

Artículo original

Los extractos de *Mycobacterium tuberculosis* inducen la producción selectiva de citocinas inflamatorias y receptores de membrana

Alma Yolanda Arce Mendoza,* Adrián Geovanni Rosas Taraco,* Mario César Salinas Carmona,* Juan Manuel Solís Soto*

RESUMEN

Antecedentes: en la etapa inicial de la tuberculosis aumenta la concentración de citocinas inflamatorias, mientras que las Th1 y Th2 se producen después de activarse las células T. Los receptores CD14, CD64, CD206 y TLR4 participan en la respuesta contra patógenos intracelulares.

Objetivo: analizar las fracciones de *Mycobacterium tuberculosis* que estimulan la expresión de CD14, CD64, CD206 y TLR4, y su influencia en la producción de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ .

Pacientes y métodos: se estimularon células mononucleares de sangre venosa periférica de voluntarios sanos PPD-positivos a *M. tuberculosis* con: a) bacterias completas, b) proteínas secretoras-excretoras de la bacteria, c) extracto proteínico, d) extracto lipídico y e) extracto de polisacáridos. Las citocinas del sobrenadante se cuantificaron mediante ELISA y las moléculas de superficie se analizaron por citometría de flujo.

Resultados: las bacterias completas estimularon la expresión de CD14 y CD206 y la producción de IFN- γ , IL-1 β e IL-2. El extracto proteínico estimuló la expresión de CD14, CD206 y TLR4 y la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-2. El extracto lipídico influyó en la expresión de CD14, CD206 y en la producción de IFN- γ . El extracto polisacárido estimuló la producción de IL-10 e IFN- γ . Las proteínas secretoras-excretoras estimularon la producción de IFN- γ e IL-2.

Conclusiones: los extractos proteínicos y de polisacáridos de *M. tuberculosis* estimulan la producción de importantes citocinas inflamatorias y la expresión de receptores en la membrana de fagocitos mononucleares para modular el sistema inmunitario del hospedero.

Palabras clave: tuberculosis, citocinas, receptores, Th1, Th2, *Mycobacterium*.

ABSTRACT

Background: In the early stages of tuberculosis, the levels of inflammatory cytokines increase, while Th1 and Th2 cytokines are produced later after T cells have been activated. CD14, CD64, CD206 and TLR4 receptors participate in the response against intracellular pathogens.

Objective: To analyze which fractions from *Mycobacterium tuberculosis* stimulate the expression of CD14, CD64, CD206, and TLR4, and their influence in the production of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF-alpha and IFN-gamma.

Methods: Peripheral mononuclear cells from healthy PPD-positive volunteers were stimulated with *M. tuberculosis*: a) whole bacteria, b) secretory/excretory proteins from the bacteria, c) protein extract, d) lipidic extract, and e) polysaccharide extract. Cytokines from the supernatants were determined by ELISA, and surface molecules were analyzed by flow cytometry.

Results: Whole bacteria induced the expression of CD14, CD206, and the production of IFN-gamma, IL-1 β and IL-2. The protein extract induced the expression of CD14, CD206, and TLR4, and the production of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1 β and IL-2. The lipidic extract induced the expression of CD14, CD206, and the production of IFN-gamma. The polysaccharide extract induced the production of IL-10 and IFN-gamma. Secretory/excretory proteins induced the production of IFN-gamma and IL-2.

Conclusions: The protein and polysaccharides extracts of *M. tuberculosis* stimulate the production of important inflammatory cytokines and the expression of receptors in the membrane of mononuclear phagocytes to modulate the host's immune system.

Key words: Tuberculosis, cytokines, receptors, Th1, Th2, *Mycobacterium*.

* Departamento de inmunología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la UANL.

Correspondencia: Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza. Departamento de inmunología. Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la UANL. Avenida Gonzalitos núm. 235 Norte, colonia Mitras Centro, CP 64460. Monterrey, Nuevo León, México. E-mail: aya_mayola@yahoo.com
Recibido: febrero, 2008. Aceptado: marzo, 2008.

Este artículo debe citarse como: Arce MAY, Rosas TAG, Salinas CMC, Solís SJM. Los extractos de *Mycobacterium tuberculosis* inducen la producción selectiva de citocinas inflamatorias y receptores de membrana. Medicina Universitaria 2008;10(39):79-86.

La versión completa de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx, www.meduconuanl.com.mx

La infección por *M. tuberculosis* es todavía uno de los mayores problemas de salud en todo el mundo, pues una tercera parte de la población está infectada actualmente. Algunas personas con *M. tuberculosis* no llegan a padecer la enfermedad; el agente patógeno puede permanecer en estado de latencia durante varios años en el huésped, pero en aquellos con sistema inmunitario debilitado podría desencadenar la enfermedad. La propagación del VIH-SIDA y la resistencia a diferentes fármacos empeoran la enfermedad.¹⁻²

La función de las citocinas en la infección micobacteriana es compleja, pues participan productos de células T y propiedades de activación y desactivación.³ En modelos animales la respuesta inicial de Th1 (producción de IL-2 e IFN- γ) es seguida de Th2 (producción de IL-4, IL-5 e IL-10), que parecen limitar la respuesta inflamatoria y la lesión al tejido.⁴ Los macrófagos producen citocinas moduladoras de manera autocrina después de la interacción directa con los productos de *M. tuberculosis*. Los monocitos secretan citocinas inflamatorias, como TNF- α , IL-1, e IL-6, mientras que las células dendríticas derivadas de monocitos producen IL-12, IFN- γ que inducen una respuesta específica antimicrobiana en las células T.⁵ La IL-1 tiene función importante en la respuesta inmunitaria contra *M. tuberculosis*.⁶⁻⁷ Los macrófagos internalizan *M. tuberculosis* y estimulan su reproducción intracelular.⁸ Se requiere la internalización de ésta y su subsecuente procesamiento para la presentación eficiente a las células T cooperadoras. Últimamente se ha tratado de aclarar la función de diversas proteínas y lípidos de *M. tuberculosis* en la interacción con el sistema inmunitario del huésped. Existen reportes de un antígeno secretado de 10 kDa que disminuye la producción de citocinas proinflamatorias; de una glucoproteína de 19 kDa que causa la apoptosis de macrófagos; de un antígeno de 30 kDa que disminuye la concentración de IFN- γ , pero eleva la de IL-10 en pacientes con tuberculosis; de la proteína ESAT-6 que quizá tenga futuro en el diagnóstico por serología; y de fibronectina y proteínas del complejo antigénico de 85 kDa, similares a las liberadas del fagosoma en compartimientos intracelulares del macrófago.⁹⁻¹³

Los antígenos lipídicos tienen una función importante en la respuesta inmunitaria inicial contra la tuberculosis, mediante la inducción de MCP-1 y TNF- α .^{14,15} La estimulación de los macrófagos con lipopolisacáridos e IFN- γ eleva la absorción de L-arginina y la síntesis de

intermediarios reactivos de nitrógeno.¹⁶ La producción de óxido nítrico regula la amplificación de la síntesis de citocinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF- α .¹⁷ Además, los antígenos lipídicos funcionan como blanco en la respuesta secundaria a *M. tuberculosis*.¹⁸ Se ha descrito una vía de presentación de antígenos por CD1 a células T, donde CD1c refuerza la presentación de antígenos isoprenoides de *M. tuberculosis* a células T.¹⁹

Se tienen pocos estudios de polisacáridos como determinantes antigénicos. El polisacárido antigénico de pared celular microbiana más conocido es el arabinomanana, pero se menciona frecuentemente como lipoarabinomannano. Cuando tiene un oligosacárido con manosa (ManLAM), es un factor de virulencia implicado en la fagocitosis de *M. tuberculosis*.²⁰⁻²¹

Los receptores del complemento, Fc γ R, CD14, CD206 (receptor de manosa), DC-SIGN y SR (receptores del surfactante), entre otros, aumentan la respuesta innata y adaptativa contra *M. tuberculosis* e inducen la respuesta inflamatoria.²² Los receptores TLR4 reconocen componentes de *M. tuberculosis* en el sobrenadante de los cultivos, indispensables para activar la respuesta inmunitaria contra *M. tuberculosis*.^{23,24}

El propósito de este estudio es determinar la fracción de *M. tuberculosis* (proteínas secretoras-excretoras, extracto proteico, lipídico o polisacárido) implicada activamente en la producción de Th1 y Th2 o en la expresión de los receptores en monocitos de sangre periférica de voluntarios sanos PPD-positivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacterias

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (donada por el Dr. Rojas Espinosa del Departamento de Inmunología de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional) se sembró en el medio Lowenstein-Jensen (4 semanas) y cultivó en el medio modificado de Proskauer-Beck Youmans (PBY). Después de seis a ocho semanas de incubación se aisló por centrifugación a 4,100 x g durante 30 minutos.

Bacterias completas

Después del aislamiento se desecaron a temperatura ambiente y se extrajeron 6 g del cultivo para disolverlas en 10 mL del medio de Proskauer-Beck Youmans con 5%

de Tween 80. Esta suspensión se agitó con microesferas de vidrio durante dos minutos para dispersar los grupos. Se utilizó la tinción de Ziehl-Neelsen para el conteo bacteriano.

Proteínas secretorias y excretorias de *M. tuberculosis*

Posterior al periodo de incubación se separaron los antígenos del cultivo mediante filtración en vacío (filtro de 0.2 μm) y se concentraron por evaporación a 4°C. Las proteínas filtradas se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio (v/v) a 4°C. El precipitado se dializó con agua destilada hasta eliminar las sales. La concentración de proteínas se determinó con el método de Bradford. Después de la liofilización, se almacenó la fracción a -20°C hasta su uso.²⁵

Extracto de proteínas de *M. tuberculosis*

Después de cultivar y deslipidar las bacterias, se maceraron en un mortero para suspenderlas en 0.01 M de Tris-HCl (pH 7.4) con 0.01 M de acetato de magnesio. Dicha suspensión se agitó durante la noche a 4°C. Las bacterias completas se extrajeron por centrifugación a 1,200 x g durante una hora a 4°C. La obtención de proteínas del sobrenadante del extracto celular se realizó por precipitación con sulfato de amonio (v/v) a 4°C. El precipitado se dializó con agua destilada hasta eliminar las sales. La concentración de proteínas se determinó con el método de Bradford. Después de su liofilización se almacenó a -20°C hasta su uso.²⁵

Extracto lipídico de *M. tuberculosis*

Las bacterias se deslipidaron tres veces con etanol-éter (1:1 la primera vez, 1:2 la segunda y 1:3 la tercera), durante 10 minutos cada fase, mediante agitación constante. El extracto lipídico se desecó y resuspendió en dimetilsulfóxido al 10%. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Extracto polisacárido de *M. tuberculosis*

Después de cultivar y deslipidar las bacterias, se maceraron en un mortero para suspenderlas en 3 M de KCl y agitarlas durante 12 horas a 4°C. Las bacterias completas se extrajeron por centrifugación a 1,200 x g durante una hora a 4°C. Posteriormente se añadió 10 mL de metanol al sobrenadante y se agitó durante 24 h a 4°C. La suspensión se centrifugó a 500 x g durante 15 minutos a 4°C. Se dejó secar, se sus-

pendió en agua desionizada y se dializó con agua destilada. Las proteínas se eliminaron con proteinasa K (50 mg/mL) en solución buffer de Tris-HCl (0.01 M) a pH de 7.4 durante una hora a 55°C; el ácido tricloroacético (0.11 M) se utilizó para detener la digestión enzimática (1 h a 4°C). La suspensión se centrifugó a 500 x g durante 15 minutos y se dializó con agua destilada. La concentración de polisacáridos se determinó con el método de Dubois. Después de su liofilización, se almacenó a -20°C hasta su uso.²⁶

Células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Se seleccionaron 15 estudiantes (varones) sanos de entre 21 y 23 años de edad, PPD-positivos, para extraerles 30 mL de sangre venosa periférica, a la que se agregó heparina y se diluyó con PBS (1:2). La muestra diluida se añadió lentamente a una solución que contenía Ficoll-diatrizoato sódico (Sigma) para formar un gradiente. Después de la centrifugación (220 x g, 30 min) se obtuvo la capa de células mononucleares de sangre periférica y se resuspendió en RPMI 1,640 con 10% de suero fetal de ternera, 200 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin (Sigma). Las células se contaron y ajustaron a 1×10^6 células/mL.

Estimulación de células mononucleares de sangre periférica o sus extractos con *M. tuberculosis*

La concentración de células mononucleares de sangre periférica (1×10^6 células/mL), en el medio RPMI 1,640, se incubó a 37°C (5% CO_2 , 73% humedad) durante 24 horas con varios estímulos. La bacteria completa de *M. tuberculosis* incluyó 4×10^6 células/mL de la cepa H37Rv en 100 μL . Las fracciones bacterianas se utilizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El sobrenadante del cultivo se obtuvo por centrifugación a 220 x g durante cinco minutos para cuantificar las citocinas. La expresión de receptores se analizó por citometría de flujo.

Análisis de citocinas

La concentración de citocinas de cada sobrenadante se analizó por ELISA sandwich. Se cuantificaron la IL- β , IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α según las especificaciones del estuche comercial (Pierce, Endogen). La densidad óptica de los pocillos (concentración de las citocinas) se determinó con un lector de microplacas de ELISA.

Análisis de la expresión de CD14, CD64, CD206 y TLR4 por citometría de flujo

Después de incubar las células mononucleares de sangre periférica o sus fracciones con *M. tuberculosis* se realizó su análisis por citometría de flujo para determinar la expresión de los receptores. Se incubaron 5×10^5 células/mL durante 60 minutos, en la oscuridad y a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos monoclonales: isotipo control (BD Biosciences Pharmingen San Diego, California, EU), anti-CD14-PE, anti-CD64-FITC, anti-CD206-FITC (BD Biosciences Pharmingen San Diego, California, EU) y anti-TLR4-PE (Santa Cruz, California, EU). Las células se obtuvieron

por centrifugación entre 220 y 240 x g durante cinco minutos y se lavaron dos veces con PBS a pH de 7.4. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 1 mL de solución FACS (BD Biosciences Pharmingen) para su análisis citofluorométrico (FACS Sort Calibur, BD, San José, California). Se analizaron 5,000 células, de las cuales se obtuvo el valor promedio de la intensidad de fluorescencia.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con la prueba de *t* de Student. Todos los valores se expresaron en media \pm desviación estándar. Se consideró significativa la $p < 0.05$.

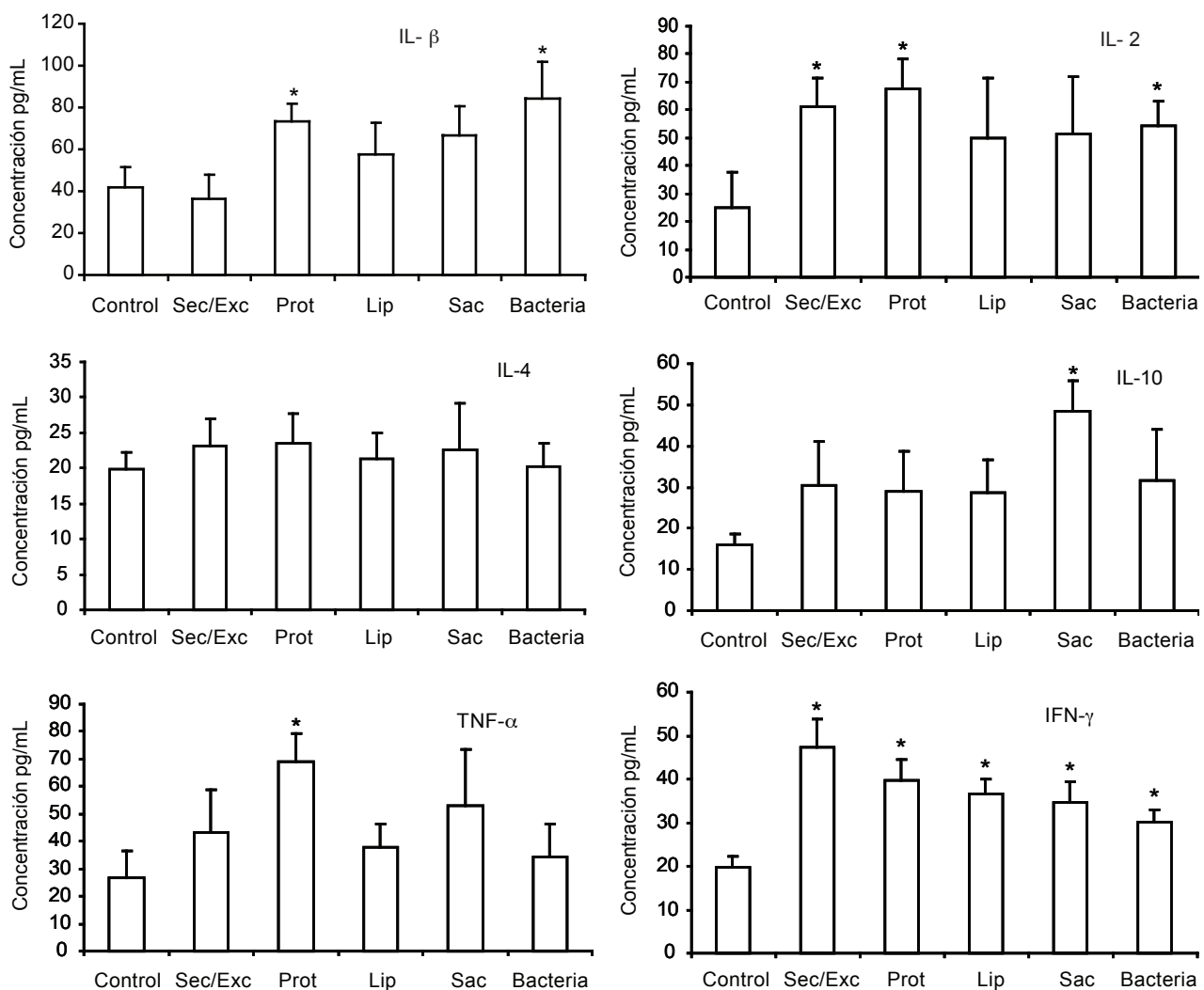


Figura 1. Producción de citocinas en respuesta a diferentes antígenos bacterianos (diferencia significativa*).

RESULTADOS

Producción de citocinas

Sólo las bacterias completas y el extracto proteínico estimularon la producción de IL-1- β por células mononucleares de sangre periférica ($p < 0.05$). El extracto lipídico y de polisacárido también incrementaron la producción de estímulo IL-1- β , pero no tuvo significación estadística (figura 1).

Hubo producción de IL-2 por el estímulo de la bacteria completa, el extracto proteínico y las proteínas secretoras-excretoras ($p < 0.05$). No hubo diferencia estadística entre la cantidad de IL-2 liberada por el extracto control, lipídico y polisacáridos (figura 1).

Ninguno de los extractos o la bacteria completa estimularon la producción de IL-4 por células mononucleares de sangre periférica ($p > 0.05$; figura 1). Solamente el extracto del polisacárido estimuló la producción de IL-10 ($p < 0.05$; figura 1).

Todos los extractos bacterianos, los de *M. tuberculosis* completa y los productos secretados-excretados aumenta-

ron la producción del TNF- α por células mononucleares de sangre periférica, pero sólo el extracto proteínico tuvo significación estadística en comparación con el control ($p < 0.01$; figura 1).

Todos los extractos bacterianos y de la bacteria completa estimularon la producción de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica; su inductor principal fueron las fracciones de proteínas secretoras-excretoras ($p < 0.01$; figura 1).

Expresión de receptores de membrana

La expresión de CD14 se elevó con el extracto proteínico, lipídico y la bacteria completa ($p < 0.01$), y disminuyó con el de proteínas secretoras-excretoras ($p < 0.05$; figura 2).

Ninguno de los extractos o la bacteria completa afectó la expresión de CD64 ($p > 0.05$; figura 2).

La expresión de CD206 aumentó con el extracto proteínico ($p < 0.001$), lipídico ($p < 0.01$) y la bacteria completa ($p < 0.05$). El extracto polisacárido y los productos excretados-secretados no alteraron su expresión (figura 2).

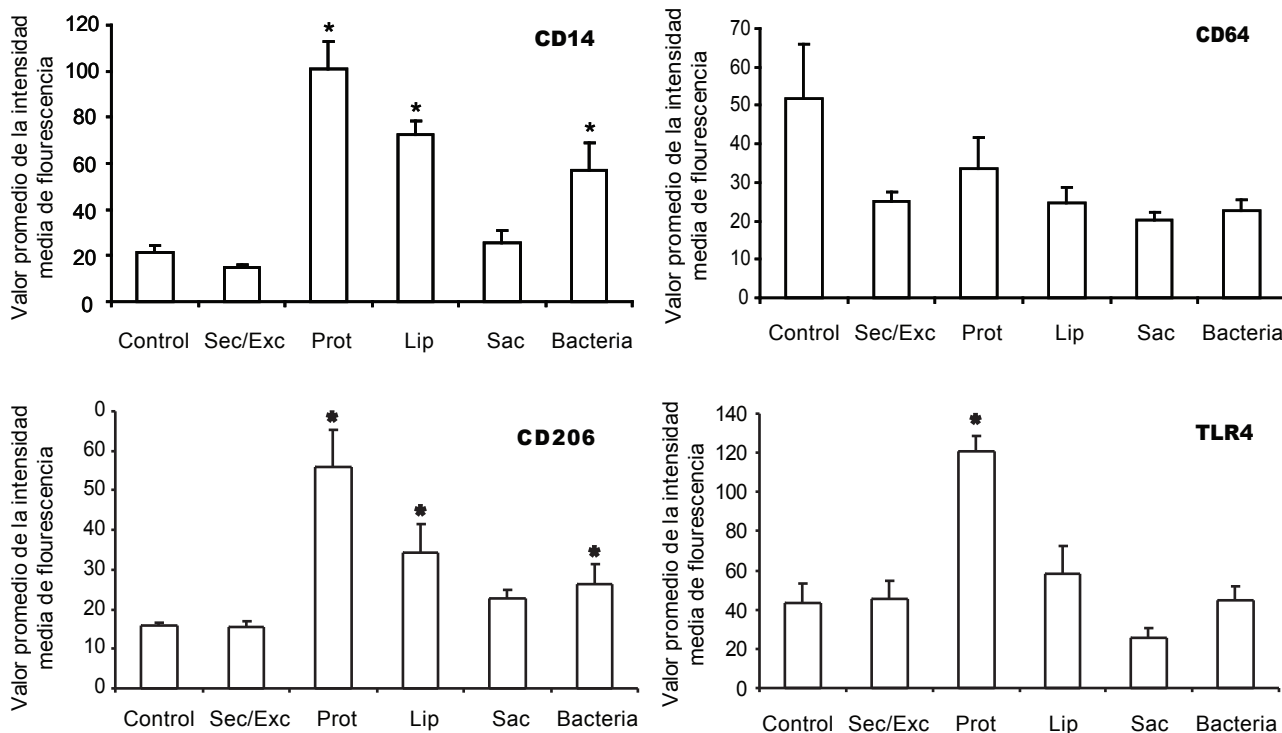


Figura 2. Expresión de receptores en respuesta a diferentes antígenos bacterianos (diferencia significativa*).

El extracto proteínico bacteriano aumentó la expresión de TLR4 ($p < 0.001$); ninguno de los estímulos adicionales provocó cambios (figura 2).

DISCUSIÓN

La variedad en producción de citocinas inflamatorias (Th1 y Th2) y expresión de moléculas de superficie en respuesta a los antígenos de *M. tuberculosis* muestran interacciones complejas entre las células mononucleares de sangre periférica y estrategias bacterianas de supervivencia.

El IFN- γ tiene función importante en la inmunidad adquirida contra micobacterias y otros agentes patógenos intracelulares.²⁷ Este hecho fue evidente, ya que todos los antígenos de *M. tuberculosis* estimularon la producción de tal citocina. Al parecer, diversos antígenos micobacterianos son reconocidos por los macrófagos y estimulan la misma vía metabólica que activa el gen del IFN- γ .

El TNF- α es una citocina esencial para la regulación de quimiocinas que controlan la formación y mantenimiento de los granulomas producidos en respuesta a la infección por *M. Tuberculosis*.²⁸ En este estudio se observó que los antígenos proteínicos provocaron la expresión del TNF- α . En condiciones *in vivo*, estimula la producción de otras citocinas para formar los granulomas.

La IL-1 β es una citocina que participa en la protección contra micobacterias.²⁹ Los resultados de este estudio muestran que el extracto proteínico y la bacteria completa estimularon la producción de dicha citocina en las células mononucleares de sangre periférica. En el cuadro clínico de tuberculosis hay fiebre y pérdida de peso por la acción biológica de la IL-1 β , que además estimula a los linfocitos CD4 para activar la respuesta celular. En esta respuesta se produce IL-2 y al igual que el IFN- γ se expresa en los pacientes con tuberculosis.³⁰ Este estudio señala que los productos secretados-excretados de la bacteria, al igual que los antígenos de superficie bacteriana y el extracto proteínico, estimulan la producción de IL-2. Se ha demostrado que diversos antígenos micobacterianos movilizan una red de citocinas en las células mononucleares de sangre periférica.

En este estudio no hubo concentraciones significativas de IL-4 con ninguno de los extractos. Los estudios *in vivo* muestran producción significativa de IL-4 y se señala que el daño tisular se debe a sus efectos.³¹ Dicha citocina pueden producirla diversas células, en estudios

in vivo, además, las células están expuestas a diferentes señales que estimulan su producción y explica porqué es alta su concentración; sin embargo, en los estudios *in vitro*, donde no aparecen ciertos estímulos para las células mononucleares, su concentración disminuye.

Las células mononucleares de pacientes con *M. tuberculosis* producen grandes cantidades de IL-10 al incubarlas con antígenos de la pared celular.³² En este estudio se demostró que los polisacáridos estimularon la producción de IL-10, que es una citocina antiinflamatoria o reguladora negativa de la activación del sistema inmunitario. Los polisacáridos se encuentran en grandes concentraciones en la pared celular de la micobacteria; cuando hay una infección muy bacilífera, el sistema inmunitario no responde adecuadamente y los polisacáridos bacterianos se convierten en moléculas que conducen a la anergia en pacientes con tuberculosis miliar.

M. tuberculosis incrementa la expresión de CD14 en la superficie de los monocitos.³³⁻³⁴ En este estudio, los extractos proteínicos y lipídicos aumentaron su expresión. Los CD14 son receptores para *M. tuberculosis*, de manera que cuando el bacilo incrementa su expresión asegura la entrada de más bacterias al macrófago.

Una investigación señala que la expresión del gen CD64 es elevada en los monocitos de pacientes con tuberculosis;³⁵ sin embargo, al analizar la proteína no hubo producción significativa en ninguno de los grupos tratados con antígenos. Se requieren más estudios para explicar esta diferencia, pues quizás haya producción de RNA mensajero, pero no traducción de éste.

La expresión de CD206 aumentó con los mismos extractos (proteicos y lipídicos). Un estudio reportó que, aunque el receptor de manosa CD206 es característico de células inmaduras, en condiciones inflamatorias aumenta su expresión en los macrófagos y estimula otro mecanismo para que la micobacteria ingrese a la célula huésped (macrófago).³⁶

El receptor TLR4 de fagocitos mononucleares reconoce a *M. tuberculosis* y activa una respuesta que estimula la respuesta inmunitaria innata y adquirida.³⁷ En este estudio se observó que los antígenos proteínicos elevaron la expresión de dicho receptor. Poco se sabe de la función que desempeña la respuesta inmunitaria innata en la resistencia a la infección y su curación, pero el hecho que TLR4 se incrementa con productos micobacterianos sugiere que al iniciar la infección estimula un mecanismo natural de

resistencia en el fagocito y cuando es superado se activa la respuesta adquirida modulada por el resto de los receptores y las citocinas que induce *M. tuberculosis*.

CONCLUSIÓN

Los antígenos de diferente naturaleza química de *M. tuberculosis* modifican selectivamente la producción de citocinas inflamatorias y la expresión de receptores de membrana en las células mononucleares. Cuando estas últimas se interrelacionan, permiten la permanencia de la infección, la respuesta inflamatoria granulomatosa y la activación adecuada o no de la respuesta inmunitaria contra *M. tuberculosis*, según la cantidad de bacilos infectantes.

REFERENCIAS

- North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2004;22:599-623.
- Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JS, et al. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2006;296:827-43.
- Wallis RS, Ellner JJ. Cytokines and tuberculosis. *J Leukoc Biol* 1994;55:676-81.
- Mossman TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
- Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* 2001;166:7033-41.
- Takii T, Abe C, Tamura A, Ramayah S, et al. Interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha augmented the cytotoxic effect of mycobacteria on human fibroblasts: application to evaluation of pathogenesis of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:187-96.
- Yamada H, Mizumo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest* 2000;80:759-67.
- Crowle AJ, Elkins N. Relative permissiveness of macrophages from black and white people for virulent tubercle bacilli. *Infect Immun* 1990;58:632-8.
- Natarajan K, Latchumanan VK, Singh B, Singh S, Sharma P. Down-regulation of T helper 1 responses to mycobacterial antigens due to maturation of dendritic cells by 10-kDa *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen. *J Infect Dis* 2003;187:914-28.
- Lopez M, Sly LM, Luu Y, Young D, et al. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like-receptor-2. *J Immunol* 2003;170:2409-16.
- Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998;66:176-80.
- Brusasca PN, Peters RL, Motzel SL, Klein HJ, Gennaro ML. Antigen recognition by serum antibodies in non-human primates experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp Med* 2003;53:165-72.
- Beatty WL, Russell DG. Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun* 2000;68:6997-7002.
- Aldwell FE, Dicker BL, da Silva Tatley FM, Cross MF, et al. *Mycobacterium bovis*-infected cervine alveolar macrophages secrete lymphoreactive lipid antigens. *Infect Immun* 2000;68:7003-9.
- Rhoades E, Hsu F, Torrelles JB, Turk J, et al. Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol Microbiol* 2003;48:875-88.
- Peteroy Kelly M, Venketaraman V, Connell ND. Effects of *Mycobacterium bovis* BCG infection on regulation of L-arginine uptake and synthesis of reactive nitrogen intermediates in J774.1 murine macrophages. *Infect Immun* 2001;69:5823-31.
- Wang CH, Kuo HP. Nitric oxide modulates interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha synthesis, and disease regression by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *Respirology* 2001;6:79-84.
- Ulrichs T, Moody DB, Grant E, Kaufmann SH, Porcelli SA. T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2003;71:3076-87.
- Moody DB, Ulrichs T, Muhlecker W, Young DC, et al. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature* 2000;404:884-8.
- Navoa JA, Laal S, Pirofski LA, McLean GR, et al. Specificity and diversity of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:88-94.
- Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003;83:91-97.
- Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998;66:1277-81.
- Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, Brown N, et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 2002;169:3155-62.
- Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, et al. Cutting edge: toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002;169:3480-4.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 1956;28:350-6.
- Reljic R. IFN-gamma therapy of tuberculosis and related infections. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27:353-64.

28. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, et al. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002;168:4620-7.
29. Wieland CW, Florquin S, Pater JM, Weijer S, van der Poll T. Interleukin-1 contributes to an effective clearance of *Mycobacterium kansasii* from the respiratory tract. *Microbes Infect* 2006;8:2409-13.
30. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 2007;178:5217-26.
31. Rook GA, Hernandez Pando R, Dheda K, Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* 2004;25:483-8.
32. Al-Attayah R, Madi N, El-Shamy AS, Wiker H, et al. Cytokine profiles in tuberculosis patients and healthy subjects in response to complex and single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;47:254-61.
33. Sánchez MD, García Y, Montes C, París SC, et al. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. *Microbes Infect* 2006;8:2492-500.
34. Rosas Taraco AG, Arce Mendoza AY, Caballero Olín G, Salinas Carmona MC. *Mycobacterium tuberculosis* up-regulate coreceptors CCR5 and CXCR4 while HIV modulates CD14 favoring concurrent infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:45-51.
35. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, Neher A, et al. Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Med* 2007;85:613-21.
36. Wollenberg A, Mommaas M, Oppel T, Schottdorf EM, et al. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2002;118:327-34.
37. Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol* 2007;9:1087-98.