



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

**ESTRUCTURA DEL 'CORD FACTOR' DE
MICOBACTERIAS ATÍPICAS Y SU RELACIÓN
CON LA CAPACIDAD DE INDUCCIÓN DE
DIVERSAS CITOQUINAS DE RELEVANCIA
EN TUBERCULOSIS**

Trabajo realizado por Carlos Linares Pérez
para optar al grado de doctor por la Universidad de Murcia

Agradecimientos:

Al término de la realización de esta Tesis quiero expresar mis agradecimientos:

Al Dr. D. Pedro Luís Valero Guillén por la dirección, constante apoyo científico, consejos y enseñanzas, sin los cuales no podría haber llevado a cabo este trabajo.

Al Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí de La Habana, Cuba, por la cesión de las cepas de *M. simiae* y '*M. habana*', y muy en especial a la Licenciada Dña. Lilian María Mederos Cuervo, por su colaboración y por su amistad.

Al Servicio de Apoyo a la Investigación, en especial a las secciones de Cultivos y Tejidos (Dra. Dña. A. Bernabéu), Instrumentación Científica (Dra. Dña. Ana de Godos, D. Diego Martínez, D. J. Rodríguez) y Microscopía Electrónica (Dña. M. García), por su apoyo en los análisis biológicos y estructurales.

A la Dra. Dña. Marina Luquin Fernández, de la Universidad Autónoma de Barcelona, por ceder las cepas de *M. alvei* y *M. brumae*, y por permitirnos el uso de una de las figuras de microscopía electrónica que ilustra esta tesis.

Este trabajo ha sido realizado con la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación y la Unión Europea, FEDER (contrato PI080079).

Llegados a este punto, no puedo continuar con unos agradecimientos tan formales, así que voy a seguir como más me gusta a mí, que es haciendo referencia a lo que ahora mismo siento de cómo las personas que me han rodeado estos años han participado para que llegue hasta este punto. El sentimiento que recorre mi cuerpo en estos momentos es la incertidumbre, una encrucijada que se asemeja a los libros de “elige tu propia aventura” que me leía cuando era pequeño, además, encuentro que hay más similitudes de las que en un principio pensaba con la gente que me rodea, así que agradeceré en torno a ello:

A Pedro, nuevamente, que representaría la figura del rey en este libro, la persona que confía ha confiado en mí y me ha encomendado una misión por la que he obtenido una gran recompensa. Debo dar las gracias dos veces a Pedro porque es la persona que se ha encargado de acoger a un investigador que gateaba en pañales, le ha enseñado a caminar, hablar y el verdadero significado de “ser investigador”, me ha cuidado en mi etapa de crecimiento y me ha dejado en las puertas de la escuela donde empieza la segunda etapa de mi carrera investigadora, muchas gracias.

A Lilian (que representa a la reina), la otra persona a la que le estoy bi- (tri, tetra, etc...) agradecido, porque gracias a ti conseguí dar mis primeros pasos en el laboratorio y me quitaste esos pañales que llevaba puestos, por tus enseñanzas y conversaciones en los tan añorados almuerzos “¿Vamos a tomarnos unos tesitos?”, por acogerme en tu “lasquita verde” de forma tan agradable y ofrecerme los manjares que me serviste, por mostrarme tu forma de ver la vida... y por supuesto, por ser mi madre cubana.

A Toñi (mi oráculo y guía en momentos más difíciles), debo agradecer tanto a la parte de jefa del servicio de cultivos como la de amiga, porque trabajar contigo no sólo ha sido instructivo y agradable, ha sido divertidísimo, me he reído un montón y lo he pasado genial en nuestras eternas jornadas de 10 – 12 horas esperando a que el citómetro nos de unos resultados que nadie puede entender o a que el espectrofotómetro diga que no hay color en las muestras analizadas.

A Pepe, Diego, Ana y el personal de microscopía electrónica (los tenderos, taberneros y armeros), por vuestra dedicación, porque gracias a vosotros he conseguido unir todas las piezas de los rompecabezas que es el análisis estructural, muchas gracias por haberme podido conseguir los espectros o imágenes necesarias incluso cuando la muestra es escasa o se disuelven los compuestos al ponerles algún disolvente (o los

demás problemas que hayan pasado a lo largo de este trabajo), sin vosotros no habría conseguido ningún resultado, mil gracias.

A los trovadores que con los que he compartido mis descansos en cada taberna y locales del camino: “Cannibal Picnic” (Euge, Victor y Eric), porque sois los únicos que habéis conseguido que me gusten más los jueves que los sábados, no sé cómo... pero cada lunes me levantaba con ganas de trabajar sólo para que llegue el día de ensayo, sois muy MUY grandes chicos. “They take Our Jobs” (Pedro, Joaquin, Jacob, Iñaki, Bea e Irene), porque a pesar de que en estas últimas semanas he estado ausente, con vosotros lo paso en grande cada vez que tocamos un poco de buen rock. “Los Caravans” (Agus y Héctor), porque con vosotros la música la vivo con risas, buen rollo y el estómago bien lleno, con vosotros todos los días es un “feeling good” (¡ni la vamos a tocar!).

Mis compañeros de viaje en antiguas misiones en el poblado de Villa Alcludia (Compañera, Viki, Chofi, Rayan, Sr. Albéniz, demás gente que habéis andado, y andáis, por esas calles) también merecen una especial mención. Os agradezco, no sólo por ser mis compañeros y amigos, más bien os debo dar las gracias por todos esos buenos ratos que me habéis hecho pasar; esos almuerzos y comidas geniales hablando de zombies, fútbol, compresas y depilaciones (láser o a cera); por aguantar al pesado que todas las tardes iba preguntando si alguien merendaba; por todos los goles que me habéis marcado y porque cada día de trabajo era como un día de fiesta, siempre guardaré mi paso por Villa Alcludia con mucho cariño, gracias a vosotros.

A mis amigos que siempre han estado ahí para ayudarme cuando lo he necesitado con lo que sea, aunque sea escucharme decir cosas rarísimas sobre bacterias y lípidos: Brothers (Isidro, Alfonso, Jordi y Patri), Vero, Marta, Rebe, Viki, Ju, Salva, Mar, Cal·la, Luismi y todos mis amigos de Alicante y de la universidad. Mira que he sido pesado y todavía continuáis preguntando y, lo más sorprendente, escuchando, gracias.

Especial mención de agradecimiento quiero hacerle a mi dulcinea (Alicia), una de las personas que se merece que le dedique esta victoria (sólo con escribir esto para mí ya es una victoria). Sin ti no habría sido capaz de llegar a este punto, gracias a tu “Heil Heil Jander Sclander” comportamiento, sin el cual no habría encontrado las fuerzas necesarias para seguir escribiendo cuando menos ganas tenía o más cansado me encontraba de la tesis. Tus fuerzas y ánimos han sido cruciales, las conversaciones sobre

estadísticas pre- y post- visualización de series, estando de fiesta (hay que ser friki...), o cuando estábamos tranquilamente tomando algo, me han calado tan hondo que me has conquistado completamente.

Dejando de un lado la analogía del libro tengo que agradecer a mi familia el haber llegado a escribir esta tesis:

A mis tíos, que siempre han sido un gran punto de apoyo, con vosotros he aprendido a ver la vida y a disfrutarla. Por estar siempre preguntando y animándome, aunque tal vez sea para celebrar otra tesis yéndonos de comilona... gracias a vosotros, con las comidas todos juntos he podido desestresarme, con los viajes hemos compartido momentos increíbles y me habéis enseñado lo que es querer a una familia.

A la pitufa, porque en los momentos más difíciles siempre me has hecho reír (aunque tú no hayas sido consciente), ya sea por haber sido la más aclamada cantautora, haciendo trucos de magia increíbles con una cuerda o hacer la croqueta en el césped, me haces reír simplemente por ser tan pitufa.

A mi hermano Héctor (mi maxi-yo). Porque de música a juegos, de conciertos a rol o de viajes a ¡Jurrs! Siempre hemos estado juntos y lo estaremos.

A mi hermana Noemi. Gracias a seguir tus pasos he podido llegar hasta aquí. Pero creo que de momento me planto, si quieres seguir sacándote títulos te dejo un poco de ventaja, pero te pillaré...

A mis padres, porque han tenido que aguantar a un segundo hijo que se saca la tesis (por si uno no fuera suficiente). Por el apoyo incondicional que siempre me habéis brindado y por el amor que siempre he recibido de los dos.

No pueden faltar las tres estrellas que brillan juntas en el cielo, de las que he aprendido lo importante que es esforzarse en la vida, compartir los buenos momentos con tus seres queridos y por supuesto disfrutarlo todo con un poco de tranquilidad, todo aderezado con una buena ración de amor. Seguiré con vuestras enseñanzas para seguir avanzando.

Publicaciones:

Parte de los resultados de la presente tesis se han publicado en la revista *Microbiology* (Society for General Microbiology; UK) (FI: 3.061):

Mederos, L.M., Montoro, E.H., Bernabéu, A., Linares, C. Valero-Guillén, P.L. 2010. Structural studies of cord factors from *Mycobacterium simiae* related to capacity for tumor necrosis factor alpha (α -TNF) induction. *Microbiology* 156, 3744-3753.

Linares, C., Bernabéu, A., Luquin, M., Valero-Guillén, P.L. 2012. Cord factors from atypical mycobacteria (*Mycobacterium alvei*, *Mycobacterium brumae*) stimulate the secretion of some pro-inflammatory cytokines of relevance in tuberculosis. *Microbiology* 158, 2878-2885.

A mis padres
A mis hermanos
A mis tios y a la pitufa
A mis iaos y al nano

A todos vosotros por darme las fuerzas para continuar
y ser un objetivo a alcanzar

Índice

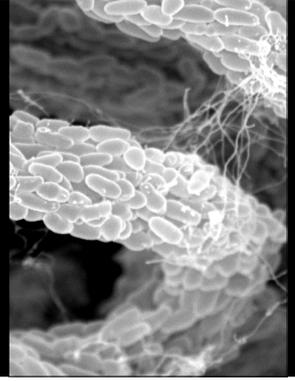
| | | |
|----|---|----|
| 1. | Introducción | 1 |
| | <u>Mycobacterium: generalidades</u> | 3 |
| | <u>Envoltura celular de Mycobacterium</u> | 5 |
| | Peptidoglicano | 6 |
| | Arabinogalactano | 7 |
| | Fosfatidilinositol manósidos y lipoarabinomanano | 8 |
| | Ácidos micólicos | 12 |
| | Glicolípidos | 22 |
| | <u>Glicolípidos basados en trehalosa</u> | 23 |
| | Aciltrehalosas | 24 |
| | Sulfolípidos | 24 |
| | ‘ <i>Cord factor</i> ’ | 26 |
| | Fleatos de trehalosa | 27 |
| | <u>Lipooligosacáridos</u> | 28 |
| | <u>Glicolípidos fenólicos</u> | 28 |
| | <u>Glicopéptidolípidos</u> | 30 |
| | Proteínas de la envoltura celular | 31 |
| 2. | Hipótesis y objetivos | 33 |
| 3. | Materiales y métodos | 41 |
| | <u>Cepas estudiadas y condiciones de cultivo</u> | 43 |
| | <u>Extracción, purificación y análisis estructural del</u> | |
| | <u>‘cord factor’</u> | 44 |
| | <u>Actividad biológica del CF</u> | 46 |
| | Líneas celulares utilizadas | 46 |
| | Análisis preliminar de la inducción de TNF-α en | |
| | Células RAW 264.7 por parte del ‘cord factor’ de | |
| | <i>Mycobacterium simiae</i> | 47 |
| | Análisis de la inducción de IL-1β, IL-6, IL-12p40 | |
| | total (IL-12/IL-23) y TNF-α en células RAW 264.7 | |

| | | |
|-----|--|-----|
| | por parte del ' <i>cord factor</i> ' de diversas micobacterias | 47 |
| | Análisis de la inducción de IL-6 y TNF-α en células RAW 264.7 por parte de diversos tipos estructurales de ácidos micólicos | 48 |
| | Análisis de la inducción de IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF-α en células THP-1 por parte del '<i>cord factor</i>' de diversas micobacterias | 49 |
| | <u>Análisis estadístico</u> | 50 |
| 4. | Resultados | 53 |
| 4.1 | Estructura fina del ' <i>cord factor</i> ' | 55 |
| | <u>Análisis estructural del '<i>cord factor</i>'</u> | 58 |
| | <u><i>Mycobacterium simiae</i></u> | 59 |
| | <u><i>Mycobacterium alvei</i> CR-21^T</u> | 67 |
| | <u><i>Mycobacterium brumae</i> CR-270^T</u> | 69 |
| | <u><i>Mycobacterium fortuitum</i> AC1</u> | 70 |
| | <u><i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv</u> | 72 |
| 4.2 | Actividad biológica del ' <i>cord factor</i> ' | 77 |
| | <u>Células RAW 264.7</u> | 79 |
| | Estudio preliminar de la inducción de TNF-α por parte del CF de <i>M. simiae</i> | 79 |
| | Inducción de IL-1β, IL-6, IL-12p40 total y TNF-α por parte del CF de diversas micobacterias | 79 |
| | <u>Estudio de la actividad biológica en la línea celular THP-1</u> | 83 |
| | Inducción de IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF-α | 83 |
| 5. | Discusión | 89 |
| 6. | Conclusiones | 101 |
| 7. | Bibliografía | 105 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------------|---|
| AG | Arabinogalactano |
| Ag85 | Antígeno 85, micoloiltransferasa |
| AM | Ácido micólico |
| AT | Acetiltransferasa |
| BCG | Bacilo de Calmette Guérin |
| CC | Cromatografía en columna |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| CEMOVIS | Microscopía crio-electrónica de secciones vítreas |
| CF | ' <i>Cord factor</i> ' |
| CM | Membrana plasmática |
| ^1H - ^1H COSY | ' ^1H - ^1H Homonuclear correlated pectroscopy' (Espectroscopía de correlación ^1H - ^1H) |
| DIM | Dimicocerosato de ftiocerol |
| ESI-TRAP-MS | Electrospray ionization ion trap mass spectrometry (espectrometría de masas con ionización mediante electrospray y análisis en trampa iónica) |
| ^1H - ^{13}C HMQC | ' ^1H - ^{13}C Heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy' (Espectroscopía de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C) |
| IL | Interleuquina |
| Inf- γ | Interferón gamma |
| IPK | Instituto de MedicinaTropical Pedro Kourí de La Habana, Cuba |
| LAL | Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i> |
| LAM | Lipoarabinomanano |
| LM | Lipomanano |
| PG | Péptidoglicano |
| PIM | Fosfatidilinositol manósido |
| Pks | Polikétido sintasa |
| RMN | Resonancia magnetica nuclear |
| TLR | Receptor tipo toll |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |

INTRODUCCIÓN



Mycobacterium: generalidades

Mycobacterium es el género tipo de la familia *Mycobacteriaceae*, integrada en el suborden *Corynebacterineae*, orden *Actinomycetales*, subclase *Actynobacteridae*, clase *Actinobacteria* (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>). Son bacilos Grampositivos, ácido-alcohol resistentes, aerobios, no esporulados, con una pared celular rica en lípidos y con una estructuración muy particular. *Mycobacterium* está filogenéticamente relacionado con diversas bacterias de alto contenido en G+C, entre las que destacan *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Gordonia*. *Mycobacterium* contiene más de un centenar de especies (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>), entre las que se encuentran los patógenos estrictos *M. tuberculosis* y *M. leprae* y otras que son consideradas saprófitas o patógenas oportunistas (Fakilnham, 1996).

El tiempo de generación de las especies de *Mycobacterium* oscila entre 2 y 20 horas (Wayne y Kubica, 1986), lo que hace posible su división en dos grandes grupos:

1. Especies de crecimiento lento, que producen colonias visibles tras 7 días o más de cultivo; p.ej. *M. tuberculosis*.
2. Especies de crecimiento rápido, con colonias visibles en menos de 7 días; p.ej. *M. brumae*.

Algunas micobacterias sintetizan pigmentos carotenoides incluso en la oscuridad (escotocromógenas), otras por acción de la luz (fotocromógenas), y las hay que no son pigmentadas (no cromógenas), lo que facilita, junto a la velocidad de crecimiento, su clasificación práctica en microbiología clínica (Runyon y cols., 1974). La gran mayoría de las micobacterias tienen requerimientos nutricionales simples, aunque, por lo general, se cultivan en medios especiales, como Löwenstein-Jensen, Middlebrook (7H9 y 7H10), Dubos y otros (Bacon, 2008). De todas las micobacterias descritas hasta la fecha, *M. leprae* (causante de la lepra) es la única que no ha podido ser aislada en medios artificiales, aunque sí puede mantenerse *in vivo* en el armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*).

Desde un punto de vista clínico, *M. tuberculosis* es, sin duda, la especie más

importante del género, al ser el agente etiológico de la tuberculosis, una enfermedad distribuida mundialmente y de la que se producen unos 8-9 millones de casos nuevos/año y entre 1-2 millones de muertes/año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un tercio de la población mundial está infectada con este microorganismo y que entre el 5 y el 15 % de las personas infectadas desarrollará la enfermedad a lo largo de su vida. La tuberculosis es, principalmente, una enfermedad pulmonar; no obstante, al igual que diversas micobacterias atípicas, *M. tuberculosis* puede producir infección urinaria, genital, osteo-articular, intestinal, de tejidos blandos, meníngea, pleural, ocular, infecciones diseminadas y linfadenitis (Casal, 1983). Esta situación se agrava por la aparición de cepas multi-resistentes (MDR) -que no responden al tratamiento con medicamentos de primera línea- y extremadamente resistentes (XDR) -cepas que no responden al tratamiento con medicamentos de primera y segunda línea (<http://www.who.int/tb/country/en/>). La falta de prevención y atención sanitaria puede ocasionar varias decenas de millones de casos en las próximas décadas (<http://www.who.int/tb/country/en/>); a este hecho hay que añadir la especial predisposición de personas inmunodeprimidas y, particularmente, la coinfección con VIH.

Aunque, la situación de la lepra parece estar controlada en la actualidad (<http://www.who.int/tb/country/en/>), el espectro de enfermedades ocasionadas por *Mycobacterium* se ve ampliado a las denominadas micobacterias atípicas o no tuberculosas (*M. kansasii*, *M. avium*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, etc.), las cuales están implicadas en diversos tipos de micobacteriosis (Falkinham, 1996).

En general, la patogénesis de las enfermedades producidas por el género *Mycobacterium* no es bien conocida; no obstante, se sabe que la afinidad por el tejido a infectar está influenciada por el contenido lipídico de su envoltura celular (Neyrolles y Guilhot, 2011); por ejemplo, dimicocerosatos de ftiocerol en *M. tuberculosis* (Cox y cols., 1999), y glicolípidos fenólicos en *M. leprae* (Spencer y Brennan, 2011). En este contexto, uno de los componentes más estudiados es el 'cord factor' (CF) (dimicolato de trehalosa), que interviene en la formación de los granulomas, lesiones características de la tuberculosis (Hunter y cols., 2006 a y b), y en los eventos de tipo celular y metabólico implicados en su formación y evolución (Rusell, 2007). Por otra parte, diversas

proteínas, como el complejo ESAT-6/CFP-10 -cuya secreción está regulada por el sistema ESX-1 (Simeone y cols., 2009)-, juegan, así mismo, un importante papel en la virulencia de *Mycobacterium*, habiéndose implicado en la capacidad que tiene este microorganismo de escapar al citoplasma de los macrófagos tras la fagocitosis (Houben y cols., 2012). Estos datos ilustran el importante papel de la envoltura celular de las micobacterias en el inicio y desarrollo de la tuberculosis y micobacteriosis.

Envoltura celular de *Mycobacterium*

La envoltura celular de las micobacterias está formada por la membrana plasmática y la pared. A pesar de ser bacterias Grampositivas, las micobacterias presentan componentes en la pared de naturaleza lipídica y polisacáridica que las hace peculiares, hecho que ocurre de forma similar, pero menos acusada, en los géneros que conforman el suborden *Corynebacterineae*. El esqueleto de la pared celular está compuesto por el peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y los ácidos micólicos (AM), que le otorga una estructuración particular a la envoltura celular (Figura 1). La micomembrana, la parte más externa de la envoltura celular, recuerda a la membrana externa de bacterias Gramnegativas, en cuanto a su estructuración, pero presenta grandes diferencias de composición. Diversos análisis (Hoffmann y cols., 2008; Zuber y cols. 2008) realizados mediante técnicas especiales de microscopía electrónica (CEMOVIS ('Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections'), demuestran la presencia de una membrana externa (o micomembrana) y de un espacio periplásmico, que alojaría al péptidoglicano y arabinogalactano (Figura 1). Los AM formarían, mayoritariamente, la parte más interna de la membrana externa, interaccionando hidrofóbicamente con otros lípidos que completarían la formación de esta estructura, que ya había sido postulada por David Minnikin (1982).

Peptidoglicano

El pepetidoglicano (PG) es una capa rígida que confiere resistencia a la presión osmótica interna y actúa de soporte para otras moléculas de la pared celular. Estudiado por primera vez en las micobacterias por Misaki y Yukawa (1966), el PG está compuesto -al igual que en otras bacterias- por unidades de N-acetil-glucosamina (NAG) y de N-acetilmurámico (NAM), aunque presenta gran cantidad de residuos de

N-glicolil murámico (Mahapatra y cols., 2005; Raymond y cols., 2005). Los residuos de NAM están unidos a una cadena peptídica formada por alanina (Ala), glutámico (Glu) y ácido meso-diaminopimérico (DAP) (L-Ala-D-Glu-DPA-D-Ala). Los enlaces interpeptídicos más frecuentes se dan entre DAP y D-Ala, aunque pueden producirse entre DAP y DAP (Draper, 1982).

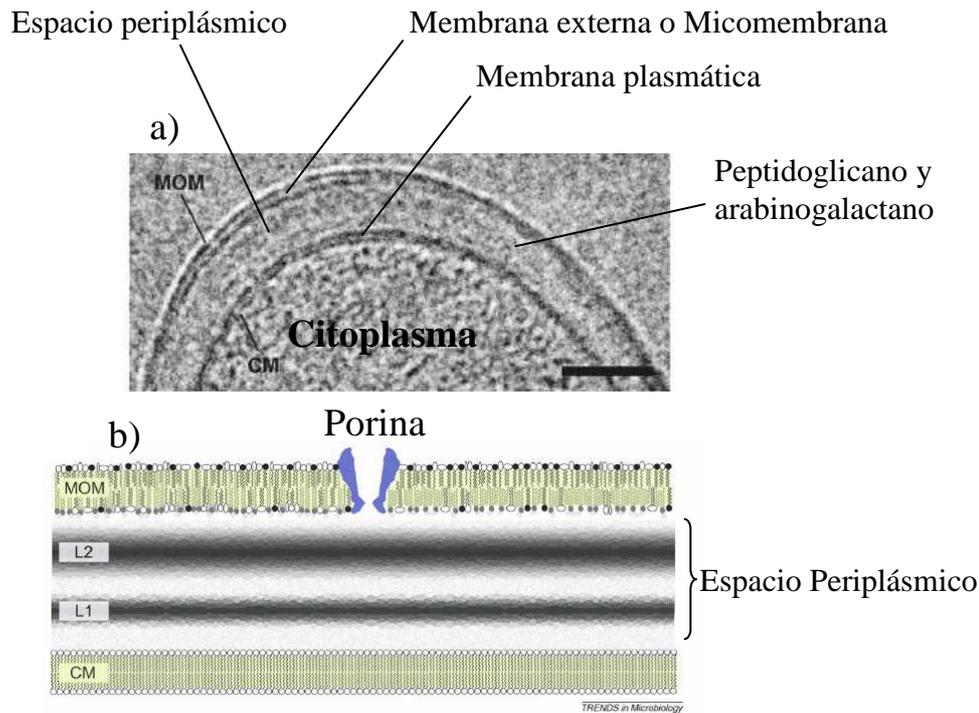


Figura 1. Envoltura celular de *Mycobacterium* (y otros miembros de *Corynebacterineae*). a) Imagen obtenida mediante criomicroscopía electrónica (CEMOVIS). b) Modelo de estructuración molecular: MOM, membrana externa (incluye un porina en azul); L2, peptidoglicano; L1, componente(s) desconocido(s); CM, membrana plasmática (Niederweis y cols., 2010).

La biosíntesis del PG es, en general, similar a la de otras bacterias (Figura 2), llevándose a cabo la oxidación del N-acetilmurámico a N-glicolilmurámico por medio de un enzima denominado NamH, aparentemente no esencial en *M. tuberculosis* (Kaur y cols., 2009). La topología exacta del PG en la pared de *Mycobacterium* está por dilucidar, existiendo modelos que consideran los enlaces glicosídicos, entre NAG-NAM, paralelos al eje principal de la bacteria y otros que estiman que éstos son perpendiculares (Kaur y cols., 2009).

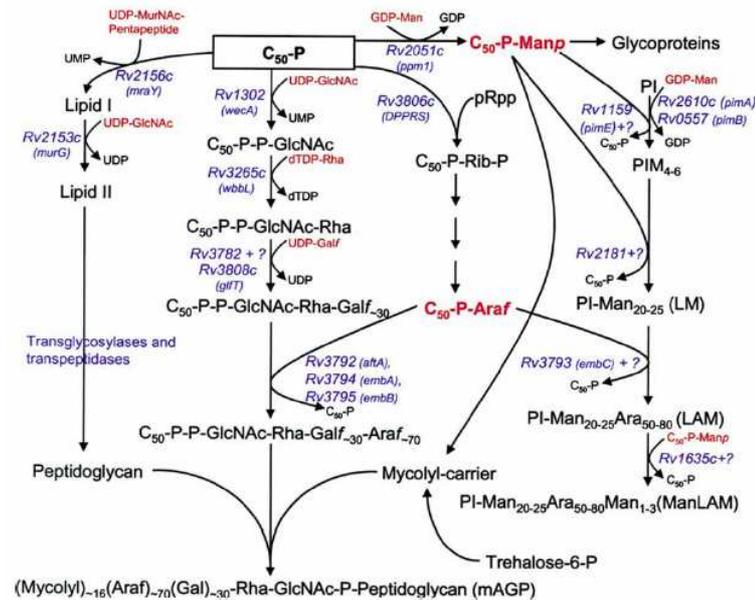


Figura 2. Biosíntesis del peptidoglicano, el arabinogalactano y el lipoarabinomano (Berg y cols., 2007).

Arabinogalactano

El AG es un polisacárido formado por arabinosa y galactosa (ambas en forma furanosa *-f*), ligado covalentemente al péptidoglicano -en concreto al 10-12% de las moléculas de ácido murámico (Lederer y cols., 1975)- a través de un enlace mediado por α -L-Rhap-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→P), conocido como unidad de unión (McNeil y cols., 1990). Este disacárido se une a un polímero lineal de galactosa (galactano), estructurado como $[-(1\rightarrow6)\text{-D-Galf}\beta\text{-(1}\rightarrow5)\text{-D-Galf-}]_{15}$. El dominio arabinano es ramificado y está compuesto por unidades de α - y β -D-arabinosa. Las cadenas de arabinano (hasta 3) están unidas a residuos de galactosa situados en las posiciones 8, 10 y 12 del galactano (Daffé y cols., 1990; Kaur y cols., 2009), cerca de su final reductor (Besra y cols., 1995). Cada cadena de arabinano está constituida por un total de 20-30 residuos de arabinosa (Kaur y cols., 2009); primero adopta una forma lineal y después se ramifica, finalizando en un dominio de seis componentes $[\beta\text{-D-Araf-(1}\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Araf}]_{2-3,5}\text{-}\alpha\text{-D-Araf(1}\rightarrow5)\text{-}\alpha\text{-D-Araf(1}\rightarrow5)\text{-(Araf)}_6$, que esterifica a cuatro ácidos micólicos (ver ácidos micólicos) en aproximadamente 2/3 de los hidroxilos del C5 de las arabinosas terminales (Daffé y cols., 1990; McNeil y cols., 1991).

La biosíntesis del AG comienza con la transferencia de NAG-1-P al decaprenil-

fosfato (C₅₀-P); seguidamente se produce la unión de la ramnosa (Rha) para formar la unidad de unión, produciéndose posteriormente la adición de Gal_f y Ara_f hasta llegar a C₅₀-P-P-NAG-Rha-[Gal_f]₋₃₀-[Ara_f]₋₇₀ (Figura 2) (Kaur y cols., 2009). Una galactosiltransferasa (GlfT1) interviene en los primeros pasos de la síntesis del galactano, si bien es la GlfT2 la que cataliza la mayor parte de la síntesis de este polisacárido. GlfT2 presenta las dos actividades necesarias para alternar las uniones β(1→5) y β(1→6) durante la polimerización del galactano (Mikusova y cols., 2000; Kremer, 2001). La adición de los primeros residuos de Ara_f se lleva a cabo por la arabinosiltransferasa Afta (Alderwick y cols., 2006; Kaur y cols., 2009), siguiendo el ciclo con EmbA y EmbB, responsables de la formación del motivo Ara_f₆. En este proceso intervienen otras arabinosiltransferasas, que completan la estructura del arabinano (Kaur y cols., 2009). Finalmente, el AG se une al PG por la acción de una arabinogalactanoligasa y la unión de los ácidos micólicos es catalizada por varias micololiltransferasas (Ag85) (Alderwick y cols., 2007; Takayama y cols., 2005) (Figura 2). La mayor parte de los genes implicados en la biosíntesis del AG han demostrado ser esenciales en *M. tuberculosis* y otras micobacterias (Kaur y cols., 2009).

Fosfatidilinositol manósidos y lipoarabinomanano

La envoltura celular de *Mycobacterium* es rica en manosa (Man), especialmente por la presencia de fosfatidilinositol manósidos (PIMs) y lipoarabinomanano (LAM), junto a una forma de LAM sin arabinano denominada lipomanano (LM) (Figura 3). Estos compuestos se relacionan estructural y biosintéticamente entre sí, al anclarse a la membrana plasmática por un residuo de fosfatidil-*myo*-inositol, sustituido en C6 por una manosa (Kaur y cols., 2009). Los PIMs actúan como molécula de anclaje de LAM y LM a la membrana, y también participan en la inmunopatogénesis de la tuberculosis (Hunter y Brennan, 1990).

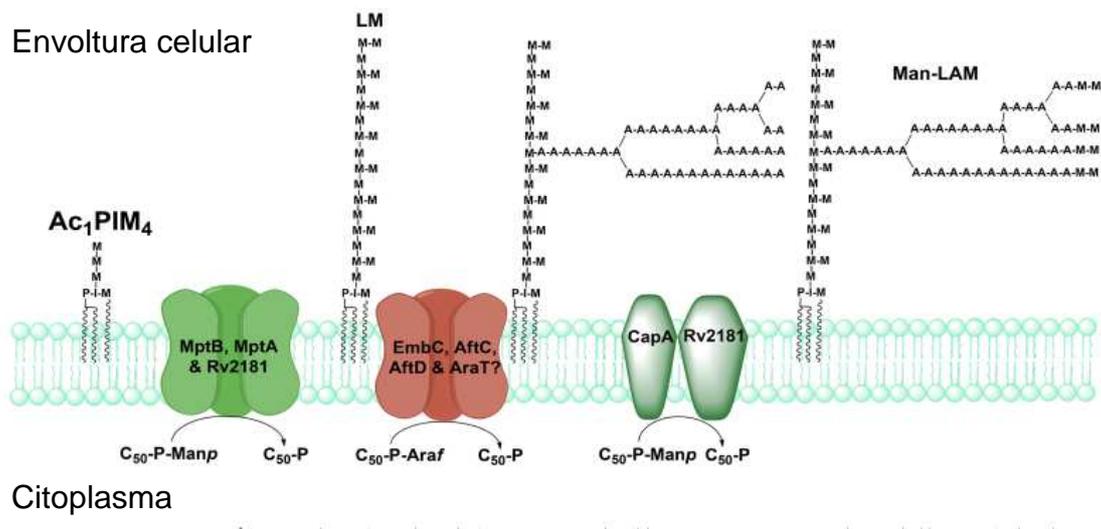


Figura 3. Biosíntesis del lipomanano y el lipoarabinomanano en *Mycobacterium tuberculosis* con algunas de las proteínas insertadas en la membrana plasmática que intervienen en la formación de ambos compuestos (Mishra y cols., 2011).

Los PIMs pueden llegar a presentar hasta un máximo de 6 manosas, estos se nombran con un subíndice (v.g. PIM₄ para la molécula con 4 manosas), siendo los mayoritarios PIM₂ y PIM₆ (Figura 4) en *Mycobacterium* (Gilleron y cols., 1999). El dominio de anclaje a la membrana está formado por una unidad de *sn*-glicerol-3-fosfo-(1-D-myo-inositol), con una α -D-Manosap unida en el O-2 del myo-inositol (Figura 4); contiene de tres a cuatro sitios de acilación (Khoo y cols., 1995; Nigou y cols., 1999), ocupados, comúnmente, por palmítico y tuberculosteárico (Nigou y cols., 2003).

El precursor biosintético principal de los PIMs es el fosfatidilinositol dimanosido (PIM₂) que tiene una segunda manosa en la posición O-6 ($\alpha 1 \rightarrow 6$) del myo-inositol (Ballou y cols., 1963; Ballou y Lee, 1964; Lee y Ballou, 1964, 1965). La adición de manosas para la formación de PIM₃ y PIM₄ es idéntica a la de PIM₂ ($\alpha 1 \rightarrow 6$), pero en PIM₅ y PIM₆ el enlace que se crea es ($\alpha 1 \rightarrow 2$) (Lee y Ballou, 1964; Chatterjee y cols., 1992a; Severn y cols., 1998).

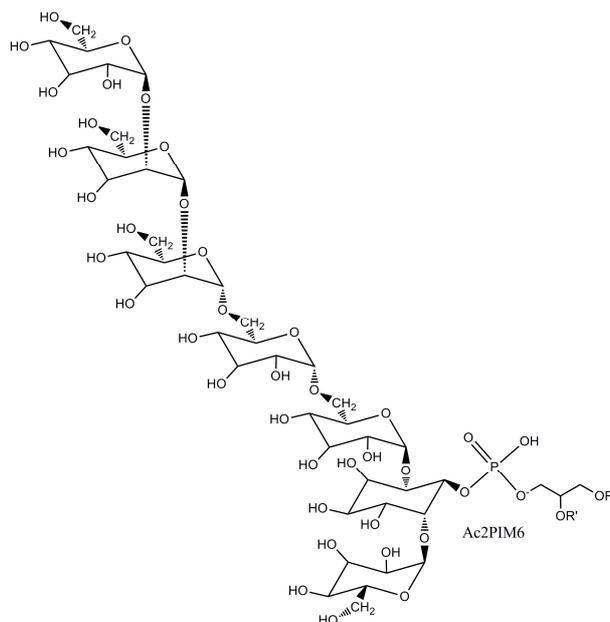


Figura 4. Estructura del PIM6.

El LAM es, junto con el AG y el PG, uno de los principales polisacáridos que forman parte de la envoltura celular del género *Mycobacterium*, considerándose como uno de los factores de virulencia (Hunter y Brennan, 1990). El esqueleto polisacárido del LAM está compuesto por dos homopolisacáridos: manano y arabinano (Figura 3). La ausencia de arabinano implica la existencia del lipomanano (LM) (Figura 3). Enlaces de α -D-manosa-(1-6)- (homomanano) forman lo que se podría denominar la “columna vertebral” de este polisacárido (Misaki y cols., 1977; Chatterjee y cols., 1991, 1992a, b), que se compone de 30 a 35 residuos de manopiranosas (*Manp*) (Figura 3) (Mishra y cols., 2011). Ocasionalmente, puede aparecer un residuo (α 1 \rightarrow 6) *Manp* sustituido en *O*-2. La cantidad de este tipo de sustituciones es diferente según la especie; así, en los estudios realizados con *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, se les otorgan un 70% de sustitución (Nigou y cols., 2000). El dominio arabinano está constituido por una cadena lineal de (α 1 \rightarrow 5)*Araf* -hasta un máximo de 70- con ramificaciones 3,5- α -D-*Araf*, que pueden formar cadenas lineales de tetra-*Araf* -[*Araf*-(β 1 \rightarrow 2)-*Araf*-(α 1 \rightarrow 5)-*Araf*-(α 1 \rightarrow 5)-*Araf*-(α 1 \rightarrow)-] y cadenas ramificadas de hexa-*Araf* -[[*Araf*-(β 1 \rightarrow 2)-*Araf*-(α 1 \rightarrow)]₂ \rightarrow 3 y \rightarrow 5)-*Araf*-(α 1 \rightarrow 5)-*Araf*-(α 1 \rightarrow)-] (Chatterjee y cols., 1991; Chatterjee y cols., 1993). En los extremos de la *Araf* del LAM pueden aparecer residuos de mono-, di- o tri- (α 1 \rightarrow 2)-D-*Manp* (Man-LAM) (Chatterjee y cols., 1992 b y 1993; Venisse y cols., 1993), como es el caso de *M. tuberculosis* y otras micobacterias de crecimiento lento

(Chatterjee y cols., 1992a; Khoo y cols., 1995 y 2001; Mishra y cols., 2011; Venisse y cols., 1993). En especies de crecimiento rápido (*M. chelonae*) no existe *Manp* distal (Ara-LAM), aunque en algunos casos (*M. smegmatis*) sí se ha detectado una unidad de fosfoinositol (PI-LAM) (Mishra y cols., 2011). Nigou y cols. (1997) identificaron otras variaciones en la estructura del LAM, que se relacionan con la presencia de residuos de ácido succínico en la parte polisacáridica y a la diferenciación -de acuerdo con la forma de extracción- entre formas parietales y celulares. Las primeras contienen como ácido graso mayoritario un compuesto identificado como ácido-12-O-metilpropanoil-esteárico, aparentemente vinculado con la capacidad de regular la supervivencia en el macrófago.

En la biosíntesis del homomanano del LAM, dos manosiltransferasas, denominadas MptA y MptB, se encargan de la formación de la cadena de manosa ($\alpha 1 \rightarrow 6$) en el extremo distal y proximal, respectivamente. Las sustituciones ($\alpha 1 \rightarrow 2$)-D-*Manp* se cree que están formadas por la acción de la MptC (Figura 3) (Mishra y cols., 2011). El dominio arabinano empieza a formarse una vez que el lipomanano se ha sintetizado; en este momento la cadena de residuos de manosa se prepara con la adición de algunas moléculas de Araf (Ara-LM), de forma similar a como ocurre en el AG (Alderwick y cols., 2006). El Ara-LM es extendido -entre 12-16 residuos de ($\alpha 1 \rightarrow 5$)-Araf- por EmbC (Figura 3) (Birch y cols., 2010; Alderwick y cols., 2011). La ramificación ($\alpha 1 \rightarrow 3$)Araf está catalizada por la AftC, enzima que también es capaz de introducir el mismo enlace en el AG (Birch y cols., 2008, 2010). La elongación de la cadena ramificada se produce por una ($\alpha 1 \rightarrow 5$) arabinofuranosiltransferasa no identificada. El último enzima implicado en la biosíntesis del dominio arabinano es la AftB (Figura 3), que forma las estructuras tetra- y hexa-arabinofuranósido. El dominio terminal del LAM que se forma en algunas especies del género *Mycobacterium*, está determinado por una ($\alpha 1 \rightarrow 5$) manopiranosiltransferasa (CapA) y la elongación de la cadena con enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 2$)*Manp* se debe a MptC (Kaur y cols., 2008). La síntesis del PG y del LAM parece estar coordinada, tal y como se recoge en la figura 2.

Ácidos micólicos

Los ácidos micólicos (AM) son ácidos grasos de cadena larga, α -ramificados, β -hidroxilados (Figura 5), específicos de gran parte de los miembros del suborden *Corynebacterineae*. Los AM fueron descubiertos por primera vez en *Mycobacterium* por Stodola y cols. (1938), aunque no logró determinarse su estructura hasta 12 años después (Asselineau y Lederer, 1950). Tienen un tamaño comprendido entre los 22 y 90 átomos de carbono, dependiendo del género (Tabla 1). En R_1 , y ocasionalmente en R_2 (Figura 5), suelen presentar instauraciones; en el caso específico de *Mycobacterium*, también pueden existir grupos ciclopropano y/o funciones oxigenadas (Figura 6).

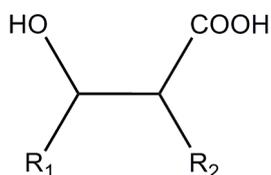


Figura 5. Estructura general de los ácidos micólicos.

Los AM de micobacterias (Figura 6) varían entre 60-90 C y se han separado en dos grupos principales:

1. Sin funciones oxigenadas adicionales al grupo $-OH$ (α - y α' -micolatos).
2. Con funciones oxigenadas adicionales en R_1 (ceto-, metoxi-, epoxi- y carboxi-micolatos).

Los α -micolatos (o ácidos α -micólicos) tienen, dependiendo de las especies, entre 60-90 C y presentan instauraciones (1 ó 2; *cis* y/o *trans*) en forma de dobles enlaces o ciclopropanos. La longitud de cadena de los α' -micolatos varía entre 60-68 C y estos compuestos se caracterizan por la presencia de un sólo doble enlace tipo *cis*. Los AM oxigenados se nombran de acuerdo con el grupo funcional; de este modo, encontramos metoxi-, ceto-, epoxi- y carboxi-micolatos (Daffé y cols., 1981; Etémadi, 1966; Minnikin y cols, 1982a; Minnikin y Goodfellow, 1980; Minnikin y Polgard, 1967). Los carboxi-micolatos aparecen en la célula esterificados a alcoholes secundarios (por ejemplo, 2-icosanol) como wax-éster-micolatos (Lanéelle y Lanéelle, 1970). Los AM oxigenados presentan una instauración, *cis* o *trans*, en forma de doble enlace o anillo

ciclopropano y derivan de un precursor común, identificado como ácido hidroximicólico (Quémard y cols., 1997). Por otra parte, Ausina y cols. (1992) han descrito en *M. alvei* un compuesto con un grupo $-OCH_3$ en la posición distal de R_1 , habiéndose identificado como (ω -1)-metoxi-micolato (Figura 6). A pesar de no poder describir su síntesis completa, su relación con los α -micolatos de la misma especie es clara, ya que sus tamaños son similares y presentan las mismas insaturaciones con la misma ratio conformacional *trans/cis*.

Tabla 1. Características generales de los ácidos micólicos de distintos géneros incluidos en *Corinebacterineae* (adaptado de Huc, 2011; Hong y cols., 2012; Laneelle y cols., 2012).

| Género | Tamaño ácido micólico | Tamaño cadena R_2 -COOH | Funciones químicas de la cadena lateral R_2 | Funciones químicas en R_1 |
|------------------------|-----------------------|---------------------------|---|--|
| <i>Corynebacterium</i> | 22-38 | 08/18 | 0-1 insaturaciones | 0-1 insaturaciones |
| <i>Rhodococcus</i> | 34-54 | 12/16 | 0-1 insaturaciones | 0-3 insaturaciones |
| <i>Nocardia</i> | 32-66 | 12/18 | 0-1 insaturaciones | 0-4 insaturaciones |
| <i>Mycobacterium</i> | 60-90 | 20-26 | 0 | Insaturación: doble enlace; ciclopropano, éster, metoxi, epoxi, hidroxilo, ceto. |
| <i>Tsukamarella</i> | 64-78 | 20-22 | 0-1 insaturaciones | 1-5 insaturaciones |
| <i>Gordonia</i> | 40-66 | 16-18 | 0-1 insaturaciones | 0-4 insaturaciones |
| <i>Dietzia</i> | 30-38 | 16-18 | 0-1 insaturaciones | 0-1 insaturaciones |
| <i>Hoyosella</i> | 30-35 | 9-12 | 0 | 0-1 insaturaciones |
| <i>Amycolobicoccus</i> | 30-35 | 9-12 | 0 | 0-1 insaturaciones |
| <i>Segniliparus</i> | 60-100 | 22-24 | 0 | 1-3 insaturaciones o ciclopropanos |

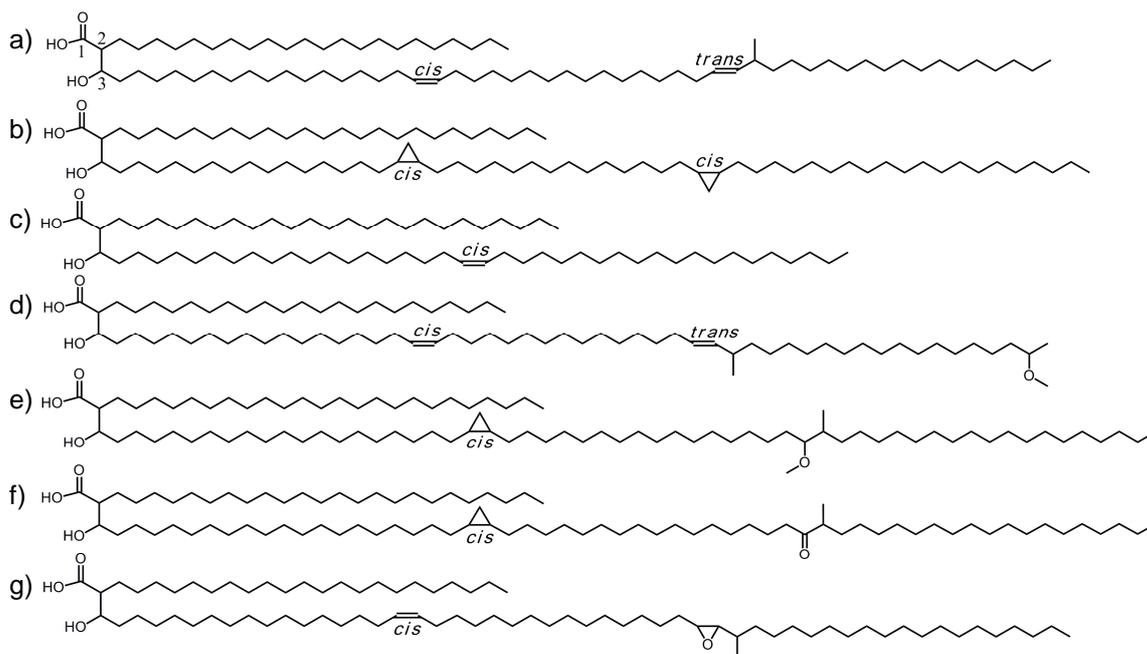


Figura 6. Estructura de distintos ácidos micólicos de *Mycobacterium*. a) α -micolato (*M. alvei*), b) α -micolato con anillos *cis*-ciclopropanos (*M. tuberculosis*), c) α' -micolato (*M. simiae* ('habana') TMC 5135), d) (ω -1)-metoxi-micolato (*M. alvei*), e) metoxi-micolato (*M. tuberculosis*), f) ceto-micolato (*M. tuberculosis*) y g) epoxy-micolato (*M. fortuitum*). El número de carbonos entre las insaturaciones varía dependiendo de la especie.

Los AM suponen hasta el 40% del peso seco de la pared celular de las micobacterias y se hallan, mayoritariamente, anclados a las arabinosas distales del AG, aunque también aparecen unidos a la trehalosa [formando mono- y di-micolatos de trehalosa (CF)] (Asselineau y Asselineau, 1978) y al glicerol (monomicolatos de glicerol). Recientemente, estos compuestos se han detectado esterificando residuos de serina en porinas de bajo peso molecular de corinebacterias (Huc y cols., 2010). Los AM ligados al AG forman una capa hidrofóbica que actúa de base para la formación de la membrana externa de *Corynebacterineae* (Hoffman y cols., 2008; Zuber y cols., 2008) e intervienen en el mantenimiento de la fluidez de la envoltura celular de estos microorganismos (Minnikin, 1982). La disposición real de los AM de micobacterias en la pared es desconocida, aunque, de acuerdo con estudios biofísicos (Villeneuve y cols., 2010) y estructurales (Brennan, 2003; Hoffman y cols., 2008; Zuber y cols., 2008) se maneja la hipótesis de que estén plegados en W (Bhamidi y cols., 2011) (Figura 7).

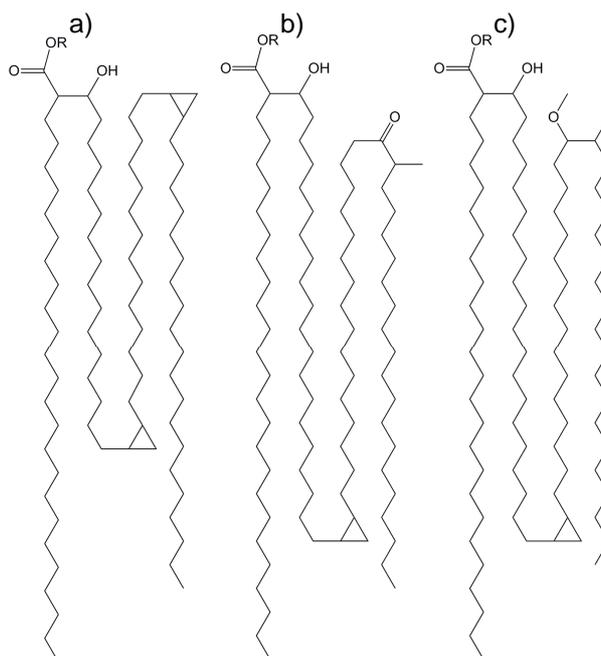


Figura 7. Representación en W de los Ácidos micólicos mayoritarios de *M. tuberculosis*: a) α -micolato, b) ceto-micolato, c) metoxi-micolato. R = arabinogalactano, trehalosa, glicerol ó H.

La importancia de la estructura fina de los AMs en la virulencia de *M. tuberculosis* ha sido demostrada por varios grupos de investigación. *M. tuberculosis* contiene α -, metoxi- y ceto-micolatos (Figura 7), en donde las insaturaciones aparecen, sobre todo, como *cis*-ciclopropanos (Minnikin, 1982; Watanabe y cols., 2001), habiéndose relacionado la presencia de estos grupos funcionales con la supervivencia en macrófagos (Glickman y cols., 2000; Rao y cols., 2005), la actividad inmunomoduladora del CF y algunos aspectos de la inmunología de la tuberculosis (Dao y cols., 2008; Vander y cols., 2011). Por otra parte, la formación de estos compuestos se ve inhibida por la acción de la isoniazida (Banerjee y Bhattacharyya, 2012; Bernadou y cols., 2001), lo que pone de manifiesto el gran potencial que supondría el conocer detalladamente la biosíntesis de estos compuestos.

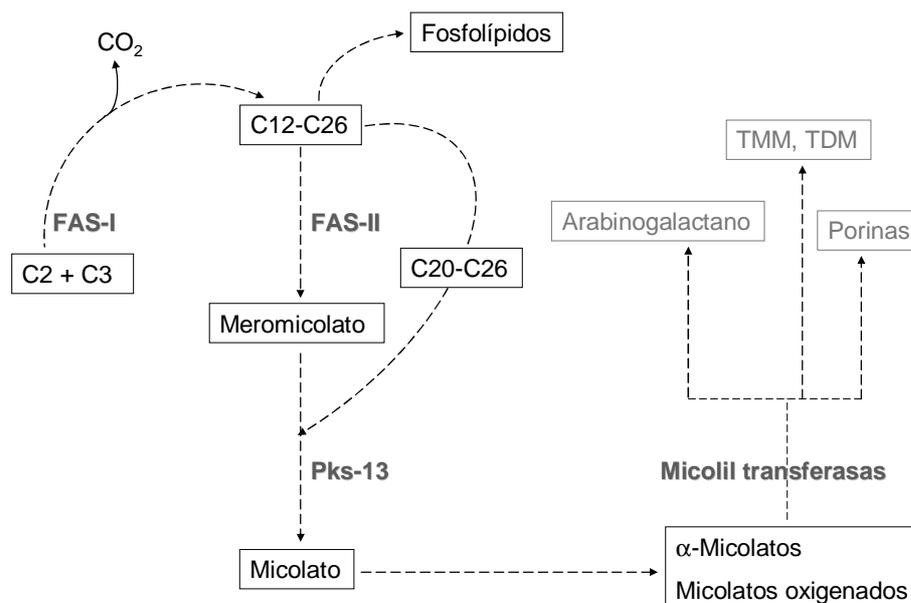


Figura 8. Esquema general de la síntesis y procesamiento de ácidos micólicos. FAS, ácido graso sintasa. Pks, poliketido sintasa. TMM, Monomicolato de trehalosa. TDM, Dimicolato de trehalosa.

La biosíntesis de los AM y su transferencia a la envoltura celular es un proceso complejo (Figura 8) en el que intervienen dos ácido graso-sintasas (FAS-I y FAS-II), una poliketido-sintasa (Pks-13) y varias metil- y micolil- transferasas. FAS-I es un complejo multienzimático de procariontes y eucariotes implicado en síntesis de ácidos grasos de C12-C26 que, a la postre, formarán parte de los fosfolípidos de membrana o serán alargados por FAS-II -un sistema desagregado que aparece en plantas y bacterias- hasta un ácido C50-C60 (meromicolato o meroácido). En el meromicolato se introducen distintos grupos estructurales (insaturaciones –dobles enlaces y/o ciclopropanos- y grupos oxigenados). Posteriormente, Pks-13 forma la molécula completa del ácido micólico mediante una condensación tipo Claisen entre un C50-C60 (FAS-II) y un C20-C26 (FAS-I) (Takayama y cols., 2005). Los distintos AM (oxigenados y no oxigenados), se transfieren al AG y otros compuestos de la envoltura celular, mediante un proceso en donde intervienen, entre otras moléculas, diversas micoliltransferasas (Takayama y cols., 2005).

La formación del AM por parte de FAS-I y FAS-II se produce por varios ciclos de reacciones, integradas por condensaciones, ceto reducciones, deshidrataciones y enoil

reducciones, en donde actúan, respectiva y secuencialmente, los enzimas β -cetoacil-ACP sintetasa, β -cetoacil-ACP reductasa, β -hidroxiacil-ACP deshidrasa y enoil-ACP reductasa (De Souza, 2008) (Figura 9).

El ciclo para la FAS-II (Figura 9) comienza a partir de una molécula de acil-CoA (proveniente de FAS-I) y otra de malonil-CoA, y, en concreto, tras la formación de acil-ACP (acil-AcpM) (catalizada por FabH) y de malonil-ACP (malonil-AcpM) (catalizada por FabD). En la condensación de ambos sustratos interviene la propia FabH, sirviendo así de unión entre las actividades de FAS-I y de FAS-II. El resto de reacciones de formación de β -cetoacil-ACP derivados es función de KasA/KasB (Figura 9) (Bhatt y cols., 2007; Takayama y cols., 2005). Parece ser que KasA participa en los primeros pasos de la elongación de la cadena, mientras que KasB es requerida para la síntesis de meromicolatos de mayor número de carbonos, incluyendo los que dan origen a los AM oxigenados (Bhatt y cols., 2007).

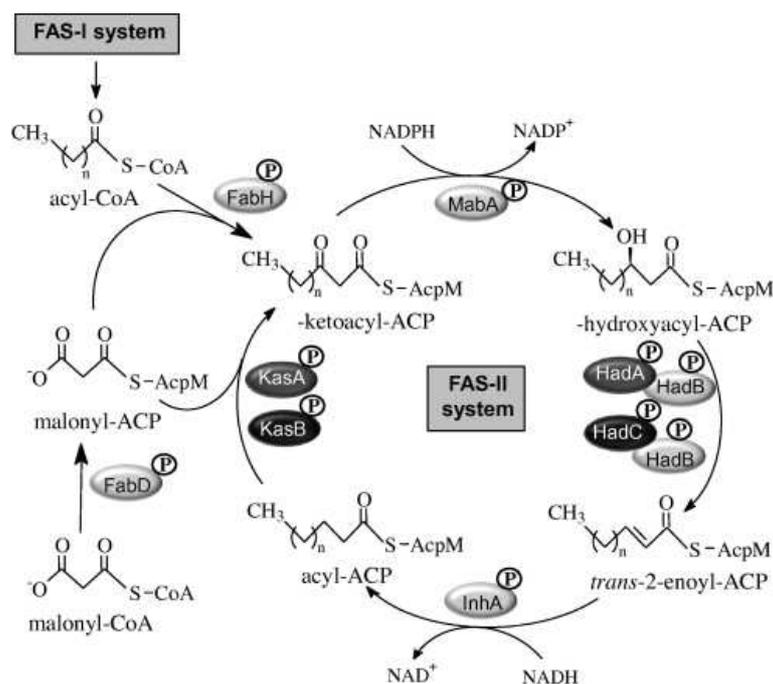


Figura 9. Ruta de elongación de los ácidos grasos por FAS-II. La biosíntesis de los ácidos micólicos es iniciada a partir de C16-CoA, producto de FAS-I. Este compuesto es transformado a C16-ACP y transformado en un meromicolato por FAS-II (Slama y cols., 2011).

En los siguientes pasos de formación del meromicolato se dan dos reducciones y una deshidratación (Figura 9). Las deshidrasas (HadAB y HadBC), que intervienen en la

conversión del hidroxiaxil-ACP a *trans*-2-enoil-ACP, han sido los últimos enzimas caracterizados dentro de este ciclo (Sacco y cols., 2007), resultan esenciales en *M. tuberculosis* y, al igual que KasA y KasB, actuarían en la elongación inicial (HadAB) y final (HadBC) de los meromicolatos. HadAB sería la única dehidrasa de géneros como *Nocardia* y *Rhodococcus* (Sacco y cols., 2007); por otra parte, estas proteínas, y el resto de FAS-II, están ausentes en *Corynebacterium*, ya que este microorganismo sintetiza sus AM a través de una condensación directa entre dos ácidos grasos C8-C18 (Sacco y cols., 2007). El producto final de la acción de FAS-II en *M. tuberculosis* es un meromicolato con dos dobles enlaces y diferentes longitudes de cadena; aquellos que son más cortos dan lugar a α -meromicolatos y los de longitud mayor (aproximadamente +6C) a meromicolatos oxigenados (Takayama y cols., 2005). Las insaturaciones provienen de las actividades de las dehidrasas y de algunas isomerasas, que reorganizan la cadena para colocar el doble enlace en su lugar (Takayama y cols., 2005). Posteriormente, estos precursores insaturados son procesados para la introducción de los dobles enlaces y/o ciclopropanos *cis* y/o *trans* que aparecen en los AM maduros (Figura 10). En los α -meromicolatos, el *cis*-ciclopropano proximal (el más cercano al grupo –COOH) es introducido por PcaA (Figura 10), mientras que el distal es función de MmaA2; en ambos casos, el donador del grupo –CH₃ es la S-adenosil metionina (SAM).

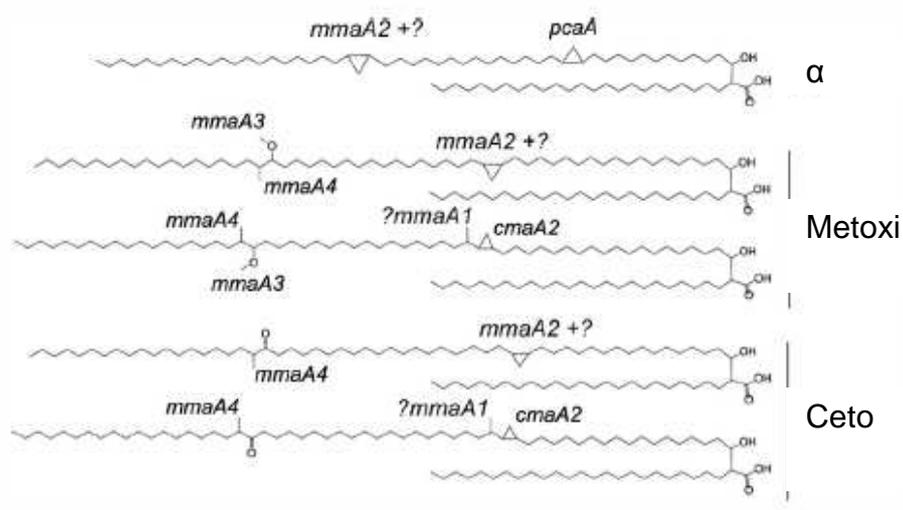


Figura 10. Estructura fina de ácidos micólicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG Russia. Se indica la posición de los anillos ciclopropano, las metil ramificaciones y los enzimas implicados en la formación de los distintos grupos funcionales (Barkan y cols., 2010).

Los meromicolatos oxigenados provienen de un precursor común, un hidroximeromicolato, derivado de la acción de MmaA4 (Takayama y cols., 2005). Este enzima produce un intermedio *cis*-monoinsaturado que, por acción de MmaA3 y MmaA2, se transforma en un metoxi-meromicolato con un *cis*-ciclopropano. La reducción del grupo -OH y la acción de MmaA2 lleva a la formación de un ceto-meromicolato con un *cis*-ciclopropano. La actividad de MmaA1 sobre el hidroximeromicolato introduce una insaturación *trans* en la estructura; este enzima se asocia a la CmaA2, encargada de la ciclopropanación *trans* en los meromicolatos oxigenados (Takayama y cols., 2005). De acuerdo con investigaciones recientes (Barkan y cols., 2010), CmaA2 es redundante con Mma2 (Figura 10), por lo que puede intervenir también en la formación de *cis*-ciclopropanos. Análisis llevados a cabo por el grupo de Cantaloube y cols. (2011) señalan que la acción conjunta entre dehidrasas y metiltransferasas es imprescindible para la elongación de los meromicolatos en la síntesis de AMs.

Una vez que el meromicolato está totalmente formado, comienza el último paso para la síntesis del AM, en el que interviene Pks-13. Este enzima fue descubierto por primera vez por Portevin y cols. (2004) y realiza, en varios pasos, una condensación tipo Claisen entre un meromicolato y un ácido C20-C26 (Figura 11). Antes de la condensación, el meroacil-S-ACP formado por FAS-II se transforma a meroacil-AMP por acción de FadD32, una AMP ligasa (Trivedi y cols., 2004; Léger y cols., 2009). Por otra parte, los C20-26-S-CoAs formados en FAS-I se carboxilan por acción de AccD4 y AccD5, dando lugar a 2-carboxil-C20-26-S-CoAs (Takayama y cols., 2005). La condensación catalizada por Pks-13 se produce en 4 pasos, ilustrados en la figura 11 (Portevin y cols., 2004; Takayama y cols., 2005; Trivedi y cols., 2004) y en donde se consideran un meroacil-AMP y del 2-carboxil-C26-S-CoA. Ambos compuestos se unen a Pks-13, concretamente a sus residuos panteteína (PPB), por enlaces tioésteres. A continuación, el α -meroacil se transfiere (acetiltransferasa, AT) a una cetoacil sintasa (KS), catalizado por el propio dominio AT (Takayama y cols., 2005; Trivedi y cols., 2004), para ligarse después al 2-carboxil derivado, dando como resultado un 3-oxo- α C78-micolato (Figura 11). La acción de una reductasa convierte el grupo 3-oxo en un alcohol secundario, quedando completamente formado el C78- α -micolato (Figura 11). El resto de AMs presentes en las distintas micobacterias se sintetizan de la misma

manera.

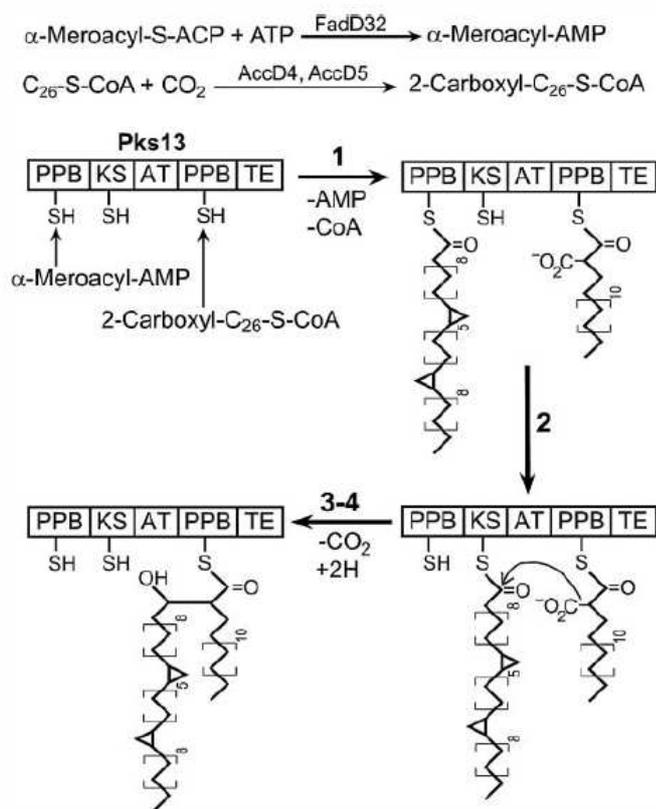


Figura 11. Mecanismo propuesto para la condensación tipo Claisen en la síntesis de α -micolatos por parte de la Pks-13 (*M. tuberculosis*) (FadD32 convierte el α -meroacil-S-ACP, derivado desde el sistema FAS-II, a α -meroacil-AMP. El hexacosanoil-S-CoA, producto de FAS-I, es carboxilado por las acil-Coa carboxilasas (AccD4 y AccD5) para formar 2-carboxil-C26-S-CoA. Estos dos productos son los sustratos para la reacción de condensación, y ambos se unen covalentemente a Pks-13 (reacción 1). El grupo meroacilo se transfiere desde PPB a la enzima de condensación (KS) (reacción 2). Las reacciones 3 y 4 son las que producen la reducción del grupo 3-oxo a un alcohol secundario por acción de una reductasa no identificada, formando el α -micolato maduro. Los dominios de Pks-13 son: 2 dominios PPB no equivalentes, un dominio KS, un dominio AT y un dominio tioéster (TE). La función de algunos de estos dominios no es totalmente conocida (Takayama y cols., 2005)).

Tal y como se indica en la figura 9, la regulación de la síntesis de AM en *Mycobacterium* y otros miembros de *Corynebacterineae* se realiza a través de la fosforilación/desfosforilación de los enzimas del sistema FAS-II y los relacionados con este complejo (Bhatt y cols., 2007; Khan y cols., 2010; Slama y cols., 2011; Veyron-Churlet y cols., 2009); además, gran parte de los genes implicados en la formación de los AM son esenciales para el crecimiento de *M. tuberculosis*, de ahí que esta ruta de

biosíntesis se contemple como una excelente vía para el diseño de nuevas drogas antituberculosas. Otro punto de control de la síntesis de AM podría estar relacionado con el sistema de secreción ESX-1 y, más concretamente, con la ATPasa EccA1, quizás por medio de su interacción con KasA, KasB y Pks-13, de acuerdo con los resultados obtenidos en *M. marinum* (Joshi y cols., 2012).

La transferencia de los AM sintetizados desde Pks-13 hacia los receptores de la envoltura celular (AG y CF, principalmente) se conoce sólo en parte y los modelos teóricos empleados derivan de la hipótesis expresada en la revisión de Takayama y cols. (2005). Se cree que los AM son transferidos a un manosil-P-poliprenol y de ahí a la trehalosa-6-fosfato para dar trehalosa-monomicolato (TMM), que sería transportado del citoplasma al espacio periplásmico a expensas de la hidrólisis de ATP. TMM interviene en la síntesis del CF (compuesto formado a partir de 2 moléculas de TMM) y es el donador de AM al AG. Una hipótesis adicional indica que TMM se formaría en el espacio periplásmico, mientras que los AM recién sintetizados se transferirían a esta zona de la célula para esterificarse a la trehalosa (Tropis y cols. 2005). No obstante, los resultados de estudios con inhibidores (Grzegorzewicz y cols., 2012; Tahlan y cols., 2012) y mutantes (Varela y cols., 2012) de MmpL3 -una proteína transmembrana de la familia MmpL (Domenech y cols., 2005)- indicarían que TMM es sintetizado en el citoplasma. Por otro lado, se ha constatado que la trehalosa libre tras la transferencia de los AM es reciclada en *Mycobacterium*, transportándose al interior celular mediante un sistema ABC (LpqY-SugA-SugBSugC) (Kalscheuer y cols., 2010) (Figura 12).

Los enzimas más relevantes implicados en la transferencia de los AM al AG y en la síntesis del CF son las micoliltransferasas. En *M. tuberculosis* estos enzimas corresponden al denominado antígeno 85 (Ag85), un complejo formado por tres proteínas (Ag85A, Ag85B y Ag85C), que son liberadas tempranamente al medio de cultivo y que presentan la capacidad de unirse a la fibronectina (Belisle y cols., 1997). Si bien hay redundancia entre los distintos componentes del complejo, Ag85C parece ser el más activo como micoliltransferasa (Jackson y cols., 1999). Estos enzimas, con marcado carácter antigénico, se usan en la actualidad en el diseño de nuevas vacunas frente a la tuberculosis (Kaufmann, 2011).

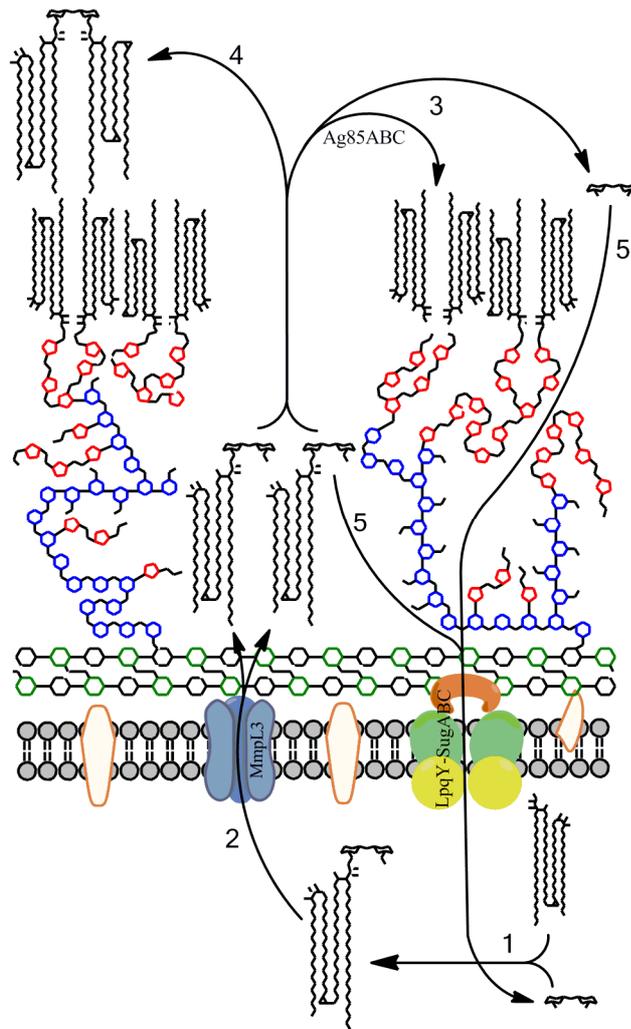


Figura 12. Transferencia a la envoltura celular de los ácidos micólicos. 1) Unión de una cadena de ácido micótico con una trehalosa-6-P para producir el monomicolato de trehalosa. 2) Transporte del monomicolato de trehalosa a través de la membrana plasmática por MmpL3. 3) Transferencia de los ácidos micólicos al arabinogalactano por el Ag85. 4) Fusión de dos moléculas de monomicolato de trehalosa para formar el 'cord factor'. 5) Reciclaje de la trehalosa por acción del sistema ABC LpqY-SugA-SugB-SugC (adaptado de Grzegorzewicz y cols., 2012).

Glicolípidos

La diversidad de glicolípidos en *Mycobacterium* es relativamente amplia y compleja, aunque se pueden dividir en cuatro grandes grupos: glicolípidos basados en trehalosa, lipooligosacáridos, glicolípidos fenólicos y glicopeptidolípidos (Sempere y cols., 1993). Todos ellos son anfipáticos y extraíbles en mezclas de cloroformo/metanol/agua, por lo que se les considera componentes de la envoltura celular. Entre aquellos que presentan actividades biológicas más interesantes se citan los

basados en trehalosa (principalmente, sulfolípidos y CF), los glicolípidos fenólicos y los dimicocerosatos de ftiocerol (DIMs).

Glicolípidos basados en trehalosa:

Estos glicolípidos están constituidos por trehalosa (Figura 13) como único azúcar y se hallan esterificados por ácidos grasos lineales y ramificados (acil trehalosas, sulfolípidos y fleatos de trehalosa) o por AM (TMM y CF). El TMM y el CF aparecen en todas las micobacterias y gran parte de los miembros de *Corynebacterineae*, los sulfolípidos están restringidos a *M. tuberculosis*, mientras que las acil trehalosas se han descrito únicamente en *M. tuberculosis* (Besra y cols., 1992; Daffé y cols., 1988; Lemassu y cols., 1991) y *M. fortuitum* (Ariza y cols., 1994; Sempere y cols., 1993). La amplia distribución de la trehalosa en micobacterias y bacterias afines demuestra la especial relevancia de este azúcar que en estos microorganismos tiene tres rutas biosintéticas (de Smet y cols., 2000):

1. $\text{UDP-Glucosa} + \text{Glucosa-P} \rightarrow \text{Trehalosa-P} \rightarrow \text{Trehalosa}$, con intervención de OstA y OstB (trehalosa 6-fosfato sintasas).
2. $\text{Glucanos}_n \alpha (1,4) \rightarrow \text{Glucanos}_{n-2} \alpha (1,4)\text{-Trehalosa} \rightarrow \text{Glucano}_{sn-2} \alpha (1,4) + \text{Trehalosa}$, por acción de TreY y TreZ (dos trehalosa sintasas).
3. $\text{Maltosa} \rightarrow \text{Trehalosa}$, en donde actúa TreS (trehalosa sintasa).

La trehalosa (Figura 13) es un disacárido no reductor presente en bacterias, hongos, algas e insectos, cumpliendo una importante función como compuesto de reserva energética. Sin embargo, en micobacterias y géneros afines no parece tener este papel (Hunter y cols., 2006a). El primer aislamiento que se realizó de una trehalosa asociada a lípidos fue en 1933 (Asselineau y Asselineau, 1978), cuando un grupo de investigadores consiguió identificar este disacárido a partir de extractos lipídicos del bacilo tuberculoso que habían sido sometidos a saponificación. No fue hasta veinte años más tarde cuando se consiguió purificar el CF a partir de extractos de la envoltura celular de *M. tuberculosis* (Bloch, 1950).

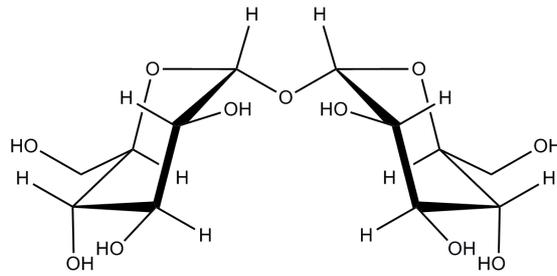


Figura 13. Estructura de la trehalosa.

Aciltrehalosas

Las aciltrehalosas (Figura 14) fueron descritas por vez primera en *M. fortuitum*, identificándose como 6,6'-di-O-palmitoil trehalosa (Vilkas y Rojas, 1964). En esta especie existen, además, variantes di- y tri-aciladas, que incluyen residuos insaturados en posición 2 (Ariza y cols., 1994; Sempere y cols., 1993) y que recuerdan a las presentes en *M. tuberculosis* (Besra y cols., 1992; Gautier y cols., 1992; Lemassu y cols., 1991), aunque en este caso los sustituyentes tienen una longitud de cadena de hasta 27 C (Besra y cols., 1992). Adicionalmente, en *M. tuberculosis*, se han descrito poliaciltrehalosas (Daffé y cols., 1988), contemplándose como factores de virulencia (Sut y cols., 1990).

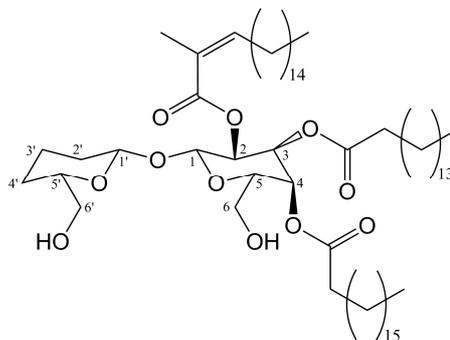


Figura 14. Estructura de la 2,3,4-acil trehalosa (Sempere y cols., 1993).

Sulfolípidos

Los sulfolípidos (SLs) tienen la estructura general de una aciltrehalosa, aunque contienen un grupo $-\text{SO}_3^-$ en la posición 2' (Figura 15). Su descubrimiento en *M. tuberculosis* se atribuye a Middlebrook y cols. (1959), aunque fueron Goren y Brennan

(1980) los que determinaron su estructura. Dependiendo del número de grupos acilo que presenten (3-4), las posiciones de sustitución y las cantidades de -OH derivados (hidroxi-ftioceranoil), los SLs se han separado en 5 tipos, siendo el más abundante el SL-1 (Figura 15) (Goren y cols., 1976).

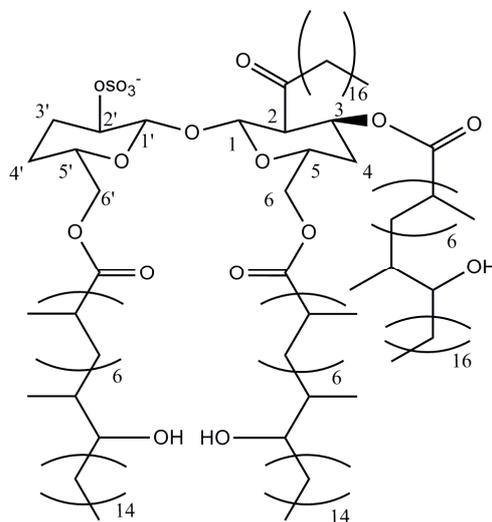


Figura 15. Estructura del sulfolípidio-1.

En la biosíntesis de SL-1 interviene, en un primer paso, una sulfotransferasa (Stf0) encargada de añadir el grupo $-\text{SO}_3^-$ a una trehalosa (Mougous y cols., 2004), formando la trehalosa-2-sulfato (T2S). T2S actúa como precursora para que una aciltransferasa (PapA2) introduzca una cadena de palmitato o estearato en la posición 2. Una segunda aciltransferasa (PapA1) actúa sobre la acil-T2S añadiendo la primera cadena de ácido hidroxi-ftioceránico o el ácido ftioceránico (ácidos metil ramificados derivados de la actividad de pks2) (Sirakova y cols., 2001). La diacil-T2S es transportada por una proteína de membrana (MmpL8) hacia el espacio periplásmico, en donde se adicionan un ftioceranoil y un hidroxi-ftioceranoil para completar la síntesis de SL-1 (Layre y cols., 2011).

Los SLs potencian los efectos del CF como inhibidor de la respiración mitocondrial, actuando también como sustancia antitumoral (Lederer, 1976), y tienen actividad antigénica (Papa y cols., 1989), siendo reconocidos por una subpoblación de linfocitos T al presentarse ligados a moléculas CDb1 (Gilleron y cols., 2004). Los SLs se han implicado en los procesos de maduración del fagosoma (Brodin y cols., 2010) y

en la patogénesis de la tuberculosis, al actuar como inhibidores de la formación del granuloma causado por moléculas como el CF (Okamoto y cols., 2006). Así mismo, parecen tener un papel en la inducción del ion superóxido por parte de neutrófilos y monocitos (Zhang y cols., 1988 y 1991).

'Cord factor'

Identificado como 6-6'-dimicoloil- α - α' -D-trehalosa (Noll y cols., 1956) (Figura 16), fue la primera sustancia tóxica identificada en *M. tuberculosis* en la década de los 50 (Bloch, 1950). CF significa, literalmente, 'factor cuerda', debido a que su presencia en *M. tuberculosis* se relacionó con la forma de crecimiento en cordón que adopta este microorganismo, sobre todo en cultivos líquidos. Esta característica, considerada específica del bacilo tuberculoso durante muchos años, se da también en micobacterias atípicas (Julián y cols., 2010) (Figura 16). La presencia del CF en la envoltura celular de *M. tuberculosis* determina la morfología rugosa e irregular de las colonias y su ausencia produce colonias de menor tamaño, no rugosas, con poca o nula tendencia de propagación (Hunter y cols., 2005).

El CF es uno de los lípidos más abundantes en *M. tuberculosis* y puede extraerse de manera no letal con éter de petróleo, lo que ha permitido demostrar su relación con distintos aspectos de la patogénesis de la tuberculosis (Hunter y cols., 2005, 2006a y 2009). Es considerado, además, como uno de los principales antígenos de esta especie; participa en la formación de los granulomas, en el proceso de caseificación y protege a *M. tuberculosis* de la destrucción por parte de los macrófagos (Hunter y cols., 2006a, 2006b y 2009), a la vez que presenta diversas funciones inmunomoduladores (Hunter y cols., 2006a, 2009).

La actividad biológica del CF se ha atribuido a la conformación cristalina que adopta en interfases hidrofóbicas-hidrofílicas, que aparecen de manera fisiológica en el granuloma (Hunter y cols., 2009). Tal conformación esta compuesta por un plano de cabezas polares (trehalosa) y otro de cadenas de lípido apolares (AM), constituyendo la monocapa biológica más estable y rígida que se ha descrito hasta el momento. La elevada toxicidad que presenta el CF en esta forma hace que la DL₅₀ para ratones inferior sea de 50 μ g (Hunter y cols., 2009).

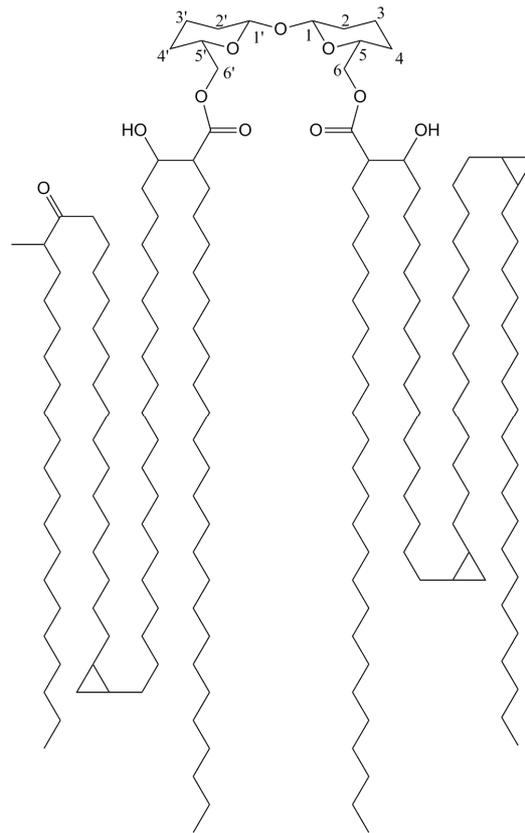


Figura 16. Estructura del CF de *M. tuberculosis* (ceto- y α -micolato en forma plegada en W).

El CF es un componente importante de la envoltura celular de todas las micobacterias, tanto patógenas como no patógenas, por lo que su consideración como determinante de patogenicidad es relativa y, aparentemente, limitada a *M. tuberculosis*. Como se ha citado, el CF se sintetiza a partir de dos moléculas de TMM en una reacción catalizada por Ag85 (Ronning y cols., 2000), habiéndose comprobado que la inhibición de Ag85C impide la formación de este glicolípido, hecho que se acompaña con una acumulación de TMM (Warrier y cols., 2012).

Fleatos de trehalosa

Los fleatos de trehalosa están formados por grupos acilo poli-insaturados, de 33 a 41 C, y fueron identificados inicialmente en *M. phlei*. (Asselineau y cols., 1969). Estudios posteriores demostraron su presencia en *M. smegmatis* (Asselineau y Asselineau, 1978). Los fleatos de trehalosa parecen derivar de una elongación del ácido palmítico, mediante adiciones del ácido 2-butenico (Asselineau y Montrozier, 1976);

su síntesis se ha ligado a la presencia un fago (Lapchine y Asseineau, 1981).

Lipooligosacáridos

La estructura de los lipooligosacáridos (LOS) se caracteriza por la presencia de un oligosacárido que contiene una α -D-trehalosa esterificada por varios ácidos grasos en la glucosa terminal. Se describieron por primera vez en *M. smegmatis* (Saadat y Ballou, 1983); posteriormente, Hunter y cols. (1983) lo describieron en *M. kansasii* y en otras especies del género *Mycobacterium*. Fuera del ámbito estructural, la función de estos compuestos no es del todo conocida. En algunos casos se han descrito como antígenos y en otros no se ha podido demostrar esta actividad (Rombouts y cols., 2009). La existencia de los LOS se ha relacionado con la morfología de las colonias de algunas especies (Brenan, 1989), aunque este tipo de compuestos se han detectado tanto en cepas rugosas como lisas de *M. tuberculosis* (Lemassu y cols., 1992). Recientemente, su expresión en la envoltura celular se ha ligado a la secreción de determinadas proteínas (Van der Woude, 2012).

Glicolípidos fenólicos

Los glicolípidos fenólicos (GLPs) (Figura 17) son también llamados dimicocerosatos de glicosil fenolftiocerol, al estar formados por una porción lipídica, compuesta por un dimicocerosil fenolftiocerol A -o un análogo del mismo-, y uno o varios azúcares, que se unen al fenolftiocerol. Representantes de esta clase de glicolípidos son los clásicos micósidos A, B y G encontrados en *M. kansasii*, *M. bovis* y *M. marinum*, respectivamente (Minnikin, 1982; Watanabe y cols., 1997). Fueron los primeros glicolípidos específicos de especie, lábiles al tratamiento con álcalis, que se identificaron como inmunogénicos (Gilleron y cols., 1990).

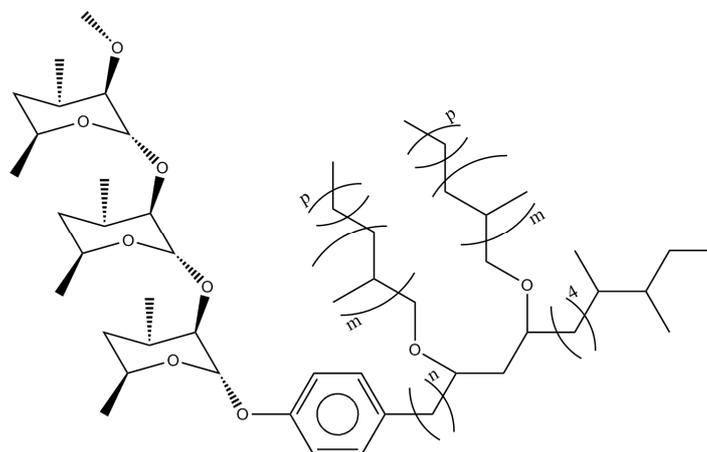


Figura 17. Estructura del triglicosil dimicocerosato de fenolftiocerol.

El carácter antigénico de estos compuestos posibilitó que se usaran en el diagnóstico de la lepra (Brett y cols., 1983; Cho y cols., 1983; Gaylord y Brennan, 1987; Young y Buchanan, 1983); además, en los siguientes años, se estudió su posible relación con la patogenia de esta enfermedad (Chan y cols., 1989; Neil y Klebanoff, 1988; Mehra y cols., 1984), lo que permitió el descubrimiento de una amplia gama de glicolípidos fenólicos en *M. leprae* (Hunter y Brennan, 1983; Fujiwara y cols., 1984; Daffé y Laneelle, 1989). Por otra parte, estos compuestos provocan una disminución de la permeabilidad de membranas artificiales (Sut y cols., 1990).

Los ftiocerolos son β -dioles, hidrox-, ceto- y metoxi- derivados, que se esterifican con ácidos polimetil ramificados, constituyendo los dimicocerosatos de ftiocerol y los diftioceranatos de ftiocerol. Estos compuestos son de gran importancia por su contribución a la hidrofobicidad de la membrana externa de *M. tuberculosis* y otras especies de crecimiento lento (Minnikin y cols., 1982). Los dimicocerosatos de ftiocerol (DIMs) son los lípidos libres (*'sensu stricto'*) de mayor tamaño de la envoltura celular de *M. tuberculosis* (Figura 18) y fueron descubiertos por Andersen en 1940. Son muy apolares y presentan un gran número de metil-ramificaciones (Brennan, 2003; Minnikin y cols., 2005). Se aislaron a partir de diferentes muestras obtenidas de enfermos de tuberculosis (Goren y cols., 1980) y se les relacionó con la virulencia de *M. tuberculosis*, al demostrarse que la cepa H37Rv atenuaba su virulencia al perder la capacidad de sintetizar DIMs. Hoy se sabe que el tropismo tisular de *M. tuberculosis* está ligado a la presencia de estos compuestos en la envoltura celular (Cox y cols.,

1999).

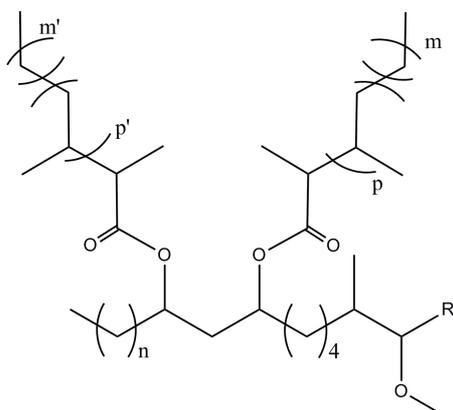


Figura 18. Estructura del dimicocerosato de ftiocerol.

Glicopeptidolípidos

Los glicopeptidolípidos (GPLs) (Figura 19) se identificaron en micobacterias gracias los trabajos de Schaefer, Marks y Jenkins en las décadas de los 60 y los 70 (citado en: Chatterjee y Khoo, 2001; Schorey y Sweet, 2008). Están formados por un tripéptido enlazado a un amino-alcohol, una estructura a la que se unen diversos azúcares y un ácido graso (3-hidroxil o 3-metoxi) de unos 30C. Este tipo de glicolípidos se encuentran principalmente en micobacterias no tuberculosas, patógenas y saprófitas, como son *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum* y *M. simiae* (Chatterjee y Khoo, 2001; Schorey y Sweet, 2008).

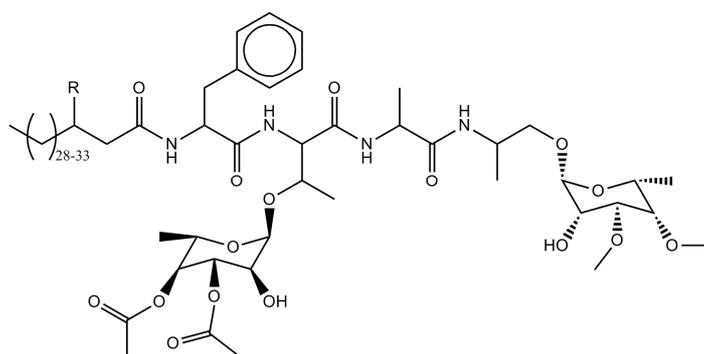


Figura 19. Estructura de los glicopeptidolípidos. R = -OH ó -OCH₃.

Proteínas de la envoltura celular

Las porinas se cuentan entre las proteínas mejor caracterizadas en la envoltura celular de micobacterias, destacando entre ellas la denominada MspA (Figura 20) de *M. smegmatis* (Faller y cols., 2004; Heinz y Niederwies., 2000; Niederweis y cols., 2010). Al igual que en bacterias Gramnegativas, las porinas son canales que permiten el acceso de sustancias hidrofílicas (Stahl y cols., 2001) al interior de la célula, incluidos determinados biocidas (Frenzel y cols., 2011). En *M. tuberculosis* también se ha detectado una proteína capaz de formar poros (OmpATb), aunque su función se relaciona con la adaptación de la bacteria al ambiente ácido del fagosoma (Molle y cols., 2006). Recientemente, se han identificado en *C. glutamicum* porinas de bajo peso molecular que están asociadas a AM: PorH y PorA (Huc y cols. 2010). Conjuntamente con sistemas de eflujo de proteínas (por ejemplo, LrfA), las porinas de micobacterias intervienen en la resistencia a diversos antibióticos (Rodrigues y cols., 2011).

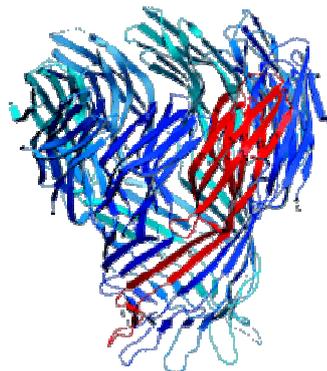
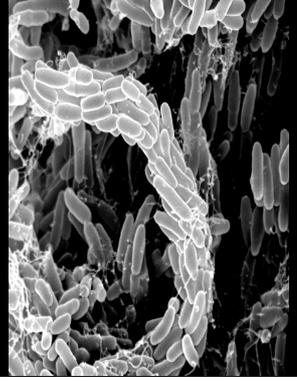


Figura 20. Porina MspA de la envoltura celular de *Mycobacterium smegmatis* (Faller y cols., 2004).

En la envoltura celular de *Corynebacterineae* también se encuentran otra serie de proteínas (Marchand y cols., 2012), entre las que sobresalen las mycoliltransferasas (Bou-Raad y cols., 2010), proteínas glicosiladas (Rpf2) (Hartmann y cols., 2004), lipoproteínas (Kovacs-Simon y cols., 2011) y la proteína Erp (Kocíncová y cols., 2004). Sin duda, quedan por definir muchos otros componentes proteicos de la envoltura celular de estos microorganismos (Marchand y cols., 2012).

FUNDAMENTOS. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Como se ha citado anteriormente, *Mycobacterium* incluye los agentes etiológicos de la tuberculosis (*M. tuberculosis*) y de la lepra (*M. leprae*), junto a otras especies saprófitas y patógenas oportunistas (Falkinham, 1996). Datos epidemiológicos sobre la tuberculosis señalan que su prevalencia es elevada en determinados países en vías de desarrollo (por ejemplo, > 300 casos/100.000 habitantes en países subsaharianos), en algunos de los cuales se agrava la situación por la coinfección con el VIH (Kaufmann, 2011). En países industrializados las cifras son también preocupantes y, contrariamente a la idea generalizada de que existe un descenso de la enfermedad, las cifras parecen sugerir lo contrario, como es el caso de una gran ciudad industrializada como Londres (Kaufmann, 2011). La OMS marca el año 2050 como fecha para que la tasa de tuberculosis mundial se sitúe en 1/1.000.000, aunque estas cifras parecen, a día de hoy, difíciles de conseguir (Kaufmann, 2011). No obstante, sí se aspira a la disponibilidad de una vacuna más efectiva que la actual BCG, que se muestra eficaz sólo en la prevención de la enfermedad en la población infantil. El diseño de nuevas vacunas frente a la tuberculosis presenta diversas alternativas (Tabla 2), entre las que incluyen BCGs recombinantes, bacilos tuberculosos avirulentos (manipulados genéticamente) o combinaciones de proteínas antigénicas mayoritarias de *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2011). Una aproximación adicional es el uso de subunidades proteicas complementadas con adyuvantes lipídicos, tales como el CF de *M. tuberculosis* o análogos estructurales, que parecen dar mejor resultado que BCG sólo, al menos en la fase inicial de experimentación (Kaufmann, 2011).

La composición y estructuración de la pared celular de *Mycobacterium* (Figura 21) es muy particular y se admite su participación en la patogénesis de tuberculosis y micobacteriosis (Daffé y Draper, 1998). El armazón principal de la misma está integrado por el PG, al que se une covalentemente el AG, un polisacárido complejo cuyas arabinosas distales están esterificadas por AM (Brennan y Nikaido, 1995; Daffé y Draper, 1998) (Figura 21). Los AM son responsables de la baja permeabilidad de la envoltura celular de *Mycobacterium* y aparecen también esterificando la trehalosa en el CF.

Tabla 2. Vacunas experimentales frente a la tuberculosis (Raviglione y cols., 2012).

| Tipo de vacuna | Ejemplo | Fase clínica |
|---|---|-------------------|
| BCG recombinantes | VMP 1002 | 2a |
| | Aeras-485 (terapéutica) | 2b |
| Proteicas (asociadas a adyuvantes) | Ag85A ESAT6 CAFO1 | 1 |
| Extractos pared <i>M. tuberculosis</i> | RUTI (terapéutica) | 2a |
| Vectores víricos | AdAg85A | 1 |
| <i>M. tuberculosis</i> avirulentos | $\Delta PhoP\Delta fadD26$, otras | Preclínica |
| Micobacterias atípicas | <i>M. vaccae</i> , | Finalizada fase 3 |
| | ' <i>Mycobacterium indicus pranii</i> ' | 3 |

En la pared se integran lípidos adicionales y diversas proteínas, y la estructuración molecular considera una membrana externa en la que se incluyen porinas, en un modelo que recuerda al de bacterias Gramnegativas (Niederweis y cols., 2010). La conformación real de los AMs en la pared de micobacterias es desconocida, aunque recientemente se postula que adoptan una forma en W (Villeneuve y cols., 2007, 2010; Bhamidi y cols., 2011), lo que justificaría la anchura estimada de la envoltura celular (Zuber y cols., 2008). Aparte de estas consideraciones estructurales, los AMs intervienen en la patogénesis de la tuberculosis a través de mecanismos no del todo conocidos. Se sabe, sin embargo, que son reconocidos, al igual que otros componentes lipídicos de la envoltura celular, por una subpoblación de linfocitos T CD1 (Beckman y cols., 1994; de la Salle y cols., 2005) y, de acuerdo con estudios recientes, participan significativamente en la inmunología de la enfermedad (Montamat-Sicotte y cols., 2011).

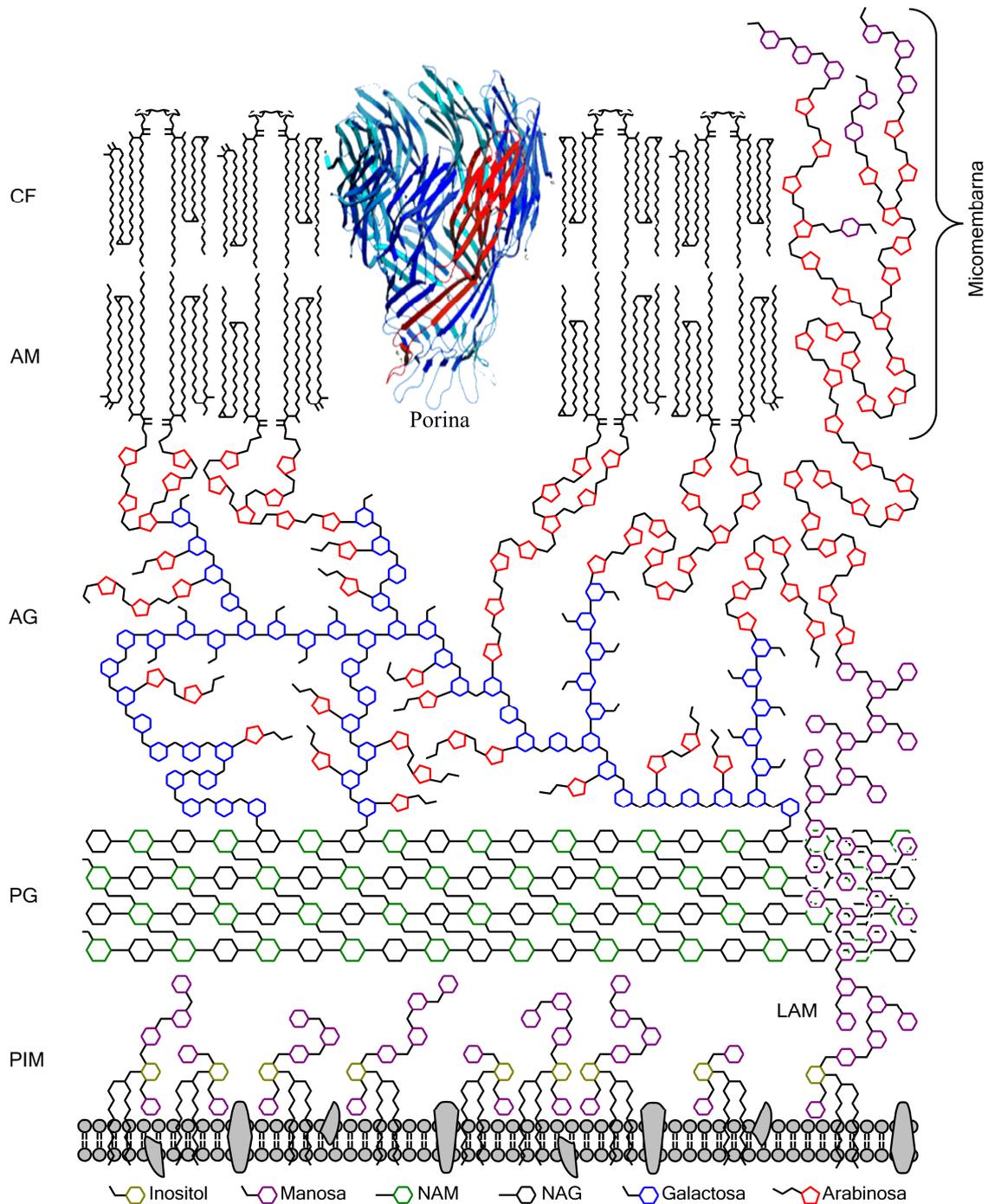


Figura 21. Modelo de estructuración molecular de la envoltura celular de micobacterias. PIM: Fosfatidil inositol manósidos. LAM: Lipoarabinomano. PG: Peptidoglicano. AG: Arabinogalactano. AM. Ácidos Micólicos. CF: 'Cord factor'.

Además, los AM son capaces de inducir *in vivo* la secreción de IL-12p40 y otras citoquinas, a la vez que producen inflamación (Korf y cols., 2005), habiéndose atribuido esta característica a la combinación de los grupo metoxi y *cis*-ciclopropano (Figura 6 d) (Vander y cols., 2011). Se ha demostrado, así mismo, que *M. tuberculosis* puede

controlar la activación del sistema inmune a través de modificaciones en los AM del CF (Dao y cols., 2008; Rao y cols., 2005 y 2006). Este glicolípido presenta diversas actividades inmunomoduladoras y participa en la formación de los granulomas, en la caseificación y en la desregulación del metabolismo lipídico que ocurre en estos procesos (Hunter y cols., 2009; Kim y cols., 2010). El interés por su estudio se ha renovado en las últimas décadas, al demostrarse, mediante estudios moleculares en *M. tuberculosis*, que su actividad biológica está ligada a la estructura fina de los AM (Dao y cols., 2008; Rao y cols., 2005 y 2006). El CF es reconocido, por al menos, dos receptores superficiales de células presentadoras de antígenos: Mincle (lectina de tipo C) (Ishikawa y cols., 2009; Schoenen y cols., 2010) y MARCO (receptor con estructura colágena) (Bowdish y cols., 2009), postulándose la participación de CD14-TLR2 en este último caso. El CF es segregado, junto a otros lípidos de la envoltura celular, por macrófagos infectados por *M. bovis* BCG (Rhoades y cols., 2003), siendo, entre éstos, el más activo desde un punto de vista biológico (Geisel y cols., 2005); por otra parte, induce la secreción de diversas citoquinas, tanto in vitro como in vivo (Hayashi y cols., 2009; Indrigo y cols., 2003; Lima y cols., 2001; Welsh y cols., 2008), y se ha empleado como adyuvante de vacunas proteicas en tuberculosis experimental, así como su análogo estructural, dibehenato de trehalosa (Khader y cols., 2007; Lima y cols., 2003; Werninghaus y cols., 2009). La capacidad de estimulación de TNF- α e interleuquina 12-p40 (IL-12p40), citoquinas de gran importancia en la inmunología de la tuberculosis (Cooper y Khader, 2008), y la virulencia o avirulencia de *M. tuberculosis* se han relacionado con el CF. De este modo, los mutantes de *M. tuberculosis* con alteraciones en la síntesis de ácidos α -micólicos con *cis*-ciclopropanos (Figura 6 b) presentan una virulencia atenuada e inducen bajos niveles de TNF- α (Rao y cols., 2005); por otra parte, mutantes incapaces de sintetizar AM oxigenados (ceto, metoxi) (Figura 6 c y d) presentan un fenotipo avirulento y estimulan altos niveles de IL-12p40 y TNF- α (Dao y cols., 2008). Por el contrario, mutantes afectados en la formación de ceto- y metoximicolatos con *trans*-ciclopropanos (Figura 6 a, d) son hipervirulentos e inducen elevadas cantidades TNF- α (Rao y cols., 2006). Por último, los estudios realizados con mutantes incapaces de sintetizar AM con ciclopropanos son avirulentos e hiperinflamatorios (inducen niveles elevados de TNF- α) (Barkan y cols., 2012).

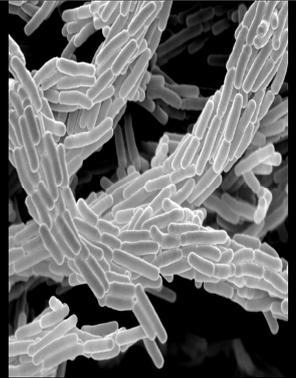
Se sabe que TNF- α es esencial en la inmunología de la tuberculosis y que la IL-12p40 favorece la respuesta Th1; sin embargo, los mecanismos que operan en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* son complejos y las relaciones celulares que en ella operan están sujetas a balances temporales y espaciales de numerosas citoquinas y otras moléculas (Cooper, 2009; Dorhoi y cols., 2011), entre las que pueden considerarse, además de las citadas, IL-1 β , IL-6 e IL-23.

En esta tesis doctoral se pretende investigar la diferencia existente entre *M. tuberculosis* y micobacterias atípicas en el diseño molecular y actividad biológica del CF. La hipótesis que se maneja es que el diseño molecular del CF de micobacterias atípicas (no tuberculosas) es distinto al del CF de *M. tuberculosis* y que este hecho debe reflejarse en su actividad biológica, en concreto, en la capacidad de inducción de citoquinas de relevancia en tuberculosis y que los resultados pueden ser útiles en la consideración del poder adyuvante del CF de micobacterias no tuberculosas.

Los objetivos del trabajo son:

1. Realizar un análisis estructural detallado del ‘*cord factor*’ de diversas micobacterias no tuberculosas, y comparar sus estructuras entre sí y con las del ‘*cord factor*’ de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
2. Determinar y comparar los niveles de inducción de diversas citoquinas de relevancia en tuberculosis por parte del ‘*cord factor*’ de distintas micobacterias atípicas y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, y relacionar los mismos con los detalles estructurales de esta molécula, como base para considerar en el futuro el uso como adyuvantes del ‘*cord factor*’ de micobacterias no tuberculosas.

MATERIAL Y MÉTODOS



Cepas estudiadas y condiciones de cultivo

Se estudiaron las siguientes cepas: *M. alvei* CR-21^T (=ATCC 51034), *M. brumae* CR-270^T (=ATCC 51384), *M. fortuitum* AC1 (aislado clínico), *M. simiae* ATCC 25275^T, *M. simiae* (*habana*) TMC 5135, *M. simiae* (*habana*) IPK-337 y *M. simiae* (*habana*) IPK-342. El epíteto '*habana*' no es taxonómicamente válido, pero se mantiene en esta tesis para indicar el origen geográfico (cubano) de estas cepas. *M. simiae* (*habana*) TMC 5135 se incluyó en la presente investigación por su carácter inmunogénico en tuberculosis y lepra experimentales (Mederos y cols., 2006); las restantes cepas de *M. simiae* se incluyeron con criterios comparativos, al igual que *M. alvei* CR-21^T, *M. brumae* CR-270^T y *M. fortuitum* AC1. *M. alvei* (Ausina y cols., 1992) y *M. brumae* (Luquin y cols., 1993) son micobacterias no patógenas cuyo contenido en AM es específico: α - y (ω -1)-metoxi-micolatos en *M. alvei* (Ausina y cols., 1992; Luquin y cols., 1990) y α -micolatos en *M. brumae* (Luquin y cols., 1993). La estructura de los α -micolatos de ambas especies es muy similar, y está relacionada con la de los (ω -1)-metoxi-micolatos. La inclusión de *M. fortuitum* (α - y epoxi-micolatos) y del CF comercial (Sigma) de *M. tuberculosis* H37Rv (ver más adelante) cubre casi la totalidad de las variaciones posibles en los ácidos micólicos del CF.

M. alvei CR-21^T, *M. brumae* CR-270^T (ambas cedidas por la Dra. Marina Luquin, Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona) y *M. fortuitum* AC1 fueron cultivadas en infusión de cerebro y corazón, a 35 °C, durante una semana (*M. brumae* CR-270^T, *M. fortuitum* AC1) o tres semanas (*M. alvei* CR-21^T). Las células se recogieron por filtración y se extrajeron directamente siguiendo el procedimiento abajo indicado. Las cuatro cepas de *M. simiae* fueron cedidas por el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), La Habana, Cuba, y se cultivaron en el IPK en medio UIT-L (Mederos y cols., 1992) a 35 °C durante 3 semanas: tras recoger por filtración, los cultivos se lavaron en solución salina, se esterilizaron a 120 °C durante 20 minutos y se secaron en atmósfera de P₂O₅ (Mederos y cols., 2007).

Extracción, purificación y análisis estructural del 'cord factor'

Para la extracción y purificación del CF se emplearon disolventes de grado analítico o HPLC y la mayor parte de los procesos se realizaron en una cabina de

extracción de gases. Se utilizaron matraces y tubos de vidrio con tapón de rosca y sello de teflón, previamente lavados con agua ultrapura (milli-Q⁵⁰, Millipore) y enjuagados – tres veces- con cloroformo/metanol (2:1, v/v).

Dos a tres gramos de células se extrajeron, sucesivamente, en cloroformo/metanol 1:2, 1:1 y 2:1 (v/v) durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación (120 rpm/min). Los extractos fueron combinados, evaporados a sequedad y fraccionados en cloroformo/metanol/agua (4:2:1, v/v). La fase clorofórmica fue recuperada, evaporada y disuelta en cloroformo, siendo analizada, para la demostración inicial del CF, mediante cromatografía de capa fina (CCF) analítica en placas de gel de sílice, empleando cloroformo/metanol (9:1, v/v) como solvente y ácido fosfomolibdico (5% en etanol, p/v)/140 °C como revelador. Posteriormente, la fase clorofórmica se precipitó en metanol (-30 °C, durante toda la noche, tres veces) y la fracción insoluble en metanol se evaporó a sequedad en atmósfera de N₂, se disolvió en 2-3 ml de cloroformo y se sometió a cromatografía en columna (CC), utilizando como solvente diferentes proporciones de metanol en cloroformo (0, 2, 5, 10, 30 y 50 %, v/v). La presencia del CF se detectó por CCF analítica (ver más arriba) en la fracción del 10 % de metanol en cloroformo. La purificación final del CF se realizó mediante CCF preparativa en placas del gel de sílice, utilizando un triple desarrollo de las placas con acetona, seguido de un desarrollo con cloroformo/metanol 9:1 (v/v). Para descartar contaminación con lipopéptidos o lipoproteínas, el CF purificado fue examinado por CCF bidimensional analítica usando el sistema de solventes descrito por Dobson y cols. (1985) [1: cloroformo/metanol/agua (100:14:0.8, v/v); 2: cloroformo/acetona/metanol/agua (50:60:2.5:3, v/v)] y por Eckstein y cols. (2006) [1: cloroformo/metanol (96:4, v/v); 2: tolueno/aetona (80:20, v/v).

El análisis estructural del CF se llevó a cabo mediante RMN (¹H-RMN, ¹H-¹H-COSY, ¹³C-RMN y ¹H-¹³C-HMQC) en un instrumento Bruker (600 MHz o 400 MHz) a 298 °K, con las muestras disueltas (4-5 mg/ml) en deuterocloroformo/deuterometanol (5:1 v/v o 6:1 v/v). El CF de *M. simiae (habana)* TMC 5135 se examinó también en deuterocloroformo/deuterometanol, utilizando las proporciones 5:1, 10:1 y 30:1 (v/v), y en deuteropiridina, a fin de descartar variaciones en la isomería de sus centros quirales C2 y C3 (Figura 6). La proporción de los distintos ácidos micólicos y de las relaciones

entre las instauraciones (ciclopropanos o dobles enlaces) en los CF de las cepas estudiadas se estimó a partir de los espectros $^1\text{H-RMN}$, aplicando las fórmulas descritas por Watanabe y cols. (2001).

El CF de *M. tuberculosis* H37Rv se adquirió en Sigma y su estructura fue confirmada por $^1\text{H-RMN}$ y espectrometría de masas (ver más adelante). Adicionalmente su pureza fue confirmada por CCF bidimensional como se ha descrito para el resto de CF. Este glicolípido comercial ha sido usado por varios autores (Indrigo y cols., 2003; Welsh y cols., 2008) en diversos ensayos biológicos, obteniéndose resultados similares a los CF de varias cepas de *M. tuberculosis* purificados en el laboratorio por otros autores (Dao y cols., 2008).

La estructura de los AM del CF se confirmó mediante espectrometría de masas tras su liberación del CF (1 mg) por saponificación en KOH-metanol (15 %, p/v). La saponificación se realizó a 90 °C durante la noche y los AM se extrajeron en hexano (tres veces), tras acidificación (pH 1-2) de la mezcla con SO_4H_2 (20 %, v/v). El extracto de AM se lavó varias veces en agua ultrapura hasta pH 5-6. Para la espectrometría de masas se empleó un espectrómetro MSD IonTrap-VL (Agilent), en donde las muestras - tras inserción directa (0.6 ml/h)- se ionizan por 'electrospray' y se analizan en una trampa iónica (ESI-TRAP-MS). La aguja del 'electrospray' se situó en 3.5 Kv; como gas nebulizador se empleó N_2 , a una presión de 69 kPa y a una temperatura de 325 °C. El voltaje aplicado fue de 80 V. Los AM se analizaron en el rango m/z 100-2000 durante varios segundos, expresando los resultados como media de al menos 50 espectros. Los análisis se efectuaron tanto en modo negativo como en modo positivo, identificándose los AM de acuerdo con el cálculo de sus masas monoisotópicas exactas (<http://www.chemcalc.org>) a partir de las fórmulas empíricas respectivas.

En el caso específico de las cepas de *M. simiae*, la composición de AM del CF se comparó con la composición de AM de las células deslipidadas, a fin de confirmar si se trasladaba al CF la peculiar composición en α -micolatos previamente encontrada en *M. simiae* (habana) TMC 5135 (Mederos y cols., 2007). Los AM de células deslipidadas se extrajeron por saponificación y se estudiaron de manera similar a la descrita arriba.

Actividad biológica del ‘cord factor’

Para el estudio de la actividad biológica del CF se empleó material libre de pirógenos y los extractos de los diferentes CFs [20 µl de una disolución de 1 mg/ml en 2-propanol (Dao y cols., 2008)] se examinaron mediante el test de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL, Lonza Ibérica), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El test LAL determina las unidades de endotoxina (UE)/ml presentes en una muestra determinada. Para su realización, la muestra se mezcló con los componentes del LAL y con el sustrato a la dilución dada; tras completar la reacción, se determinó la absorbancia (410 nm) del color amarillo desarrollado, estableciéndose la cantidad de endotoxina a partir de una curva estándar. El valor de absorbancia para el control (agua purificada sin LPS, incluida en el test) fue de 0.1 UE/ml. Los resultados obtenidos con las muestras de CF indicaron la ausencia de contaminación con endotoxina.

Líneas celulares utilizadas.

Se emplearon las líneas celulares RAW 264.7 (ATCC) (macrófagos derivados de leucemia murina) y THP-1 (ECACC) (monocitos derivados de leucemia humana). Las células RAW 264.7 se cultivaron en DMEM y las THP-1 en RPMI, en ambos casos suplementados con suero bovino fetal (10 %), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda (> 90 %) con CO₂ al 5 % durante tiempos apropiados (ver más adelante). De forma rutinaria, y antes de cualquier ensayo biológico, se determinó la ausencia de contaminación por micoplasmas.

Análisis preliminar de la inducción de TNF- α en células RAW 264.7 por parte del ‘cord factor’ de *Mycobacterium simiae*

Se siguió, con ciertas modificaciones, el método descrito por Rao y cols. (2006). El CF se resuspendió en 2-propanol (1 mg/ml) mediante sonicación y se distribuyó en el fondo de placas Nunc de 24 pocillos en cantidades de 0 -control-, 0.1, 1 y 10 µg. Tras la evaporación total del disolvente, se añadieron 10⁶ células en 0.5 ml de medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (10 %), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Tras incubación (37 °C, atmósfera húmeda, 5 % de CO₂) durante 24 h, se

recogieron los sobrenadantes y se mantuvieron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. La cantidad de TNF- α producida se determinó mediante el kit BD OptEIA para TNF- α de ratón (BD Bioscience), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados se expresaron como media \pm desviación típica de dos experimentos independientes, que se efectuaron por duplicado.

Análisis de la inducción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40 total (IL-12/IL-23) y TNF- α en células RAW 264.7 por parte del ‘cord factor’ de diversas micobacterias

Se estudió la capacidad de inducción de las citoquinas citadas por parte del CF de *M. alvei* CR-21^T, *M. brumae* CR-270^T, *M. simiae* (habana) TMC 5135 y *M. tuberculosis* H37Rv, siguiendo una metodología similar a la citada en el apartado anterior. Se realizó un análisis dosis-respuesta empleando 0 -control-, 1, 5 y 20 μg de CF, midiendo la concentración de las distintas citoquinas tras 48 h de incubación. Por otro lado, se comprobó la evolución de la respuesta en el tiempo a las 24, 48 y 72 h a una dosis de 1 μg de CF. En ambos ensayos se utilizaron 10^6 células en 1 ml de medio DMEM, suplementado con suero bovino fetal (10 %), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Al cultivo se añadieron 100 U/ml de INF- γ , siguiendo las recomendaciones de Hayashi y cols. (2009). Tras incubación ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, atmósfera húmeda, 5 % de CO_2) durante los periodos de tiempo citados, se recogieron los sobrenadantes y se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α se determinaron mediante citometría de flujo en un citómetro Beckman Coulter FC500, empleando el kit FlowCytomix multiplex (eBioscience). Los valores de IL-12p40 total se establecieron mediante el kit ELISA Ready-Set-Go (IL-12/IL-23) (eBioscience). En todos los casos se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Para descartar contaminación residual por parte de lipopéptidos, la inducción (dosis-respuesta) de IL-6 se realizó también tras tratamiento de los CF de *M. alvei* CR-21^T, *M. brumae* CR-270^T y *M. tuberculosis* H37Rv con H_2O_2 (Zähringer y cols., 2008): 0.1 mg de CF se mezclaron con H_2O_2 al 1 %, v/v; tras agitación durante 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, el CF se extrajo en cloroformo-metanol (2:1, v/v) y se repurificó mediante cromatografía en columna. El ensayo biológico dosis-respuesta con IL-6 se repitió obteniéndose resultados similares a los reflejados en la Figura 41 a (Resultados). Diversos autores han

indicado que la contaminación por lipopéptidos es muy improbable con los métodos de purificación seguidos para lípidos de micobacterias (Fujita y cols., 2007; Montamat-Sicotte y col., 2011).

Análisis de la inducción de IL-6 y TNF- α en células RAW 264.7 por parte de diversos tipos estructurales de ácidos micólicos

Como complemento al estudio anterior, e intentando averiguar si la molécula completa del CF es necesaria para la óptima inducción de diversas citoquinas, se procedió a la extracción y purificación de los AM presentes en las células deslipidadas de *M. alvei* CR-21^T, *M. brumae* CR-270^T y *M. simiae (habana)* TMC 5135. Los ácidos micólicos se extrajeron por metanólisis ácida y se purificaron por CC y CCF (Mederos y cols., 2007), confirmándose su estructura mediante ¹H-RMN. La metanólisis ácida (Minnikin y cols., 1980) libera los AMs de la pared celular y los transforma a ésteres metílicos, por lo que una pequeña porción se saponificó en KOH-metanol (ver más arriba) para obtenerlos en su forma libre. Los AMs de *M. tuberculosis* (aislado clínico) se extrajeron y purificación previamente en el laboratorio siguiendo procedimientos similares. Los AMs se ensayaron en las dos formas: ésteres metílicos y libres, realizando un estudio dosis-respuesta a 0 –control-, 1, 5 y 20 μ g, siguiendo, exactamente, las condiciones que las descritas para el CF y determinando los niveles de IL-6 y TNF- α mediante el kit ELISA Ready-Set-Go (eBioscience) para ambas citoquinas.

Análisis de la inducción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF- α en células THP-1 por parte del ‘cord factor’ de diversas micobacterias

El estudio con la línea celular THP-1 (no adherente) se realizó siguiendo, con ligeras modificaciones, el método descrito por Indrigo y cols. (2003). Se utilizaron microbolas de poliestireno (Polyscience; diámetro medio de 1 μ m) impregnadas con el CF para facilitar el contacto con las células.

Las microbolas se lavaron tres veces con tampón carbonato (8mM)/bicarbonato (17 mM) (pH 9.6), se recogieron por centrifugación (2200 g, 15 minutos) y se sometieron a dos lavados adicionales con etanol (uno al 30 % y otro al 1 %). A las

microbolas se añadieron 100 µg de CF, disuelto en 2-propanol y el volumen se llevó hasta 1 ml. Las microbolas fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche con una suave agitación orbital. Posteriormente, se lavaron con PBS (tres veces) y con medio RPMI más suplementos (tres veces). Como control se utilizaron bolas sometidas al mismo proceso sin CF añadido. Para comprobar que el CF se adhirió a las microbolas, una alícuota (100 µl) de la suspensión se extrajo con 2 ml de cloroformo (tres veces); el extracto se evaporó a sequedad y se disolvió en 100 µl de cloroformo, examinándose a continuación mediante CCF analítica, empleando cloroformo/metanol (9:1, v/v) como solvente. De forma análoga se examinó la ausencia de CF en las microbolas control. Todas las muestras se estudiaron en paralelo con un extracto clorofórmico del medio RPMI, conteniendo los suplementos anteriormente especificados. Adicionalmente, el proceso de fagocitosis de las microbolas por parte de las células THP-1 se comprobó mediante microscopía electrónica de transmisión, realizada en el Servicio de Microscopía del SAI de la Universidad de Murcia. Brevemente, las muestras se fijaron en glutaraldehído en tampón cacodilato y con OsO₄, contrastándose con acetato de uranilo. Tras deshidratarse con etanol, se impregnaron en óxido de propileno/resina y los bloques se realizaron en silicona/resina. Los cortes se recogieron en rejilla de cobre y se trataron con acetato de uranilo y citrato de plomo, siendo visualizados en un microscopio Jeol JEM 1011 a 90 KeV.

En los ensayos se empleó una relación microbolas/células THP-1 de 10:1, realizando la estimación de la cantidad de microbolas en una cámara de Neubauer. Se utilizaron placas de 24 pocillos (Nunc), adicionando a cada pocillo un total de 10⁶ células en 1 ml de RPMI suplementado como se ha indicado. Unos 30 minutos antes de la incorporación de las microbolas impregnadas con CF y las microbolas control, las células se trataron con INF-γ (100 U/ml) (Hayashi y cols., 2009). Tras incubación durante 48 h (37 °C, atmósfera húmeda y 5 % de CO₂), los sobrenadantes se recogieron y se conservaron a -70 °C hasta su análisis. Las concentraciones de IL-12p40 e IL23 se analizaron utilizando, respectivamente, el kit BDOptEIA IL-12p40 humana (BD Bioscience) y el kit platinum ELISA de IL-23 humana (p19/p40) (eBioscience), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las cantidades de IL-1β, IL-6 y TNF-α se determinaron mediante el kit FlowCytomix simplex (IL-1β, IL-6 y TNF-α,

humanas) (eBioscience), utilizando un citómetro de flujo Beckman Coulter FC500 y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Un resumen general de los distintos ensayos biológicos realizados en el desarrollo de la presente tesis aparece en la Tabla 3.

Análisis estadístico

En general, los análisis se realizaron por triplicado en experimentos independientes y los resultados se expresaron como media \pm desviación típica. La significación estadística de la diferencia entre medias se situó en $P < 0.05$, estimándose mediante ANOVA (tres o más comparaciones) o t de Student (dos comparaciones). Por lo general, en el ANOVA se aplicó el 'post-hoc' de Bonferroni, empleando, en ocasiones, una transformación logarítmica (\ln) de los resultados, a fin de obtener varianzas iguales. En los experimentos con las células THP-1, la comparación de los distintos patrones globales se realizó mediante un análisis de grupos, empleando la prueba del vecino más cercano. A lo largo del trabajo se utilizaron las versiones 15.0 y 17.0 del paquete estadístico SPSS (Statistical Program for the Social Sciences).

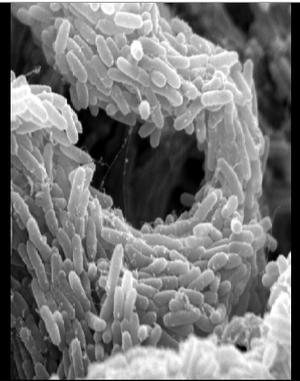
Tabla 3. Esquema del diseño experimental de los ensayos biológicos realizados.

| Línea celular | Compuesto | Cantidad del compuesto (µg) | Cultivo (h) | Origen del CF | Inf-γ | Citoquinas analizadas |
|---------------|-----------|-----------------------------|----------------|--|-------|---|
| RAW 264.7 | CF | 0 0,1 1 10 | 24 | <i>M. simiae</i> ATCC 25275 ^T <i>M. simiae (habana)</i> TMC5135 <i>M. simiae (habana)</i> 342 | No | TNF-α |
| RAW 264.7 | CF | 0 1 | 24 48 72 | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv* <i>M. simiae (habana)</i> TMC5135 <i>M. alvei</i> <i>M. brumae</i> | Si | TNF-α IL-1β IL-6 IL-23 |
| | | 5 20 | 48 | | Si | IL-12 |
| RAW 264.7 | AM | 0 1 5 20 | 48 | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv* <i>M. simiae (habana)</i> TMC5135 <i>M. alvei</i> <i>M. brumae</i> | Si | TNF-α IL-6 |
| THP-1 | CF | ≈ 10 (teórico) | 48 | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv* <i>M. simiae</i> ATCC 25275 ^T <i>M. simiae (habana)</i> TMC 5135 <i>M. simiae (habana)</i> IPK-337 <i>M. simiae (habana)</i> IPK-342 <i>M. alvei</i> CR-21 ^T <i>M. brumae</i> CR-270 ^T <i>M. fortuitum</i> | Si | TNF-α IL-1β IL-6 IL-23 IL-12p40 |

CF: "cord factor"; AM: ácidos micólicos.

*:CF comercial (Sigma)

RESULTADOS



Estructura fina del '*cord factor*'

Todas las cepas estudiadas contenían CF en los extractos lipídicos obtenidos (Figura 22 a). El CF apareció en la fracción del 10% (v/v) de metanol en cloroformo, tras cromatografía en columna (Figura 22 b), obteniéndose puro tras CCF preparativa (Figuras 22 c), tal y como se verificó por CCF bidimensional (Figura 22 d).

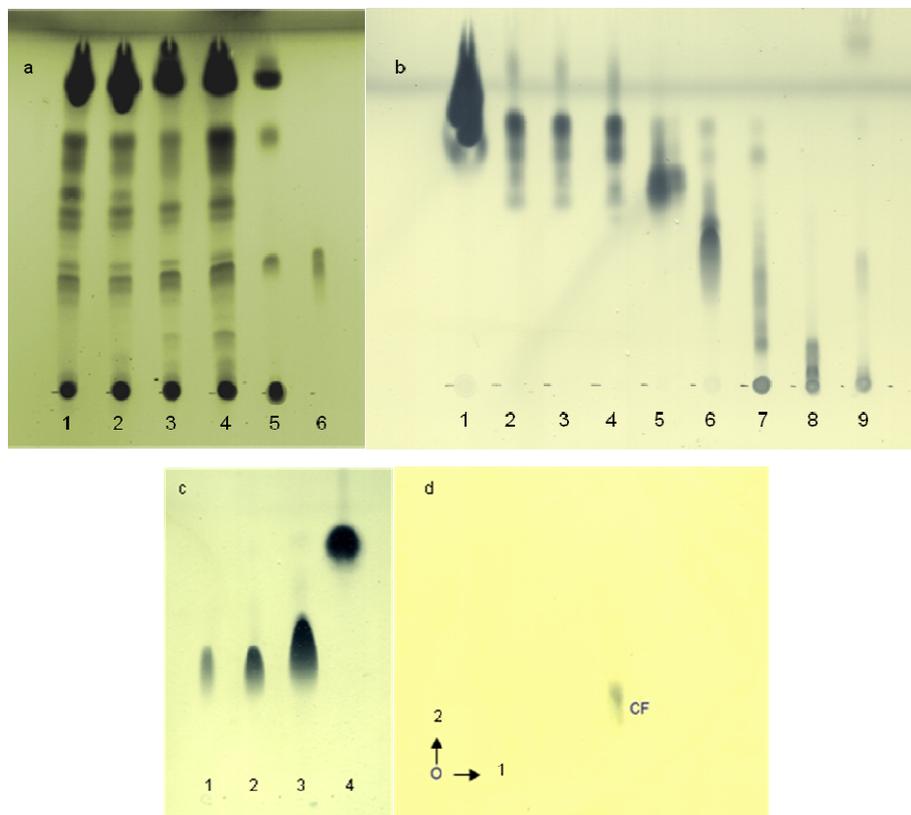
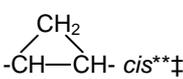
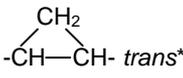
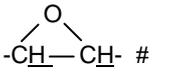


Figura 22. Detección y purificación del CF mediante cromatografía. a) Extracto de lípidos totales de, 1) *M. simiae* (habana) TMC 5135, 2) *M. simiae* (habana) IPK-342, 3) *M. simiae* (habana) IPK-337, 4) *M. simiae* ATCC 25275^T, 5) *M. tuberculosis* H37Rv, 6) CF control. b) CCF de los diferentes fracciones lipídicas obtenidas por CC *M. simiae* (habana) TMC 5135, 1) fracción clorofórmica, 2) y 3) fracción 2 % de metanol en cloroformo, 4) y 5) fracción 5 % de metanol en cloroformo, 6) y 7) fracción 10 % de metanol en cloroformo, 8) fracción 30 de metanol en cloroformo y 9) fracción 50 % de metanol en cloroformo. c) CCF del CF purificado: 1) CF control, 2) *M. simiae* (habana) TMC 5135, 3) *M. alvei* CR-21^T, 4) AMs libres de *M. simiae* (habana) TMC 5135 d) CCF bidimensional del CF de *M. simiae* (habana) TMC 5135, O) Punto de origen. a-c: cloroformo-metanol (9:1, v/v); d: 1) cloroformo-metanol-agua (100:140:8, v/v/v), 2) cloroformo/acetono/metanol/agua (50:60:2.4:3, v/v/v).

Análisis estructural del 'cord factor'

La identidad del CF se determinó mediante la combinación de diversas técnicas de RMN (ver Material y Métodos), que permitieron la asignación correcta de los distintos protones y carbonos de la molécula, coincidiendo los distintos desplazamientos químicos obtenidos (Tabla 4) con los espectros publicados en la bibliografía (Niescher y cols., 2006 y Nishizawa y cols., 2007).

Tabla 4. Análisis mediante ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del CF de distintas micobacterias.

| Ácidos micólicos | ^1H (ppm) | ^{13}C (ppm) |
|---|-----------------------|-----------------------|
| -CH ₃ terminal | 0.81 | 13.72 |
| -CH ₃ ramificado | 0.87 | 20.62 |
| -CH ₂ - | 1.20 | 22 – 30 |
| -CH=CH- <i>trans</i> | 5.16,5.29 | 128.17, 136.21 |
| -CH=CH- <i>cis</i> | 5.27 | 129.62 |
| -COO0 | - | 175.24 |
| -C ₃ H | 3.60 | 72.34 |
| -C ₂ H | 2.35 | 52.26 |
| -OCH ₃ * | 3.25 | 55.48 |
| -CH-OCH ₃ * (ω -1)-metoxi) | Superpuesto a metanol | 76.98 |
| CH ₃ -CH-OCH ₃ * (ω -1)-metoxi) | 1.06 | 36.46 |
|  -CH-CH- <i>cis</i> **‡ | -0.40, 0.49, 0.58 | 10.72, 15.64 |
|  -CH-CH- <i>trans</i> **‡ | 0.04-0.07 | 10.32 – 25.19 |
| CH ₃ -CH-CO**‡, CH-CO-**‡, -CO**‡ | 0.98, 2.45 | 175.35 |
| H ₃ C-O-CH- ‡ | 2.92 | No hecho |
|  -CH-CH- # | 2.37, 2.69 | 53, 60 |
| Trehalosa | ^1H (ppm) | ^{13}C (ppm) |
| C ₁ H ₁ /C _{1'} H _{1'} | 4.96 - 4.98 | 94.46 |
| C ₂ H ₂ /C _{2'} H _{2'} | 3.42 - 3.44 | 70.88 |
| C ₃ H ₃ /C _{3'} H _{3'} | 3.68 - 3.71 | 72.48 |
| C ₄ H ₄ /C _{4'} H _{4'} | 3.18 – 3.20 | 71.14 |
| C ₅ H ₅ /C _{5'} H _{5'} | 4.08 - 4.20 | 69.69 |
| C _{6a} H _{6a} /C _{6a'} H _{6a'} | 4.52 - 4.63 | 63.85 |
| C _{6b} H _{6b} /C _{6b'} H _{6b'} | 3.92 – 4.01 | 63.85 |

Aplicable a: **M. alvei*, ** *M. simiae*, ‡*M. tuberculosis*, #*M. fortuitum*

Mycobacterium simiae

El CF de *M. simiae* ATCC 25275^T fue identificado sin ambigüedad como una 6,6'-dimicoloil trehalosa por ¹H-RMN (Figura 23), ¹H-¹H-COSY-RMN (Figuras 24 y 25), ¹³C-RMN (Figura 26) y ¹H-¹³C-HMBC (no mostrado).

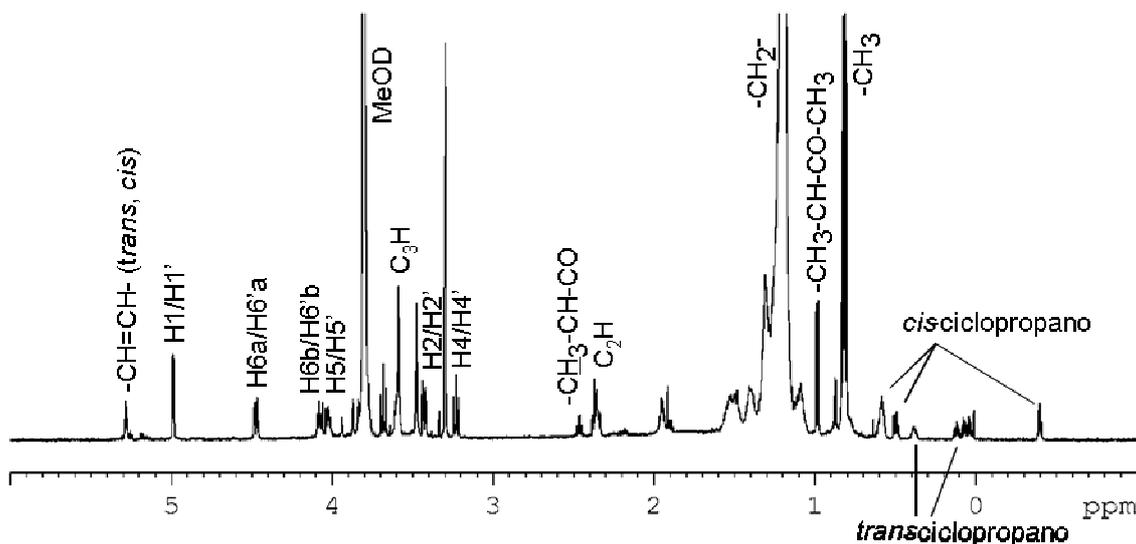


Figura 23. Espectro ¹H-RMN del CF de *M. simiae* ATCC 25275^T. Se indican las señales debidas a los distintos protones de la trehalosa y de los ácidos micólicos.

Los protones anoméricos de la trehalosa (H1/H1') (Figura 23) se localizaron a 4.98ppm, siendo $J_{1,2} = 3.9$ Hz, demostrando así una configuración α/α' en este disacárido (Lin y cols., 2007). Dos de los protones en posición 6 (H6a/H6'a) aparecieron a 4.50 ppm y los otros dos (H6b/H6'b) a 4.08 ppm, indicando que los grupos hidroxilos en C6/C6' estaban esterificados (Lin y cols., 2007). Los espectros ¹H-RMN del CF de las cepas IPK-337 e IPK-342 fueron similares a los de ATCC 25275^T (no mostrados). Sin embargo, en TMC 5135 (Figura 27) e IPK-220 (no mostrado) se observó un solapamiento de las señales de los protones H5/H5' con las señales de los protones H6a/H6'a, que fue confirmado mediante ¹H-¹H-COSY (no mostrado). Para estudiar esta aparente anomalía, el CF de TMC 5135 fue reanalizado utilizando diferentes relaciones (v/v) de deuterocloroformo/deuterometanol (30:1, 10:1 y 5:1).

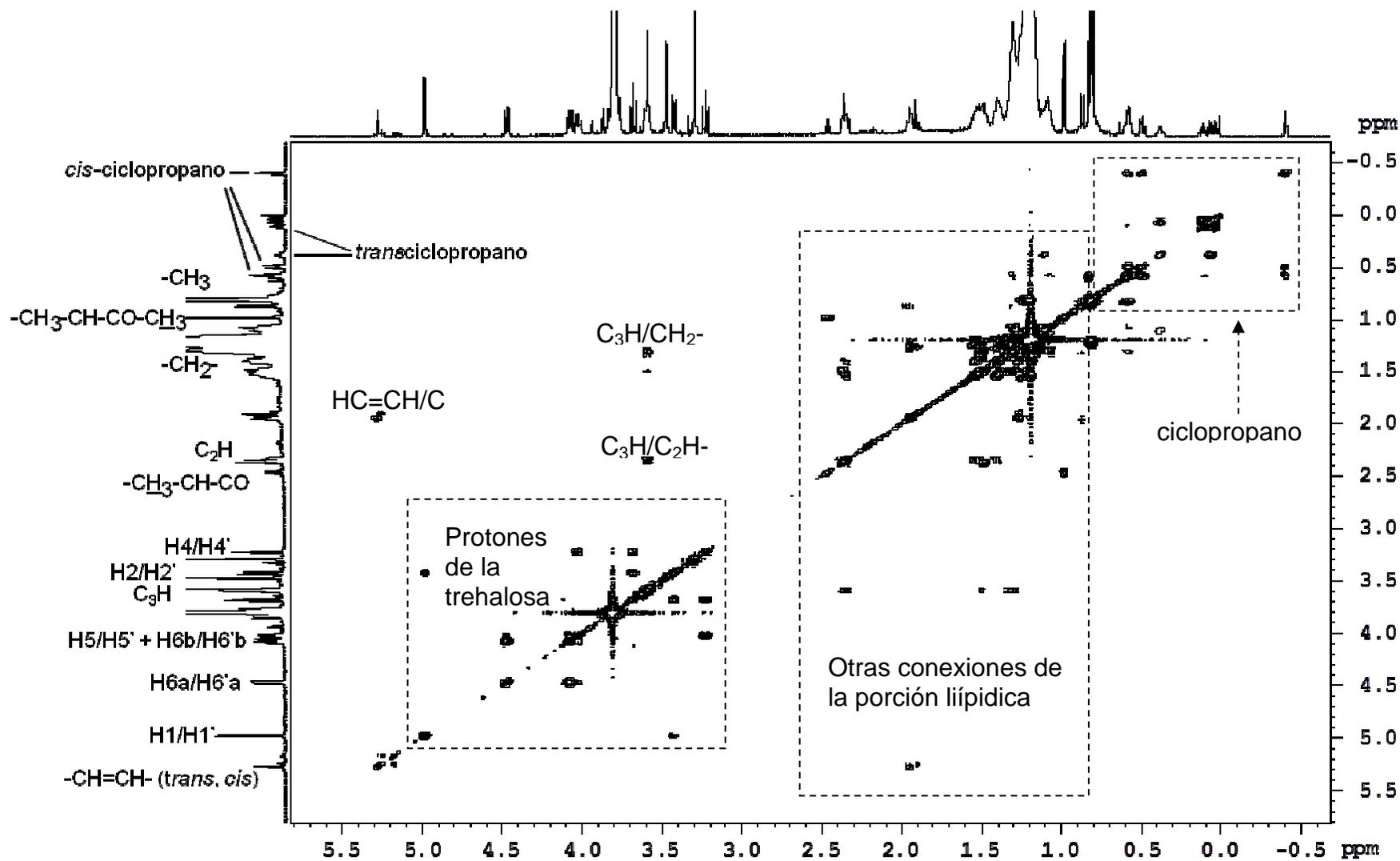


Figura 24. ^1H - ^1H -COSY del CF de *M. simiae* ATCC 25275^T.

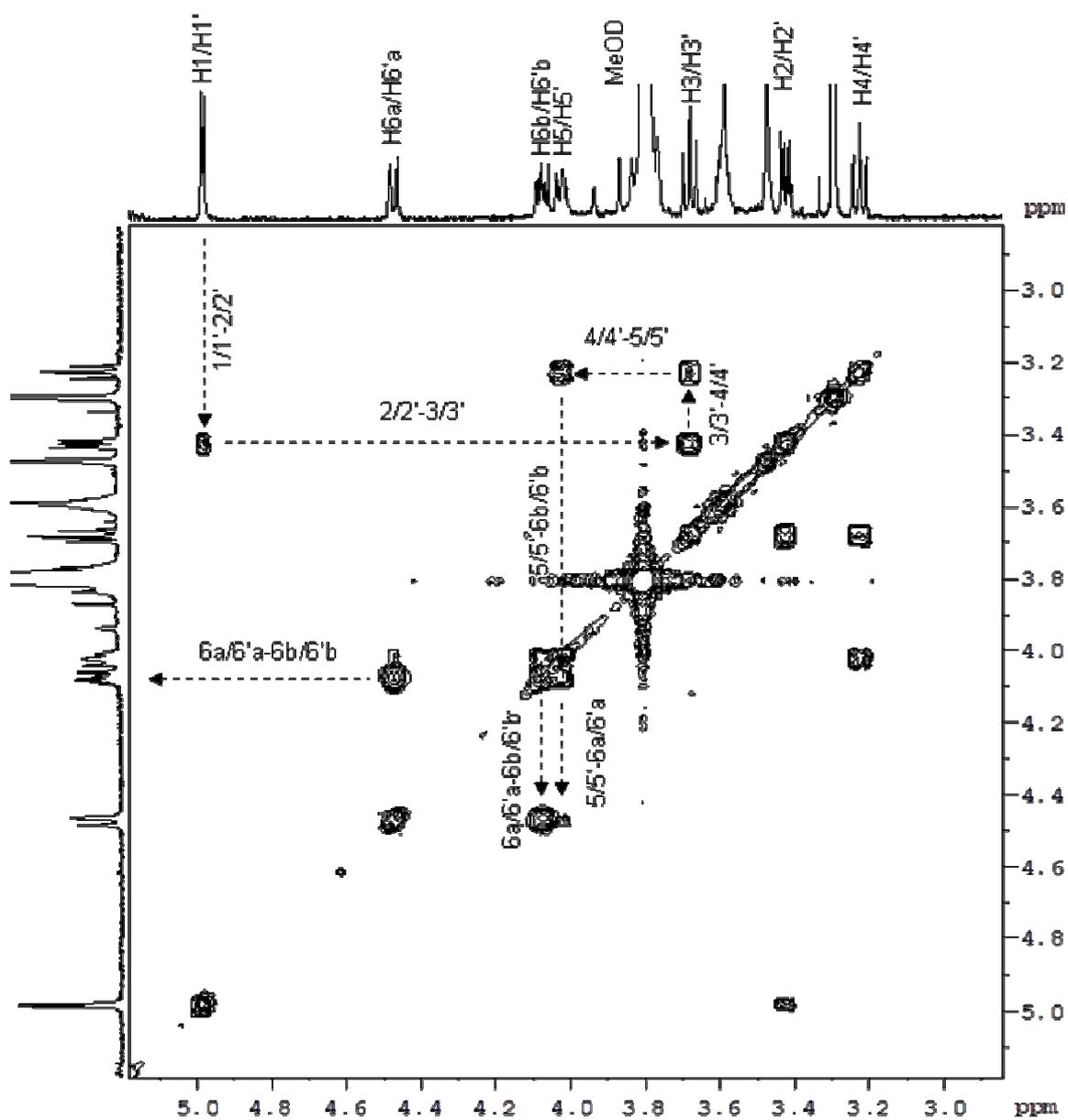


Figura 25. Detalle ampliado del espectro ^1H - ^1H -COSY del CF de *M. simiae* ATCC 25275^T mostrando la correlación entre los distintos protones de la trehalosa.

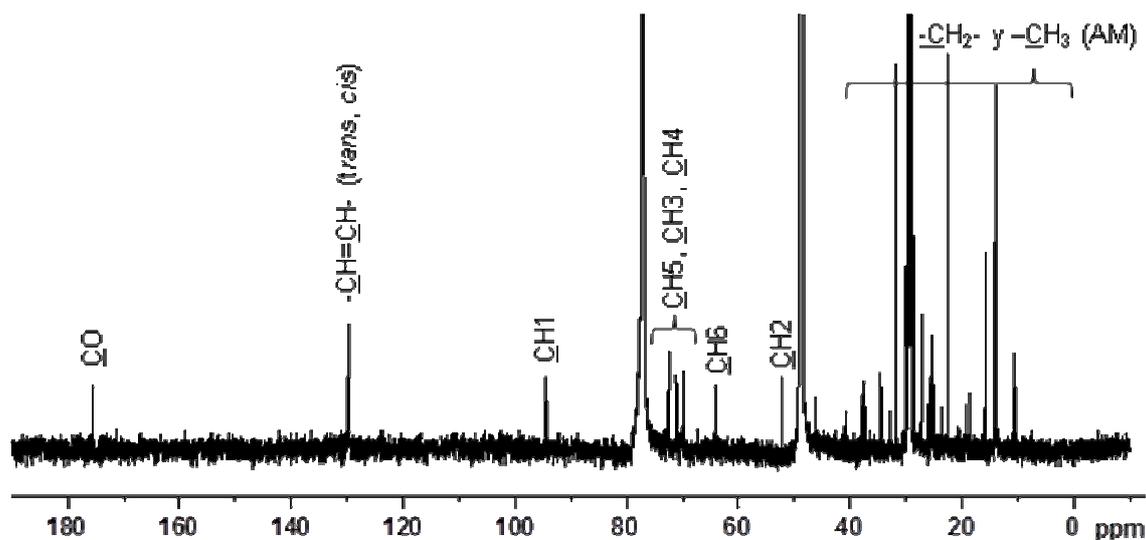


Figura 26. Espectro ^{13}C -RMN de *M. simiae* (*habana*) TMC 5135. Se indican las señales debidas a los distintos carbonos de la trehalosa y de los ácidos micólicos.

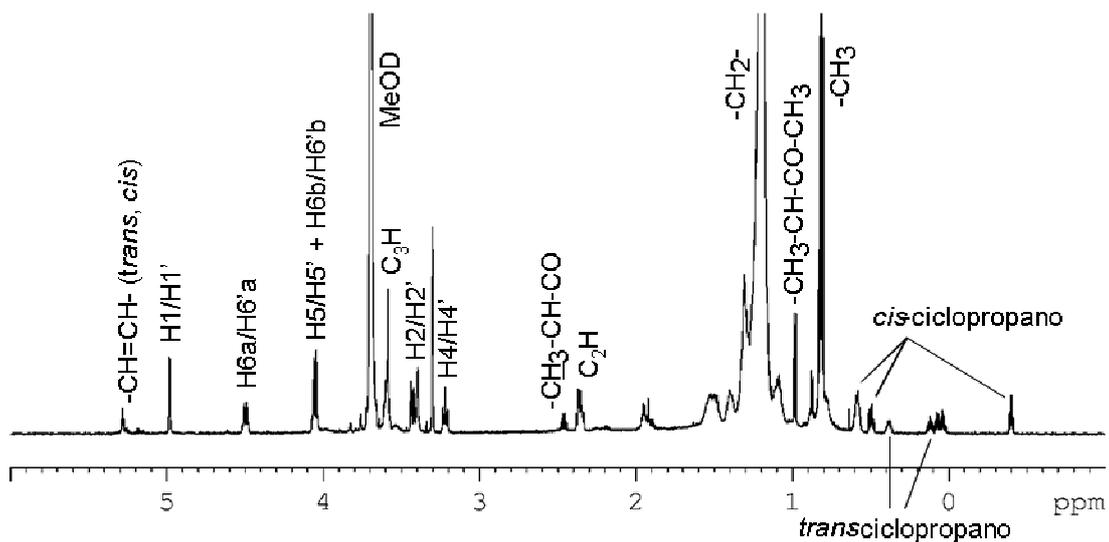


Figura 27. Espectro ^1H -RMN del CF de *M. simiae* (*habana*) TMC 5135. Se indican las señales debidas a los distintos protones de la trehalosa y de los ácidos micólicos. Nótese el solapamiento de H5/H5' con H6b/H6'b.

Los resultados reflejados en la Figura 28, indican que el solapamiento observado se debe a un efecto disolvente, puesto que al bajar la proporción de deuterometanol se produce un desdoblamiento de las señales H5/H5' y H6a/H6'a. No obstante, para descartar cambios en la configuración de los carbonos C2/C3, el espectro del CF de TMC 5135 se estudió también en piridina deuterada (no mostrado), confirmándose el efecto disolvente indicado (Nishizawa y cols., 2007). Por otra parte, los espectros ^{13}C -RMN de las cepas ATCC 25275^T y TMC 5135 fueron similares (Figura 26), no encontrándose ninguna alteración en los carbonos anoméricos (C1).

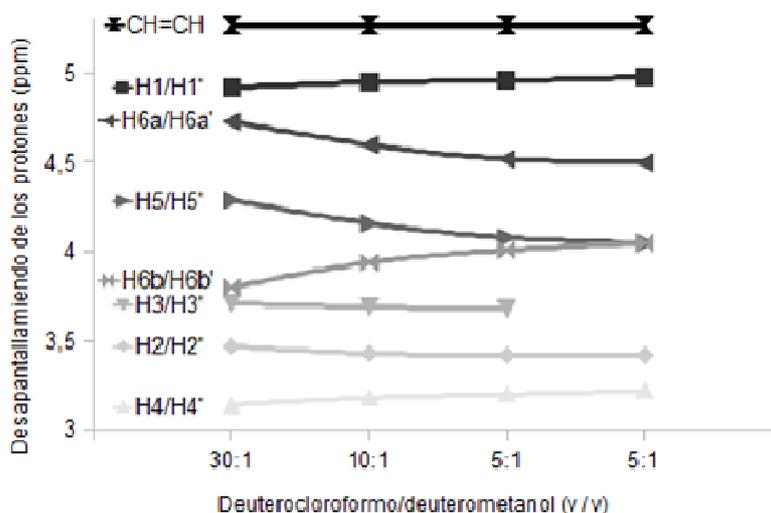


Figura 28. Desplazamientos químicos de los protones de la trehalosa y de los protones de los dobles enlaces *cis* dependiendo de la relación deuterocloroformo:deuterometanol.

La evaluación directa de los espectros ^1H -RMN (Figuras 23 y 27) permitió la identificación de los sustituyentes lipídicos del CF como: a) α' -micolil [señal a 5.27 ppm, debida a un doble enlace *cis* -CH=CH- (Figura 6 c)], b) α -micolil [señales a -0.40, 0.49 y 0.58 ppm: anillos *cis*-ciclopropano (Figura 6 b) y c) ceto-micolil [señales a 0.98 y 2.45 ppm, debidas, respectivamente a los grupos metilo y metino adyacentes al -C=O (Figura 6 f)] (Mederos y cols., 2007; Watanabe y cols., 1999). Otras señales detectadas en los diferentes espectros fueron las relacionadas con anillos *trans*-ciclopropanos (0.04-0.07 ppm) (en los sustituyentes α - y ceto-micolil, Figuras 23 y 27), las de los grupos metileno -CH₂- (1.20 ppm), las de los -CH₃ distales (0.81 ppm), las de los *trans*-dobles enlaces (5.17-5.23 ppm) y las de ramificaciones -CH₃ (0.87 ppm) (Figuras 6 a, d, 23 y 27) (Mederos y cols., 2007; Watanabe y cols., 1999).

La composición general de ácidos micólicos del CF de las cepas de *M. simae* analizadas se estimó mediante ^1H -RMN y se muestra en la Tabla 5. Los datos sugieren una alta proporción de ceto-micolatos en TMC-5135 y ATCC 25275^T, cepas que, a su vez, presentaron la mayor relación *trans/cis* en los grupos ciclopropanos (Tabla 5). Los α' -micolatos fueron especialmente abundantes en ATCC 25275^T, IPK-337 e IPK-342. Por otro lado, la cantidad de *trans*-insaturaciones en alfa- y ceto-micolatos fue particularmente alta en ATCC 25275^T (Tabla 5).

Tabla 5. Composición general de ácidos micólicos del CF de diversas cepas de *M. simiae*, estimada a partir de los espectros ¹H-RMN.

| Cepa | $\alpha/\alpha'/\text{ceto}$ | Ciclopropano <i>trans/cis</i> | insaturaciones <i>trans/cis</i> |
|-------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| ATCC 25275 ^T | 1/0,68/1,37 | 0,73 | 0,41 |
| IPK 220 | 1/0,87/0,59 | 0,62 | 0,37 |
| IPK 337 | 1/0,72/0,67 | 0,66 | 0,28 |
| IPK 342 | 1/0,66/0,85 | 0,60 | 0,19 |
| TMC 5135 | 1/0,47/1,16 | 0,72 | 0,25 |

Los espectros de masas (ESI-TRAP, modo negativo) (Figura 29) de los ácidos micólicos liberados del CF de las distintas cepas de *M. simiae* confirmaron las evidencias obtenidas mediante ¹H-RMN, identificándose éstos como α' - (C64-C68), α - (C89-C91) y ceto- (C85-C91) micolatos. Datos previos sobre ácidos micólicos de *M. simiae* (Mederos y cols., 2007) y de otras micobacterias (Minnikin, 1982; Watanabe y cols., 2001) indican que la serie impar de α -micolatos contiene un *trans*-ciclopropano más un *cis*-ciclopropano en su estructura, mientras que la serie par presenta dos *cis*-ciclopropanos (Figura 6 b). La serie impar de los ceto-micolatos contiene un *trans*-ciclopropano. Hay que indicar, no obstante, que las series pares de α - y ceto-micolatos pueden contener un *trans*-doble enlace en vez de un *trans*-ciclopropano, aunque su proporción relativa debe ser mucho menor a juzgar por las señales de dobles enlaces *trans* en los espectros (Figuras 23 y 27) (Mederos y cols., 2007; Watanabe y cols., 2001). Teniendo en cuenta las intensidades de los diferentes iones (M-H)^{-1/z} (Tabla 5), la serie mayoritaria entre los α' -micolatos fue C66:1, mientras que entre los ceto-micolatos el C87 alcanzó las mayores proporciones (Tabla 6) en todas las cepas analizadas. Sin embargo, se detectaron diferencias entre los α -micolatos, ya que en TMC 5135 predominaron las series C87 y C89 y en las demás cepas estudiadas los niveles en las series de cadena par e impar fueron más equilibrados (Tabla 6). Los patrones generales de ácidos micólicos en la pared celular (células deslipidadas) resultaron similares a los del CF (Tabla 6). Sin embargo, es de destacar que TMC 5135 mantiene la misma composición de α -micolatos impares y pares en el CF y en la pared (Tabla 6), contrariamente a ATCC 25275^T, IPK-337 e IPK-342, en donde el contenido de la serie impar fue más alto en el CF que en las células deslipidadas (Tabla 6).

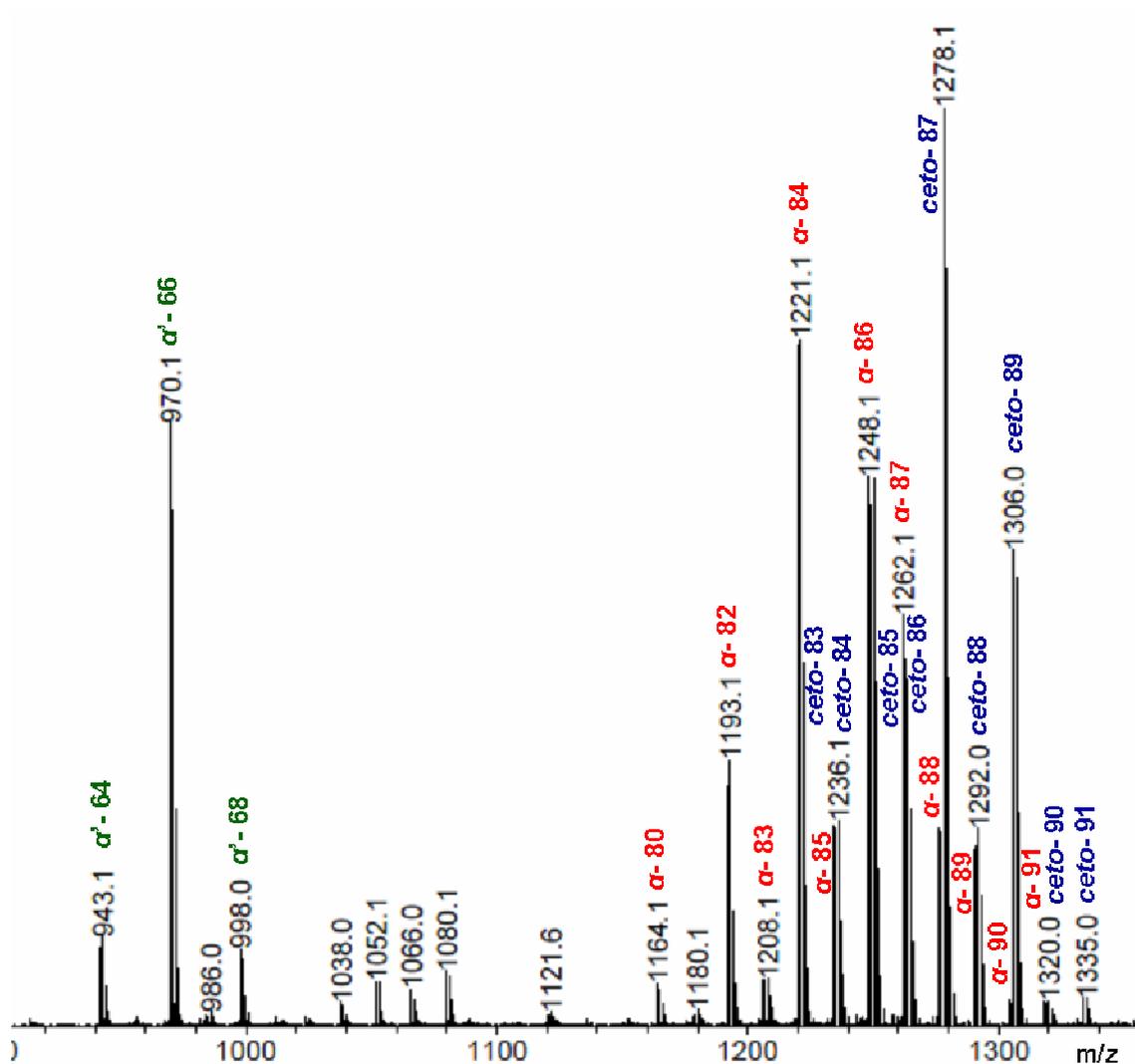


Figura 29. Espectro de masas (ESI-TRAP, modo negativo) de los ácidos micólicos, $(M-H)^{-1/z}$, del CF de *M. simiae* ATCC 25275^T. Los distintos tipos estructurales se identifican con colores diferentes y se indica el número de C de cada uno de ellos.

Tabla 6. Composición de ácidos micólicos del 'cord factor' y células deslipidadas de diversas cepas de *Mycobacterium simiae*, deducida de la intensidad de los diferentes iones (M-H)⁻¹/z obtenidos mediante ESI-TRAP-MS. La masa exacta de los iones (M-H)⁻¹/z se da con un error máximo de 800 ppm.

| Ácidos micólicos (M-H) ⁻¹ | | Cepa | | | | | | | | | |
|---|--------------|------------------------------------|----------------------|--|----------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | | <i>M. simiae</i> (habana) TMC 5135 | | <i>M. simiae</i> ATCC 35375 ^T | | <i>M. simiae</i> (habana) IPK-220 | | <i>M. simiae</i> (habana) IPK-337 | | <i>M. simiae</i> (habana) IPK-342 | |
| | | 'Cord factor' | Células deslipidadas | 'Cord factor' | Células deslipidadas | 'Cord factor' | Células deslipidadas | 'Cord factor' | Células deslipidadas | 'Cord factor' | Células deslipidadas |
| α' | C64 (941·9) | 13·8 ± 1·7 | 20·3 ± 4·7 | 7·8 | 11·7 | 15·8 | 7·8 | 13·6 | 3·9 | 12·7 | 18·2 |
| | C66 (969·9) | 70·6 ± 1·7 | 74·4 ± 0·6 | 79·6 | 77·9 | 73·4 | 79·7 | 73·6 | 90·2 | 73·6 | 68·2 |
| | C68 (997·9) | 15·6 ± 0·0 | 5·3 ± 5·3 | 12·6 | 10·4 | 10·8 | 12·5 | 12·8 | 5·9 | 13·7 | 13·6 |
| α | C80 (1165·0) | 2·0 ± 0·2 | 1·8 ± 1·1 | 1·0 | 1·6 | 2·9 | 2·1 | 2·2 | 3·5 | 1·7 | 4·2 |
| | C82 (1193·0) | 6·4 ± 1·8 | 8·1 ± 3·2 | 5·1 | 10·1 | 7·6 | 10·7 | 9·8 | 13·2 | 10·8 | 11·5 |
| | C84 (1211·0) | 13·4 ± 2·2 | 16·1 ± 3·5 | 13·7 | 26·1 | 23·5 | 23·1 | 19·4 | 25·2 | 18·4 | 26·8 |
| | C86 (1249·0) | 11·4 ± 0·8 | 11·8 ± 2·7 | 18·3 | 20·5 | 14·7 | 19·3 | 16·0 | 16·7 | 12·6 | 14·7 |
| | C88 (1277·0) | 7·1 ± 0·1 | 5·3 ± 0·4 | 11·3 | 7·4 | 4·7 | 6·2 | 6·2 | 2·9 | 5·4 | 4·7 |
| | C90 (1305·0) | 2·3 ± 0·9 | 1·6 ± 1·0 | 4·1 | 0·7 | 0·9 | 1·4 | 0·8 | 1·3 | 2·7 | 1·0 |
| | C83 (1207·0) | 2·5 ± 0·4 | 3·2 ± 0·7 | 1·0 | 1·6 | 3·8 | 2·8 | 3·1 | 3·2 | 2·7 | 4·2 |
| | C85 (1235·0) | 10·5 ± 1·3 | 11·7 ± 1·6 | 5·8 | 7·8 | 13·8 | 9·7 | 11·5 | 9·6 | 5·4 | 9·9 |
| | C87 (1263·0) | 21·5 ± 0·7 | 25·5 ± 5·8 | 16·8 | 15·6 | 19·1 | 15·5 | 20·4 | 16·7 | 17·5 | 15·7 |
| | C89 (1291·0) | 18·1 ± 5·2 | 13·1 ± 5·4 | 16·1 | 7·4 | 7·9 | 7·9 | 9·5 | 6·4 | 16·1 | 6·3 |
| | C91 (1319·1) | 4·8 ± 2·4 | 1·8 ± 0·8 | 6·8 | 1·2 | 1·1 | 1·3 | 1·1 | 1·3 | 6·7 | 1·0 |
| ceto | C85 (1251·0) | 23·6 ± 0·8 | 24·6 ± 4·6 | 0·0 | 27·7 | 32·3 | 28·1 | 26·2 | 29·6 | 25·0 | 33·5 |
| | C87 (1279·0) | 42·9 ± 3·1 | 50·1 ± 2·3 | 51·1 | 46·6 | 44·5 | 48·4 | 42·2 | 45·3 | 43·0 | 51·9 |
| | C89 (1307·1) | 30·8 ± 3·8 | 22·6 ± 0·7 | 42·2 | 24·1 | 21·4 | 21·4 | 27·9 | 23·2 | 28·9 | 13·4 |
| | C91 (1335·1) | 2·8 ± 0·1 | 1·8 ± 0·5 | 6·7 | 1·6 | 1·7 | 2·1 | 3·7 | 1·9 | 3·1 | 1·2 |
| Suma de la serie impar α | | 57·4 | 55·3 | 46·5 | 33·6 | 45·7 | 37·2 | 45·6 | 37·2 | 48·4 | 37·1 |

***Mycobacterium alvei* CR-21^T**

El CF de *M. alvei* CR-21^T combina tanto α - como (ω -1)-metoxi-micolatos (Figura 30) en su porción lipídica, coincidiendo con la composición de la envoltura celular descrita por Luquin y cols. (1990). Las señales específicas para los sustituyentes (ω -1)-metoxi se detectan a 1,06 ppm (-CH₃ adyacente a -CH-OCH₃) y a 3,25 ppm (-OCH₃) en el espectro ¹H-RMN (Figura 30), correspondiendo a 36,46 ppm y 55,48 ppm, respectivamente, en el espectro ¹³C-RMN (Tabla 4). Las señales comunes para todos los sustituyentes lipídicos del CF son similares a las descritas para *M. simiae* (Tabla 4), e incluyen -CH₃ terminales, -CH₂-, -COO, C₃ y C₂, así como las *trans*- y *cis*-insaturaciones (Figura 30, Tabla 4).

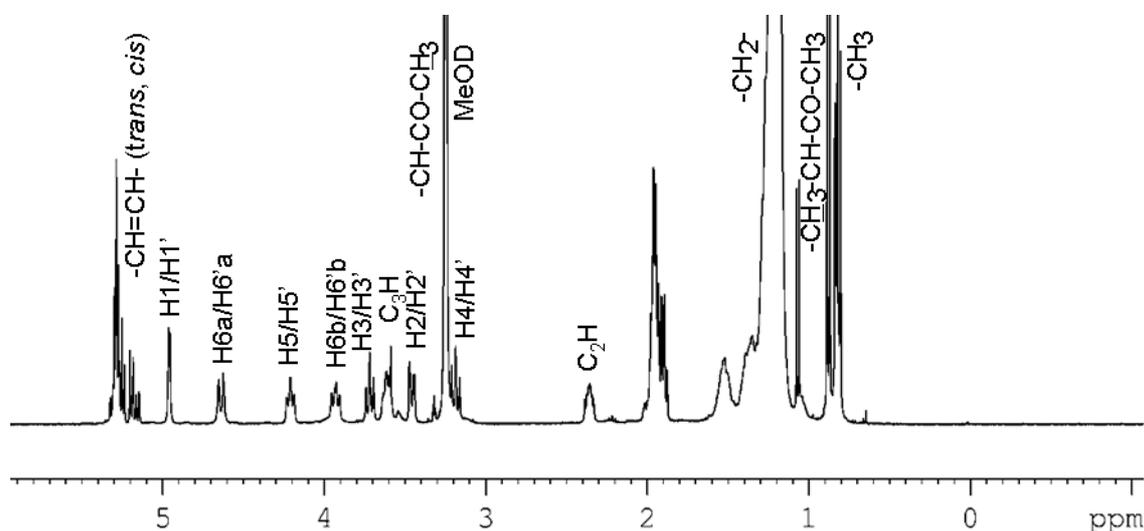


Figura 30. Espectro RMN del CF de *M. alvei* CR-21^T. Se indican las señales debidas a los distintos protones de la trehalosa y de los ácidos micólicos.

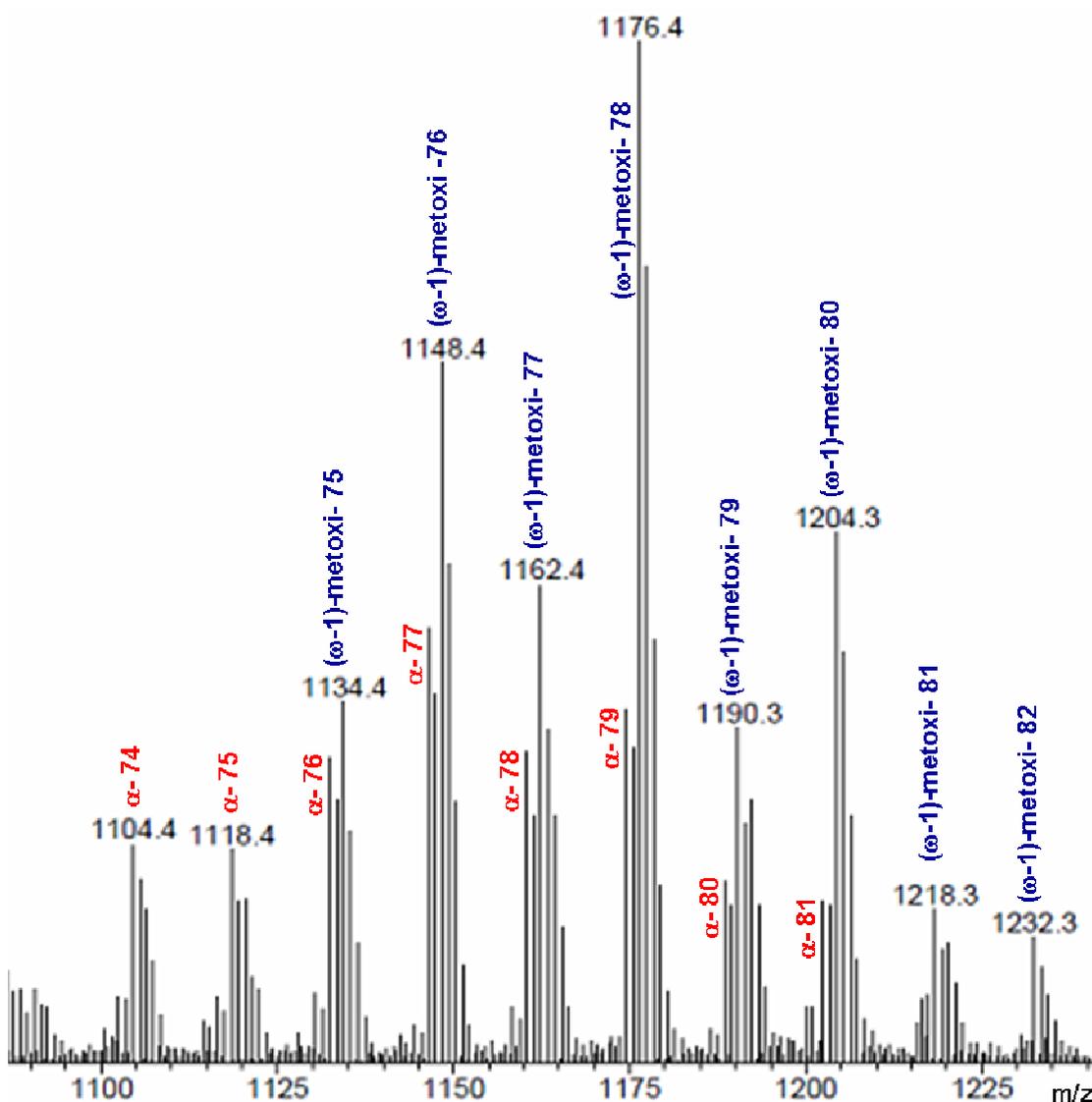


Figura 31. Espectro de masas (ESI-TRAP) de los ácidos micólicos, $(M+Na)^+$, del CF de *M. alvei* CR-21T. Los distintos tipos estructurales se identifican con colores diferentes y se indica el número de C de cada uno de ellos.

De acuerdo con el análisis realizado mediante espectrometría de masas (Figura 31), los α -micolatos de *M. alvei* CR-21^T variaron entre C72 y C81, con C77 y C79 como mayoritarios. La serie par contiene dos dobles enlaces en conformación *trans* y la impar presenta un doble enlace *cis* y otro *trans* (Luquin, 1990) (Figura 6 a). Los ω -1)-metoxi-micolatos variaron del C71 a C82, siendo los más abundantes C78 y C76 (Figura 31); en este caso, la serie par presenta una estructura similar a los de la serie impar de α -micolatos, y lo mismo ocurre con la serie impar de ambos tipos. Por otra parte, hay que señalar que son posibles (aunque en pequeña abundancia) las combinación de dobles enlaces *cis* + *cis*, tanto en α - como en ω -1)-metoxi-micolatos.

La relación entre los dobles enlaces *trans/cis* es 0.8, mientras la abundancia relativa $\alpha/(\omega-1)$ -metoxi es 1/0.7.

M. brumae CR-270^T

Los análisis mediante RMN (Figura 32, tabla 4) y ESI-TRAP-MS (Figura 33, Tabla 4) del CF de *M. brumae* CR-270^T indicaron que este compuesto contiene, exclusivamente, α -micolatos. Los resultados obtenidos mostraron que los AM varían entre C70 y C79, con C76 y C75 como mayoritarios (Figura 33). Al igual que *M. alvei* CR-21^T, la serie par contiene dos dobles enlaces en conformación *trans*, mientras que las impares presentan un doble enlace *cis* y otro *trans* (Luquin y cols., 1993). La ratio *trans/cis* de los dobles enlaces de esta especie es de 3.3, por lo que no es probable que exista una cantidad significativa de AMs con las dos instauraciones en conformación *cis*.

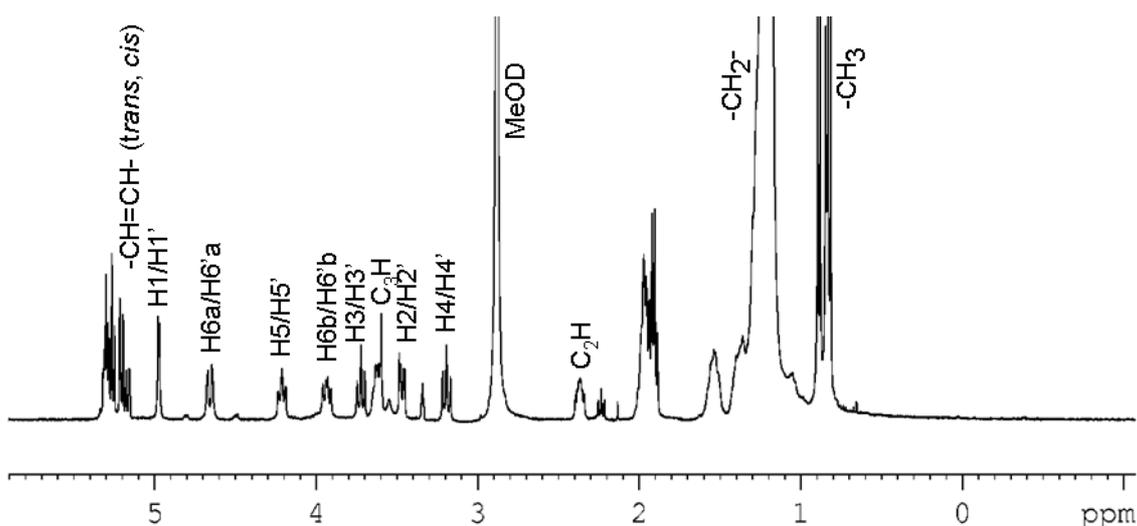


Figura 32. Espectro RMN del CF de *M. brumae* CR-270^T. Se indican las señales debidas a los distintos protones de la trehalosa y de los ácidos micólicos.

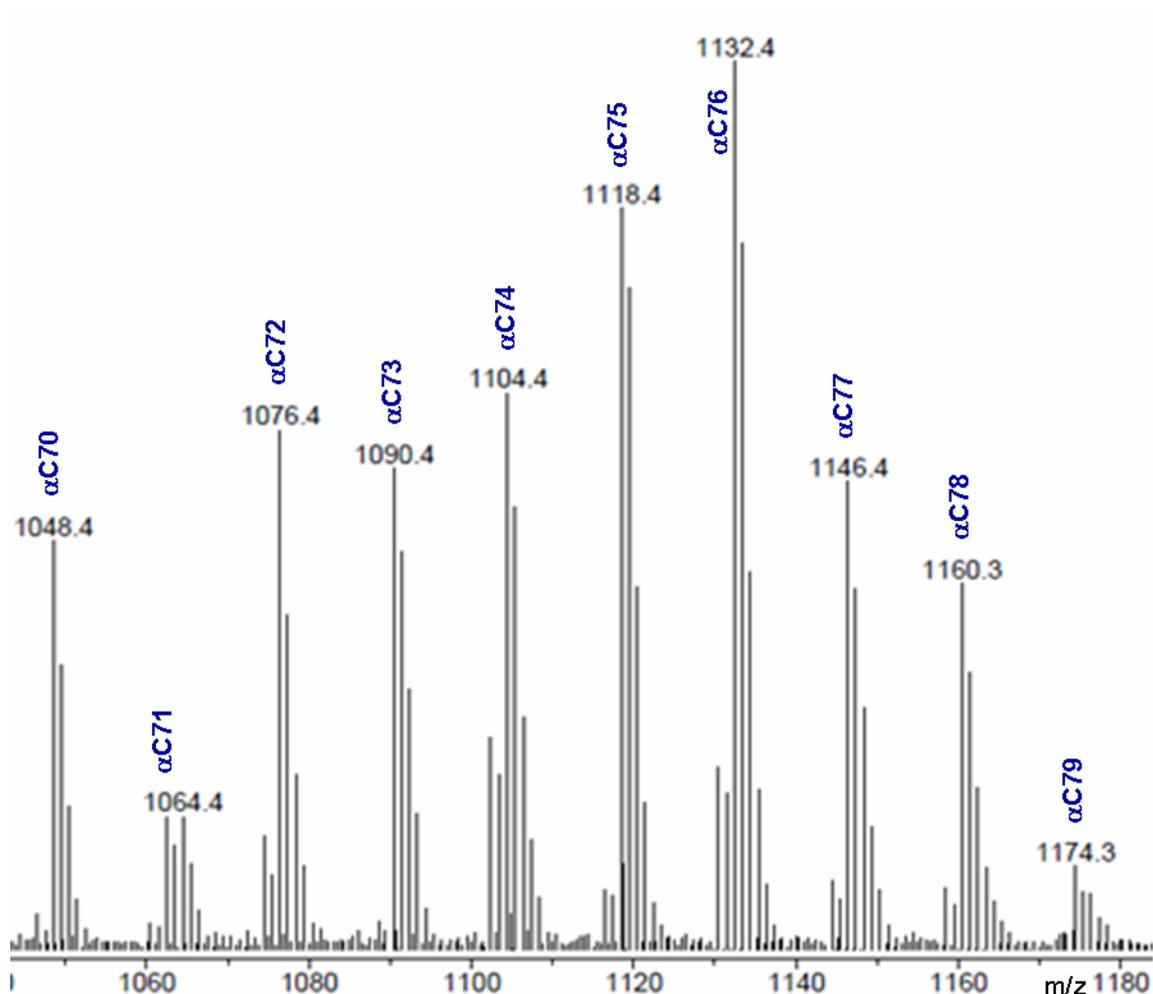


Figura 33. Espectro de masas (ESI-TRAP) de los ácidos micólicos, $(M+Na)^+$, del CF de *M. brumae* CR-270^T.

***M. fortuitum* AC1**

El CF de *M. fortuitum* (Figura 34) presentó α - (Figura 6 a) y epoxi-micolatos (Figura 6 g) ($-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}-$, 2.37 ppm y 2.69 ppm, respectivamente). El análisis mediante ESI-TRAP-MS indicó una longitud de cadena entre C73-C82 (Figura 35), predominando C77 y C79 entre los α -micolatos y C79 entre los epoxi-micolatos. La relación entre ambos tipos estructurales (α /epoxi) fue 1/0,7 y la de las insaturaciones *trans/cis* 0,87.

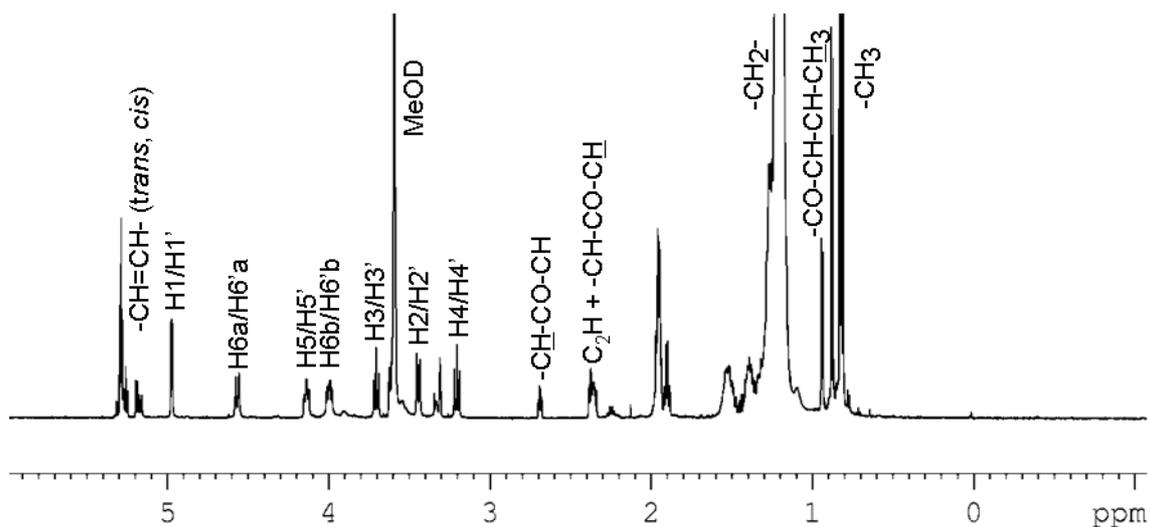


Figura 34. Espectro RMN del CF de *M. fortuitum* AC1. Se indican las señales debidas a los distintos protones de la trehalosa y de los ácidos micólicos.

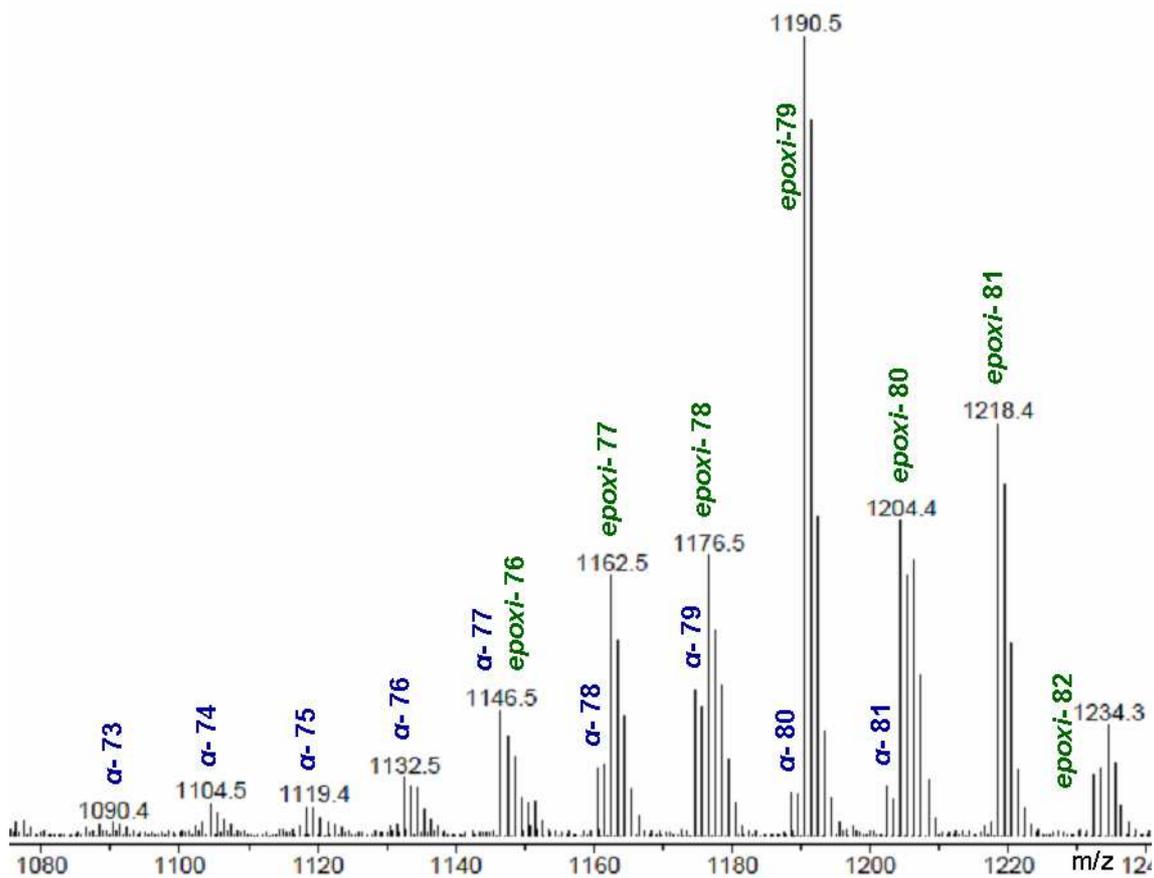


Figura 35. Espectro de masas (ESI-TRAP) de los ácidos micólicos, $(M+Na)^+$, del CF de *M. fortuitum* AC1. Los distintos tipos estructurales se identifican con colores diferentes y se indica el número de C de cada uno de ellos.

M. tuberculosis H37Rv

La identidad del CF de *M. tuberculosis* fue confirmada por ^1H -RMN y ESI-TRAP-MS (Figuras 36 y 37). Detalles del espectro ^1H -RMN (Figura 36) indican la presencia de sustituyentes α - (Figura 6 b), ceto- (Figura 6 f) ($\text{CH}_3\text{-CH-CO-}$, 0.98 y 2.45 ppm, respectivamente (figura 36) y metoxi-micolil (Figura 6 e) ($-\text{CH-OCH}_3$, 2.92 ppm; $-\text{OCH}_3$, 3.27 ppm) (figura 36). La ratio α /ceto/metoxi fue de 1/0.4/0.5 y la mayoría de los anillos ciclopropano presentaron conformación *cis* (relación *trans/cis* = 0.15). Sólo una pequeña cantidad (2 %) de ácidos micólicos contenía dobles enlaces *cis* + *trans*. Los α -micolatos variaron de C76-C82, los ceto-micolatos entre C82-C90 y los metoxi-micolatos entre C85-C89 (Figura 37).

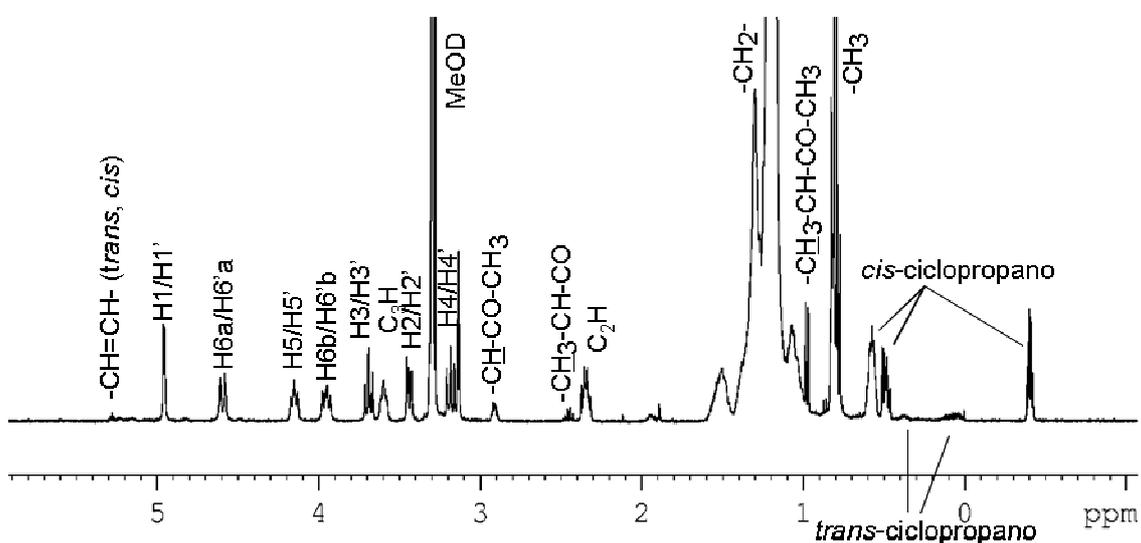


Figura 36. Espectro RMN del CF de *M. tuberculosis* H37Rv. Se indican las señales debidas a los distintos protones de la trehalosa y de los ácidos micólicos.

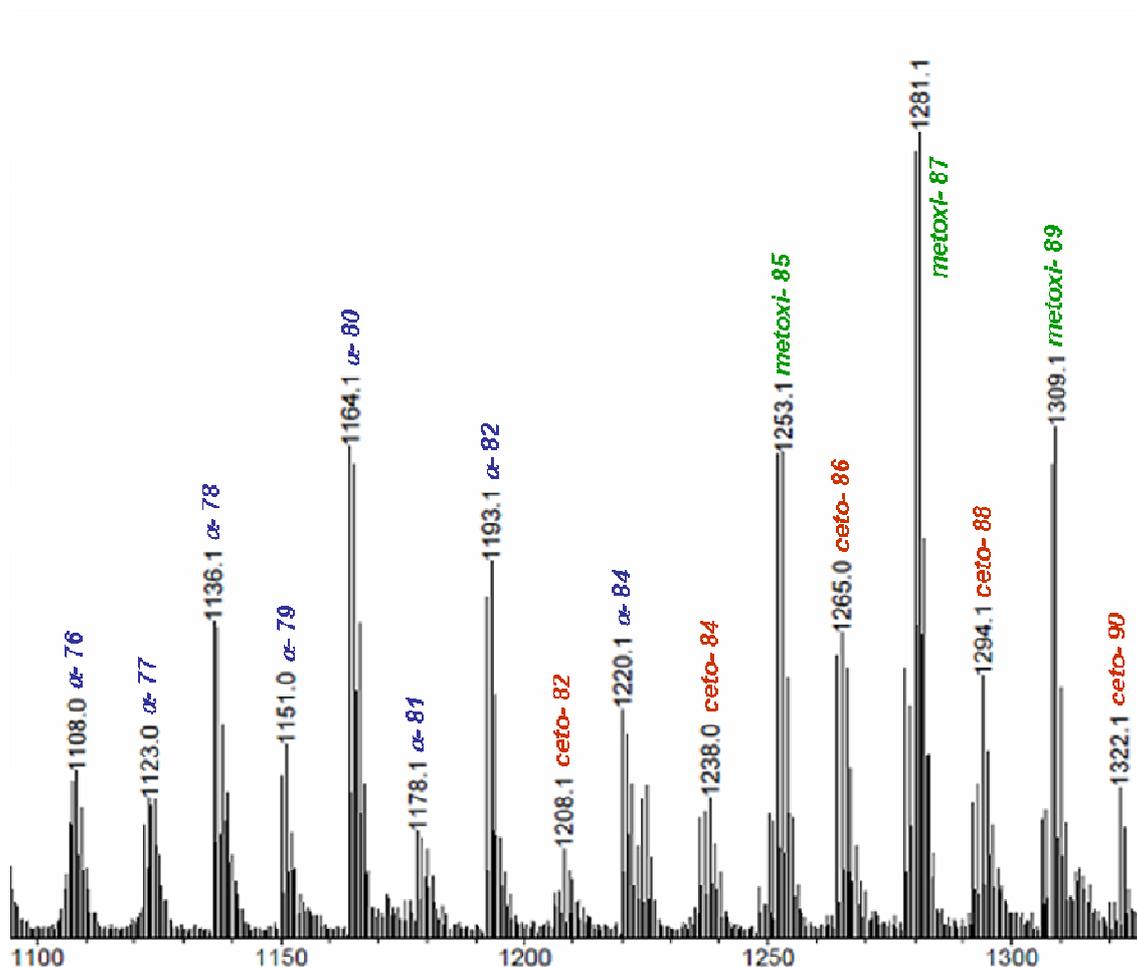


Figura 37. Espectro MS (ESI-TRAP, modo negativo) de los ácidos micólicos, $(M-H)^{-1}$, del CF de *M. tuberculosis* H37Rv. Los distintos tipos estructurales se identifican con colores diferentes y se indica el número de C de cada uno de ellos.

Un resumen de las características generales de la estructura fina de los ácidos micólicos presentes en los distintos CFs analizados aparece en la Tabla 7. Adicionalmente, en las Figuras 38 y 39 se muestran algunos de los homólogos estructurales del CF de *M. simiae* (*habana*) TMC 5135 (Figura 38 a), *M. alvei* CR-21^T (Figura 38 b), *M. brumae* CR-280^T (Figura 39 a), *M. fortuitum* AC1 (Figura 39 b). En la Figura 16 puede consultarse una de las posibles combinaciones estructurales del CF de *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabla 7. Composición y detalles estructurales generales de los ácidos micólicos del CF de diversas micobacterias, deducidos de los estudios de RMN y espectrometría de masas (ESI-TRAP).

| Cepa | trans / cis | Ácido micólico | Tamaño (nº de carbonos) | Compuesto mayoritario |
|---|-------------|----------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>M. simiae</i> ATCC 25275 ^T | 0,73 | α | C80 – C91 | C84 |
| | | α' | C64 – C68 | C66 |
| | | ceto | C85 – C91 | C87 |
| <i>M. simiae</i> (habana) TMC 5135 | 0,72 | α | C80 – C91 | C87 |
| | | α' | C64 – C68 | C66 |
| | | ceto | C85 – C91 | C87 |
| <i>M. simiae</i> (habana) IPK-342 | 0,60 | α | C80 – C91 | C84 |
| | | α' | C64 – C68 | C66 |
| | | ceto | C85 – C91 | C87 |
| <i>M. simiae</i> (habana) IPK-337 | 0,66 | α | C80 – C91 | C84 |
| | | α' | C64 – C68 | C66 |
| | | ceto | C85 – C91 | C87 |
| <i>M. simiae</i> (habana) IPK-220 | 0,62 | α | C80 – C91 | C84 |
| | | α' | C64 – C68 | C66 |
| | | ceto | C85 – C91 | C87 |
| <i>M. alvei</i> CR-21 ^T | 0,8 | α | C72 – C81 | C79 |
| | | (ω-1)-metoxi | C71 – C82 | C78 |
| <i>M. brumae</i> CR-270 ^T | 3,3 | α | C77 – C79 | C77 |
| <i>M. fortuitum</i> AC1 | 0,87 | α | C73 – C81 | C77/C79 |
| | | epoxi | C76 – C82 | C79 |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv | 0,15 | α | C76 – C84 | C80 |
| | | metoxi | C85 – C89 | C87 |
| | | ceto | C82 – C90 | C86 |

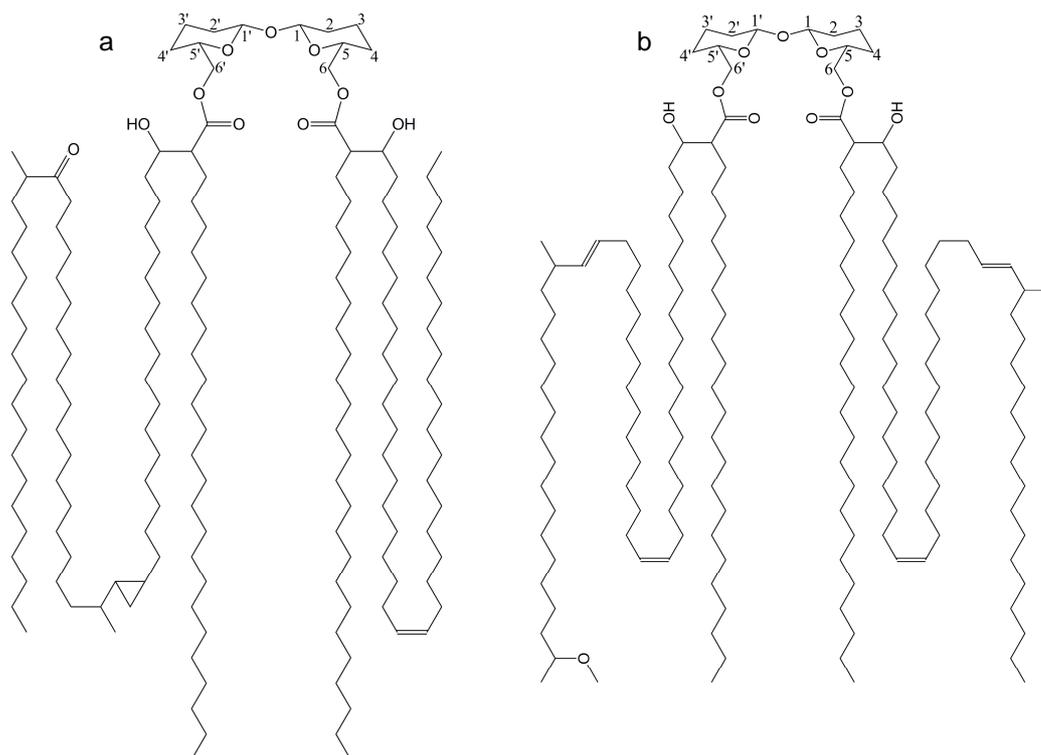


Figura 38. Estructura del 'cord factor' de: a) *M. simiae* (habana) TMC 5135 (ceto y α-micolatos). b) *M. alvei* CR-21^T (ω-1 metoxi- y α-micolatos). Son posibles otras combinaciones en ambas especies.

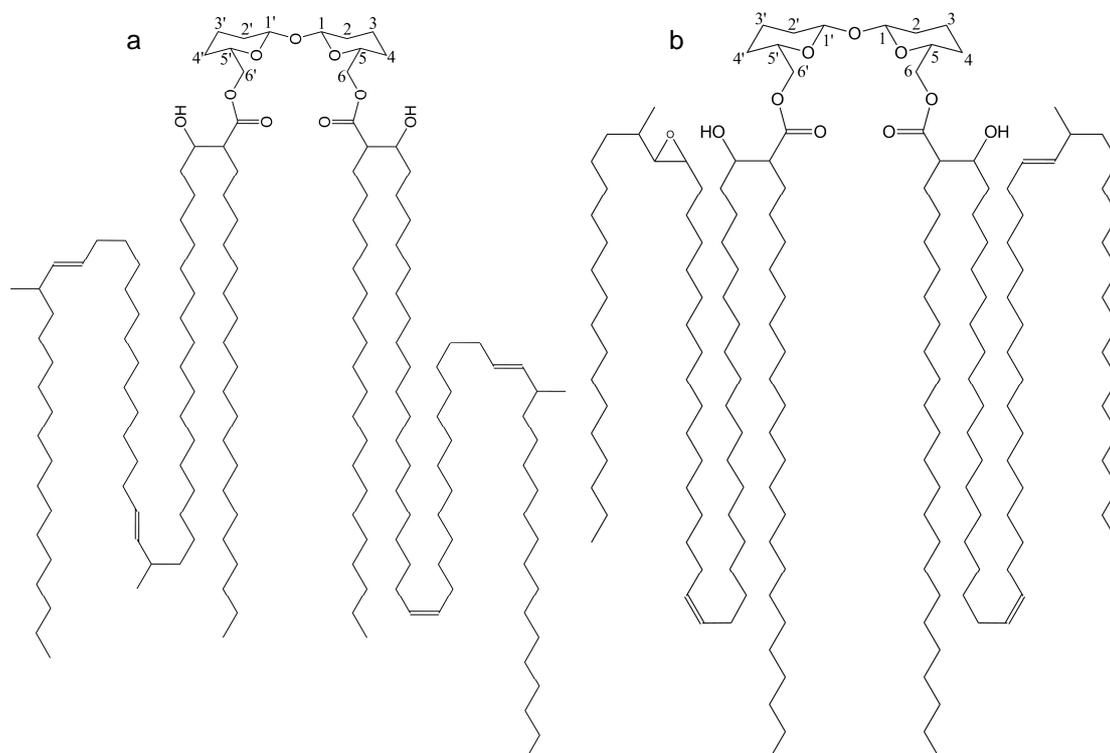


Figura 39. Estructura del 'cord factor' de: a) *M. brumae* CR-270^T (α-micolatos). b) *M. fortuitum* AC1 (epoxi- y α-micolatos) (en esta especie son posibles otras combinaciones).

**Actividad biológica del
'*cord factor*'**

Células RAW 264.7

Estudio preliminar de la inducción de TNF- α por parte del ‘cord factor’ de *M. simiae*

La capacidad de inducción de TNF- α por parte del CF de distintas cepas de *M. simiae* (ATCC 25275^T, *habana* IPK-342 y *habana* TMC 5135) se estudió de manera preliminar (sin estimulación previa por INF- γ) a las dosis de 0 μ g (control), 0.1 μ g, 1 μ g y 10 μ g (Figura 40). Las tres moléculas ensayadas fueron capaces de estimular la secreción de TNF- α , dándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($P < 0.05$, ANOVA) a 0.1 μ g y a 1 μ g, pero no a 10 μ g. Sin embargo, se consideró que este resultado era meramente fortuito, puesto que no pudo relacionarse con las diferencias en la estructura fina de los distintos CFs.

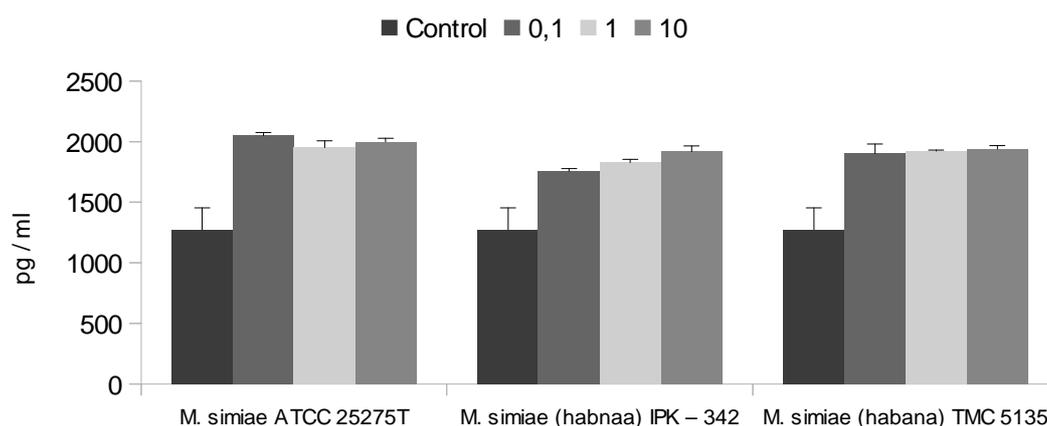


Figura 40. Inducción de TNF- α por parte del CF de diversas cepas de *M. simiae*. Células RAW 264.7, 24 h de incubación a 37 °C. Los resultados se representan como la media \pm desviación típica de dos experimentos independientes realizados por triplicado y se obtuvieron mediante ELISA.

Inducción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40 total y TNF- α por parte del ‘cord factor’ de diversas micobacterias

Los distintos CF analizados [*M. alvei* CR-21^T, *M. brumae* CR-270^T, *M. simiae* (*habana*) TMC 5135 y *M. tuberculosis* H37Rv] fueron capaces de inducir la secreción de IL-6 y TNF- α en la línea celular RAW 264.7, pero no la de IL-1 β ni la de IL-12p40 total. La relación dosis-respuesta (48 h) y la evolución en el tiempo (1 μ g, 24 h – 72 h) para IL-6 y TNF- α se refleja en la Figura 41.

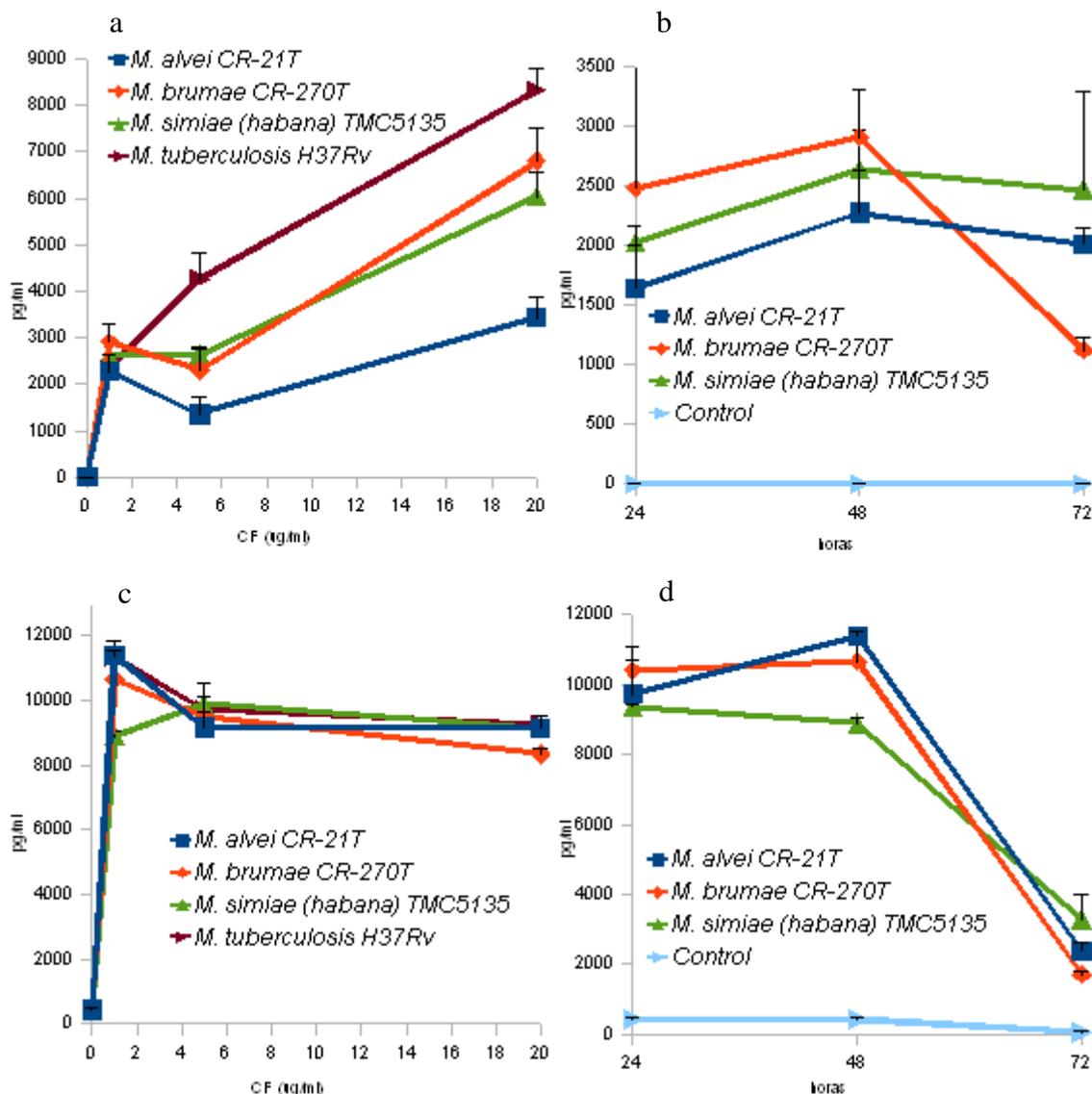


Figura 41. Inducción de IL-6 y de TNF- α en células RAW 264.7 por parte de los CFs de *M. alvei* CR-21^T, *M. brumae* CR-270^T, *M. simiae* (habana) TMC 5135 y *M. tuberculosis* H37Rv. a) Dosis-respuesta de IL-6 (48 h; 0, 1, 5 y 20 µg. b) Evolución en el tiempo de la inducción de IL-6 (1 µg; 24 h, 48 h y 72 h). c) Dosis-respuesta de TNF- α (48 h; 0, 1, 5 y 20 µg. d) Evolución en el tiempo de la inducción de TNF- α (1 µg; 24 h, 48 h y 72 h). Los resultados (pg/ ml) se representan como media \pm desviación típica de tres experimentos independientes y se obtuvieron mediante citometría de flujo.

Para IL-6 se observó, en general, una clara relación entre la dosis y los niveles de inducción (Figura 41 a), obteniéndose los valores más altos para *M. tuberculosis* H37Rv, que difirieron significativamente ($P < 0.05$) del resto de micobacterias estudiadas a las dosis de 5 µg y 20 µg. *M. brumae* CR-270^T y *M. simiae* (habana) TMC 5135 produjeron niveles similares a las distintas dosis ensayadas y se diferenciaron ($P < 0,05$) de *M. alvei* CR-21^T sólo a 20 µg (Figura 41 a). La inducción de TNF- α no mostró, en general, dosis dependencia en ninguna de las cepas estudiadas, siendo los niveles

muy similares entre sí, aunque a 1 μg *M. simiae* (*habana*) TMC 5135 se diferenció significativamente del resto ($P < 0.05$) (Figura 41 c). En el estudio de la evolución temporal de la respuesta, tanto IL-6 (Figura 41 b) como TNF- α (Figura 41 d) mostraron un incremento o estabilización entre 24 h y 48 h, junto a una tendencia a un descenso de los niveles a las 72 h, muy pronunciada en el caso de TNF- α .

La necesidad de la integridad de la molécula del CF para ejercer su actividad biológica se reflejó en el hecho de que los distintos tipos estructurales de ácidos micólicos por sí solos fueron incapaces de inducir la síntesis de IL-6 en células RAW 264.7.

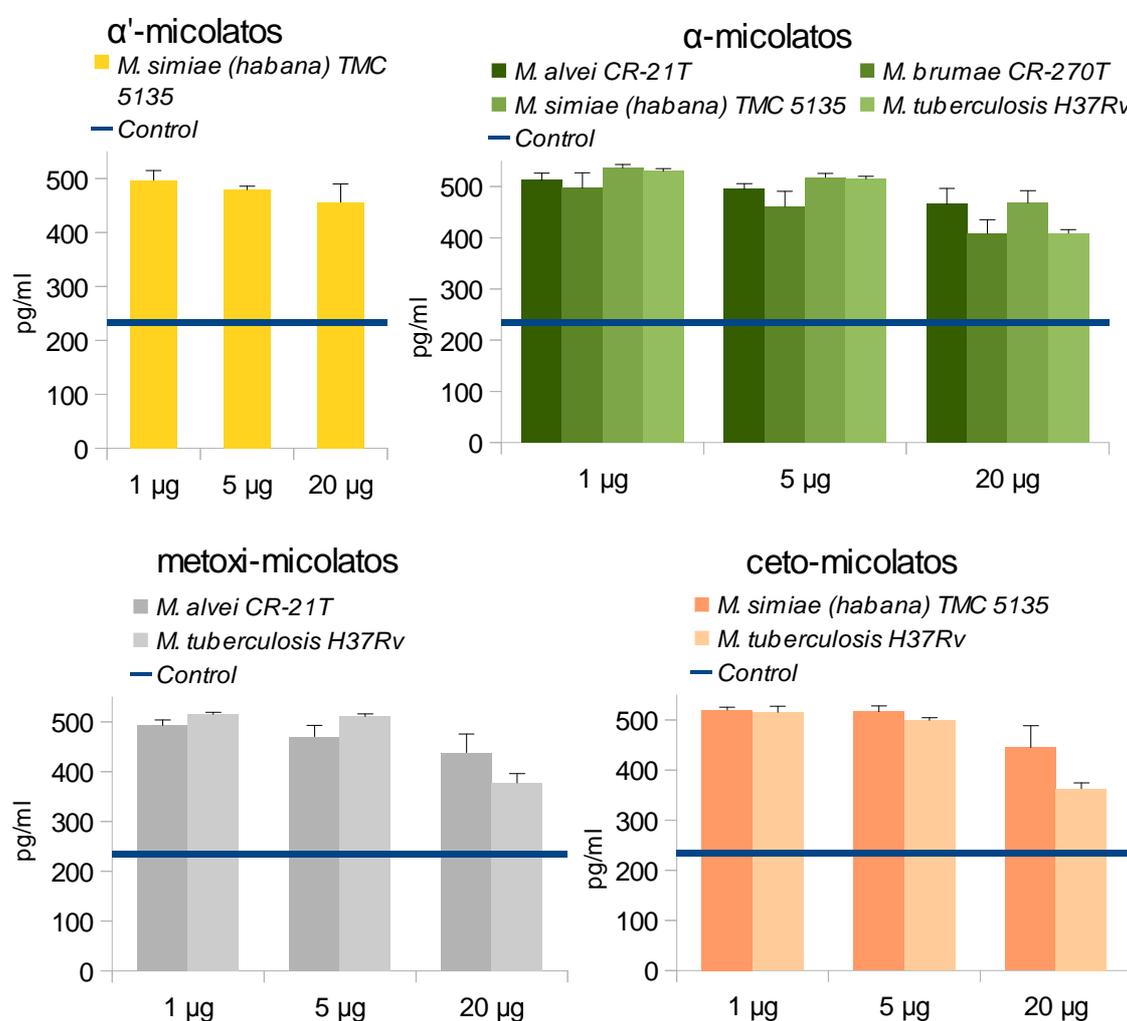


Figura 42. Inducción de TNF- α en células RAW 264.7 por parte de diversos tipos de ácidos micólicos libres (R-COOH), a dosis de 1 μg , 5 μg y 20 μg . La línea horizontal indica el valor del control.

De forma análoga, la capacidad de inducción de TNF- α se vio marcadamente afectada, tanto en su forma libre (Figura 42) como en su forma de ésteres metílicos (Figuras 43), produciéndose, en general, una respuesta muy homogénea, en línea con lo obtenido para la molécula completa (Figuras 41).

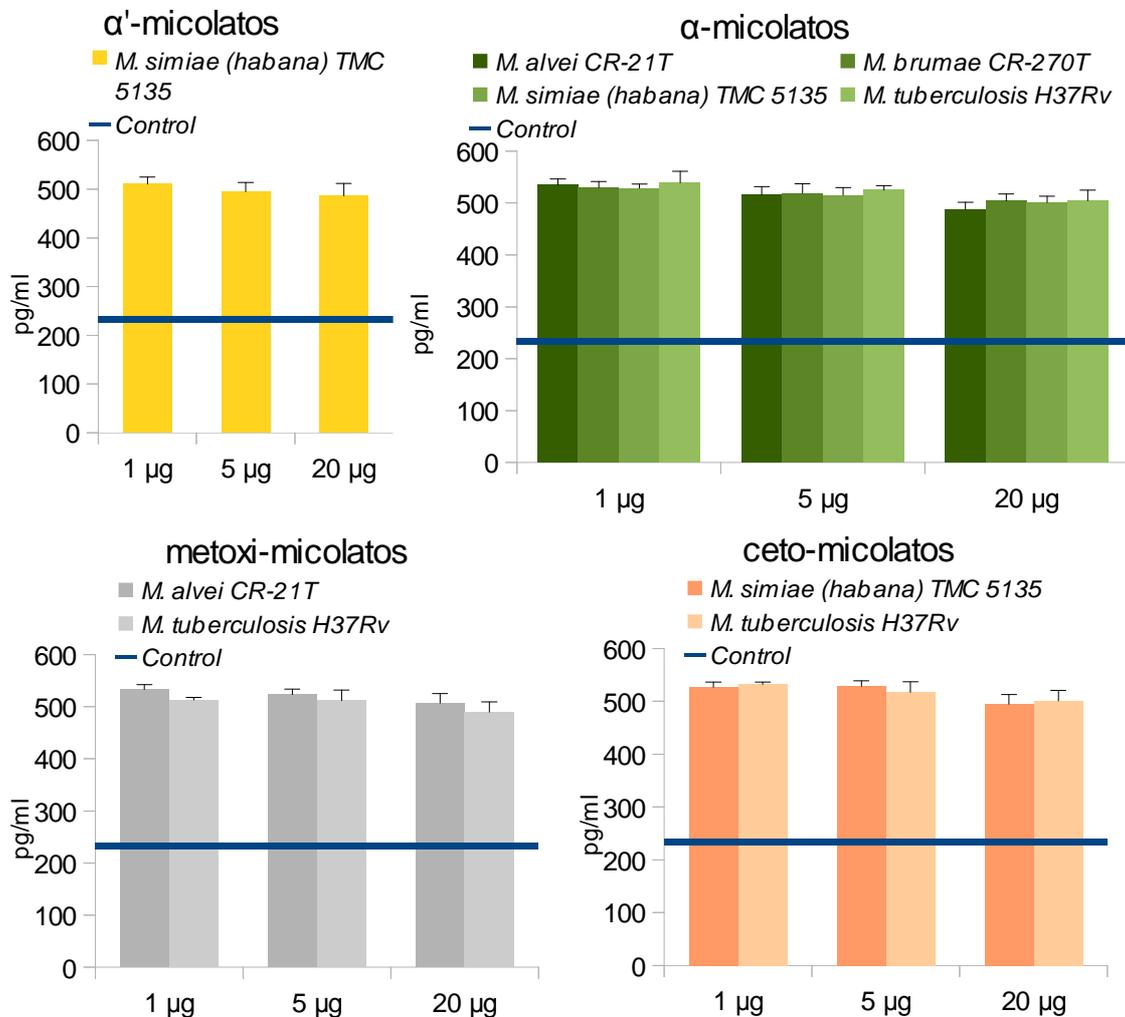


Figura 43. Inducción de TNF- α en células RAW 264.7 por parte de diversos tipos de ácidos micólicos en forma de ésteres metílicos (R-COOCH₃), a dosis de 1 μ g, 5 μ g y 20 μ g. La línea horizontal indica el valor del control.

Estudio de la actividad biológica en la línea celular THP-1

Inducción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF- α por parte del ‘cord factor’ de diversas micobacterias

Los distintos CFs estudiados fueron capaces de inducir la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF- α (Figura 44), relacionándose este resultado con la interacción directa (fagocitosis) de las células THP-1 con las microbolas control (Figura 45 a) o impregnadas con CF (Figura 45 b). Los mayores niveles de inducción de IL-1 β y TNF- α correspondieron a los CFs de las distintas micobacterias atípicas analizadas, mientras que los niveles más altos de IL-6, IL-12p40 e IL-23 fueron producidos por el CF de *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 44).

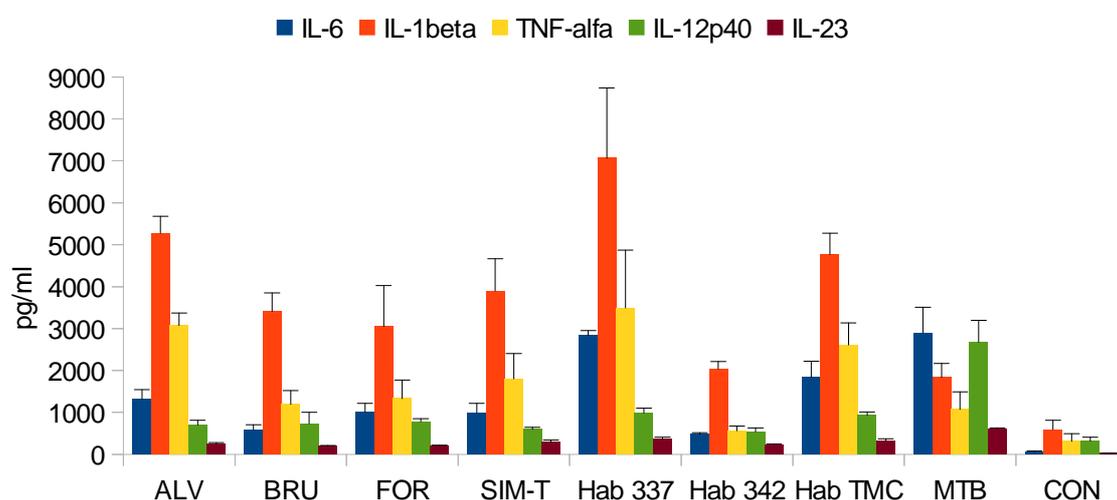


Figura 44. Inducción de diversas citoquinas en células THP-1 (48 h, 37 °C) por parte del CF (impregnado en microbolas) de distintas micobacterias. Los valores representan la media \pm desviación típica de tres experimentos independientes. IL-1 β , IL-6 y TNF- α se determinaron mediante citometría de flujo e IL-12p40 e IL-23 mediante ELISA. ALV) *M. alvei* CR-21^T, BRU) *M. brumae* CR-270^T, FOR) *M. fortuitum* AC1, SIM-T) *M. simiae* ATCC 25275^T, Hab 337) *M. simiae* (*habana*) IPK-337, Hab 342) *M. simiae* (*habana*) IPK-342, Hab TMC) *M. simiae* (*habana*) TMC 5135, MTB) *M. tuberculosis* H37Rv, CON) Control.

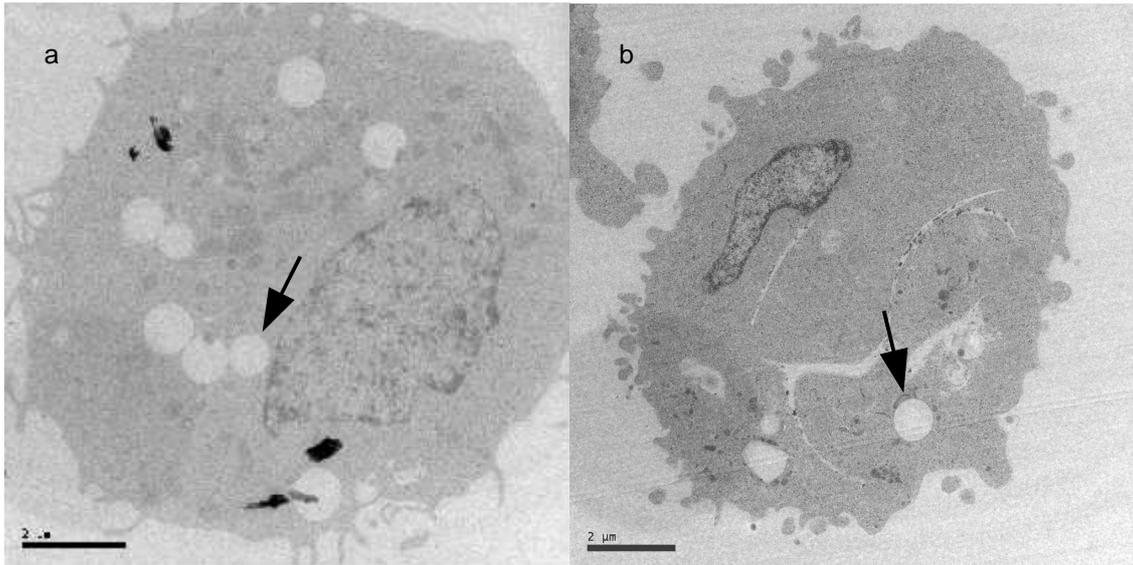


Figura 45. Microscopía electrónica de células THP-1 mostrando la fagocitosis de microbolas (flechas): a) microbolas control, b) microbolas impregnadas con el CF de *M. simiae* (*habana*) TMC 5135.

El análisis estadístico realizado arrojó diferencias significativas entre diferentes cepas; sin embargo, este resultado no se consideró relevante, al comprobar que las microbolas no se habían impregnado con cantidades equivalentes de CF (Figura 46).

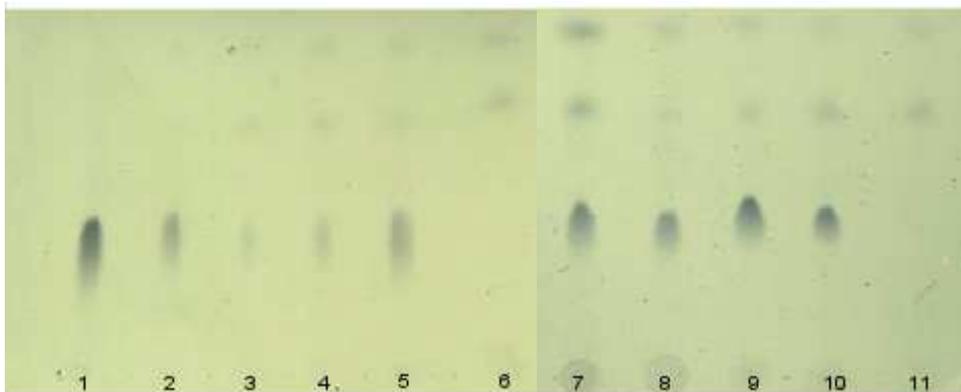


Figura 46. CCF del CF extraído de las microbolas tras el proceso de impregnación. 1) CF control, 2) *M. simiae* (*habana*) TMC 5135, 3) *M. simiae* ATCC 25275^T, 4) *M. simiae* (*habana*) IPK-342, 5) *M. simiae* (*habana*) IPK-337, 6) Medio de cultivo con microbolas sin impregnar de CF, 7) *M. alvei* CR-21^T, 8) *M. brumae* CR-270^T, 9) *M. fortuitum* AC1 10) *M. tuberculosis* H37Rv y 11) Medio de cultivo.

Pareció, pues, más conveniente expresar los resultados como producción relativa de las distintas citoquinas en cada una de las cepas incluidas en el análisis, generándose un patrón global (Figura 47) susceptible de una mejor comparación.

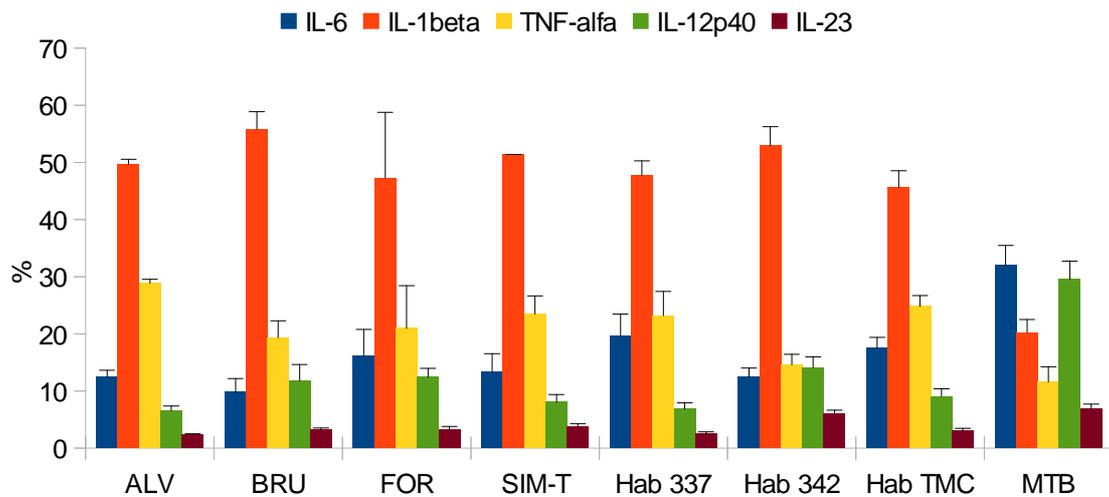


Figura 47. Inducción de diversas citoquinas (producción relativa: %) tras la estimulación de células THP-1 por parte del CF de: ALV) *M. alvei* CR-21^T, BRU) *M. brumae* CR-270^T, FOR) *M. fortuitum* AC1, SIM-T) *M. simiae* ATCC 25275^T, Hab 337) *M. simiae* (*habana*) IPK-337, Hab 342) *M. simiae* (*habana*) IPK-342, Hab TMC) *M. simiae* (*habana*) TMC 5135, MTB) *M. tuberculosis* H37Rv. Los resultados se expresan como media \pm desviación típica de tres experimentos independientes.

Así, *M. alvei* CR-21^T, *M. brumae* CR-270^T, *M. fortuitum* AC1, *M. simiae* ATCC 25275^T, *M. simiae* (*habana*) IPK-337, *M. simiae* (*habana*) IPK-342 y *M. simiae* (*habana*) TMC 5135 muestran un patrón en donde la inducción de IL-1 β y TNF- α es mayoritaria, separándose claramente del patrón de *M. tuberculosis* H37Rv, en donde predominan IL-6 e IL-12p40 (Figura 48).

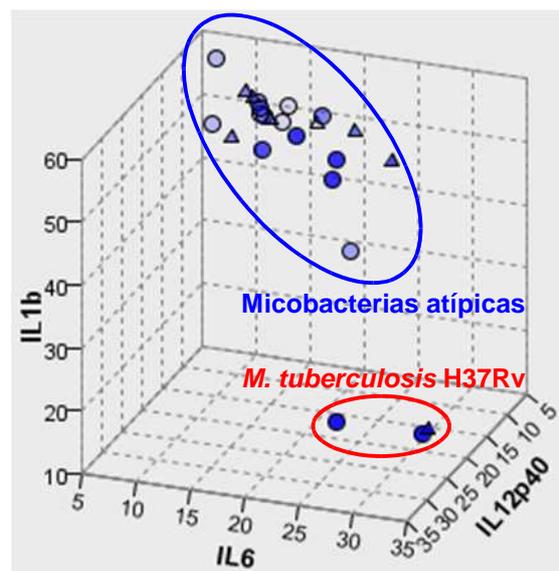


Figura 48. Clasificación (vecino más próximo, SPSS 17.0) de las cepas estudiadas en función de la producción relativa de diversas citoquinas. Se incluyen los tres ensayos realizados por cepa.

En un análisis estadístico global (ANOVA), *M. tuberculosis* H37Rv se diferenció del resto de cepas en la inducción relativa de IL-6 ($P \leq 0.004$) e IL-12p40 ($P < 0.0005$); en las demás citoquinas las diferencias no fueron tan uniformes como las citadas. Al considerar únicamente las cepas de *M. simiae*, se constató que IPK-342 difirió del resto en TNF- α ($P \leq 0.045$), IL-1 β ($P \leq 0.009$), IL-12p40 ($P \leq 0.019$) e IL-23 ($P \leq 0.003$). Añadiendo a este análisis *M. tuberculosis* H37Rv, se mantuvieron las diferencias arriba indicadas en el análisis global, ampliándose éstas a IL-1 β ($P < 0.0005$). Del análisis estadístico en donde se consideraron todas las micobacterias atípicas, sólo hay que reseñar diferencias puntuales entre algunas de las cepas y la separación de IPK-342 del resto en cuanto a la producción relativa de IL-23 ($P < 0.0005$).

Aunque las distintas cepas se agruparon en dos patrones principales, al relacionar la producción relativa de las citoquinas con sus controles respectivos (Figura 49), se observó que tanto IL-6 como IL-23 eran las moléculas que más veces se activaron sobre el control, lo que podría indicar que el CF por sí solo es capaz de inducir la secreción de ambos compuestos, no afectando demasiado la adición de INF- γ , al contrario de lo que pareció suceder con IL-1 β , IL-12p40 y TNF- α .

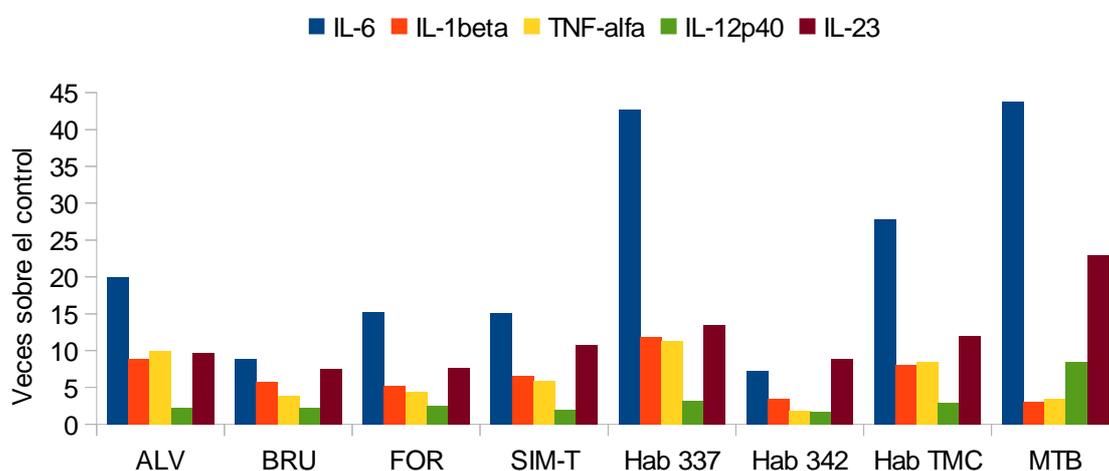


Figura 49. Inducción (veces sobre el control) de diversas citoquinas en células THP-1 por parte del CF de diversas micobacterias. ALV) *M. alvei* CR-21^T, BRU) *M. brumae* CR-270^T, FOR) *M. fortuitum* AC1, SIM-T) *M. simiae* ATCC 25275^T, Hab 337) *M. simiae* (habana) IPK-337, Hab 342) *M. simiae* (habana) IPK-342, Hab TMC) *M. simiae* (habana) TMC 5135, MTB) *M. tuberculosis* H37Rv.

Por otra parte, al comparar la producción relativa de las citoquinas analizadas con la estructura fina de los ácidos micólicos del CF, y, más concretamente, con la conformación de sus instauraciones (ciclopropanos e instauraciones), se constató una relación inversa entre el

cociente *trans/cis* (Tabla 7) y la inducción de IL-6, IL-12p40 e IL-23 (Figura 50 a). Esa misma relación fue directa para IL-1 β y TNF- α (Figura 50 b).

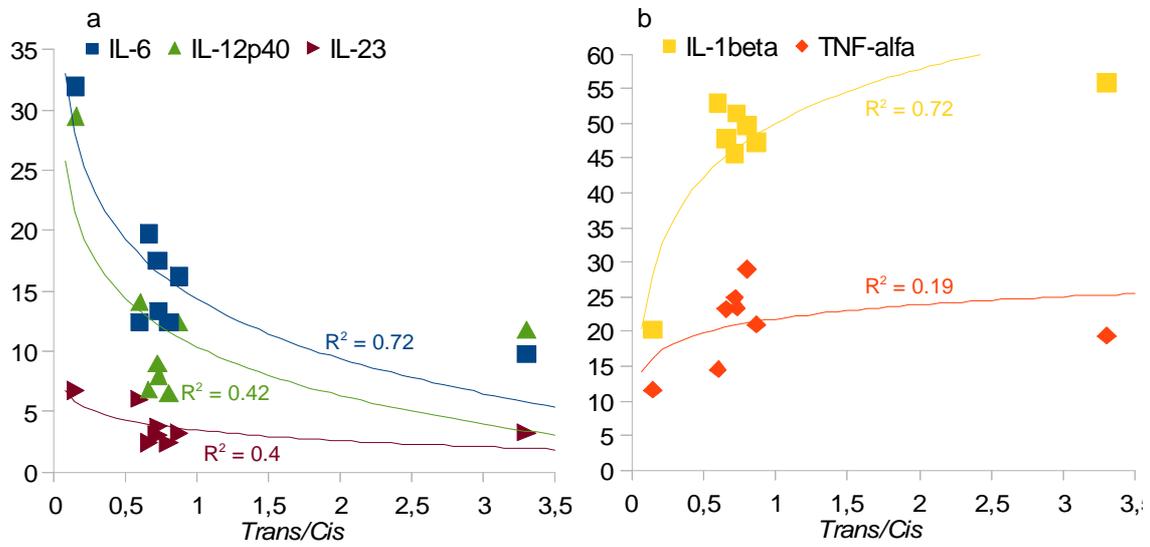
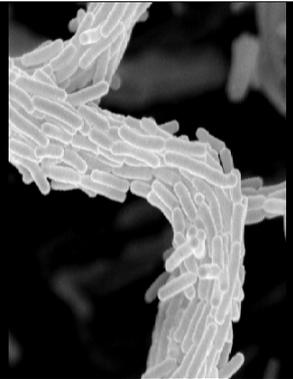


Figura 50. Relación entre la producción relativa (%) de diversas citoquinas y la conformación (cociente *trans/cis*) de las insaturaciones (ciclopropanos o dobles enlaces) de los ácidos micólicos del CF.

DISCUSIÓN



El interés científico por el CF viene desde su descubrimiento por Bloch y, específicamente, desde su determinación como sustancia tóxica en *M. tuberculosis* (Bloch, 1950). En la actualidad, ese interés se ha renovado, no sólo por las evidencias de su participación en la patogénesis de la tuberculosis (Hunter y cols., 2009), sino también por su capacidad adyuvante, al asociarse con cierto éxito a posibles vacunas proteicas frente a la tuberculosis (Khader y cols., 2007; Lima y cols., 2001; Werninghaus y cols., 2009), algunas de las cuales se encuentran en fase experimental (Kaufmann, 2011). Además, estudios recientes demuestran que el CF es reconocido por al menos dos receptores distintos de células presentadoras de antígenos, como son, MARCO (receptor de estructura relacionada con el colágeno, presente en macrófagos) (Bowdish y cols., 2009) y Mincle (receptor tipo lectina-C) (Ishikawa y cols., 2009; Schoenen y cols., 2010). Por otra parte, diversas evidencias moleculares indican que la capacidad inmunomoduladora del CF de *M. tuberculosis* está ligada a sus componentes lipídicos (ácidos micólicos: α , metoxi, ceto) (Dao y cols., 2008; Rao y cols., 2005, 2006), cuyas instauraciones aparecen, mayoritariamente, como *cis*-ciclopropanos (Minnikin, 1982; Watanabe y cols., 2001).

Los datos obtenidos en este trabajo revelan la existencia de CF en todas las cepas analizadas y muestran que las distintas especies se diferencian entre sí por los detalles específicos de la estructura fina de los ácidos micólicos. La identificación estructural se llevó a cabo mediante técnicas combinadas de RMN y espectrometría de masas y su patrón estructural responde, sin ambigüedad, al de una 6,6'-di-*O*-micoloil trehalosa, similar a la de *M. tuberculosis* (Noll y cols., 1956) y otros miembros del suborden *Corynebacterineae* (Niescher y cols., 2006; Nishizawa y cols., 2007). No obstante, los resultados iniciales obtenidos con el CF de *M. simiae* fueron un tanto sorprendentes, debido al solapamiento de las señales H-5/H-5' y H-6b/H6'b en TMC 5135 y en IPK-220, contrariamente a lo encontrado en ATCC 25275^T, IPK-337 e IPK-342. Los análisis sugieren, sin embargo, que este solapamiento se explica por un efecto solvente y no por modificaciones en la configuración de los centros quirales de los carbonos C2 y C3 de los ácidos micólicos. Hasta ahora, los ácidos micólicos analizados son C2*R*, C3*R* (Quémard y cols., 1997) y los datos obtenidos en el ¹H-RMN con deuteropiridina confirman que los presentes en el CF de TMC 5135 poseen la misma configuración. Sin embargo, dado que el CF es en realidad una mezcla natural de

numerosos homólogos estructurales (en donde destacan α -micolatos impares y ceto-micolatos de cadena larga) no es de descartar que el posible plegamiento en W (Villeneuve y cols., 2007, 2010) de estos compuestos pueda influir en los resultados de la ^1H -RMN.

La composición lipídica del CF de *M. simiae* fue similar en todas las cepas de la especie, caracterizándose por la presencia de α' -, α - y ceto-micolatos, siendo posibles seis combinaciones básicas de ácidos micólicos en este glicolípido; sin embargo, y debido a la variación en la longitud de cadena de estos lípidos, son posibles numerosas especies moleculares distintas, tal y como se ha descrito en el CF de diferentes especies de *Mycobacterium* (Fujita y cols., 2005). Como se ha citado, TMC 5135 presentó una combinación específica en sus α -micolatos, en la que abundan los de serie impar (que combina un anillo *cis*-ciclopropano con otro *trans*-ciclopropano), contrariamente al resto de cepas de *M. simiae*, en donde prevalece la serie par que contiene dos anillos *cis*-ciclopropano. Los ácidos micólicos del CF y los de la pared celular (células deslipidadas) fueron similares, aunque en estos últimos se mantienen –de manera más acusada– la diferencias entre TMC 5135 y el resto de cepas de *M. simiae*, algo que ya se observó en estudios previos de la estructura de los ácidos micólicos de esta especie (Mederos y cols., 2007). Variaciones en la estructura fina de los micolatos dentro de una misma especie de *Mycobacterium* se han descrito también por otros autores (Minnikin, 1982; Watanabe et al., 2001, 2002), aunque su significado biológico está por determinar. Es de destacar, así mismo, que en todas las cepas de *M. simiae* la longitud de cadena de los ácidos α -micólicos mayoritarios es similar a la de los ceto-micolatos, algo poco común en micobacterias, dado que los ácidos micólicos oxigenados suelen presentar unos 4C-6C adicionales en su estructura (Minnikin, 1982; Watanabe et al., 2001). Esto induce a pensar que los precursores de la síntesis de α - y ceto-micolatos en *M. simiae* serían idénticos, contrariamente a los que sucede en otras micobacterias. Además, debe existir alguna particularidad enzimática en la cepa TMC 5135 que la lleve a combinar, mayoritariamente, anillos ciclopropanos *cis* y *trans* en los α -micolatos. Estas peculiaridades estructurales no se reflejan, sin embargo, en la actividad biológica global del CF de TMC 5135, ya que, en general, puede considerarse similar a la del CF de otras micobacterias atípicas incluidas en este trabajo.

Mycobacterium simiae es la única micobacteria no tuberculosa analizada que contiene ciclopropanos en sus ácidos micólicos, lo que la aproxima a *M. tuberculosis*; sin embargo, la conformación global de estos grupos estructurales es diferente en ambas especies. En *M. alvei*, *M. brumae* y *M. fortuitum* las instauraciones son, exclusivamente, dobles enlaces *cis* y *trans*, destacando el hecho de que la longitud de cadena de los ácidos micólicos es inferior a la de *M. simiae*. No obstante, *M. alvei* y *M. fortuitum* tienen valores similares a *M. simiae* en la relación *trans/cis* de las instauraciones, pero difieren de *M. brumae*, lo que en conjunto puede justificar algunos de los resultados obtenidos en el análisis de la actividad biológica del CF, sobre todo los determinados en la línea celular THP-1.

Los distintos CFs ensayados fueron capaces de estimular la secreción de las citoquinas estudiadas en las líneas celulares RAW 264.7 (IL-1 β y TNF- α) y THP-1 (IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF- α), distinguiéndose en esta última dos patrones bien claros, uno correspondiente a micobacterias atípicas (con niveles mayoritarios de IL-1 β y TNF- α) y otro a *M. tuberculosis* H37Rv (con niveles mayoritarios de IL-6 e IL-12p40). Este hallazgo podría atribuirse a las diferencias globales que se observan en la estructura fina de los ácidos micólicos de *M. tuberculosis* y del resto de las especies consideradas. No obstante, cada uno de los CFs estudiados constituye un conjunto de moléculas homólogas, por lo que no puede descartarse que algunos grupos funcionales actúen como inhibidores o activadores de la estimulación de una u otra citoquina, y que lo que observamos sea, en realidad, un resultado promedio de los efectos particulares de las distintas combinaciones de los ácidos micólicos en la molécula. Así, por ejemplo, las distintas cepas de *M. simiae* muestran la misma capacidad de estimulación del TNF- α en células RAW 264.7, a la vez que TMC 5135 es similar a *M. alvei*, *M. brumae* y *M. tuberculosis* H37Rv en los análisis de dosis-respuesta de esta citoquina, aún cuando sus ácidos micólicos sean claramente diferentes. Por otro lado, *M. simiae* TMC 5135 es capaz de estimular IL-6 en la misma medida que *M. brumae* en la línea celular RAW 264.7; en este contexto, ambas superan a *M. alvei*, pero están significativamente por debajo de *M. tuberculosis* H37Rv.

La influencia de determinados grupos funcionales de los ácidos micólicos del CF sobre la capacidad de inducción de diversas citoquinas en macrófagos, ha sido estudiada

en *M. tuberculosis* mediante técnicas de biología molecular. Así, mutantes en *pcaA* (carentes del *cis*-ciclopropano proximal en α -micolatos) se ven alterados en la capacidad de estimulación de IL-6 y, sobre todo, de TNF- α (Rao y cols., 2005); estos datos sugieren que la presencia de dobles enlaces proximales en los α -micolatos afecta negativamente a los niveles de secreción de ambas citoquinas. Por otra parte, estudios con mutantes en *mmaA4* [gen implicado en la biosíntesis de ácidos micólicos oxigenados (Takayama et al., 2005)] indican que ceto- y metoxi-micolatos actuarían como inhibidores de TNF- α e IL-12p40 (Dao y cols., 2008). La influencia sobre TNF- α es incluso más refinada, ya que los niveles de inducción de esta citoquina aumentan en mutantes *cmaA2* (Rao y cols., 2006), un gen responsable de la formación de *trans*-ciclopropanos en ácidos micólicos oxigenados (Takayama y cols., 2005). Se ha publicado, además, que el CF de micobacterias no patógenas presenta la capacidad de inducir granulomas (Fujita y cols., 2007); en general, esta actividad sería dependiente de TNF- α (Takimoto y cols., 2006; Welsh y cols., 2008) y estaría conectada con la longitud de cadena de los ácidos α -micólicos (Fujita y cols., 2007), compuestos que también influirían en la toxicidad de la molécula. Por otra parte, el contenido en metoxi-micolatos del CF de diversas cepas de *M. bovis* BCG influye en la capacidad de estimulación de TNF- α y varias interleuquinas (Hayashi y cols., 2009). La presencia de ciclopropanos y funciones oxigenadas en los ácidos micólicos parece tener un gran impacto en su actividad biológica (Glickman y cols., 2000; Rao y cols., 2005, 2006; Bhatt y cols., 2007; Dao y cols., 2008; Dubnau y cols., 2000), habiéndose demostrado que mutantes de *M. tuberculosis* carentes de ciclopropanos son hiperinflamatorios en ratones (Barkan y cols., 2012) y producen niveles elevados de TNF- α y, en parte, IL-1 β .

Los ácidos micólicos ‘per se’ son capaces de estimular la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12 (Korf y cols., 2005), provocando inflamación (Vander y cols., 2011), siendo los metoxi-micolatos con *cis*-ciclopropanos los más potentes. Los ceto-micolatos se consideran anti-inflamatorios y los α -micolatos se califican como inertes (Vander y cols., 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el CF de *M. brumae* (con sólo α -micolatos) es capaz de estimular la secreción de todas las citoquinas estudiadas y, por otra parte, los mutantes *mmaA4* de *M. tuberculosis* inducen altos niveles de TNF- α e IL-12p40 (Dao y cols., 2008), por lo que la aparente falta de actividad de los α -

micolatos podría circunscribirse a su incapacidad de inducir la transformación de macrófagos a macrófagos espumosos en el granuloma (Korf y cols., 2005; Peyron y cols., 2008). Se sabe, así mismo, que los ácidos micólicos de *Mycobacterium* son reconocidos por un subgrupo de linfocitos T cuando son presentados en el contexto de moléculas CD1 (Beckman y cols., 1994), contribuyendo de manera significativa a la inmunología de la tuberculosis (Montamat-Sicotte y cols., 2011).

Los ácidos micólicos de la envoltura celular interaccionan con el sistema inmune de forma variada y compleja a través de mecanismos no bien conocidos en la actualidad, aunque se ha demostrado que en el caso concreto del CF intervienen tanto la parte polar (trehalosa) como la lipídica (Bowdish y cols., 2009; Ishikawa y cols., 2009; Ozeki y cols., 2006; Werninghaus y cols., 2009). Como se ha citado, diversos grupos funcionales influyen de manera diferente en la estimulación de distintas citoquinas, por lo que las peculiaridades estructurales de los ácidos micólicos son importantes en los mecanismos de reconocimiento de este glicolípido, cuya estructura completa es necesaria para una óptima actividad biológica, tal y como se ha mostrado en este trabajo, tanto para IL-6 como para TNF- α . Los resultados obtenidos con las células THP-1 inducen a pensar que lo que realmente podría determinar la capacidad de inducción de una determinada citoquina es la relación *trans/cis* en la conformación estructural de las insaturaciones de los ácidos micólicos del CF. El que esas insaturaciones tengan una conformación u otra influye significativamente en el plegamiento en W de los ácidos micólicos (Villeneuve y cols., 2007, 2010) y, probablemente, en la interacción de esta molécula con sus receptores en células presentadoras de antígenos. En macrófagos y células dendríticas, el receptor MinCLE parece esencial (Ishikawa y cols., 2009; Schoenen y cols., 2010), aunque la ausencia de este receptor en ratones manipulados genéticamente no impide establecer una respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* (Heitmann y cols., 2012). El receptor MARCO también interviene en macrófagos (Bowdish y cols., 2009), a lo que parece presentando el CF a CD-14/TLR2, por lo que la participación de estas proteínas justificaría la importancia de los ácidos micólicos en el reconocimiento del glicolípido y en la fina regulación que debe tener este proceso.

Las distintas citoquinas estudiadas juegan un importante papel en la inmunología de la tuberculosis. En general, IL-12p40 favorece la respuesta Th1 y la resistencia a infección (Cooper y Khader, 2008), pero el papel de IL-6 es controvertido, ya que en algunas ocasiones se ha calificado de patológica, por ayudar a mantener el granuloma (Welsh y cols., 2008), y en otras se ha considerado como beneficiosa (Méndez-Samperio, 2010), en parte por su influencia sobre las células Th-17, un grupo de linfocitos que segregan IL-17, una interleucina importante en la organización del granuloma (Torrado y Cooper, 2010). TNF- α , entre otras funciones, es crítico para el inicio de la formación del granuloma y la activación de los macrófagos (Russell, 2007), siendo críticos sus niveles: la nula secreción de esta citoquina genera granulomas desestructurados y afecta a la co-localización de linfocitos y macrófagos (Flynn y cols., 1995, Bean y cols., 1999), mientras que la hipersecreción causa inflamación destructiva (Bekker y cols., 2000). IL-1 β participaría tanto en la respuesta innata como en la adaptativa (Korbel y cols., 2008), aunque para algunos autores su función en la respuesta frente a la tuberculosis no está bien definida (Guller y cols., 2011; Shiratsuchi y cols., 1991), si bien podría influir en la inducción de IL-12p40. Por otra parte, IL-23 regula la producción de IL-17 y promueve la aparición de células de memoria en el momento inicial de la infección (Khader y cols., 2007), pero puede tener efectos nocivos cuando la enfermedad ya está establecida (Cruz y cols., 2010). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los mecanismos que intervienen en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* son mucho más complejos y no conocidos en profundidad (Torrado y Cooper, 2011), y que las relaciones celulares que en ellos operan deben estar sujetas a balances temporales y espaciales de numerosas citoquinas y de otras moléculas inmunomoduladoras (Cooper, 2009; Dorhoi y cols., 2011).

Una aproximación inicial al análisis de la actividad biológica del CF de *M. simiae (habana)* TMC 5135 se realizó estudiando la capacidad de inducción de TNF- α , en un intento por explicar parte de la inmunogenicidad atribuida a esta cepa (Mederos y cols., 2006) en tuberculosis (Gupta y cols., 1979) y lepra (Singh y cols., 1989, 1997) experimentales. Los resultados obtenidos no permiten, sin embargo, dar ningún significado especial al CF de este microorganismo, aún a pesar de las peculiaridades de su estructura, ya que otras cepas de la especie inducen niveles similares de TNF- α .

Además, como se ha citado más arriba, en el estudio dosis-respuesta (RAW 264.7), TMC 5135 mostró el mismo comportamiento que otras micobacterias atípicas, aunque sí se observaron algunas diferencias en relación con la estimulación de IL-6. El abanico de inducción de citoquinas se amplía a IL-1 β , IL-12p40 e IL-23 cuando se usan células THP-1, por lo que podría afirmarse que el CF sí podría tener un papel global en la inmunogenicidad de TMC 5135. Diversos antígenos proteicos de TMC 5135 tendrían también esta propiedad, al ser capaces de inducir IL-2, IL-12 e INF- γ en macrófagos de ratones (Divya Jyothi y cols., 2000).

La inducción de TNF- α por parte de los distintos CFs ensayados puede considerarse muy estable, teniendo en cuenta los datos del estudio dosis-respuesta (RAW 264.7), aunque este resultado no debe interpretarse como una falta de relación entre la estructura fina de los ácidos micólicos y la estimulación de esta citoquina (ver más arriba). Los datos indicarían, más bien, que a la dosis de 1 μ g se alcanzan los niveles máximos de activación y que, posiblemente, podrían encontrarse diferencias a dosis menos elevadas. Por otra parte, cuando se emplean células THP-1, aparecen los dos patrones diferenciados ya comentados, correspondiendo los niveles más altos a los CFs de micobacterias atípicas. La ruta de activación de TNF- α en macrófagos pasa por NF- κ B (Sato y cols., 1998), al igual que la de otras citoquinas, y sería la interacción del CF con su receptor celular la que marcaría, a través de toda una cascada de señales, el resultado cuantitativo de la estimulación. Ha de reseñarse, en este punto, que MARCO no está presente en RAW 264.7, por lo que parte de las diferencias encontradas con THP-1 pudieran deberse a este hecho. IL-1 β es, junto a TNF- α , la citoquina inducida en mayores niveles por los CFs de micobacterias atípicas en THP-1. La ausencia de estimulación de IL-1 β en RAW 264.7 se debe atribuir al propio CF, puesto que diversos polisacáridos son capaces de inducirla en esta línea celular (Adams y Czuprynski, 1994). Recientemente se ha publicado que IL-1 β se estimula a través de Nlcr3 (Schwenker y cols., 2012), tras interaccionar el dibehenato de trehalosa (un análogo sintético del CF) con el receptor Mincl. Nlcr3 forma parte de un complejo de proteínas citoplasmáticas (inflammasomas) implicadas en la maduración y secreción de IL-1 β e IL-18 (Franchi y cols., 2012). Las diferencias de estimulación de IL-1 β entre *M. tuberculosis* H37Rv y micobacterias atípicas podrían fundamentarse, en parte, en la interacción con Nlcr3, aunque, en general, en estos procesos también parece intervenir

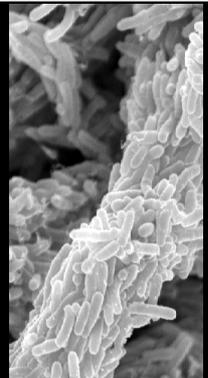
NF- κ B tras ser activado por otros posibles receptores (Franchi y cols., 2012). Hay que tener en cuenta, además, que la inducción de determinadas citoquinas puede influir sobre otras, como es el caso de TNF- α y/o IL-1 β sobre IL-6 (Kishimoto, 2005).

IL-6 es una de las citoquinas mayoritariamente estimuladas por *M. tuberculosis* en THP-1. Por otra parte, el CF de esta cepa presenta -al igual que *M. alvei*, *M. brumae* y *M. simiae* (*habana*) TMC 5135- una clara relación dosis-respuesta en RAW 264.7. En este último estudio, parecería que la presencia de un grupo metoxi en el extremo de la cadena (*M. alvei*) tuviera un efecto inhibitorio sobre la estimulación de IL-6, algo que, sin embargo, no se observa en THP-1. También es sorprendente que *M. brumae* y *M. simiae* (*habana*) TMC 5135 muestren la misma tendencia en la inducción de IL-6; no obstante, habría que considerar lo que se apuntó más arriba sobre el efecto neto de inducción que tendrían algunos grupos funcionales presentes en los ácidos micólicos y, específicamente, los *trans*-ciclopropanos (abundantes en *M. simiae*). En algunos estudios, IL-6 aparece como inhibidora de la activación de macrófagos (Wallis y cols., 1994), de la fusión fagosoma-lisosoma y de la formación del autofagosoma (Dutta y cols., 2012), efectos todos ellos inducidos por INF- γ , lo que favorecería el desarrollo de *M. tuberculosis* y vendría a destacar el hecho de que IL-6 sea activada significativamente por el CF de H37Rv. Sin embargo, Singh y cols. (2011) apuntan que IL-6 (junto a IL-1 y TNF- α) es necesaria para provocar una respuesta duradera de células Th1, a la vez que induce la aparición de linfocitos T de memoria, tanto CD4 como CD8. En el patrón de estimulación de citoquinas en células THP-1 por parte del CF de *M. tuberculosis* H37Rv también destaca IL-12p40, un hallazgo que no parece encajar con los resultados publicados por Dao y cols. (2008) en el mutante *mmaA4* de *M. tuberculosis*. Sin embargo, hay que reseñar que tanto Dao y cols. (2008) como Rao y cols. (2005, 2006) no dan datos de la estructura fina del CF por lo que sólo se pueden hacer conjeturas teóricas sobre la composición de las cepas analizadas. En teoría, el mutante *mmaA4* -que carece de funciones oxigenadas- tendría ácidos micólicos insaturados, con dobles enlaces y ciclopropanos en -principalmente- configuración *cis*, una combinación que es capaz de estimular altos niveles de TNF- α (Dao y cols., 2008). Curiosamente, la ausencia de ciclopropanos en los ácidos micólicos de la pared celular también se traduce en una capacidad elevada de inducción de TNF- α e IL-1 β (Barkan y cols., 2012), pero la ausencia conjunta de ciclopropanos y de funciones oxigenadas lleva

a una disminución de la secreción de esta citoquina (Barkan y cols., 2012). IL-12p40 es una citoquina esencial para la migración de células dendríticas tras la infección por *M. tuberculosis* (Henry y cols., 2008), por lo podríamos especular que la baja producción de las micobacterias atípicas, se correspondería con su menor patogenia, ya que los macrófagos podrían ser capaces de eliminar estos microorganismos sin necesidad del apoyo de las células dendríticas. IL-12p40 es una molécula efectora que aparece en distintas formas en el sistema inmune, tales como IL-12p70, IL-12p80 e IL-23 (Méndez-Samperio, 2010). Esta última es un dímero con una subunidad adicional de 19 kDa, por lo que resulta lógico que los resultados obtenidos sean paralelos para las dos interleucinas. En un estudio reciente de Khader y cols. (2011) se demuestra que IL-23 es indispensable para el control a largo plazo de la infección producida por *M. tuberculosis*; no obstante, altos niveles de IL-23 también se han relacionado con un incremento en las consecuencias patológicas de la tuberculosis (Cruz y cols., 2010).

El CF controla, en parte, la virulencia de *M. tuberculosis* a través de sus ácidos micólicos oxigenados (Dao y cols., 2008), los *trans*-ciclopropanos en ceto- y metoximicolatos (Rao y cols., 2006) y los *cis*-ciclopropanos de los ácidos α -micólicos (Rao y cols., 2005). Las micobacterias atípicas estudiadas carecen, en general, de los rasgos estructurales de los ácidos micólicos del CF de *M. tuberculosis* y su patrón de inducción de citoquinas es distinto al de la cepa H37Rv de esta especie. No obstante, es difícil extrapolar este hallazgo al caso específico de la inmunología de la tuberculosis, aunque los resultados obtenidos sí podrían ser de interés en la consideración del poder adyuvante del CF de micobacterias atípicas, y es aquí donde pueden abrirse perspectivas futuras para nuevas investigaciones.

CONCLUSIONES



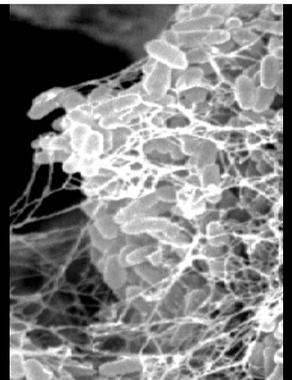
1. Las distintas especies estudiadas contienen cord factor, diferenciándose entre sí y del cord factor de *M. tuberculosis* H37Rv en la estructura fina de sus ácidos micólicos. La cepa TMC 5135 de *M. simiae* –catalogada como inmunogénica en tuberculosis y lepra experimentales- se distingue, además, del resto de cepas de la especie citada por su elevado contenido en ácidos α -micólicos de cadena impar.

2. Todos los cord factors analizados fueron capaces de estimular la secreción de IL-6 y TNF- α en la línea celular RAW 264.7, requiriéndose la estructura completa de este glicolípido para una inducción óptima de ambas citoquinas. El cord factor de *M. tuberculosis* H37Rv difiere del cord factor de diversas micobacterias atípicas en la capacidad de inducción de IL-6.

3. Todos los cord factors analizados fueron capaces de estimular la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF- α en la línea celular THP-1, diferenciándose claramente el perfil correspondiente a micobacterias atípicas del perfil de *M. tuberculosis* H37Rv. No se obtuvieron diferencias significativas entre *M. simiae* TMC 5135 y el resto de cepas de esta especie incluidas en el presente estudio, aún a pesar de las peculiaridades estructurales detectadas en su cord factor.

4. Los perfiles de inducción de las citoquinas estudiadas se relacionan, en cierta medida, con la estructura fina de los ácidos micólicos del cord factor y, en concreto, con la configuración de las instauraciones. Así, los cord factors de micobacterias atípicas (cociente *trans/cis* ≥ 0.5) estimulan, especialmente, IL-1 β y TNF- α , mientras que el cord factor de *M. tuberculosis* H37Rv (cociente *trans/cis* ≤ 0.5) induce, preferentemente, IL-6, IL-12p40 e IL-23. Este resultado sugiere que el cord factor de micobacterias atípicas puede tener valor como adyuvante.

BIBLIOGRAFÍA



- Adams, J.L., Czuprynski, C.J.** 1994. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Microb. Pathog.* 16, 401-411.
- Alderwick, L.J., Seidel, M., Sahm, H., Besra, G.S., Eggeling, L.** 2006. Identification of a novel arabinofuranosyltransferase (AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 281, 15653-15661.
- Alderwick, L.J., Birch, H.L., Mishra, A.K., Eggeling, L., Besra, G.S.** 2007. Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1325-1328.
- Alderwick, L.J., Lloyd, G.S., Ghadbane, H., May, J.W., Bhatt, A., Eggeling, L., Fütterer, K., Besra, G.S.** 2011. The C-terminal domain of the arabinosyltransferase *Mycobacterium tuberculosis* EmbC is a lectin-like carbohydrate binding module. *PLoS Pathog.* 7, e1001299.
- Ariza, M.A., Martín-Luengo, F., Valero-Guillén, P.L.** 1994. A family of diacyltrehaloses isolated from *Mycobacterium fortuitum*. *Microbiology* 140, 1989-1994.
- Asselineau, C., Montrozier, H.L., Prome, J.C.** 1969. Présence d'acides polyinsaturés dans une bactérie: isolement, á partir des lipides de *Mycobacterium phlei*, d'acide hexatriacontapentaéne-4,8,12,16,20-oïque et d'acides analogues. *Eur. J. Biochem.* 10, 580-584.
- Asselineau, C., Montrozier, H.L.** 1976. Étude du processus de biosynthèse des acides phléiques, acides polyinsaturés sintetisés par *Mycobacterium phlei*. *Eur. J. Biochem.* 63, 509-518.
- Asselineau, C., Asselineau, J.** 1978 Trehalose-containing glycolipids. *Prog. Chem. Fats other Lipids* 16, 59-99.
- Asselineau, J., Lederer, E.** 1950. Structure of the mycolic acids of mycobacteria. *Nature* 166, 782-784.
- Ausina, V., Luquin, M., García-Barceló, M., Lanéelle, M.A., Lévy-Frébault, V., Belda, F., Prats, G.** 1992. *Mycobacterium alvei* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 529-535.
- Bacon, J., Hatch, K.A.** 2008. Continuous culture of Mycobacteria. En: *Mycobacteria Protocols* (eds. T. Parish, N.G. Stoker), p. 153-172, Human Press. Totowa (New jersey).

- Ballou, C.E., Vilkas, E., Lederer, E.** 1963. Structural studies on the myo-inositol phospholipids of *Mycobacterium tuberculosis* (var. bovis, strain BCG). *J. Biol. Chem.* 238, 69-76.
- Ballou, C.E., Lee, Y.C.** 1964. The structure of a myoinositol mannoside from *Mycobacterium tuberculosis* glycolipid. *Biochemistry* 3, 682-685.
- Banerjee, D., Bhattacharyya, R.** 2012. Isoniazid and thioacetazone may exhibit antitubercular activity by binding directly with the active site of mycolic acid cyclopropane synthase: hypothesis based on computational analysis. *Bioinformation* 8, 787-789.
- Barkan, D., Rao, V., Sukenick, D.G., Glickman, M.S.** 2010. Redundant function of *cmaA2* and *mmaA2* in *Mycobacterium tuberculosis* *cis* cyclopropanation of oxygenated mycolates. *J. Bacteriol.* 192, 3661–3668.
- Barkan, D., Hedhli, D., Yan, H.G., Hyugen, K., Glickman, M.S.** 2012. *M. tuberculosis* lacking all mycolic acid cyclopropanation is viable but highly attenuated and hyperinflammatory in mice. *Infect. Immun.* 80, 1958-1968.
- Bean, A.G.D., Roach, D.R., Briscoe, H., France, M.P., Korner, H., Sedgwick, J.D., Britton, W.J.** 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol.* 162, 3504–3511.
- Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlong, S.T., Brenner, M.B.** 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 372, 691-694.
- Bekker, L.G., Moreira, A.L., Bergtold, A., Freeman, S., Ryffel, B., Kaplan, G.** 2000. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose-dependent. *Infect. Immun.* 68, 6954–6961.
- Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., Besra, G.S.** 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276, 1420-1422.
- Bernadou, J., Nguyen, M., Meunier, B.** 2001. The mechanism of action of isoniazid. A chemical model of activation. *Ann. Pharm. Fr.* 59, 331-337.
- Berg, S., Kaur, D., Jackson, M., Brennan, P.J.** 2007. The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology* 17, 35R-56R.

- Besra, G.S., Bolton, R.C., McNeil, M.R., Ridell, M., Simpson, K.E., Glushka, J., van Halbeek, H., Brennan, P.J., Minnikin, D.E.** 1992. Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 31, 9832-9837.
- Besra, G.S., Khoo, K.H., McNeil, M.R., Dell, A., Morris, H.R., Brennan, P.J.** 1995. A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 34, 4257-4266.
- Bhamidi, S., Scherman, M.S., Jones, V., Crick, D.C., Belisle, J.T., Brennan, P.J., McNeil, M.R.** 2011. Detailed structural and quantitative analysis reveals the spatial organization of the cell walls of in vivo grown *Mycobacterium leprae* and in vitro grown *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 286, 23168-23177.
- Bhatt, A., Molle, V., Besra, G.S., Jacobs, W.R. Jr., Kremer, L.** 2007. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol. Microbiol.* 64, 1442-1454.
- Birch, H.L., Alderwick, L.J., Bhatt, A., Rittmann, D., Krumbach, K., Singh, A., Bai, Y., Lowary, T.L., Eggeling, L., Besra, G.S.** 2008. Biosynthesis of mycobacterial arabinogalactan: identification of a novel α (1 \rightarrow 3) arabinofuranosyltransferase. *Mol. Microbiol.* 69, 1191-1206.
- Birch, H.L., Alderwick, L.J., Appelmelk, B.J., Maaskant, J., Bhatt, A., Singh, A., Nigou, J., Eggeling, L., Geurtsen, J. Besra, G.S.** 2010. A truncated lipoglycan from mycobacteria with altered immunological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2634-2639.
- Bloch, H.** 1950. Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organism. *J. Exp. Med.* 91, 197-218.
- Bou-Raad, R., Méniche, X., de Sousa-d'Auria, C., Chami, M., Salmeron, C., Tropis, M., Labarre, C., Daffé, M., Houssin, C., Bayan, N.** 2010. A deficiency in arabinogalactan biosynthesis affects *Corynebacterium glutamicum* mycolate outer membrane stability. *J. Bacteriol.* 192, 2691-2700.
- Bowdish, D.M.E., Sakamoto, K., Kim, M.J., Mariliis Kroos, M., Mukhopadhyay, S., Leifer, C.A., Tryggvason, K., Gordon, S., Russell D.G.** 2009. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 5, e10000474.
- Brennan, P.J.** 1989. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* 2, 420-430.

- Brennan, P.J., Nikaido, H.** 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29-63.
- Brennan, P.J.** 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 83, 91–97.
- Brett, S.J., Draper, P., Payne, S.N., Rees, R.J.** 1983. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 52, 271-279.
- Brodin, P., Poquet, Y., Levillain, F., Peguillet, I., Larrouy-Maumus, G., Gilleron, M., Ewann, F., Christophe, T., Fenistein, D., Jang, J., Jang, M.S., Park, S.J., Rauzier, J., Carralot, J.P., Shrimpton, R., Genovesio, A., Gonzalo-Asensio, J.A., Puzo, G., Martin, C., Brosch, R., Stewart, G.R., Gicquel, B., Neyrolles, O.** 2010. High content phenotypic cell-based visual screen identifies *Mycobacterium tuberculosis* acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling. *PLoS Pathog.* 6, e1001100.
- Cantaloube, S., Veyron-Churlet, R., Haddache, N., Daffé, M., Zerbib, D.** 2011. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. *PloS One* 6), e29564.
- Casal, R.M.** 1983. *Bacteriología de la tuberculosis y micobacterias*. Editorial AC, Madrid.
- Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S.J., Sibille, J.C., Snapper, M., Aisen, P., Bloom, B.** 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2453-2457.
- Chatterjee, D., Bozic, C.M., McNeil, M., Brennan, P.J.** 1991. Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 266, 9652-9660.
- Chatterjee, D., Hunter, S.W., McNeil, M., Brennan, P.J.** 1992a. Lipoarabinomannan: multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *J. Biol. Chem.* 267, 6228-6233.
- Chatterjee, D., Lowell, K., Rovoire, B., McNeil, M.R., Brennan, P.J.** 1992b. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J. Biol. Chem.* 267, 6234-6239
- Chatterjee, D., Khoo, K.H., McNeil, M.R., Dell, A., Morris, H.R. Brennan, P.J.** 1993. Structural definition of the non-reducing termini of mannose-capped lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* through selective enzymatic degradation and fast atom bombardment-mass spectrometry. *Glycobiology* 3, 497-506.

- Chatterjee, D., Khoo, K.H.** 2001. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 2018-2042.
- Cho, S.N., Yanagihara, D.L., Hunter, S.W., Gelber, R.H., Brennan, P.L.** 1983. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.* 41, 1077-1083.
- Cooper, A.M., Khader, S.A.** 2008. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol. Rev.* 226, 191-204.
- Cooper, A.M.** 2009. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 393-422.
- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., Jacobs, W.R.** 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402, 73-83.
- Cruz, A., Fraga, A.G., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Torrado, E., Saraiva, M., Pereira, D.R., Randall, T.D., Pedrosa, J., Cooper, A.M., Castro, A.G.** 2010. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 207, 1609-1616.
- Daffé, M., Lanéelle, M.A., Puzo, G., Asselineau, C.** 1981. Acide mycolique époxydique: un nouveau type d'acide mycolique. *Tetrahedron Lett.* 22, 4515-4516.
- Daffé, M., Lacave, C., Lanéelle, M.A., Gillois, M., Lanéelle, G.** 1988. Polyphthienoyl trehalose, glycolipid specific for virulent strains of tubercle bacillus. *Eur. J. Biochem.* 172, 579-584.
- Daffé, M., Lanéelle, M.A.** 1989. Diglycosyl phenol phthiocerol diester of *Mycobacterium leprae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1002, 333-337.
- Daffé, M., Brennan, P.J., McNeil, M.** 1990. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ¹H and ¹³C-NMR analyses. *J. Biol. Chem.* 265, 6734-6743.
- Daffé, M., Draper, P.** 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131-203.
- Dao, D.N., Sweeney, K., Hsu, T., Grurcha, S.S., Nascimento, I.P., Roshevsky, D., Besra, G.S., Chan, J., Porcelli, S.A., Jacobs, W.R. Jr.** 2008. Mycolic acid modification by the *mmaA4* gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS Pathog.* 4, e1000081.
- De Souza, M.V., Ferreira, M. de L., Pinheiro, A.C., Saraiva, M.F., de Almeida, M.V., Valle, M.S.** 2008. Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against *Mycobacterium tuberculosis*. *Scien. W. J.* 8, 720-751.

- De la Salle, H., Mariotti, S., Angenieux, C., Gilleron, M., Garcia-Alles, L.F., Malm, D., Berg, T., Paoletti, S., Maître, B., Mourey, L., Salamero, J., Cazenave, J.P., Hanau, D., Mori, L., Puzo, G., De Libero, G.** 2005. Assistance of microbial glycolipid antigen processing by CD1e. *Science* 310, 1321-1324.
- De Smet, K.A., Weston, A., Brown, I.N., Young, D.B., Robertson, B.D.** 2000. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* 146, 199-208.
- Divya Jyothi, M., Garg, S.K., Singh, N.B.** 2000. Mechanisms involved in protective immune response generated by secretory proteins of *Mycobacterium habana* against experimental tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 51, 502-510.
- Dobson, G., Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Parlet, J.H., Goodfellow M.** 1985. Systematic analysis of complex mycobacterial lipids. En: *Chemical Methods in Bacterial Systematic* (eds., M. Goodfellow, D.E. Minnikin), p. 237-265. Academic Press. Londres.
- Domenech, P., Reed, M.B., Barry, C.E. 3rd.** 2005. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect. Immunol.* 73, 3492-3501.
- Dorhoi, A., Reece, S.T., Kaufmann, S.H.** 2011. For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunol. Rev.* 240, 235-251.
- Draper, P.** 1982. The anatomy of Mycobacteria. En: *The Biology of the mycobacteria.* (C. Ratledge, J. Stanford), vol. 1, p. 9-52. Academic Press, London.
- Dubnau, E., Chan, J., Reynau, C., Mohan, V.P., Lanéelle, M.A., Yu, K., Quémard, A., Smith, I., Daffé, M.** 2000. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* 36, 630-637.
- Dutta, R.K., Kathania, M., Raje, M., Majumdar, S.** 2012. IL-6 inhibits IFN- γ induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 942-954.
- Eckstein, D.M., Chandrasekaran, S., Mahapatra, S., McNeil, M.R., Chatterjee, D., Rithner, C.D., Ryan, P.W., Belisle, A.T., Inamine, J.M.** 2006. A major cell wall lipopeptide of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 281, 5209-5215.
- Etémadi, A.H.** 1966. Sur la structure des acides mycoliques méthoxylés de la souche humaine de *Mycobacterium tuberculosis*. *C. r. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* 203, 1257-1259.
- Fakilnham, J.O. 3rd.** 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 177-215.

- Faller, M., Niederweis, M., Schulz G.E.** 2004. The structure of a mycobacterial outer-membrane channel .Science 303, 1189-1192.
- Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Chan, J., Triebold, K.J., Pfeffer, K., Lowenstein, C.J., Schreiber, R., Mak, T.W., Bloom, B.R.** 1995. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity. 2, 561–572.
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., Núñez, G.** 2012. Sensing and reacting to microbes via the inflammasomes. Nat. Immunol. 13, 325-332.
- Frenzel, E., Schmidt, S., Niederweis, M., Steinhauer, K.** 2011. Importance of porins for biocide efficacy against *Mycobacterium smegmatis*. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3068-3073.
- Fujita, Y., Naka, T., McNeil, M.R., Yano, I.** 2005. Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. Microbiology 151, 3403-3416.
- Fujita, Y., Okamoto, Y., Uenishi, Y., Sunagawa, M., Uchiyama, T., Yano, I.** 2007. Molecular and supra-molecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of mycobacterial cord factor in mice. Microb. Pathog. 43, 10-21.
- Fujiwara, T., Hunter, S.W., Cho, S.N., Aspinall, G.O., Brennan, P.J.** 1984. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of a leprosy. Infect. Immunol. 43, 245-252.
- Gautier, L., Lopez-Marín, L.M., Lanéelle, M.A., Daffé, M.** 1992. Structure of mycosides F, a family of trehalos-containing glycolipids of *Mycobacterium fortuitum*. FEMS Microbiol. Lett. 98, 81-88.
- Gaylord, H., Brennan, P.J.** 1987. Leprosy and the leprosy bacillus: recent developments in characterization of antigens of immunology of the disease. Annu. Rev. Microbiol. 41, 645-675.
- Geisel, R.E., Sakamoto, K., Russell, D.G., Rodes, E.R.** 2005. In vivo activity of related cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin is due principally to trehalose mycolates. J. Immunol. 174, 5007-5015.
- Gilleron, M., Venisse, A., Fournié, J.J., Rivière, M., Dupont, M.A., Gas, N., Puzo, G.** 1990. Structural and immunological properties of the phenolic glycolipids from *Mycobacterium gastri* and *Mycobacterium kansasii*. Eur. J. Biochem. 189, 167-173.

- Gilleron, M., Nigou, J., Cahuzac, B., Puzo, G.** 1999. Structural study of the lipomannans from *Mycobacterium bovis* BCG: characterisation of multiacylated forms of the phosphatidyl-myo-inositol anchor. *J. Mol. Biol.* 285, 2147-2160.
- Gilleron, M., Stenger, S., Mazorra, Z., Wittke, F., Mariotti, S., Böhmer, G., Prandi, J., Mori, L., Puzo, G., De Libero, G.** 2004. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 199, 646-659.
- Glickman, M.S., Cox, J.S., Jacobs, W.R. Jr.** 2000. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell.* 5, 717-727.
- Goren, M.B., Brokl, O., Das, B.C.** 1976. Sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*: the structure of the principal sulfatide (SL-I). *Biochemistry* 15, 2728-2735.
- Goren, M.B., Brennan, P.J.** 1980. Mycobacterial lipids: chemistry and biological activities. En: *Tuberculosis* (Ed., G.P. Youmans), p. 63-193. Saunders, Philadelphia (Pensilvania).
- Grzegorzewicz, A.E., Pham, H., Gundi, V.A., Scherman, M.S., North, E.J., Hess, T., Jones, V., Gruppo, V., Born, S.E., Korduláková, J., Chavadi, S.S., Morisseau, C., Lenaerts, A.J., Lee, R.E., McNeil, M.R., Jackson, M.** 2012. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat. Chem. Biol.* 8, 334-341.
- Guller, R., Parihar, S.P., Spohn, G., Johansen, P., Brombacher, F., Bachmann, M.F.** 2011. Blocking IL-1 α but not IL-1 β increases susceptibility to chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Vaccine* 29, 1339-1346.
- Gupta, H.P., Singh, N.B., Mathur, I.S., Gupta, S.K.** 1979. *Mycobacterium habana*, a new immunogenic strain in experimental tuberculosis of mice. *Indian J. Exp. Biol.* 17, 1190-1193.
- Hartmann, M., Barsch, A., Niehaus, K., Tauch, A., Kalinowski, J.** 2004. The glycosylated cell surface protein Rpf2, containing a resuscitation-promoting factor motif, is involved in intracellular communication of corynebacterium glutamicum. *Arch. Microbiol.* 182, 299-312.
- Hayashi, D., Takii, T., Fujiwara, N., Fujita, Y., Yano, I., Yamamoto, S., Kondo, M., Yasuda, E., Inagaki, E., Kanai, K., Fujiwa, A., Kawarazaki, A., Chiba, T., Onozaki, K.** 2009. Comparable studies of immunostimulating activities *in vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 56, 116-128.
- Heinz, C., Niederweis, M.** 2000. Selective extraction and purification of a mycobacterial outer membrane protein. *Anal. Biochem.* 285, 113-120.

- Heitmann, L., Schoenen, H., Ehlers, S., Lang, R., Hölscher, C.** 2012. Mincle is not essential for controlling *Mycobacterium tuberculosis* infection. Immunobiology (in press), <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.06.005>.
- Henry, C.L., Ornelles, D.A., Mitchell, L.M., Brzoza-Lewis, K.L., Hiltbold, E.M.** 2008. IL-12 produced by dendritic cells augments CD8⁺ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J. Immunol.* 181, 8576-84.
- Hoffmann, C., Leis, A., Neiderweis, M., Plitzko J.M., Engelhardt, H.** 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 3963-3967.
- Hong, S., Cheng, T.Y., Layre, E., Sweet, L., Young, D.C., Posey, J.E., Butler, W.R., Moody, D.B.** 2012. Ultralong C100 mycolic acids support the assignment of *Segniliparus* as a new bacterial genus. *PloS One* 7, e39017.
- Houben, D., Demangel, C., van Ingen, J., Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A.M., Caleechurn, L., Bottai, D., van Zon, M., de Punder, K., van der Laan, T., Kant, A., Bossers de Vries, R., Willemsen, P., Bitter, W., van Soolingen, D., Brosch, R., van der Wel, N., Peters, P.J.** 2012. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol.* 14, 1287-1298.
- Huc, E., Meniche, X., Benz, R., Bayan, N., Ghazi, A., Tropis, M., Daffé, M.** 2010. O-mycoloylated proteins from *Corynebacterium*: an unprecedented post-translational modification in bacteria. *J. Biol. Chem.* 285, 21908-21912.
- Huc, E.** 2011. O-mycoloylation: Caractérisation d'une nouvelle modification post-traductionnelle de petites protéines d'enveloppe chez les *Corynebacterineae*. Thèse du doctorat. Université de Toulouse III - Paul Sabatier.
- Hunter, R.L., Venkatraprasad, N., Olsen, M.R.** 2005. The role of trehalose dimycolate (cord factor) of virulent *M. tuberculosis* in vitro. *Tuberculosis* 86, 349-356.
- Hunter, R.L., Olsen, M.R., Jarannath, C., Actor, J.K.** 2006a. Review: Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 36, 371-386.
- Hunter, R.L., Olsen, M., Jagannath, C., Actor, J.K.** 2006b. Trehalose 6,6'-dymicolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice. *Am. J. Pathol.* 168, 1249-1261.
- Hunter, R.L., Armitige, L., Jagannath, C., Actor, J.k.** 2009. TB Research at UT-Houston -A review of cord factor: new approaches to drugs, vaccines and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis* 89, 18-25.

- Hunter, S.W., Brennan, P.J.** 1983. Further specific extracellular phenolic glycolipid antigens and related diacylphthiocerol from *Mycobacterium leprae*. J. Biol. Chem. 258, 7556-7562.
- Hunter, S.W., Murphy, R.C., Clay, K., Goren, M.B., Brennan, P.J.** 1983. Trehalose-containing lipooligosaccharides. A new class of species-specific antigens from *Mycobacterium*. J. Biol. Chem. 258, 10481-10487.
- Hunter, S.W., Brennan, P.J.** 1990. Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem. 265, 9272-9279.
- Indrigo, J., Hunter, R.L. Jr., Actor, J.K.** 2003. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. Microbiology 149, 2049-2059.
- Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y.S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kimoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamasaki, S.** 2009. Direct recognition of mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. J. Exp. Med. 206, 2879-2888.
- Jackson, M., Raynaud, C., Lanéelle, M.A., Guilhot, C., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Gicquel, B., Daffé, M.** 1999. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Mol. Microbiol. 31, 1573-1587.
- Joshi, S.A., Ball, D.A., Sun, M.G., Carlsson, F., Watkins, B.Y., Aggarwal, N., McCracken, J.M., Huynh, K.K., Brown, E.J.** 2012. EccA1, a component of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 protein virulence factor secretion pathway, regulates mycolic acid lipid synthesis. Chem. Biol. 19, 372-380.
- Julián, E., Roldán, M., Sánchez-Chardi, A., Astola, O., Agustí, G., Luquin, M.** 2010. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. J. Bacteriol. 192, 1751-1760.
- Kalscheuer, R., Weinrick, B., Veeraraghavan, U., Besra, G.S., Jacobs, W.R. Jr.** 2010. Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugB-SugC is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 21761-21766.
- Kaufmann, S.H.** 2011. Tuberculosis vaccines--a new kid on the block. Nat. Med. 17, 159-160.
- Kaur, D., Obregon-Henao, A., Pham, H., Chatterjee, D., Brennan, P.J., Jackson, M.** 2008. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium*: mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 17973-17977.

- Kaur, D., Guerin, M.E., Skovierova, H., Brennan, P.J., Jackson, M.** 2009. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 69, 23-78.
- Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.I., Swain, S.L., Locksley, R.M., Haynes, L. Randall, T.D., Cooper, A.M.** 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature Immunol.* 8, 369-377.
- Khader, S.A., Guglani, L., Rangel-Moreno, J., Gopal, R., Fallert, B.A.J., Fountain, J.J., Martino, C., Pearl, J.E., Tighe, M., Lin, Y.Y., Slight, S., Kolls, J.K., Reinhart, T.A., Randall, T.D., Cooper, A.M.** 2011. IL-23 is required for long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* and B cell follicle formation in the infected lung. *J. Immunol.* 187, 5402-7.
- Khan, S., Narayanan, S.N., Parikh, A., Samantaray, S., Singh, A. Kumar, D., Roy, R.P., Bhatt, A., Kumar, V.N.** 2010. Phosphorylation of enoyl-acyl carrier protein reductase InhA impacts mycobacterial growth and survival. *J. Biol. Chem.* 285, 37860-37871.
- Khoo, K.H., Dell, A., Morris, H.R., Brennan, P.J., Chatterjee, D.** 1995. Inositol phosphate capping of the nonreducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. *J. Biol. Chem.* 270, 12380-12389.
- Khoo, K.H., Tang, J.B., Chatterjee, D.** 2001. Variation in mannose-capped terminal arabinan motifs of lipoarabinomannans from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. *J. Biol. Chem.* 276, 3863-3871.
- Kim, M.J., Wainwright, H.C., Lockets, M., Bekker, L.G., Walther, G.B., Dittrich, C., Visser, A., Wang, W., Hsu, F.F., Wiehart, U., Tsenova, L., Kaplan, G., Russell, D.G.** 2010. Caesation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol. Med.* 2, 258-274.
- Kishimoto, T.** 2005. Interleukin-6: From basic science to medicine – 40 years in immunology. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 1-21.
- Kocíncová, D., Sondén, B., Bordat, Y., Pivert, E., de Mendonça-Lima, L., Gicquel, B., Reyrat, J.M.** 2004. The hydrophobic domain of the mycobacterial Erp protein is not essential for the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 72, 2379-2382.
- Korbel, D.S., Schneider, B.E., Schaible, U.E.** 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microb. Infect.* 10, 995-1004.
- Korf, J., Stoltz, A., Verschoor, J., De Baetselier, P., Grooten, J.** 2005. The *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune response. *Eur. J. Immunol.* 35, 890-900.

- Kovacs-Simon, A., Titball, R.W., Michell, S.L.** 2011. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect. Immun.* 79, 548-561.
- Kremer, L., Dover, L.G., Morehouse, C., Hitchin, P., Everett, M., Morris, H.R., Dell, A., Brennan, P.J., McNeil, M.R., Flaherty, C.** 2001. Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276, 26430–26440.
- Lanéelle, M.A., Lanéelle, G.** 1970. Structure d'acides micoliques et d'un intermédiaire dans la biosynthèse d'acides dicarboxyliques. *Eur. J. Biochem.* 12, 296-300.
- Lanéelle, M.A., Launay, A., Spina, L., Marrakchi, H., Laval, F., Eynard, N., Lemassu, A., Tropis, M., Daffé, M., Etienne, G.** 2012. A novel mycolic acid species defines two novel genera of the *Actinobacteria*, *Hoyosella* and *Amycolicococcus*. *Microbiology* 158, 843-855.
- Lapchine, L., Asselineau, C.** 1981. Présence d'un bactériophage chez *Mycobacterium phlei*. *Ann. Microbiol. (Institut Pasteur)* 134, 129-139.
- Layre, E., Paepe, D.C., Larrouy-Maumus, G., Vaubourgeix, J., Mundayoor, S., Lindner, B., Puzo, G., Gilleron, M.** 2011. Deciphering sulfoglycolipids of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Lipid Res.* 52, 1098-1110.
- Lederer, E., Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J.F., Wietzerbin, J.** 1975. Cell walls of mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Mol. Cell Biochem.* 7, 87-104.
- Lederer, E.** 1976. Cord factor and related trehalose esters. *Chem. Phys. Lipids* 16, 91-106.
- Lee, Y.C., Ballou, C.E.** 1964. Structural studies on the myoinositol mannosides from the glycolipids of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* 239, 1316–1327.
- Lee, Y.C., Ballou, C.E.** 1965. Gas chromatography of inositols as their trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.* 18, 147-149.
- Léger, M., Gavalda, S., Guillet, V., van der Rest, B., Slama, N., Montrozier, H., Mourey, L., Quémard, A., Daffé, M., Marrakchi, H.** 2009. The dual function of the *Mycobacterium tuberculosis* FadD32 required for mycolic acid biosynthesis. *Chem. Biol.* 16, 510-519.
- Lemassu, A., Lanéelle M.A., Daffé, M.** 1991. Revised structure of trehalose-containing immunoreactive glycolipid of *mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 171-176.

- Lemassu, A., Lévy-Frébault, V.V., Lanéelle, M.A., Daffé, M.** 1992. Lack of correlation between colony morphology and lipooligosaccharide content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1535-1541.
- Lima, V.M., Bonato, V.L., Lima, K.M., Dos Santos, S.A., Dos Santos, R.R., Gonçalves, E.D., Faccioli, L.H., Brandão, I.T., Rodrigues-Junior, J.M., Silva, C.L.** 2001. Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infect. Immu.* 69, 5305-5312.
- Lima, K.M., Santos, S.A., Lima, V.M., Coelho-Castelo, A.A., Rodrigues, J.M. Jr., Silva, C.L.** 2003. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Ther.* 10, 678-685.
- Lin, F.L., van Halbeek, H., Bertozzi, C.R.** 2007. Synthesis of mono- and dideoxygenated α,α' -trehalose analogs. *Carbohydr. Res.* 342, 2014-2030.
- Luquin, M., Roussel, J., López-Calahorra, F., Lanéelle, G., Ausina, V., Lanéelle, M.A.** 1990. A novel mycolic acid in a *Mycobacterium* sp. from the environment. *Eur. J. Biochem.* 192, 753-759.
- Luquin, M., Ausina, V., Vincent-Lévy-Frébault, V., Lanéelle, M.A., Belda, F., García-Barceló, M., Prats, G., Daffé, M.** 1993. *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 405-413.
- Mahapatra, S., Scherman, H., Brennan, P.J., Crick, D.C.** 2005. N-Glycolylation of the nucleotide precursors of peptidoglycan biosynthesis of *Mycobacterium* spp. is altered by drug treatment. *J. Bacteriol.* 187, 2341-2347.
- Marchand, C.H., Salmeron, C., Bou Raad, R., Méniche, X., Chami, M., Masi, M., Blanot, D., Daffé, M., Tropis, M., Huc, E., Le Maréchal, P., Decottignies, P., Bayan, N.** 2012. Biochemical disclosure of the mycolate outer membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 194, 587-597.
- McNeil, M., Daffé, M., Brennan, P.J.** 1991. Location of the mycoloyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 266, 13217-13223.
- Mederos, L.M., Gutierrez, A.M., Valdivia, J.A.** 1992. Utilization of a new culture medium in biochemical tests for the mycobacterial classification. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87, 441.
- Mederos, L.M., Valdivia, J.A., Valero-Guillén, P.L.** 2006. Lipids of '*Mycobacterium habana*', a synonym of *Mycobacterium simiae* with vaccine potential. *Tuberculosis* 86, 324-329.

- Mederos, L.M., Valdivia, J.A., Valero-Guillén, P.L.** 2007. Analysis of the structure of mycolic acids of *Mycobacterium simiae* reveals a particular composition of α -mycolates in strain 'habana' TMC 5135, considered as immunogenic in tuberculosis and leprosy. *Microbiology* 153, 4159-4165.
- Mehra, V., Brennan, P.J., Rada, E., Convit, J., Bloom, B.R.** 1984. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. *Nature* 308, 194-196.
- Méndez-Sampeiro, P.** 2010. Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease. *Int. J. Infect. Diseases* 14, e366-e371.
- Middlebrook, G., Coleman, C.M., Schaefer, W.B.** 1959. Sulfolipid from virulent tubercle bacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45, 1801-1804.
- Mikusova, K., Yagi, T., Stern, R., McNeil, M.R., Besra, G.S., Crick, D.C., Brennan, P.J.** 2000. Biosynthesis of the galactan component of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* 275, 33890–33897.
- Minnikin, D.E., Polgar, N.** 1967. The methoxymycolic and ketomycolic acids from human tubercle bacilli. *Chem. Comm.* 1172-1174.
- Minnikin, D.E., Goodfellow, M.** 1980. Lipid composition in the classification of acid-fast bacteria. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 8, 189-256.
- Minnikin, D.E.** 1982. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. En: *The Biology of the Mycobacteria* (Eds., C. Ratledge, J. Stanford), vol. 1, p. 95-184. Academic Press, Londres.
- Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Goodfellow, M.** 1982. The oxygenated mycolic acids of *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense*. *Biochim. Biophys. Acta* 712, 616-620.
- Minnikin, D.E., Kremer, L., Dover, L.G., Besra, G.S.** 2005. The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* 9, 545-553.
- Misaki, A., Yukawa, S.** 1966. Studies on cell wall of Mycobacteria. II. Constitution of polysaccharides from BCG cell walls. *J. Biochem.* 59, 511-520.
- Misaki, A., Azuma, I., Yamamura, Y.** 1977. Structural and immunochemical studies on D-arabino-D-mannans and D-mannans of *Mycobacterium tuberculosis* and other *Mycobacterium* species. *J. Biochem.* 82, 1759-1770.
- Mishra, A.K., Driessen, N.N., Appelmelk, B.J., Besra, G.S.** 2011. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 1126-1157.

- Molle, V., Saint, N., Campagna, S., Kremer, L., Lea, E., Draper, P., Molle, G.** 2006. pH-dependent pore-forming activity of OmpATb from *Mycobacterium tuberculosis* and characterization of the channel by peptidic dissection. *Mol. Microbiol.* 61, 826-837.
- Montamat-Sicotte, D.J., Millington, K.A., Willcox, C.R., Hingley-Wilson, S., Hackforth, S., Innes, J., Kon, O.M., Lammas, D.A., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Willcox, B.E., Lalvani, A.** 2011. A mycolic acid-specific CD1-restricted T cell population contributes to acute and memory immune responses in human tuberculosis infection. *J. Clin. Invest.* 121, 2493-2503.
- Mougous, J.D., Petzold, C.J., Senaratne, R.H., Lee, D.H., Akey, D.L., Lin, F.L., Munchel, S.E., Pratt, M.R., Riley, L.W., Leary, J.A., Berger, J.M., Bertozzi, C.R.** 2004. Identification, function and structure of the mycobacterial sulfotransferase that initiates sulfolipid-1 biosynthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 721-729.
- Neil, M.A., Klebanoff, S.J.** 1988. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J. Exp. Med.* 167, 30-42.
- Neyrolles, O., Guilhot, C.** 2011. Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* 91, 187-195.
- Niederweis, M., Danilchanka, O., Huff, J., Hoffmann, C., Engelhardt, H.** 2010. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol.* 18, 109-116.
- Niescher, S., Wray, V., Lang, S., Kaschabek, S. R. & Schlömann, M.** 2006. Identification and structural characterisation of novel trehalose dinocardomycolates from n-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 605–611.
- Nigou, J., Gilleron, M., Cahuzac, B., Bounéry, J.D., Herold, M., Thurnher, M., Puzo, G.** 1997. The phosphatidyl-myo-inositol anchor of the lipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Heterogeneity, structure, and role in the regulation of cytokine secretion. *J. Biol. Chem.* 272, 23094-23103.
- Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G.** 1999. Lipoarabinomannans: characterization of the multiacylated forms of the phosphatidyl-myo-inositol anchor by NMR spectroscopy. *J. Biochem.* 337, 453-460.
- Nigou, J., Vercellone, A., Puzo, G.** 2000. New structural insights into the molecular deciphering of mycobacterial lipoglycan binding to C-type lectins: lipoarabinomannan glycoform characterization and quantification by capillary electrophoresis at the subnanomole level. *J. Mol. Biol.* 299, 1353-1362.

- Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G.** 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* 85, 153-166.
- Nishizawa, M., Yamamoto, H., Imagawa, H., Barbier-Chassafière, V., Petit, M., Azuma, I. & Papy-García, D.** 2007. Efficient synthesis of a series of trehalose dimycolate (TDM)/trehalose dicorynemycolate (TDCM) analogues and their interleukin-6 level enhancement activity in mice sera. *J. Org. Chem.* 72, 1627–1633.
- Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J., Lederer, E.** 1956. The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 299-309.
- Okamoto, Y., Fujita, Y., Naka, T., Hirai, M., Tomiyasu, I., Yano, I.** 2006. Mycobacterial sulfolipid shows a virulence by inhibiting cord factor induced granuloma formation and TNF-alpha release. *Microb. Pathog.* 40, 245.
- Ozeki, Y., Tsutsui, H., Kawada, N., Suzuki, H., Kataoka, M., Kodama, T., Yano, I., Kaneda, K., Kobayashi, K.** 2006. Macrophage scavenger receptor down-regulates mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages. *Microb. Pathog.* 40, 171-176.
- Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Leviailain, F., Botanch, C., Bardou, F., Daffé, M., Emile, J.-F., Marchou, B., Cardona, P.J., de Chastellier, C., Altare, F.** 2008. Foamy macrophages from tuberculosis patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* 4, e1000204.
- Portevin D, De Sousa-D'Auria C, Houssin C, Grimaldi C, Chami M, Daffé M, Guilhot C.** 2004. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 314-319.
- Quémard, A., Lanéelle, M.A., Marrakchi, H., Promé, D., Dubnau, E., Daffé, M.** 1997. Structure of a hydroxymycolic acid potentially involved in the synthesis of oxygenated mycolic acids of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Eur. J. Biochem.* 250, 758-763.
- Rao, V., Fujiwara, N., Porcelli, S.A., Glickman, M.S.** 2005. *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J. Exp. Med.* 201, 535–543.
- Rao, V., Gao, F., Chen, B., Jacobs, W.R. Jr., Glickman, M.S.** 2006. Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis*-induced inflammation and virulence. *J. Clin. Invest.* 116, 1660-1667.

- Raviglione, M., Marais, B., Floyd, K., Lönnroth, K., Getahun, H., Migliori, G.B., Harries, A.D., Nunn, P., Lienhardt, C., Graham, S., Chakaya, J., Weyer, K., Cole, S., Kaufmann, S.H., Zumla, A.** 2012. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. *Lancet* 379, 1902-1913.
- Raymond, J.B., Mahapatra, S., Crick, D.C., Pavelka, M.S. Jr.** 2005. Identification of the *namH* gene, encoding the hydroxylase responsible for the N-glycolylation of the mycobacterial peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 280, 326-333.
- Rhoades, F. Hsu, F.F., Torrelles, J.B., Turk, J., Chatterjee, D., Rusell, D.G.** 2003. Identification and macrophage-activating of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol. Microbiol.* 48, 875-888.
- Rodrigues, L., Ramos, J., Couto, I., Amaral, L., Viveiros, M.** 2011. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC Microbiol.* 11, 35.
- Rombouts, Y., Burguière, A., Maes, E., Coddeville, B., Ellass, E., Guérardel, Y., Kremer, L.,** 2009. *Mycobacterium marinum* lipooligosaccharides are unique caryophyllose-containing cell wall glycolipids that inhibit tumor necrosis factor- α secretion in macrophages. *J. Biol. Chem.* 284, 20975-20988.
- Ronning, D.R., Klabunde, T., Besra, G.S., Vissa, V.D., Belisle, J.T., Sacchettini, J.C.** 2000. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nat. Struct. Biol.* 4, 141-146.
- Runyon, E.H., Wayne, L.G., Kubica, G.P.** 1974. *Mycobacterium* Lehman and Neumann. En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (eds., Buchanan R.E., Gibbons N.E.), 8^a ed., p. 681-701. Williams y Wilkins, Baltimore (Maryland).
- Rusell, D.G.** 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis?. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 39-47.
- Saadat, S., Ballou, C.E.** 1983. Pyruvylated glycolipids from *Mycobacterium smegmatis*. Structures of two oligosaccharide components. *J. Biol. Chem.* 258, 1813-1818.
- Sacco, E., Covarrubias, A.S., O'Hare, H.M., Carroll, P., Eynard, N., Jones, T.A., Parish, T., Daffé, M., Bäckbro, K., Quémard, A.** 2007. The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14628-14633.
- Sato, K., Akaki, T., Tomoika, H.** 1998. Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN-gamma) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha). *Clin. Exp. Immunol.* 112, 63-68.

- Schoenen, H., Bodendorfer, B., Hitchens, K., Manzanero, S., Werninghaus, K., Nimerjahn, F., Agger, E.M., Stenger, S., Andersen, P., Ruland, J., Brown, G.D., Wells, C., Lang, R.** 2010. Cutting edge: mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J. Immunol.* 184, 2756-2760.
- Schorey, J.S., Sweet, L.** 2008. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology* 18, 832-841.
- Schweneker, K., Gorka, O., Schweneker, M., Poeck, H., Tschopp, J., Peschel, C., Ruland, J., Gross, O.** 2012. The mycobacterial cord factor adjuvant analogue threhalose 6,6'-dibehenate (TDB) activates the Nlrp3 inflammasome. *Immunobiology* (in press), <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.07.029>.
- Sempere, M.A., Valero-Guillén, P.L., de Godos, A., Martín-Luengo, F.** 1993. A triacyl trehalose containing 2-methyl branched unsaturated fatty acyl groups isolated from *Mycobacterium fortuitum*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 585-590.
- Severn, W.B., Furneaux, R.H., Falshaw, R., Atkinson, P.H.** 1998. Chemical and spectroscopic characterisation of the phosphatidylinositol manooligosaccharides from *Mycobacterium bovis* AN5 and WAg201 and *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. *Carbohydr. Res.* 308, 397-408.
- Shiratsuchi, H., Johnson, J.L., Ellner, J.J.** 1991. Bidirectional effects of cytokines on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. *J. Immunol.* 146, 3165-3170.
- Simeone, R., Bottai, D., Brosch, R.** 2009. ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 4-10.
- Singh, N.B., Lowe, C.R.E., Rees, R.J.W., Colston, M.J.** 1989. Vaccination of mice against *Mycobacterium leprae* infection. *Infect. Immune.* 57, 653-655.
- Singh, N.B., Gupta, H.P., Srivastava, A., Kandpal, H., Srivastava, U.M.** 1997. Lymphostimulatory and delayed-type hypersensitivity response to a candidate leprosy vaccine strain: *Mycobacterium habana*. *Lepr. Rev.* 68, 125-130.
- Singh, V., Jain, S., Gowthaman, U., Parihar, P., Gupta, P., Gupta, U.D., Agrewala, J.N.** 2011. Co-Administration of IL-1+IL-6+TNF- α with *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages vaccine induces better protective T cell memory than BCG. *PloS One* 6, e16097.
- Sirakova, T.D., Thirumala, A.K., Dubey, V.S., Sprecher, H., Kolattukudy, P.E.** 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 16833-16839.

- Slama, N., Leiba, J., Eynard, N., Daffé, M., Kremer, L., Quémard, A., Molle, V.** 2011. Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC dehydratases from *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 401-406.
- Spencer, J.S., Brennan, P.J.** 2011. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr. Rev.* 82, 344-357.
- Stahl, C., Kubetzko, S., Kaps, I., Seeber, S., Engelhardt, H., Niederweis, M.** 2001. MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 40, 451-464.
- Stodola, F.H., Lesuk, A., Anderson, R.J.** 1938. The chemistry of the lipides of tubercle bacilli. LIV. The isolation and properties of mycolic acid. *J. Biol. Chem.* 129, 505-513.
- Sut, A., Sirugue, S., Sixou, S., Lakhdar-Ghazai, F., Tocanne, J.F., Lanéelle, G.** 1990. Mycobacteria glycolipids as potential pathogenicity effectors: alteration of model and natural membranes. *Biochemistry* 29, 8498-8502.
- Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D.B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., Barnes, S.W., Walker, J.R., Alland, D., Barry, C.E. 3rd, Boshoff, H.I.** 2012. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1797-1809.
- Takayama, K., Wang, C., Besra, G.S.** 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 81-101.
- Takimoto, H., Maruyama, H., Shimada, K.L., Yakabe, R., Yano, I., Kumazawa, I.** 2006. Interferon- γ independent formation of pulmonary granuloma in mice by injections with trehalose dimycolate (cord factor), lipoarabinomannan and phosphatidylinositol mannosides isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* 144, 134-141.
- Torrado, E., Cooper, A.M.** 2010. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 455-462.
- Torrado, E., Cooper, A.M.** 2011. What do we really know about how CD4 cells controls *Mycobacterium tuberculosis*? *PLoS Pathog.* 7, e1002196.
- Trivedi, O.A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., Gokhale, R.S.** 2004. Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* 428, 441-445.

- Tropis, M., Meniche, X., Wolf, A., Gebhardt, H., Strelkov, S., Chami, M., Schomburg, D., Krämer, R., Morbach, S., Daffé, M.** 2005. The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in *Corynebacterineae*. *J. Biol. Chem.* 280, 26573-26585.
- Van der Woude, A.D., Sarkar, D., Bhatt, A., Sparrius, M., Raadsen, S.A., Boon, L., Geurtsen, J., van der Sar, A.M., Luirink, J., Houben, E.N., Besra, G.S., Bitter, W.** 2012. Unexpected link between lipooligosaccharide biosynthesis and surface protein release in *Mycobacterium marinum*. *J. Biol. Chem.* 287, 20417-20429.
- Vander, S.B., Juma'a, R.A.D., Naessens, T., Koza, G., Maza-Iglesias, M., Rowles, R., Theunissen, C., Medtz, J., Lanckacker, E., Bair, M.S., Grooten, J.** 2011. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *Eur. J. Immunol.* 41, 450-460.
- Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., Besra, G.S., Bhatt, A.** 2012. *MmpL* genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chem. Biol.* 19, 498-506.
- Veyron-Churlet, R., Molle, V., Taylor, R.C., Brown, A.K., Besra, G.S., Zanella-Cléon, I., Fütterer, K., Kremer, L.** 2009. The *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue. *J. Biol. Chem.* 284, 6414-6424.
- Venisse, A., Berjeaud, J.M., Chaurand, P., Gilleron, M., Puzo, G.** 1993. Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry, *J. Biol. Chem.* 268, 12401-12411.
- Vilkas, E., Rojas, A.** 1964. Sur les lipides de *Mycobacterium fortuitum*. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46, 689-701.
- Villeneuve, M., Kawai, M., Watanabe, M., Aoyagi, Y., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K., Gouda, H., Hirono, S., Minnikin, D.E., Nakahara, H.** 2007. Conformational behavior of oxygenated mycobacterial mycolic acids from *Mycobacterium bovis* BCG. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1717-1726.
- Villeneuve, M., Kawai, M., Watanabe, M., Aoyagi, Y., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K., Gouda, H., Hirono, S., Minnikin, D.E., Nakahara, H.** 2010. Differential conformational behaviors of alpha-mycolic acids in Langmuir monolayers and computer simulations. *Chem. Phys. Lipids* 163, 569-579.
- Wallis, R.S., Ellner, J.J.** 1994. Cytokines and tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.* 55, 676-681.

- Warrier, T., Tropis, M., Werngren, J., Diehl, A., Gengenbacher, M., Schlegel, B., Schade, M., Oschkinat, H., Daffe, M., Hoffner, S., Eddine, A.N., Kaufmann, S.H.** 2012. Antigen 85C inhibition restricts *Mycobacterium tuberculosis* growth through disruption of cord factor biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1735-1743.
- Watanabe, M., Agyagi, Y., Ohta, Y., Minnikin, D.E.** 1997. Structures of phenolic glycolipids from *Mycobacterium kansasii*. *Eur. J. Biochem.* 248, 93-98.
- Watanabe, M., Ohta, A., Sasaki, S.I., Minnikin, D.E.** 1999. Structure of a new glycolipid from the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex. *J. Bacteriol.* 181, 2293-2297.
- Watanabe, M., Agyagi, Y., Ridell, M., Minnikin, D.E.** 2001. Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiology* 147, 1825-1837.
- Watanabe, M., Aoyagi, Y., Mitome, H., Fujita, T., Naoki, H., Ridell, M., Minnikin, D.E.** 2002. Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; the recognition of new structural principles in mycolic acids. *Microbiology* 148, 1881-1902.
- Wayne, L.G., Kubica, G.P.** 1986. The mycobacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Eds., P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt) vol. 2, p. 1435-1457. Williams y Wilkins. Baltimore (Maryland).
- Welsh, K.J., Abbott, A.N., Hwang, S.A., Indrigo, J., Armitige, L.Y., Blackburn, M.R., Hunter, R.L. Jr., Actor, J.K.** 2008. A role for tumour necrosis factor-alpha, complement C5 and interleukin-6 in the initiation and development of the mycobacterial cord factor trehalose 6,6'-dimycolate induced granulomatous response. *Microbiology* 154, 1813-1824.
- Werninghaus, K., Babiak, A., Gross, O., Hölscher, C., Dietrich, H., Agger, E.M., Mages, J., Mocsai, A., Schoenen, H., Finger, K., Nimmerjahn, F., Brown, G.D., Kirschning, C., Heit, A., Andersen, P., Wagner, H., Ruland, J., Lang, R.** 2009. Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit *Mycobacterium tuberculosis* vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *J. Exp. Med.* 206, 89-97.
- Young, D.B., Buchanan, T.M.** 1983. Serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science* 221, 1057-1059.
- Zhang, L., Goren, M.B., Holzer, T.J., Andersen, B.R.** 1988. Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infect. Immun.* 56, 2876.
- Zhang, L., English, D., Andersen, B.R.** 1991. Activation of human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid-1. *J. Immunol.* 146, 2730-2736.

Zähringer, H., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H., Alexander, C. 2008. TLR-2 promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad selectivity. *Immunobiology* 213, 205-224.

Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., Daffé, M. 2008. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.* 190, 5672-5680.