

Las DCs son capaces de fagocitar a Mtb, y antígenos micobacterianos [134], dando lugar a cambios morfológicos y funcionales en estas células. Junto con los macrófagos, las DCs localizadas en la tráquea son las primeras en encontrarse con la bacteria. Se han descrito varios receptores implicados en el reconocimiento de la bacteria por las DCs como el receptor de manosa, CD11b y DEC-205 [135]; sin embargo, el receptor principal que se encarga de reconocer a la bacteria es un receptor tipo C-lectina denominado molécula no-integrina de adhesión intercelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) [136]. Este receptor reconoce a las manLAMs y esta interacción le permite a las DCs discriminar entre especies del género *Mycobacterium spp.* [137]. La interacción de estos azúcares con DC-SIGN interrumpe la maduración de las DCs inducida por LPS e induce la producción de

IL-10 [138]. Adicionalmente a la interacción con DC-SIGN, otros componentes de Mtb como el LAM, la proteína de 19 kDa y el DNA no metilado pueden interactuar con TLRs [139, 140, 141]. La activación de estos receptores por componentes del bacilo, resulta en la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), seguido de la secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas, así como un incremento en la expresión de moléculas de presentación de antígeno y moléculas coestimuladoras [142] y la disminución en la expresión de la molécula CD1 [143].

El bacilo puede sobrevivir dentro de las DCs. Esta persistencia se encuentra asociada con la localización del bacilo dentro de vacuolas que muestran características de una célula inmadura, sin embargo, esto limita su comunicación con la célula, privándola de nutrientes esenciales para su replicación como el hierro y el colesterol [144].

III. JUSTIFICACIÓN

M. tuberculosis ha desarrollado mecanismos de defensa que le permiten evadir la respuesta inmune, algunos de los cuales están asociados a factores de virulencia ubicados en la pared micobacteriana. Entre estos se encuentran los glicolípidos, que al interactuar con las células del hospedero inhiben su función protectora. Estudios previos en el laboratorio han demostrado que los glicolípidos Di-O-acil trehalosa y Tri-O-acil trehalosa inhiben en macrófagos la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible y la producción de óxido nítrico, arma efectora importante del sistema inmune. Las DCs comparten características fenotípicas y funcionales con los macrófagos, es por ello que creemos que estas células podrían verse afectadas por la Di-O-acil trehalosa. Este estudio se enfocó a estudiar el efecto de la Di-O-acil trehalosa sobre la maduración de las células dendríticas.

IV. HIPÓTESIS

El glicolípido micobateriano DAT inhibe la maduración de las células dendríticas.

V. OBJETIVOS

General

Estudiar los efectos de DAT sobre la maduración de las células dendríticas.

Particulares

- Purificación de DAT
- Desarrollar un protocolo para la obtención de células dendríticas inmaduras a partir de células de la médula ósea de ratón
- Estudiar del efecto del DAT sobre las células dendríticas analizando:
 1. El porcentaje de células que expresan moléculas de presentación de antígeno y moléculas coestimuladoras.
 2. Producción de citocinas pro y anti-inflamatorias.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Purificación de DAT

Por razones de seguridad biológica y de rendimiento se utilizó la cepa saprófita *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, que expresa DAT con una estructura e inmunogenicidad muy semejante al de Mtb [66,67]. La cepa fue cultivada en medio Sauton a 37°C durante dos semanas; transcurrido ese tiempo, los cultivos fueron esterilizados con calor húmedo y se recuperó la biomasa mediante filtración utilizando papel filtro. Los glicolípidos totales fueron extraídos incubando la biomasa con una mezcla de cloroformo/metanol (JT Baker Center Valley, PA, USA) (1:2, vol/vol) durante 4 días a temperatura ambiente; posteriormente se recuperó la biomasa por filtración, el solvente filtrado fue recuperado en un matraz y el solvente fue evaporado en un rotavapor a 70°C. La biomasa recuperada se trató con cloroformo/metanol (2:1, vol/vol) durante 1 día a temperatura ambiente, se recuperó el solvente por filtración y el exceso fue evaporado con un rotavapor a 70°C. Los lípidos solubilizados se juntaron y se les sometió a un lavado de Folch con la finalidad de eliminar cualquier residuo acuoso, solubilizando los lípidos en una mezcla de cloroformo/metanol/agua (4:2:1 vol/vol/vol). La separación de la fase acuosa y la fase orgánica se realizó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se recuperó la fase orgánica que es en donde se encuentran los glicolípidos.

Para purificar a DAT, el extracto lipídico se disolvió en cloroformo y se aplicó a una columna de vidrio empacada con Florisil (Biotecna Corp., Miami, FL, USA); (de Fluorisil se utilizan 30 veces el peso del lípido). Los lípidos fueron obtenidos de la columna eluyendo el extracto lipídico total con cloroformo y metanol a diferentes proporciones (100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12 y 86:14); el fraccionamiento de los lípidos fue monitoreado mediante una cromatografía en

capa fina (CCF) en placas de Silica-gel 60 F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany). La CCF se realizó con cloroformo/metanol/agua (60:16:2 vol/vol/vol) como fase móvil. Los lípidos se visualizaron en la placa con antrona al 2% en H₂SO₄, seguido de calentamiento a 110°C. Las trehalosas aciladas aparecen como lípidos positivos a la reacción con antrona, expresado en manchas de color azul y con un tiempo de retención (Rf) de 0.37 para DAT [66]. Las fracciones con los lípidos de interés se juntaron y se filtraron en una segunda columna de vidrio empacada con Fluorisil, cuya cantidad fue nuevamente calculada de acuerdo al peso del lípido obtenido. La elución se realizó utilizando cloroformo/metanol a diferentes proporciones (98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12 y 86:14). Las fracciones enriquecidas con DAT se corrieron en una placa de cromatografía preparativa en placas de sílica-gel 60 con un grosor de 0.5 mm (E. Merck, Darmstadt, Germany). Las placas se revelaron con Rodamina al 0.01% y fueron expuestas a luz UV. Las trehalosas aciladas fluorescen con la luz UV. Una vez identificados en la placa, los lípidos fueron recuperados por raspado y la sílica fue eliminada por filtración. La rodamina fue eliminada en una columna de Florisil y los lípidos obtenidos se analizaron por CCF.

Las fracciones obtenidas se caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en un espectrómetro Vector 33 FTIR (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), equipado con un módulo de reflexión total atenuada (ATR). Cerca de 0.5 mg de la muestra se disolvió en 200 µl de cloroformo/metanol (9:1 vol/vol) y se colocó en la celda ATR, La medición del espectro de absorción se llevó a cabo en un intervalo de número de onda ($\tilde{\nu}$) de 4000-450cm⁻¹. La ausencia de endotoxinas en las fracciones de DAT se investigó

por la prueba del lisado de amebocitos de Lymulus (LAL) (Lonza Anaheim, CA, USA).

2. Obtención de DCs inmaduras a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6L

Las DCs se obtuvieron de los fémures y tibias de ratones hembra de la cepa C57BL/6L. Se extrajo la médula ósea con una jeringa utilizando medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor a 56°C (medio completo) (Gibco BAL Products USA); las células se colocaron en cajas de cultivo con medio completo, 0.023 mM de bicarbonato de sodio, 10 mM HEPES, 50 µM 2-mercaptoetanol y 20 µg/ml sulfato de gentamicina (Gibco BRL Products, Rockville MD) y se cultivaron toda la noche a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente las células se recolectaron mediante un pipeteo suave y fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 mins, el sobrenadante fue desechado; las células recuperadas se contaron con azul tripano. Enseguida se colocaron 20x10⁶ células en cajas petri con medio completo suplementado como se describió anteriormente; adicionalmente se agregaron 1000 U/ml de GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) y las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Al tercer día se adicionó a las células 10 ml de medio suplementado con 2000 U/ml de GM-CSF continuándose con la incubación a 37°C con 5% de CO₂. Al sexto día se recuperaron las células raspando suavemente las placas y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 mins para eliminar el exceso de medio. Se analizó la diferenciación de las células por citometría de flujo en un citómetro FACS Calibur (Beckton Dickinson) (San Diego, CA, USA), utilizando un mAb contra CD11c (PE, Biolegend, San Diego CA, USA). La viabilidad de las DCs se verificó con azul tripano. Por citometría de flujo se

investigó la apoptosis y necrosis utilizando mAbs anti-Anexina V (FITC, Biolegend, San Diego CA, USA) y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) (Biolegend) por protocolos estándares [145].

3. Ensayos para estudiar el efecto del DAT sobre la maduración de las células dendríticas

Para estudiar el efecto del DAT sobre la maduración de las DCs, los lípidos fueron disueltos en hexano/etanol (1:1 vol/vol) y se agregaron 0.1, 1 y 10 µg de DAT en cajas de cultivo de 24 pozos y el solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó a los pozos un volumen de 500 µl de medio completo, al cual se adicionaron 5×10^5 DCs obtenidas a los 6 días de cultivo y se incubaron durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Como control positivo, las DCs fueron tratadas con 1µg de LPS. (*E. coli* B55:05; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Al siguiente día se midió el porcentaje de células que expresan moléculas de presentación de antígeno y moléculas coestimuladoras por citometría de flujo. Los mAbs utilizados fueron:

mAb α-	Fluorocromo	Clona	Proveedor
MHC I	Alexa Fluor 647	AF6-88.5	Biolegend
MHC II	PE	M5/114.15.2	Biolegend
CD40	PE/Cy5	3/23	Biolegend
CD80	PerCP/Cy5.5	16-10A1	Biolegend
CD83	APC	Michel-9	Biolegend
CD86	APC	GL-1	TONBO biosciences (San Diego CA, USA)
CD25	PE/Cy7	PC61	Biolegend

4. Efectos de DAT sobre la producción de citocinas por las DCs

Para estudiar el efecto de DAT sobre la producción de citocinas en DCs, se cuantificó la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 y de las citocinas pro-inflamatorias IL-12, TNF-α e IFN-γ, mediante ELISA (Biolegend, San Diego, CA,

USA). Debido a que la producción de citocinas es un fenómeno dinámico, se obtuvieron los sobrenadantes a las 6 y 24 h de células no tratadas (5×10^5 DCs), células tratadas con DAT (10 μ g de DAT por 5×10^5 DCs) y células tratadas con LPS (1 μ g de LPS por 5×10^5 DCs) y para determinar el efecto de DAT sobre la producción inducida por LPS, las células se trataron simultáneamente con LPS y DAT.

5. Análisis estadístico

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

VII. RESULTADOS

1. Purificación de DAT

Transcurrido el tiempo de incubación de la bacteria en medio Sauton; se recuperó la biomasa obtenida de crecer la bacteria en 4 lts de medio de cultivo. Al solubilizar los lípidos totales de la biomasa con cloroformo/metanol, se recuperaron 12.86g de lípidos totales, los cuales se redujeron a 8.88g al eliminar los residuos acuosos de esta extracción con el lavado de Folch. El extracto fue eluído con una mezcla de solventes de polaridad creciente en una columna de vidrio empacada con Fluorisil; la elución fue monitoreada mediante CCF. En las placas reveladas con antrona/H₂SO₄ se observó que en las fracciones eluidas con cloroformo/metanol 90:10 a 88:12 aparecen manchas de color azul que representan compuestos con azúcares en su estructura; además, su movilidad en la placa mostró que estos compuestos tienen un valor R_f de 0.37, lo cual sirvió de criterio para identificarlos tentativamente como DAT (Fig. 12A). Estas fracciones se juntaron y se volvieron a eluir en una segunda columna de vidrio con Fluorisil; el monitoreo realizado por CCF muestra nuevamente manchas de color azul positivas a la antrona/H₂SO₄, con un valor R_f de 0.37, además de una reducción importante de impurezas que se encontraban en el extracto original (Fig. 12B), la cantidad de lípidos recuperados hasta este punto es de 1.437g.

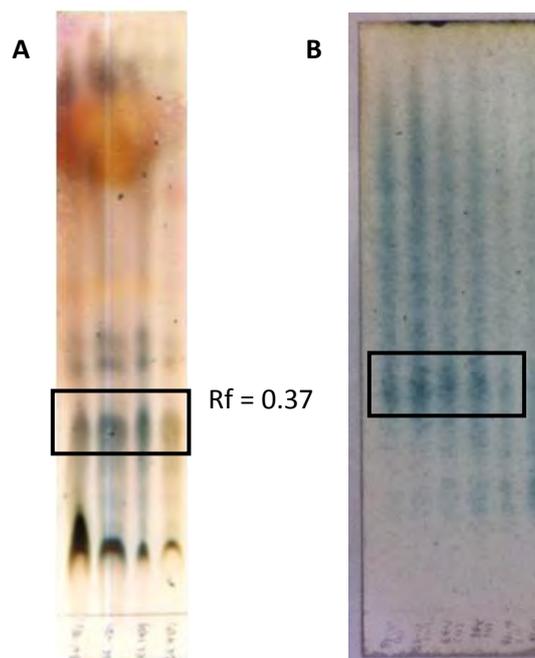


Figura 12. Enriquecimiento de DAT por cromatografía en columna. Cromatografía en capa fina de la elución del extracto lipídico total obtenido de *M. fortuitum* (A). Cromatografía en capa fina de la elución de las fracciones enriquecidas con DAT. (B), en ambos casos se observan manchas positivas a la reacción antrona/H₂SO₄ con un Rf de 0.37.

Las fracciones enriquecidas con DAT se corrieron en placas de CCF preparativas, estas fueron reveladas con rodamina la cual tiñe a los glicolípidos de color rosa (Fig. 13A) y emiten fluorescencia al ser expuestos a la luz UV. Una vez que se identificó a DAT en la placa, se raspó la sílica en la región donde se encontraba DAT; al eliminar la sílica y la rodamina se recuperaron en total 0.483g de DAT divididos en cuatro fracciones; una muestra de éstas se aplicaron a una placa de CCF. Al revelar con antrona/H₂SO₄, se obtuvieron compuestos únicos que reaccionan a este compuesto y con un Rf de 0.37 (Fig. 13B).

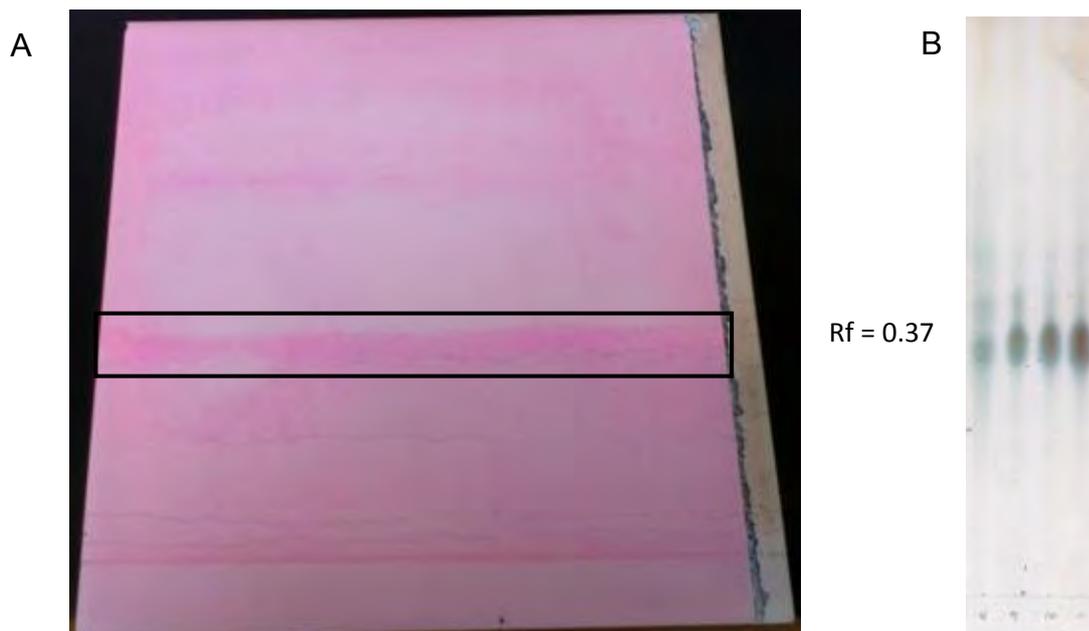


Figura 13. Purificación de DAT con placas de cromatografía preparativas. Placa de silica-gel revelada con rodamina la cual muestra la localización de DAT (A). Cromatografía en capa fina del DAT purificado donde se observa el corrimiento de cuatro eluciones hechas con cloroformo/metanol para eliminar la rodamina (aplicadas en distintos carriles), al revelar la placa se observan manchas positivas a la reacción antrona/ H_2SO_4 con un Rf de 0.37 (B).

Finalmente, se caracterizó a DAT mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El espectro obtenido (Fig. 19) muestra bandas características a con un valor de $\tilde{\nu}$ de 3320 cm^{-1} que indican la presencia de enlaces oxígeno-hidrógeno en los grupos hidroxilo (-OH) en los compuestos azucarados de DAT. Las bandas con un $\tilde{\nu}$ de 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} fueron asignadas a los grupos alifáticos metileno (-CH₂-) y metilo (-CH₃) respectivamente. El pico localizado al $\tilde{\nu}$ de 1647 cm^{-1} indica la presencia de grupos ester-carboxilo (-CO-O-). Finalmente, la banda que caracteriza a las trehalosas aciladas se encuentra en la región que va del valor de $\tilde{\nu}$ 1500 a 500 cm^{-1} (Fig. 14). Finalmente, el lote obtenido de DAT fue analizado para descartar la presencia de endotoxinas mediante la prueba de LAL; el nivel de endotoxinas fue indetectable.

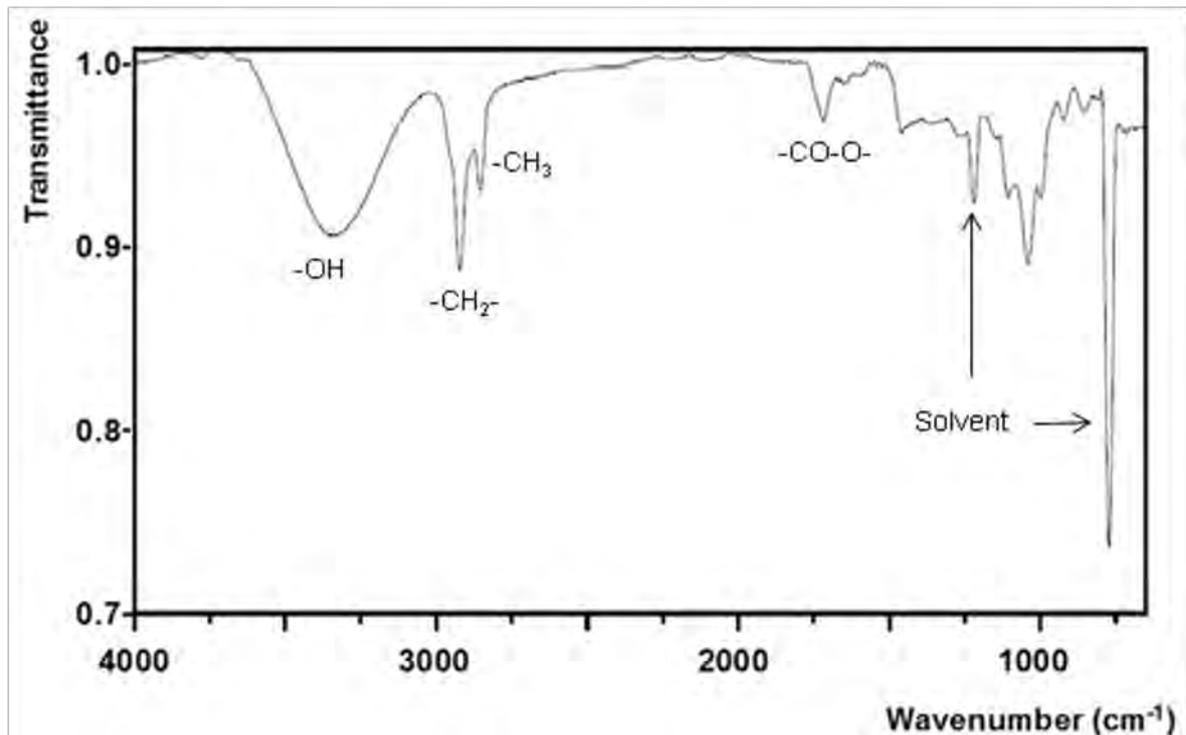


Figura 14. Caracterización de DAT mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. El espectro obtenido muestra bandas a una $\tilde{\nu}$ de 3320 cm^{-1} , característicos de grupos hidroxilo (-OH); hay bandas de absorción a una $\tilde{\nu}$ de 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} que corresponden a los grupos alifáticos metileno (-CH₂-) y metilo (-CH₃). La banda con una $\tilde{\nu}$ de 1647 cm^{-1} indica la presencia de grupos ester-carboxilo (-CO-O-). En la región de con valores de $\tilde{\nu}$ de $1500\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$ se obtienen bandas características de las acil trehalosas.

2. Obtención de cultivos de células dendríticas inmaduras

Para obtener los cultivos de iDCs necesarias para realizar este trabajo, se utilizó el protocolo descrito por Inaba y col [146], basado en el uso de GM-CSF para diferenciar iDCs a partir de células de médula ósea de ratón; se realizaron modificaciones menores con el objetivo de optimizar el rendimiento de los cultivos. Se utilizaron cajas petri de baja adherencia lo que facilita la remoción de las células. Así, se obtuvieron 13×10^6 iDCs por cada 20×10^6 células de médula ósea sembradas (rendimiento del 65%). Con este protocolo se obtuvieron células que a los 6 días de cultivo mostraban una morfología microscópica característica de

DCs, con prolongaciones citoplásmicas de tipo dendrita, las cuales forman agregados que no están adheridos a las cajas de cultivo (Fig. 15).

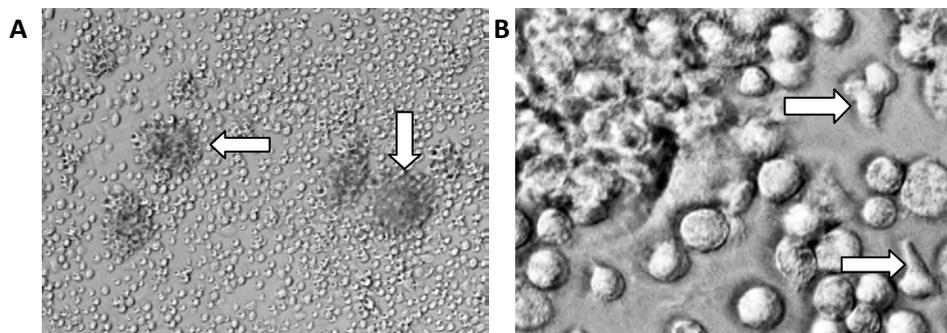


Figura 15. Morfología microscópica de cultivos celulares de iDCs. (A) A los 6 días de cultivo las células forman agregados que no están adheridos a la caja de cultivo (flechas) (10X). (B) A mayor aumento se pueden observar células con prolongaciones citoplásmicas de tipo dendrita en el citoplasma (flechas) (60X).

La caracterización fenotípica de las iDCs se realizó a los 6 días de cultivo determinando el porcentaje de expresión de CD11c y MHC II por citometría de flujo (Fig. 16A-16B); analizando la población total de células, el análisis demostró una expresión del 70%-80% de CD11c y 60%-70% de MHC II (Fig. 16C).

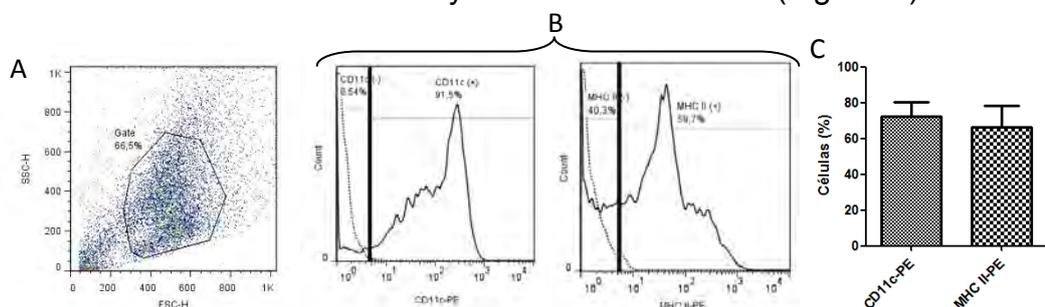


Figura 16. Diferenciación de las iDCs a los 6 días de cultivo. Por citometría de flujo se evaluó el porcentaje de células que expresan CD11c (PE) y MHC II (PE) en trece experimentos realizados por duplicado; el análisis se realizó a partir de la población más concentrada de células (Gate) (A); ajustando con un control de auto fluorescencia (línea punteada) (B), se determinó que el porcentaje de células que expresan CD11c y de MHC II; teniendo un alto porcentaje de células que expresan CD11c y MHC II. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (C).

3. Efecto de DAT sobre la maduración de las células dendríticas

Para conocer el efecto de DAT sobre la maduración de las DCs, se realizaron dos experimentos piloto para determinar la cantidad óptima de lípido a utilizar. Por

citometría de flujo se evaluó el porcentaje y la expresión de moléculas de presentación de antígeno MHC I y MHC II. Los pozos se recubrieron con 0.1, 1, y 10µg DAT disueltos en hexano/etanol (1:1 vol/vol) y se utilizó 1 µg de LPS y el solvente como controles. Después de que se evaporó el solvente y se añadieron a los pozos 500 µl de medio RPMI y 5×10^5 iDCs y se incubaron durante 24 h. Por citometría de flujo se determinó el porcentaje y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de MHC I y MHC II en las DCs (Fig. 17). Los resultados mostraron que ninguna de las concentraciones de DAT tuvieron un efecto aparente sobre el porcentaje de DCs que expresan MHC I y MHC II (Fig. 18A). Al medir la IMF se encontró que 0.1µg de DAT no disminuyó la IMF de MHC I y MHC II; al utilizar 1µg de DAT la IMF de MHC I y MHC II disminuyó; con 10 µg de DAT también hubo una disminución de la IMF de MHC I y MHC II (Fig. 18B). En vista de estos resultados se decidió utilizar 10 µg de DAT en los experimentos subsecuentes.

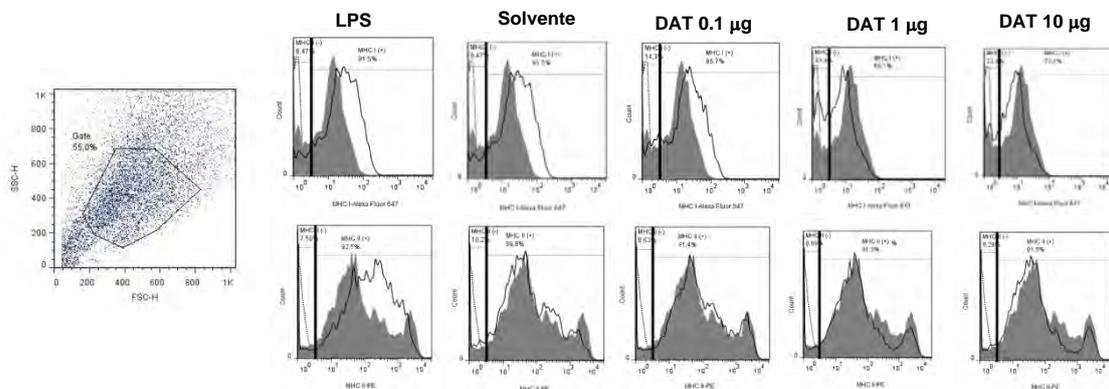


Figura 17. Análisis del efecto de la concentración del DAT sobre la expresión de las moléculas de MHC I y II en iDCs. A los 6 días de cultivo las iDCs se incubaron durante 24 h con 0.1, 1 y 10µg de DAT. Por citometría de flujo se analizó el efecto de DAT sobre la expresión de MHC I y MHC II; el análisis se realizó a partir de la población más concentrada de células (Gate). Línea punteada = Control de autofluorescencia, Área sombreada = Células sin tratamiento.

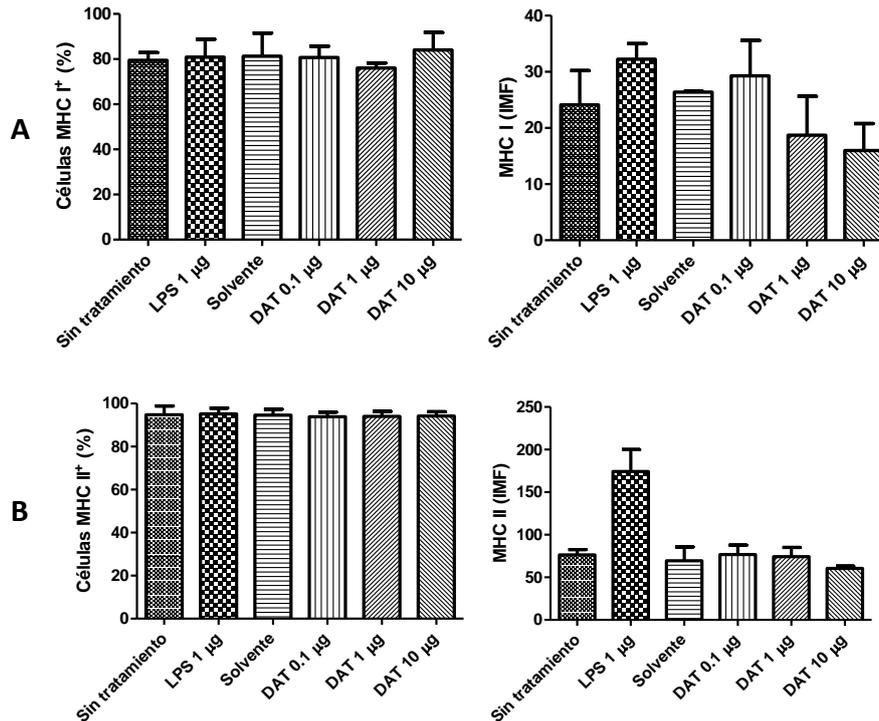


Figura 18. Efecto de la concentración del DAT sobre la expresión de moléculas de MHC I y II en iDCs. A partir del análisis por citometría de flujo se determinó el porcentaje de células que expresan MHC I y MHC II (A), la IMF se determinó en la población MHC I⁺ y MHC II⁺ (B). Los resultados están expresados como media \pm SEM.

El efecto de DAT sobre la maduración de las iDCs se evaluó utilizando 10µg de DAT en las mismas condiciones de incubación. A las 24 h de incubación se midió por citometría de flujo el efecto de DAT sobre el porcentaje de células que expresan las moléculas de presentación de antígeno MHC I y MHC II, así como las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83, CD86 y CD25, a partir de las células positivas a la expresión de estas moléculas se determinó la IMF de estas moléculas (Fig. 19A). Así mismo, se estudió el efecto que tiene DAT sobre la maduración inducida por LPS; el cual ha demostrado inducir la maduración de las DCs [65].

Los resultados muestran que DAT disminuye de manera significativa el porcentaje basal de células que expresan MHC I (*P=0.0104). Al analizar la IMF de la población MHC I⁺, se observó que DAT redujo significativamente la

expresión de MHC I (*P=0.0138), y redujo la expresión inducida por LPS (*P=0.0103) (Fig. 19B). En el caso de MHC II se observó que DAT disminuyó de manera significativa el porcentaje de células que expresan MHC II inducidas con LPS (*P=0.0237). Al analizar la IMF se observó que DAT disminuyó significativamente la expresión inducida por LPS de esta molécula (**P=0.0092) (Fig. 19C).

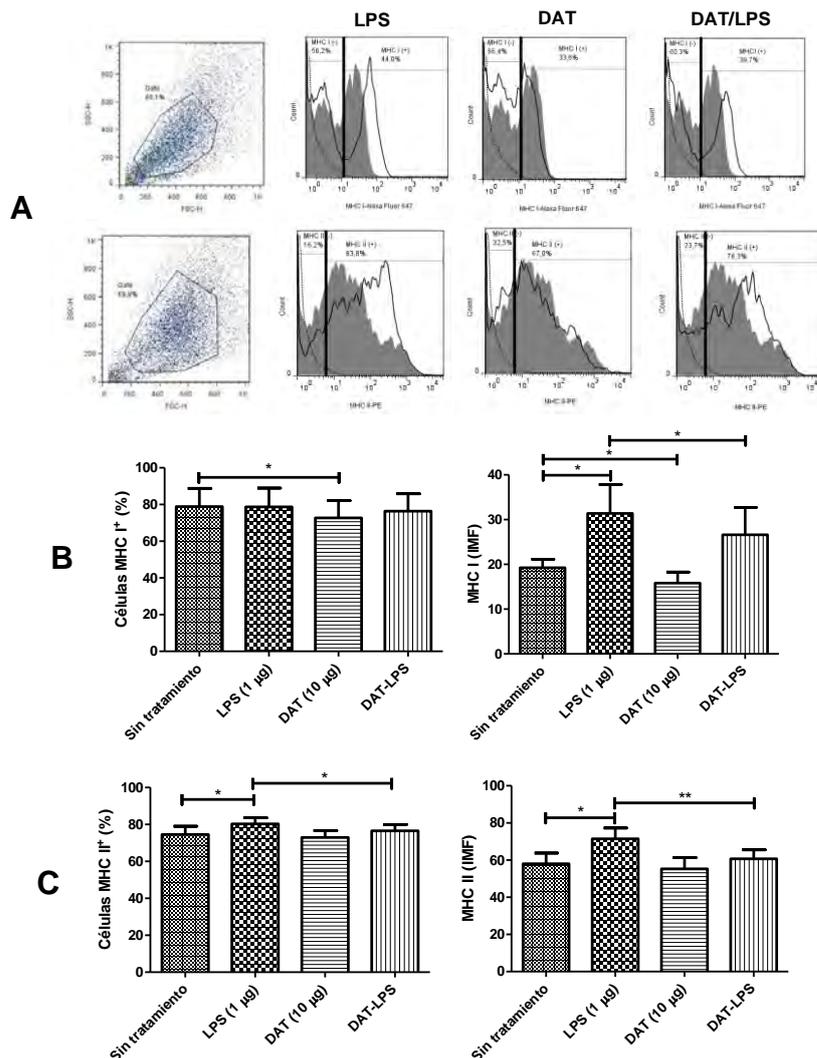


Figura 19. Efecto de DAT sobre la expresión basal e inducida por LPS de MHC I y II en DCs. Por citometría de flujo se evaluó el porcentaje de células que expresan MHC I y MHC II a partir de la población más concentrada de células (Gate). Línea punteada = Control de autofluorescencia, Área sombreada = Células sin tratamiento (A). En cinco experimentos realizados por duplicado se determinó, que DAT disminuyó el porcentaje de células que expresan MHC I a nivel basal; en cuanto a la IMF, se observó una disminución de la expresión basal y de inducida por LPS (B). DAT también disminuyó el porcentaje de células que expresan MHC II inducido por LPS y también disminuyó la IMF inducido por LPS (C). Análisis por *t Student* pareada, $P < 0.05$; los datos se expresan como media \pm SEM.

En cuanto a las moléculas coestimuladoras, se observó que DAT disminuye significativamente el porcentaje de células que expresan CD40 inducidas por LPS (*P=0.0339). DAT también disminuyó de manera significativa la IMF inducido por LPS de CD40 (P=0.0481) (Fig. 20B). El DAT no tuvo efecto sobre el porcentaje de células que expresan CD80, sin embargo DAT disminuyó significativamente la IMF inducido por LPS (*P=0.0107) (Fig. 20C). Por otra parte, DAT no tuvo efecto sobre el porcentaje de células que expresan CD83, tanto en la expresión basal como en la inducida por LPS, sin embargo, la IMF disminuye significativamente en células tratadas con LPS (P=0.0490) y en células tratadas con DAT (P=0.0388) (Fig. 20D). DAT no tuvo efecto sobre el porcentaje de células que expresan CD86 tanto a nivel basal como la inducida por LPS, sin embargo, disminuyo significativamente la IMF basal (*P=0.0473) e inducido por LPS (P=0.0126) (Fig. 20E).

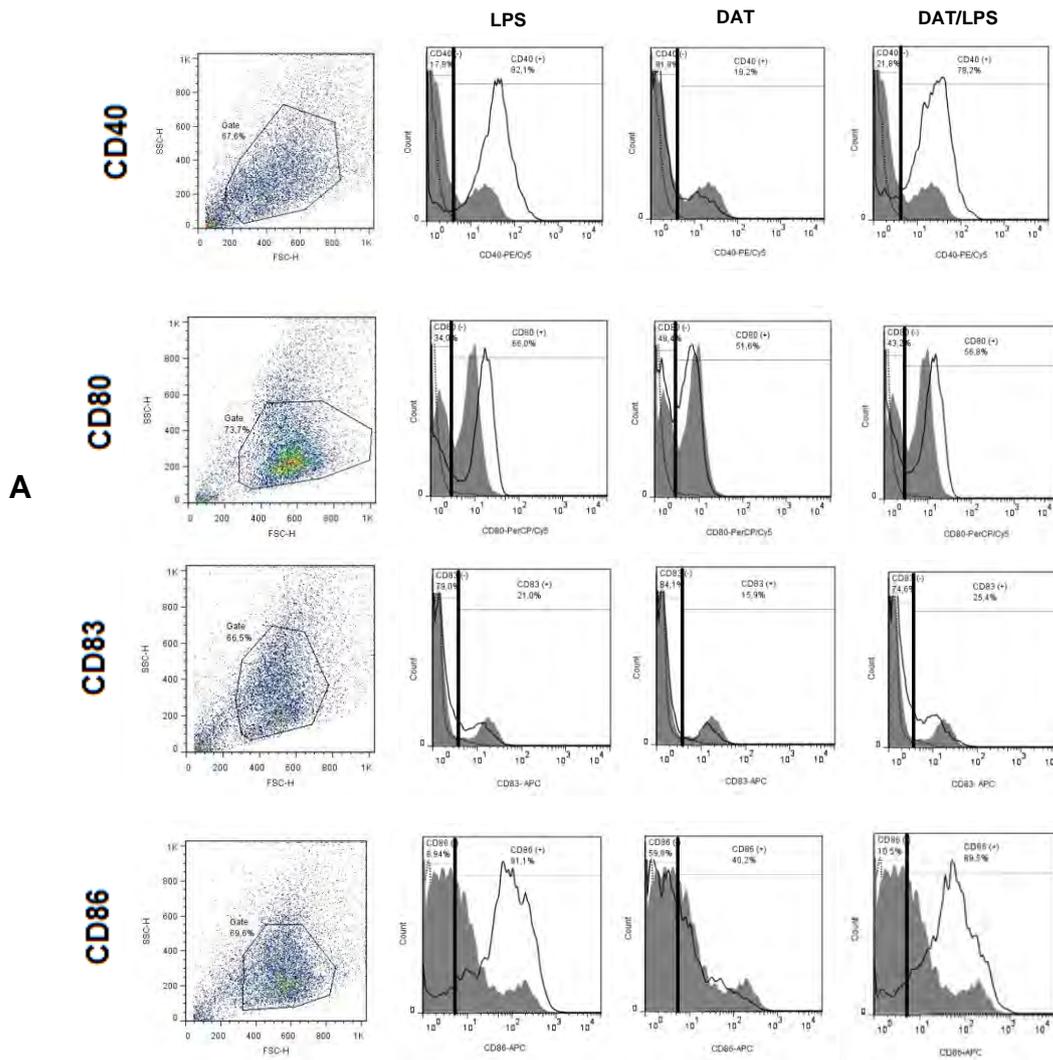


Figura 20. Efecto de DAT sobre la expresión basal e inducida de moléculas coestimuladoras en DCs. Por citometría de flujo se analizó la población más concentrada de células (Gate). Línea punteada = Control de autofluorescencia, Área sombreada = Células sin tratamiento.

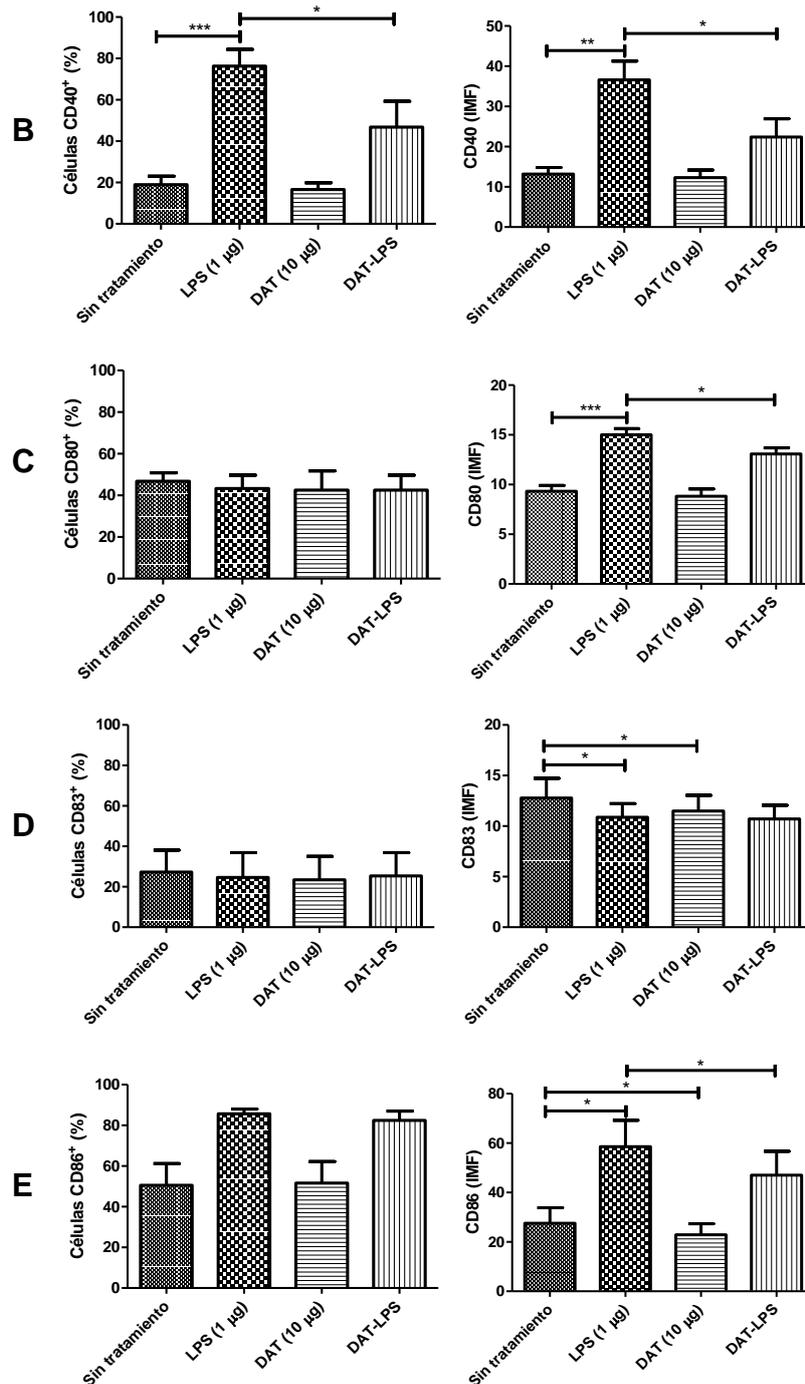


Figura 20. Efecto de DAT sobre la expresión basal e inducida de moléculas coestimuladoras en DCs. En cinco experimentos realizados por duplicado, se determinó que DAT disminuyó el porcentaje de células que expresan CD40 inducida con LPS; así como la IMF (B). DAT disminuyó la IMF de CD80 inducido por LPS (C). DAT también disminuyó la IMF basal de CD83 (D). El porcentaje de células que expresan CD86 no se ve afectada por DAT, sin embargo disminuye la IMF basal e inducida por LPS (E). Análisis por *t Student* pareada $p < 0.05$. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

Finalmente se realizaron estudios preliminares para evaluar el efecto de DAT sobre la expresión membranal de CD25, la cual se ha propuesto que tiene importancia en la activación de linfocitos T efectores [147], los resultados muestran que el porcentaje de células que expresan CD25 aumenta cuando están expuestas a LPS, de la misma forma la IMF de esta molécula aumenta en estas células. DAT disminuyó el porcentaje de células que expresan CD25 de manera basal; además DAT disminuyó tanto el porcentaje como la IMF de células que expresan CD25 inducidas por LPS (Fig. 21).

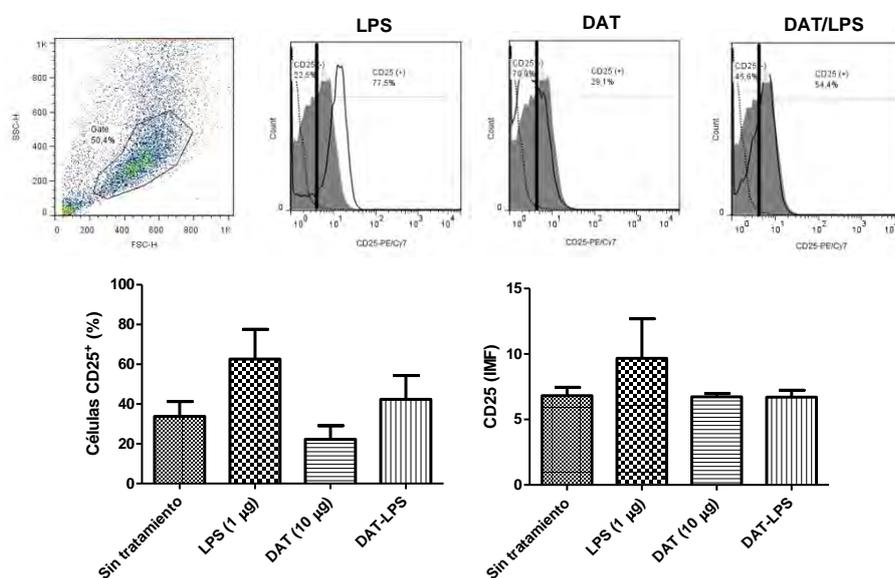


Figura 21. Efecto de DAT sobre la expresión basal e inducida de CD25 en la membrana de las DCs. Por citometría de flujo se analizó la población más concentrada de células (Gate). Línea punteada = Control de autofluorescencia, Área sombreada = Células sin tratamiento (A). En dos experimentos realizados por duplicado, se determinó que DAT disminuyó el porcentaje de células que expresan CD25 de manera basal e inducida por LPS, además DAT disminuye la IMF de CD25 en células cuya maduración fue inducida por LPS. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

4. Efecto de DAT sobre la producción autócrina de citocinas en células dendríticas

Para evaluar el efecto de DAT sobre la producción de citocinas en las DCs se tomaron los sobrenadantes de los cultivos de células sin tratamiento, y de células tratadas con 1 µg de LPS, 10 µg de DAT y la combinación de DAT/LPS en las

mismas concentraciones. Debido a que la producción de citocinas es un proceso dinámico en el que cambia el perfil de citocinas de pro-inflamatorio a anti-inflamatorio con el paso del tiempo [148], los sobrenadantes fueron recolectados a las 6 y 24 h de cultivo. Las citocinas que se estudiaron por el método de ELISA fueron IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ como se observa en la figura 22.

A las 6 horas DAT disminuye significativamente la producción basal de IL-10 (*P=0.0146), sin embargo a las 24 hubo un incremento significativo en la producción de esta citocina en células tratadas con LPS; cuando las células fueron tratadas con DAT/LPS hubo un incremento significativo en la expresión de IL-10 sobre la producción inducida con LPS (*P=0.0129) (Fig. 21A). Para IL-12, no hay variación en la producción de esta citocina a las 6 y 24 horas; sin embargo, la producción de esta citocina inducida por LPS disminuye significativamente a las 24 horas en las DCs tratadas con DAT/LPS (**P=0.0068) (Fig. 21B). En células tratadas con LPS se incrementó la producción de TNF- α a las 6 h, pero disminuyó a las 24 h; a las 6 horas DAT disminuyó significativamente la producción inducida por LPS de esta citocina (**P=0.0022) (Fig. 21C). La producción de IFN- γ fue indetectable a las 6 h; a las 24 h hubo poca producción de esta citocina en todos los tratamientos, sin embargo, no hubo diferencia en la producción de esta citocina con alguno de los tratamientos (Fig. 21D).

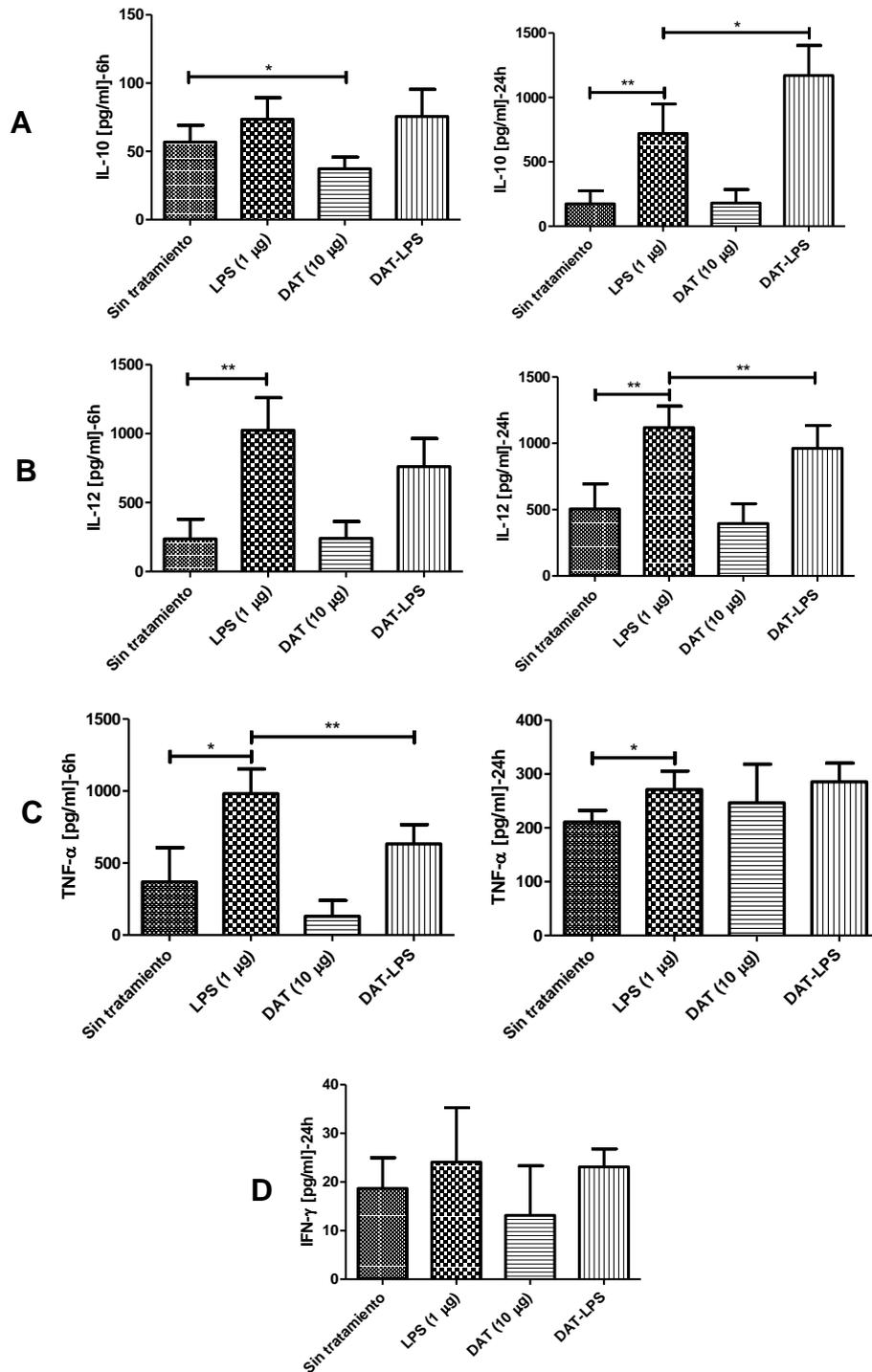


Figura 22. Efecto del DAT sobre la producción de citocinas. La producción de citocinas se midió a las 6 y 24 h en células sin tratamiento, tratadas con LPS, DAT y DAT/LPS y la medición se realizó en cinco experimentos por triplicado. Los resultados muestran que DAT disminuye la producción de IL-10 basal a las 6 horas, pero provoca un aumento en la producción inducida por LPS a las 24 horas (A); a las 24 h la producción de IL-12 inducida por LPS disminuyó significativamente (B); DAT también disminuyó la producción de TNF- α inducido por LPS a las 24 horas (C). *t Student* pareada $p < 0.05$. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

VIII. DISCUSION

Las DCs juegan un papel importante en la respuesta inmune, debido a su alta capacidad para capturar y procesar antígenos, estas son eficientes para estimular linfocitos T y B [92]. Una vez que las DCs maduran, estas son capaces de presentar antígenos y activar a los linfocitos T efectores; este proceso esta mediado por citocinas pro-inflamatorias y componentes microbianos [82, 149, 150] y tiene como consecuencia un incremento en la expresión de moléculas de presentación de antígeno, así como de moléculas coestimuladoras.

Algunos microorganismos tienen la capacidad de interrumpir el proceso de maduración de las DCs, como *Candida albicans* [151] o el virus de la hepatitis C [152]. En la infección con Mtb, se ha reportado que ciertos compuestos glicoconjugados en la pared de Mtb tienen efectos inmunoreguladores sobre las DCs como las araLAMs [134] o PIMs [136], las cuales provocan que las DCs no maduren. Resulta de interés conocer los efectos de otros compuestos glicoconjugados como son los glicolípidos sobre la función de las DCs. Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que DAT y TAT, los disminuyen la expresión de iNOS y por lo tanto la producción de NO en macrófagos [69]. Al compartir características fenotípicas y funcionales las DCs y los macrófagos, consideramos que estos glicolípidos podrían tener un efecto sobre la maduración de las DCs [75].

El paso inicial fue la purificación de DAT a partir del cultivo de *M. fortuitum*, trabajos previos han demostrado que este método de purificación es eficaz en la purificación de este glicolípido [66, 67, 68, 69].

En este trabajo se decidió trabajar con iDC, actualmente el método descrito por Inaba y col [146] ha demostrado ser altamente eficaz en la obtención de estas

células; basados en este método obtuvimos cultivos de iDCs cuya marca de CD11c y MHC II corresponde a la que se ha descrito en la literatura [153].

Los efectos sobre la maduración de las DCs con DAT fueron evaluados midiendo la expresión de moléculas de presentación de antígeno MHC I y MHC II; moléculas de coestimulación CD80, CD83, CD86, las cuales son inducidas en procesos de maduración de la célula [154]; además se estudió el efecto de DAT sobre la maduración inducida por LPS, el cual ha demostrado que puede inducir la expresión de las moléculas antes mencionadas [82, 155]. Por otra parte, también se hizo el estudio en la producción de citocinas IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ , las cuales, pueden ser producidas por las DCs [99].

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el DAT tiene efectos inhibitorios en la expresión de moléculas de presentación de antígeno MHC I y MHC II; la expresión de estas moléculas aumenta en la maduración de las DCs, en la infección por Mtb las DCs pueden hacer presentación cruzada de antígenos micobacterianos por medio del MHC I a los linfocitos TCD8⁺; por otra parte, la presentación de antígenos por medio del MHC II genera la activación de linfocitos T CD4⁺, los cuales están encargados de la respuesta efectora en contra del bacilo [50]. La expresión de estas moléculas puede estar regulada por factores inflamatorios como TNF- α o LPS, los cuales interactúan con sus respectivos receptores para inducir la maduración de las DCs [82,156].

Mtb puede aumentar la expresión de MHC I y MHC II en las DCs [157], sin embargo, se ha reportado que ciertos componentes de la pared de Mtb pueden reducir la expresión de MHC II como la lipoproteína LpqH, la cual al interactuar con el receptor TLR-2 inhibe la expresión de esta molécula [144].

En este trabajo también se observó que DAT redujo la expresión de CD40, CD80 y CD86, la expresión de estas moléculas es importante en el proceso de presentación de antígenos a los linfocitos T [120]. CD40 interactúa con CD40L (CD154), provocando que las DCs aumenten su expresión del MHC II y la producción de citocinas pro-inflamatorias [158]. CD86 comparte funciones con CD80 para interactuar con CD28 o con CTLA-4, los cuales son expresados por los linfocitos T y cuya función es propiciar la proliferación o inhibir la función de estas células respectivamente [159]. La interacción con CD28, induce la producción de IL-2 el cual permite la supervivencia y proliferación de los linfocitos T [160], además la coestimulación mediada por esta molécula interfiere con las propiedades tolerogénicas de las DCs e inhibe la diferenciación de linfocitos reguladores previniendo la estabilización del receptor de IL-10 en los linfocitos T [161]. CD86 es la molécula más abundante en términos de expresión y su expresión se incrementa rápidamente después de la activación de la DCs. Por otro lado el CD80 no se encuentra altamente expresado en células en estado estacionario y su expresión se induce de manera más lenta después de la activación de la célula. Actualmente los estudios tienden indicar que CD86 tiene el papel más importante en la interacción con CD28 durante la activación de los linfocitos T [162]. El reconocimiento de algunos compuestos en la pared micobacteriana como LAM o manLAM por medio del DC-SIGN inhibe la expresión de CD40, CD80 y CD86 [163].

DAT redujo la expresión basal de CD83, el cual se ha demostrado que puede ser expresado de manera constitutiva tanto en DCs maduras e inmaduras [164], además esta molécula puede ser expresada en linfocitos T y B activados, así como en linfocitos T reguladores [165]. Esta molécula es conocida como un

marcador de activación en DCs y su inhibición resulta en una reducción en su capacidad de inducir una respuesta por parte de los linfocitos T; sin embargo, se han hecho estudios en ratones knock-out para esta molécula, en donde estos son capaces de inducir una respuesta alogénica de la misma forma que lo hacen ratones que expresan normalmente CD83 [166].

En este estudio se decidió incluir a CD25, una molécula que puede ser inducida en las DCs por LPS y que se ha sugerido que puede tener importancia en la activación de linfocitos T CD4⁺, cuando esta molécula es expresada en la membrana de las DCs [167]. Los resultados preliminares demuestran que DAT disminuye la expresión de CD25. La expresión de esta molécula incrementa en DCs cuya maduración es inducida con LPS o CD40L [168]. Esta molécula en su forma soluble proviene del CD25, que se encuentra en la membrana de las DCs, se han reportado que este desprendimiento se lleva a cabo por medio de metaloproteinasas en el epitelio que se encuentra en la córnea [169], sin embargo, esto no se ha comprobado en las DCs. Esta molécula actúa como un regulador de la respuesta inmune, aunque no se ha demostrado el mecanismo por el cual realiza esta función [168].

La expresión de citocinas en las DCs es un fenómeno dinámico, al madurar las DCs producen citocinas pro-inflamatorias, que favorecen la respuesta inmune efectora, aproximadamente un día después, las DCs comienzan a producir citocinas anti-inflamatorias [148].

Los resultados obtenidos muestran este cambio de perfil de citocinas con respecto al tiempo, en donde se observa una producción favorecida de citocinas pro-inflamatorias a las 6 h, el cual cambia a un perfil anti-inflamatorio a las 24 h. DAT favoreció la producción de IL-10 y redujo la producción de IL-12 y TNF- α .

Se ha descrito de manera general que la interacción de Mtb con las DCs provoca que éstas liberen IL-10, que en consecuencia provoca la disminución en la liberación de citocinas pro-inflamatorias [170]. La interacción de manLAM de Mtb con DC-SIGN provoca la disminución de TNF- α e IL-12, gracias a la supresión de la vía de activación por TLRs en donde se bloquea la acetilación de NF- κ B, induciendo a su vez, la producción de IL-10 [171]. Esta última puede inducir DCs que no producen IL-12 e IFN- γ e inclusive, puede inhibir la maduración de las DCs [172]. Por otra parte, no se observó una producción de IFN- γ , que a pesar de ser una de las citocinas más importantes para el control de la infección por Mtb, se ha descrito que las DCs producen esta citocina de manera moderada [173].

Los resultados muestran que DAT interrumpe la maduración de las DCs; este hallazgo nos permite sugerir que este glicolípido puede inducir un perfil tolerigénico en las DCs, este argumento viene de la demostración que se ha hecho sobre la relación entre el estado de maduración de las DCs con la actividad tolerogénica de las mismas [174]. En la actualidad no existen reportes sobre la inducción de CDs tolerigénicas a causa de Mtb, lo más cercano desarrollar un mecanismo de tolerancia en las CDs es la Inducción de las moléculas co-inhibitorias PD-L1 y PD-L2, la cual inhibe la proliferación de linfocitos T efectores y estimula la proliferación de linfocitos T reguladores [175, 176]; sin embargo se ha reportado que algunos patógenos como *Fasciola hepatica*, *Candida albicans*, *Bordetella pertussis* y *Vibrio cholerae* pueden promover la tolerogenicidad en las DCs e inducir la producción de linfocitos T reguladores como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, sin embargo, no se conocen los mecanismos involucrados en este proceso [177].

En conclusión, en este trabajo hemos demostrado que un componente glicolipídico de la pared de Mtb, inhibe de manera significativa la expresión de algunos componentes esenciales en la maduración de las DCs, que son células de una importancia primordial en el desarrollo de la respuesta antimicrobiana mediada por linfocitos T. Para valorar adecuadamente la importancia de DAT como modulador de la función de las DCs, es necesario realizar una serie de ensayos funcionales para verificar si los cambios descritos en este trabajo afectan la capacidad de las DCs de procesar y presentar antígenos a linfocitos T.

IX. CONCLUSIONES

- El método de cultivo de DCs utilizado en este trabajo fue adecuado para la obtención de iDCs.
- El método de purificación del DAT fue satisfactorio al obtener lípidos de alta pureza
- DAT disminuyó la expresión basal de MHC I y CD83, además de la expresión inducida de MHC II, CD40, CD80 y CD86.
- DAT disminuye de manera importante la expresión inducida por LPS de CD25
- DAT disminuyó la producción inducida por LPS de las citocinas IL-12 y TNF- α y potenció la producción de IL-10 inducida por LPS.
- Los hallazgos anteriores sugieren que DAT induce un perfil tolerogénico en las DCs.

X. PERSPECTIVAS

- Complementar el estudio de los efectos de DAT sobre las DCs evaluando su capacidad para activar linfocitos T, por medio de ensayos de presentación de antígeno.
- Caracterizar el perfil tolerogénico de las DCs, evaluando la producción de CD25 soluble, PD-L1, PD-L2 y la producción de la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa.
- Evaluar la capacidad de estas DCs para generar linfocitos T reguladores.

XI. REFERENCIAS

1. Global Tuberculosis Report. 2014. WHO, World Health Organization
2. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378:57-72.
3. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:9869-9874.
4. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*. 2006; 100:1862-1870
5. Centers for Disease Control and prevention. Tuberculosis-TB in specific populations. <http://www.cdc.gov/tb/topic/populations/default.htm>
6. Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto M. BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. *Rev Saúde Pública*. 2007;41:1-7
7. Roche PW, James A, Triccas JA, Winter N. BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes. *Elsevier Science*. 1995;3:397-400.
8. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-544 doi:10.1038/31159
9. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS*. 2002;99(6):3684–3689 .
10. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7:537-544.
11. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995;64:29–63.

12. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2009;83:91–97
13. Lemassu A, Daffé M. Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* 1994; 297:351–357.
14. Ortalo-Magné A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen AB, Gounon P, Daffé M. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiol.* 1995;141:1609–1620.
15. Minnikin, DE. Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. Ratledge, C.;Stanford, J., editors. *The biology of the mycobacteria: Physiology, identification and classification.* Academic Press.1982; 95-184.
16. Hoffmann C. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3963–3967.
17. Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol.* 2010;18(3):109–116.
18. Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, Brennan PJ, Jackson M. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis* *Adv Appl Microbiol.* 2009;69:23–78.
19. Mahon RN, Sande OJ, Rojas RE, Levine AD, Harding CV, Boom WH *Mycobacterium tuberculosis* ManLAM inhibits T-cell-receptor signaling by interference with ZAP-70, Lck and LAT phosphorylation. *Cell Immunol.* 2012;275(1-2):98-105.
20. Sander P, Rezwan M. Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology.* 2004;52(6):1543-1552.
21. Sutcliffe IC, Harrington DJ. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *Microbiol Rev.* 2004;28(5):645-659.
22. Daffé M, McNeil MR, Brennan PJ. Novel type-specific lipooligosaccharides from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* 1991;30:378–388.

23. Yamagami H, Matsumoto T, Fujiwara N, Arakawa T, Kaneda K, Yano I, Kobayashi K. Trehalose 6,6-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infection and Immunity*. 2001;810–815.
24. Schluger NW. The Pathogenesis of Tuberculosis. 2005. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 32;4:251-256.
25. Rubins JB. Alveolar Macrophages. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;167(2):103-104.
26. Sakamoto K. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary Pathology* 2012;49(3):423-439.
27. McCune RM, Feldmann FM, McDermott W. Microbial persistence, II: characteristics of the sterile state of tubercle bacilli. *J Exp Med*. 1966; 123: 469–486.
28. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, Von Reyn F. Tuberculosis. *N Engl J Med* 2013; 368:745-755
29. Verver S, Warren RM, Beyers N, et al. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171:1430–1435.
30. Slauch JM. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol*. 2011;80(3):580–583.
31. Means TK, Wang S, Lien E, et al. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1999; 163: 3920–3927.
32. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. 1995. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2: 561-72
33. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium-Tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.*, 1992;175: 1111-1122.
34. Toossi Z. The inflammatory response in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2000, 48, 513-519.

35. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SHE. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC I and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med.* 2003;9:1039-1046.
36. Santiagoschwarz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem-cells into dendritic cells and macrophages. *J. Leukoc.Biol*, 1992;52:274-281.
37. Fantuzzi G, Dinarello CA. The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol.* 1996; 59:489–493.
38. Toossi Z, Sedor JR, Lapurga JP, et al. Expression of functional interleukin 2 receptors by peripheral blood monocytes from patients with active pulmonary tuberculosis. *J Clin Invest.*1990; 85: 1777–1784.
39. Xirouchaki N, Tzanakis N, Bouros D, et al. Diagnostic value of interleukin-1alpha, interleukin-6, and tumor necrosis factor in pleural effusions. *Chest.* 2002; 121: 815–820.
40. VanHeyningen TK, Collins HL, Russell DG. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J Immunol.* 1997; 158: 330–337.
41. Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH. 1997. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect Immun* 65: 1936-8
42. Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, et al. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology.* 1995; 84: 423–432.
43. Bertagnolli MM, Lin BY, Young D, et al. IL-12 augments antigen-dependent proliferation of activated T lymphocytes. *J Immunol.* 1992; 149: 3778–3783.
44. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. 2003. Immune control of tuberculosis by IFN- γ -inducible LRG-47. *Science* 302:654–59
45. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*2001;19:683–765.

46. 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
47. Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Eguale T, Hiwot K, Aderaye G, Britton S. Circulating TNF-a, TGF-b, and IL-10 in Tuberculosis Patients and Healthy Contacts *Scand. J. Immunol.* 53, 85±91, 2001
48. Shabaana A. Khader and Andrea M. Cooper IL-23 and IL-17 in tuberculosis *Cytokine.* 2008;41(2):79–83.
49. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary Dendritic Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2005;172:530-551.
50. Cooper MA. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual Review of Immunology* 2009;27:393-422.
51. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Fundamental Immunology*, 2003 5th edition, W.E. Paul (Ed.), pp. 1229-1261.
52. Zenaro E, Donini M, Dusi S. Induction of Th1/Th17 immune response by *Mycobacterium tuberculosis*: role of dectin-1, mannose receptor, and DC-SIGN. *Journal of Leukocyte Biology.* 2009;86(6):1393-1401
53. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11:119–130
54. Trinath J, Maddur MS, Kaveri SV, Balaji KN, Bayry J. *Mycobacterium tuberculosis* promotes regulatory T-cell expansion via induction of programmed death-1 Ligand 1 (PDL1, CD274) on dendritic cells. *J Infect Dis* 2012;205:694–696
55. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992;89(24):12013-12017.
56. Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. *Infection and Immunity.* 1998;66(2):830-834.
57. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modlin RL. Differential effects of

- cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*. 1997; 276(5319):1684-1687.
58. Vergne I, Fratti RA, Hill PJ, Chua J, Belisle J, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis Phagosome Maturation Arrest: Mycobacterial Phosphatidylinositol Analog Phosphatidylinositol Mannoside Stimulates Early Endosomal Fusion. *Mol Biol Cell*. 2004;15(2):751–760.
 59. Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic*. 2000;1(3):235-47.
 60. Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(9):5437-42.
 61. Axelrod S, Oschkinat H, Enders J, Schlegel B, Brinkmann V, Kaufmann, SH, Haas A, Schaible UE. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide *Cellular Microbiology* 2008;10(7):1530–15457.
 62. Muñoz, M. Lanéelle, MA, Luquin, M, Torrelles J, Julián, e, Austina V, Daffé, M. Occurrence of an antigenic triacil trehalose in clinical isolates and reference strains of Mycobacterium tuberculosis. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;157:251-259.
 63. Chesne-Seck ML, Barilone N, Boudou F, Asensio JG, Kolattukudy PE, Martín C, Cole ST, Gicquel B, Gopaul DN, Jackson M. A Point Mutation in the Two-Component Regulator PhoP-PhoRA accounts for the Absence of Polyketide-Derived Acyltrehaloses but Not That of Phthiocerol Dimycocerosates in Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *Journal of bacteriology*. 2008;1329–1334
 64. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:183-215.
 65. Pérez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martín C. An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence. *Mol Microbiol*. 2001;41(1):179-87.
 66. Escamilla L, Mancilla R, Glender W, López-Marín LM. 1996 Mycobacterium fortuitum glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Resp. Crit. Care Med*. 154: 1864-1867

67. Saavedra R, Segura E, Leyva R, Esparza LA, López-Marín LM. Mycobacterial Di-O-Acyl-Trehalose Inhibits Mitogen- and Antigen-Induced Proliferation of Murine T Cells In Vitro Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology. 2001; 1081–1088.
68. Palma-Nicolas JP, Hernández-Pando R, Segura E, Ibarra-Sánchez MJ, Estrada-García I, Zentella-Dehesaa A, López-Marín LM. Mycobacterial di-O-acyl trehalose inhibits Th-1 cytokine gene expression in murine cells by down-modulation of MAPK signaling. Immunobiology 2010; 143–152.
69. Espinosa-Cueto P, Escalera-Zamudio M, Magallanes-Puebla A, López-Marín LM, Segura-Salinas E, Mancilla R. Mycobacterial glycolipids di-O-acylated trehalose and tri-O-acylated trehalose downregulate inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in macrophages. BMC Immunol. 2015;23;(16):1-6
70. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Journal of Experimental Medicine. 1973;137:1142-1162
71. Nussenzweig MC, et al. Dendritic cells are accessory cells for the development of antitrinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. J Exp Med 1980;152:1070–1084.
72. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol 2002;2:151–161.
73. Dudziak D, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. Science 2007;315:107–111.
74. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. Cell 2001;106:259–262.
75. Kang L, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. Immunological Reviews 2010;234:45–54.
76. Randolph GJ, et al. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. Science 1998;282:4-80–483.
77. Fogg DK, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. Science 2006;311:83–87.

78. Naik SH, et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 2006;7:663–671.
79. Liu K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 2009;324:392–397.
80. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109–1118.
81. Idoyaga J, et al. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8 alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:1524–1529.
82. De Smedt T, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996;184:1413–1424.
83. Ohl L, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004;21:279–288.
84. Iyoda T, et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 2002;195:1289–1302.
85. Bedoui S, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2009;10:488–495.
86. Romani N, Brunner PM, Stingl G. Changing Views of the Role of Langerhans Cells *Journal of Investigative Dermatology* (2012), Volume 132 872-881
87. Schuler G, Romani N, Steinman RM. A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1985;85:99–106.
88. Ginhoux F, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 2006;7:265–273.
89. Varol C, et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 2009;31:502–512.
90. Ginhoux F, et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* 2009;206:3115–3130.

91. Bogunovic M, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 2009;31:513–525.
92. Banchereau, J., R.M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245–52.
93. McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J. Exp. Med.* 1994;179:1331–36
94. Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol.* 1999;60(7):562-7.
95. Sallusto F, Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* 1999;29:1617–1625.
96. Cisco RM, Abdel-Wahab Z, Dannull J, Nair S, Tyler DS, Gilboa E, Vieweg J, Daaka Y, Pruitt SK. Induction of Human Dendritic Cell Maturation Using Transfection with RNA Encoding a Dominant Positive Toll-Like Receptor. *J Immunol* 2004;172:7162-7168
97. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:9305–10
98. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by doublestranded RNA. *J. Exp. Med.* 1999;189:821–29
99. Zou GM, TamYK. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *European Cytokine Network.* 2002;13(2):186-99.
100. Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity *J Exp Med.* 2005;202(2):203-7.
101. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:375-96.

102. Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH. Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration Volume 29, Issue 3, 19 September 2008, Pages 325–342
103. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Kollnberger M, Tubo N, Moseman EA, Huff IV, Junt T, Wagers AJ, Mazo IB, von Andrian UH. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell*. 2007;131:994–1008.
104. Salmi M, Jalkanen S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nature Rev* 2005;5:760–771
105. Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:614–621
106. Martín-Fontecha A, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dendritic Cell Migration to Peripheral Lymph Nodes *Handb Exp Pharmacol*. 2009;188:31-49.
107. Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, Steinman RM. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med*. 1998;188:2163–73
108. ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(12): a016873. doi: 10.1101/cshperspect.a016873.
109. Shin JS, Ebersold M, Pypaert M, Delamarre L, Hartley A, Mellman I. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*. 2006;444(7115):115-8.
110. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):607-18.
111. Joffre OP, Segura E, Savina P, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells_ *Nat Rev Immunol*. 2012;12:557-569.
112. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993;361:359–6.

113. Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1997;27:280–88
114. Porcelli SA, Segelke BW, Sugita M, Wilson IA, Brenner MB. The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol.* 1998;19:362.
115. Sugita M, Jackman RM, van Donselaar E, Behar SM, Rogers RA, Peters PJ, Brenner MB, Porcelli SA. Cytoplasmic tail-dependent localization of CD1b antigen-presenting molecules to MHCs. *Science.* 1996;273: 349
116. Briken V, Jackman RM, Watts GF, Rogers RA, Porcelli SA. Human CD1b and CD1c isoforms survey different intracellular compartments for the presentation of microbial lipid antigens. *J. Exp. Med.* 2000;192: 281.
117. Sugita M, Grant EP, van Donselaar E, Hsu VW, Rogers RA, Peters PJ, Brenner MB. Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. *Immunity.* 1999;11: 743
118. Cao X, Sugita M, van der Wel N, Lai J, Rogers RA, Peters PJ, Brenner MB. CD1 Molecules Efficiently Present Antigen in Immature Dendritic Cells and Traffic Independently of MHC Class II During Dendritic Cell Maturation. *J Immunol* 2002;169:4770-4777.
119. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells *Front. Immunol.*, 03 April 2013 | <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00082>
120. Khan N, Gowthaman U, Pahari S, Agrewala JN. Manipulation of Costimulatory Molecules by Intracellular Pathogens: Veni, Vidi, Vici!! *PLoS Pathog* 2012;8(6): e1002676. doi:10.1371/journal.ppat.1002676
121. Nagorsen D, Marincola FM, Panelli MC. Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine.* 2004;25(1):31–35.
122. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation *Cur Op Immunol.* 2010;22(3):333–340.

123. Kanako L. Lewis and Boris Reizis. Dendritic Cells: Arbiters of Immunity and Immunological Tolerance Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(8):a007401. doi: 10.1101/cshperspect.a007401.
124. Maldonado RA, von Andrian UH. How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells. *Advances in Immunology*, 2010;108:111-144
125. Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance to tissuespecific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 2004;200:1039–1049.
126. Proietto AI, van Dommelen S, Wu L. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunol Cell Biol* 2009;87: 39–45.
127. Yamazaki S, DudziakD, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, Nussenzweig MC, Steinman RM. CD8⁺ CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2008;181: 6923–6933.
128. Bar-On L, Birnberg T, KimKW, Jung S. Dendritic cellrestricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation. *Eur J Immunol*. 2011;41: 291–298.
129. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007;8:191–197.
130. Soliman H, Mediavilla-Varela M, Antonia S. Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? *Cancer J*. 2010;16(4):354-9. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181eb3343.
131. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998;281:1191–1193.
132. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 1992;11:245
133. Driesen J, Popov A, Schultze JL. CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells. *Immunobiology*. 2008;213(9-10):849-58. doi: 10.1016/j.imbio.2008.07.026.

134. Tsuji R, Matsumoto M, Tekeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. MAuration of human dendritic cells by cell Wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin: involvement of Toll-like receptors. *Infect Immunol* 2000;68:6883-6890.
135. Nigou J, Zelle-Riesser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* 2001;166:7477-7485.
136. Teunis B. H. Geijtenbeek, Anneke Engering, and Yvette van Kooyk. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *Journal of Leukocyte Biology.* 2002;71: 921-931
137. Maeda N, Nigou J, Hermann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, Puzo G, Giquel B, Neyrolles O. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem.* 2003;278:5513-5516.
138. Mazurek J, Ignatowicz L, Kallenius G, Svenson SB, Pawlowski A, et al. Divergent Effects of Mycobacterial Cell Wall Glycolipids on Maturation and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PLoS ONE* 2012;7(8): e42515. doi:10.1371/journal.pone.0042515
139. Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. The CD14 ligands lipoarabinomannans and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol.* 1999; 163:6748-6755.
140. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.* 2001;167:910-918.
141. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sto S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408:740-745.
142. Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: Where the action starts. *Immunol and Cell Biol.* 2000;78:318-324.
143. Stenger S, Niazi KR, Modlin RL. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with M. tuberculosis. *J Immunol* 1998; 161:3582-3588.

144. Tailleux L, Neyrolles O, Honoré-Bouakline S, Perret E, Sanchez F, Abastado JP. Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:1939–48.
145. Holmes K, Lantz LM, Fowlkes BJ, Schmid I, Giorgi JV. Preparation of Cells and Reagents for Flow Cytometry. *Current Protocols in Immunology*. 2001;5.3
146. Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G, Brinster C. Isolation of dendritic cells *Current Protocols in Immunology*. 2009; 3.7.1-3.7.19.
147. Mnasria K, Lagaraine C, Velge-Roussel F, Lebranchu Y, Baron C. Anti-CD25 Antibodies Decrease the Ability of Human Dendritic Cells to Prime Allogeneic CD4 T Cells. *Transplantation Proceedings* 2009;41(2):695–697
148. Luger R, Valookaran S, Knapp N, Vizzardelli C, Dohnal AM, Felzmann T. Toll-Like Receptor 4 Engagement Drives Differentiation of Human and Murine Dendritic Cells from a Pro- into an Anti-Inflammatory Mode. *PLoS ONE* 2013;8(2): e54879. doi:10.1371/journal.pone.0054879
149. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation *Eur. J. Immunol* 1998;28:2760-2769.
150. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells *Eur. J. Immunol*. 1998;28:2045-2054
151. Ryan KR, Hong M, Arkwright PD, Gennery AR, Costigan C, Dominguez M, Denning D, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Spickett GP, Lilic D. Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED. *Clin Exp Immunol*. 2008;154(3): 406–414.
152. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *May 15, 2001; Blood*: 97 (10) 3171 – 3176.

153. Helft J, Bottcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, Goubau D, Reis e Sousa C. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 2015;42(6):1197-211
154. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693-1702
155. Quah BJC, O'Neill HC. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med.* 2005;9(3):643-654.
156. Ding X, Yang W, Shi X, Du P, Su L, Qin Z, Chen J, Deng H. TNF receptor 1 mediates dendritic cell maturation and CD8 T cell response through two distinct mechanisms *J Immunol.* 2011 Aug 1;187(3):1184-91
157. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J immunol.* 1997;159(2): 635-643.
158. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994;180(4):1263-72
159. Samson DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?. *Immunology.* 2000;101(2):169–177. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x
160. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 1991;173: 721–730 10.1084/jem.173.3.721
161. Tuettenberg A., Huter E., Hubo M., Horn J., Knop J., Grimbacher B., et al. The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol.* 2009;182:3349–3356 10.4049/jimmunol.0802733
162. Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, Schweitzer AN, Tivol EA, Jacoby D, Strom TB, Simpson EM, Freeman GJ, Sharpe AH. B7-1 and B7-2 have

overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*. 1997;6(3):303-13.

163. Dulphy N, Herrmann JL, Nigou J, Réa D, Boissel N, Puzo G, Charron D, Lagrange PH, Toubert A. Intermediate maturation of Mycobacterium tuberculosis LAM-activated human dendritic cells. *Cellular Microbiology* 2007;9(6), 1412–1425
164. Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2001. 194: 1813–1821
165. Reinwald S, Wiethe C, Westendorf AM, Breloer M, Probst-Kepper M, Fleischer B, Steinkasserer A, Buer J, Hansen W. CD83 Expression in CD4⁺ T Cells Modulates Inflammation and Autoimmunity. *The Journal of Immunology*. 2008;180(9):5890-5897
166. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.*1997; 27: 1229.
167. von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel MS, Fiore F, Roth U, Beyer M, Debey S, Wickenhauser C, Hanisch FG, Schultze JL. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood*, 2006;108(1):228-237
168. Pilon C, Levast B, Meurens F, Le Vern Y, Kerboeuf D, Salmon H, Velge-Roussel F, Lebranchu Y, Baron C. CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1. *Molecular Immunology*. 2009;46(3):437–447.
169. De Paiva CS, Yoon KC, Pangelinan SB, Pham S, Puthenparambil LM, Chuang EY, Farley WJ, Stern ME, Li DQ, Pflugfelder SC. Cleavage of functional IL-2 receptor alpha chain (CD25) from murine corneal and conjunctival epithelia by MMP-9. *Journal of Inflammation* 2009, 6:31
170. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M.. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.*1997; 27: 1229.

171. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. C-type lectin DC-SIGN modulates toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappa B. *Immunity*. 2007;26:605–616
172. Corinti S, Albanesi C, Ia Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* 2001;166: 4312.
173. Vremec D, O'Keeffe M, Hochrein H, Fuchsberger M, Caminschi I, Lahoud M, Shortman K. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. February 1, 2007; *Blood*: 109 (3) 1165-73
174. De Heusch M, Oldenhove G, Urbain J, Thielemans K, Maliszewski C, Leo O, Moser M. Depending on their maturation state, splenic dendritic cells induce the differentiation of CD4(+) T lymphocytes into memory and/or effector cells in vivo *Eur. J. Immunol.* 2004;34,1861-1869.
175. Lopez M, Behrens C, Falcon-Beas C, Tempio F, Salazar-Onfray F. Blocking of PD-L1 on therapeutic dendritic cells modulate in vitro T cells proliferation and differentiation to Th1 and Th17 subpopulations *The Journal of Immunology*, 2013, 190, 47.3
176. Liu H, Bakthavatsalam R, Meng Z, Li Z, Li W, Perkins JD, Reyes JPD-L1 signal on liver dendritic cells is critical for Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) Treg and liver tolerance induction in mice *Transplant Proc.* 2013;45(5):1853-5.
177. Maldonado RA, von Andrian UH. How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells. *Advances in Immunology*, 2010;108:111-144.