



Universidad de Buenos Aires.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular.

*Modulación de los mecanismos efectores de linfocitos T  
por proteínas de señalización en pacientes con  
tuberculosis pulmonar activa.*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS.**

*Lic. Virginia Pasquinelli*

**Director de tesis:** Dra. Verónica E. García.

**Consejero de estudios:** Dr. Omar Coso.

**Lugar de Trabajo:** Laboratorio de Inmunogenética, Facultad de  
Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2008.

***Modulación de los mecanismos efectores de linfocitos T por proteínas de señalización en pacientes con tuberculosis pulmonar activa.***

La producción de la citoquina Th1 IFN- $\gamma$  por células T es crucial para la inmunidad contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Nosotros investigamos la expresión y el rol de SLAM (Molécula Linfocitaria Activadora de Señales), SAP (Proteína asociada a SLAM) e ICOS (Coestimulador Inducible), moléculas de señalización que regulan citoquinas Th1, en el contexto de la tuberculosis humana. Más aun, para comprender las vías de señalización que controlan la secreción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis*, estudiamos la función del factor de transcripción CREB y de la citoquina IL-17, proteínas que participan en la regulación del IFN- $\gamma$ . Encontramos que la expresión de SLAM e ICOS en células T correlacionaba directamente con la respuesta al antígeno específico, mientras que la expresión de SAP en células de pacientes con tuberculosis se asociaba inversamente con la producción de IFN- $\gamma$  de estos individuos. SLAM se expresó tanto en linfocitos T como en células dendríticas de pacientes con tuberculosis, conduciendo a una señalización bidireccional que indujo producción de IFN- $\gamma$ . Finalmente encontramos que IL-17 e IFN- $\gamma$  se regulan recíprocamente a través de un mecanismo dependiente de SLAM y CREB. En conjunto nuestros resultados sugieren que la regulación terapéutica de las moléculas de señalización podría en última instancia modificar la respuesta en tuberculosis y promover una inmunidad más efectiva contra el patógeno.

**Palabras claves:** Tuberculosis, proteínas de señalización, IFN- $\gamma$ , Coestimulación, células T, células dendríticas.

***Modulation of the effectors mechanisms of T lymphocytes by signaling proteins in patients with active pulmonary tuberculosis.***

Production of the Th1 cytokine IFN- $\gamma$  by T cells is considered crucial for immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. We investigated the expression and role of SLAM (signaling lymphocytic activation molecule), SAP (SLAM associated protein) and ICOS (Inducible costimulatory, signaling molecules known to regulate Th1 cytokines in the context of human tuberculosis. Moreover, to further understand the signaling pathways that control IFN- $\gamma$  secretion in response to *M. tuberculosis* we studied the function of the transcription factor CREB and the cytokine IL-17, proteins known to participate in the IFN- $\gamma$  pathway. We found that T cell expression of SLAM and ICOS was directly correlated with responsiveness to *M. tuberculosis* antigen, whereas the expression of SAP on cells from tuberculosis patients was inversely associated with IFN- $\gamma$  production in those individuals. Furthermore, SLAM was expressed both on T lymphocytes and dendritic cells (DC) from tuberculosis patients, leading to a bi-directional signaling that induced IFN- $\gamma$  production. Finally we found that IL-17 and IFN- $\gamma$  were cross-regulated in human tuberculosis, by a mechanism involving SLAM and CREB. Together our results suggest that therapeutic regulation of signaling molecules may ultimately alter the T cell response in tuberculosis and promote more effective immunity against tuberculosis infection.

**Key words:** Tuberculosis, signaling proteins, IFN- $\gamma$ , Costimulation, T cells, dendritic cells.

*A mi mamá y mi papá.*

<i>Abreviaturas</i> .....	4
<b>Introducción</b> .....	<b>6</b>
<i>Tuberculosis</i> .....	7
<i>Respuesta inmune del huésped contra M. tuberculosis</i> .....	11
Respuesta Inmune Innata:.....	11
Respuesta inmune adaptativa en tuberculosis:.....	15
El nuevo paradigma: las células Th17 y su función en la respuesta inmune.	22
<i>Función de moléculas coestimuladoras y proteínas de señalización en la diferenciación Th1/Th2.</i> .....	30
SLAM (Molécula Linfocitaria Activadora de Señales) .....	34
SAP (Proteína de Unión a SLAM) .....	36
ICOS (Coestimulador Inducible) .....	41
<i>Factores de transcripción involucrados en el establecimiento de respuestas Th1</i> .....	43
<b>Objetivos</b> .....	<b>48</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>52</b>
<i>Pacientes e individuos control participantes del estudio.</i> .....	53
<i>Antígeno.</i> .....	53
<i>Cultivos celulares.</i> .....	53
<i>Ensayos de Proliferación.</i> .....	54
<i>ELISA</i> .....	55
<i>Citometría de Flujo en CMSP.</i> .....	55
<i>Detección de IFN-<math>\gamma</math> intracelular</i> .....	56
<i>Obtención de líneas celulares T de corto término a partir de sangre periférica.</i> .....	56

Western blot.....	57
Purificación y estimulación de Células Dendríticas .....	58
Reacción Mixta Leucocitaria (RML).....	59
Síntesis y transfección de ARN de interferencia (ARNi) para SLAM .....	59
Análisis estadístico.....	61
<b>Resultados .....</b>	<b>62</b>
<i>I. Caracterización del estado inmunológico de dos poblaciones de pacientes con tuberculosis. ....</i>	<i>63</i>
Estudio de la expresión de moléculas coestimuladoras inducibles durante la infección activa por <i>M. tuberculosis</i> : SLAM-ICOS. ....	66
El microambiente de citoquinas influencia la expresión de SLAM e ICOS. ..	70
<i>II. Investigación de la función de SLAM en tuberculosis activa. ....</i>	<i>73</i>
Estudio de la expresión de SAP y SLAM en pacientes con tuberculosis según la respuesta de IFN- $\gamma$ contra <i>M. tuberculosis</i> .....	73
Estudio de la función de SLAM en individuos con el gen de SAP deficiente. ....	76
La señalización a través de SLAM induce la producción de IFN- $\gamma$ durante la infección activa por <i>M. tuberculosis</i> . ....	78
<i>III. Estudio de la función de ICOS en tuberculosis activa. ....</i>	<i>83</i>
Regulación de la expresión de ICOS. ....	83
Expresión y activación de ICOS en líneas T polarizadas.....	86
Efecto de la señalización a través de ICOS sobre la respuesta de citoquinas en pacientes con tuberculosis pulmonar activa. ....	88
<i>IV. Interrelación entre SLAM-ICOS e IFN-<math>\gamma</math> durante la tuberculosis activa. ....</i>	<i>94</i>
<i>V. Estudio del rol de SLAM en las CD de pacientes con tuberculosis.....</i>	<i>98</i>

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> induce la maduración de células dendríticas de pacientes con tuberculosis. ....	98
<i>M. tuberculosis</i> induce la producción de citoquinas por CD de pacientes con tuberculosis activa.....	99
Expresión y rol de SLAM en CD de pacientes con tuberculosis. ....	102
Rol funcional de las CD en pacientes con tuberculosis. ....	105
La interacción SLAM-SLAM entre CD y linfocitos T participa en la inducción de IFN- $\gamma$ contra <i>M. tuberculosis</i> .....	106
<b>VI. Vías de Señalización que regulan la producción de IFN-<math>\gamma</math> en la tuberculosis humana.....</b>	<b>109</b>
Rol de CREB en la vía de señalización de SLAM. ....	110
Estudio de la regulación de la expresión de SLAM por IL-17. ....	112
IL-17 inhibe la expresión de CREB .....	113
<b>Discusión .....</b>	<b>115</b>
<i>Rol de la vía SLAM-SAP en tuberculosis.</i> ....	117
<i>Rol de ICOS en tuberculosis.</i> .....	122
<i>Interrelación ICOS- SLAM y su función en tuberculosis.</i> ....	126
<i>Rol de las CD en la infección activa por M. tuberculosis.</i> .....	128
<i>Vías de señalización activadas por SLAM que conducen a producción de IFN-<math>\gamma</math> durante la tuberculosis activa.</i> .....	134
<b>Conclusión .....</b>	<b>137</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>140</b>



**Abreviaturas**

BCG	Bacilo de Calmette Guérin
CD	Células Dendríticas
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTLA-4	Proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CRE)
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleuquina
ICOS	Coestimulador Inducible
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
NK	Células natural killer
NF-AT	Factor nuclear de células T activada
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa-B
PPD	Derivado Proteico Purificado
SLAM	Molécula Linfocitaria Activadora de Señales
SAP	Proteína Asociada a SLAM
Stat	Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción
T-bet	T-box expresado en células T
TCR	Receptor de la célula T
Th	Linfocito T colaborador ("helper")
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

Treg Células T regulatorias

XLP Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

**Introducción**

---

### Tuberculosis

*Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno humano altamente exitoso debido a su habilidad de infectar y causar enfermedad en diez millones de personas por año en el mundo, constituyendo así la principal causa de muerte mundial por un agente infeccioso. Datos estimativos indican que anualmente se producen entre 8 y 10 millones de nuevos casos de tuberculosis activa, de los cuales al menos 3,5 millones mueren a causa de esta infección. Así, la tuberculosis se ubica en el séptimo lugar global en términos de morbilidad y mortalidad (1).

En 1993, la Organización Mundial de la Salud declaró a la tuberculosis "emergencia sanitaria mundial". En Argentina los últimos reportes notificaron 11.240 nuevos casos de tuberculosis en el 2006 (OPS, Ministerio de Salud), con casi mil muertes/año. Desde el año 2001, el programa nacional de control de tuberculosis, como el país en general, sufrió una gran crisis que afectó la capacidad de brindar a la población el mejor y más efectivo método de detección y control de un problema de enorme repercusión en la salud pública. Esta problemática afectó gravemente el desarrollo de las acciones, que en el futuro hará que su efecto se refleje en la situación epidemiológica del país. Asimismo, la interacción tuberculosis-virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) está ocasionando efectos devastadores (2): la infección por VIH ha emergido como el principal factor predisponente para el desarrollo de tuberculosis (primaria o reactivación), la co-infección VIH-M. *tuberculosis* constituye una combinación letal, ya que cada una de estas infecciones individualmente acelera el progreso de la otra, siendo la infección por este

patógeno intracelular una de las principales causas de muerte en individuos VIH positivos (VIH<sup>+</sup>). A este respecto, por un lado, la tuberculosis empeora el estado de la infección por el virus VIH, incrementa la replicación viral, disminuye la inmunidad y acelera el inicio del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (3). Más aún, la co-infección por el virus VIH incrementa marcadamente el riesgo de progresión a tuberculosis activa, ya que la habilidad del huésped de controlar la infección bacteriana se encuentra limitada (4). A esto se agrega el significativo problema clínico constituido por la tuberculosis multiresistente, lo cual se asocia con alta morbilidad y mortalidad.

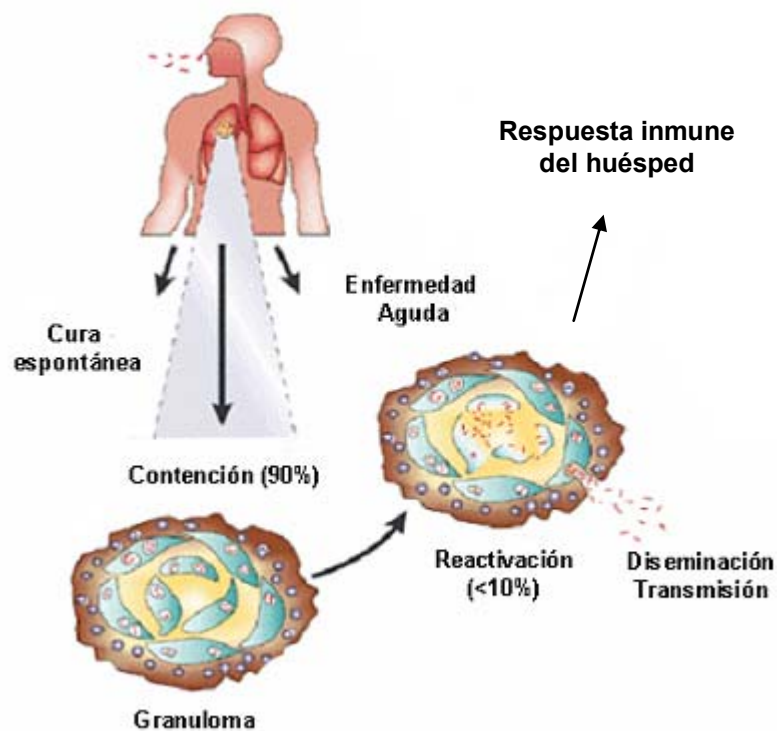
Aunque ha sido demostrada la eficiencia en la prevención de formas severas de tuberculosis infantil, varios ensayos clínicos (5) han sugerido que la BCG no previene la infección por el bacilo tuberculoso y que confiere escasa protección frente a la tuberculosis pulmonar en adultos. Como consecuencia, a pesar del uso de la vacuna BCG en ciertos países como la Argentina, la tuberculosis continúa siendo una epidemia global por lo que el diseño de una nueva vacuna efectiva constituye una necesidad urgente. Más aún, nuevas estrategias experimentales han mostrado ser prometedoras (5), pero el desarrollo de una vacuna eficiente contra la tuberculosis claramente depende de una completa comprensión de la respuesta inmune del huésped frente a la infección por este patógeno (6).

Un tercio de la población mundial está latentemente infectada con *M. tuberculosis*. Luego de la infección, se establece un balance entre el huésped y el patógeno, y el tipo de respuesta inmune montada contra la bacteria influenciará fuertemente el curso de la enfermedad (6). Aproximadamente en

un 5% de los individuos inmunocompetentes, la infección progresa de la forma latente a la enfermedad activa en el transcurso de dos años; en otro 5%, la reactivación de la enfermedad ocurre más tarde (6). La razón de la progresión a la enfermedad no ha sido aún completamente definida. Por otro lado, aproximadamente el 90% de los individuos inmunocompetentes con tuberculosis latente permanecen como individuos sanos, sin síntomas, a lo largo de toda su vida. Estos individuos desarrollan una fuerte respuesta inmune, pero el bacilo permanece indefinidamente en el huésped. Así, en la patogénesis de la tuberculosis es posible distinguir tres etapas (Fig. 1), durante las cuales intervienen múltiples factores, como factores de virulencia propios del microorganismo y una respuesta inmune inapropiada del huésped que conduce a daño tisular (7). **La primera etapa** se inicia con la inhalación de partículas con *M. tuberculosis*, y este contacto fértil con el bacilo conduce a evolución de la infección primaria hacia enfermedad. Sin embargo, sólo 10 % del inóculo inhalado llega a los alvéolos y bronquiolos, donde la bacteria es reconocida y fagocitada por los macrófagos alveolares o las células dendríticas (CD) (7). Una vez dentro de las células, el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* dependerá de la capacidad de evasión de la bacteria y de los mecanismos microbicidas de los macrófagos. Los macrófagos expuestos a *M. tuberculosis* secretan citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6) que contribuirán a la formación de lesiones focales granulomatosas, proceso que lleva 2-3 semanas, y que generalmente conduce a la contención del patógeno (8). A las 3 semanas comienza **la segunda etapa**, desarrollándose una respuesta antígeno específica que contribuye a resolver la infección en un huésped inmunocompetente. Estos individuos permanecerán infectados y

serán portadores del bacilo, pero no presentarán signos de infección (individuos con tuberculosis latente). Los macrófagos infectados, presentes en el interior del granuloma, serán eliminados; en tanto que a nivel periférico se producirá fibrosis (7). Luego de 4-5 semanas de infección progresiva, los granulomas microscópicos aumentan de tamaño y se fusionan con otros granulomas, ocasionando grandes áreas necróticas rodeadas por capas de histiocitos epiteloides, células gigantes multinucleadas, fibroblastos, linfocitos y monocitos. A pesar del pH ácido, la baja concentración de oxígeno y la presencia de ácidos grasos tóxicos, *M. tuberculosis* puede permanecer viable por décadas. La infección puede mantenerse en esta etapa o progresar hacia la siguiente etapa, según la inmunidad mediada por células. Si la misma es apropiada, el granuloma se resolverá, dejando pequeñas lesiones fibrosas calcificadas (7). **La tercera** y última etapa se produce por reactivación del bacilo latente, comenzando una infección aguda secundaria; si bien la infección secundaria también puede ocurrir por inhalación adicional de *M. tuberculosis*. Actualmente se desconoce el mecanismo responsable de la reactivación, pero está claramente asociado a factores del sistema inmune del huésped, ya que condiciones que afectan al mismo (infección por VIH, terapia con esteroides, edad avanzada, desnutrición), favorecen el proceso de reactivación. En estos casos, los macrófagos infectados pueden escapar del granuloma ocasionando diseminación hacia el ganglio linfático regional. Si la inmunidad mediada por células es inadecuada, la respuesta de hipersensibilidad retardada tratará de combatir a los bacilos que se multiplican, pero a la vez ocasionará destrucción del tejido pulmonar llevando a la formación de cavidades. La reactivación que progresa a formación de

cavidades, con multiplicación extracelular en altísimos números de la bacteria, favorece la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y de alta virulencia (7).



**Figura 1. Tuberculosis: de la infección a la enfermedad activa.** Existen tres etapas o resoluciones diferentes en la infección humana por *M. tuberculosis*. La frecuencia de la cura espontánea es desconocida, pero se supone que es poco frecuente. En el huésped inmunocomprometido, la infección puede desarrollarse directamente luego de la infección. En la mayoría de los casos, las micobacterias son inicialmente contenidas y la enfermedad se desarrolla luego como resultado de la reactivación. El granuloma es el sitio de infección, persistencia, patología y protección. (Figura adaptada de *Nature Reviews Immunology* (2001; 1:20–30).

### Respuesta inmune del huésped contra *M. tuberculosis*

#### *Respuesta Inmune Innata:*

La respuesta innata frente al bacilo no ha sido aún completamente dilucidada pero es claramente importante ya que algunos individuos con



exposición primaria a *M. tuberculosis* no se infectan. Más aún, datos epidemiológicos, avalan el rol de la respuesta inmune innata en la tuberculosis humana (9).

Los macrófagos alveolares residentes son el primer tipo celular involucrado en la fagocitosis de *M. tuberculosis* (9). Luego de este primer encuentro, las CD y los macrófagos derivados de monocitos también forman parte del proceso fagocítico. Un gran número de receptores son críticos en el reconocimiento de *M. tuberculosis* por los fagocitos (Fig. 2), incluyendo los receptores del complemento (CR), el receptor de manosa (MR), el receptor DC-SIGN en las CD, el receptor de la proteína surfactante A (Sp-A), el receptor "scavenger" clase A, las lectinas de unión a manosa (MBL), y posiblemente la dectina-1 (10). En los macrófagos humanos, los receptores primarios para el reconocimiento de *M. tuberculosis* son el MR y CR3 (10). En contraste en las CD humanas, DC-SIGN es el principal receptor involucrado en la fagocitosis de este microorganismo (10). Además de la fagocitosis, el reconocimiento de *M. tuberculosis* o sus productos es un paso crucial en la respuesta inmune efectiva contra este patógeno (9). Los receptores tipo Toll (TLR) son esenciales para el reconocimiento de componentes microbianos por macrófagos y CD; y la activación de estos receptores en la respuesta inmune innata permitirán la subsiguiente activación de la respuesta inmune adaptativa frente a distintos patógenos (9, 11). Varios estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que los TLRs son reguladores críticos de la respuesta inmune en tuberculosis. Estudios *in vitro* indican que *M. tuberculosis* es reconocido por el TLR2/1/6, TLR9, y posiblemente también por TLR4 (55, 56). Ha sido propuesto que el TLR2 tiene un rol central en el reconocimiento de *M. tuberculosis* por los macrófagos (10). La pared celular

de las micobacterias contiene un gran número de ligandos proinflamatorios del TLR2, incluyendo lipoproteínas, peptidoglicanos complejos, lípidos, y lipoarabinomananos (LAM) (10). Los LAM de *M. tuberculosis* poseen una terminación de manosa no estimuladora (ManLAM), la cual está ausente en las micobacterias de crecimiento rápido (ara-LAM). Ha sido demostrado que ara-LAM pero no Man-LAM es un ligando del TLR2 (10). Por último, trabajos recientes sugieren que el TLR1, TLR6 y TLR9 cooperarían con el TLR2 para el reconocimiento de la micobacteria por macrófagos y CD (10).

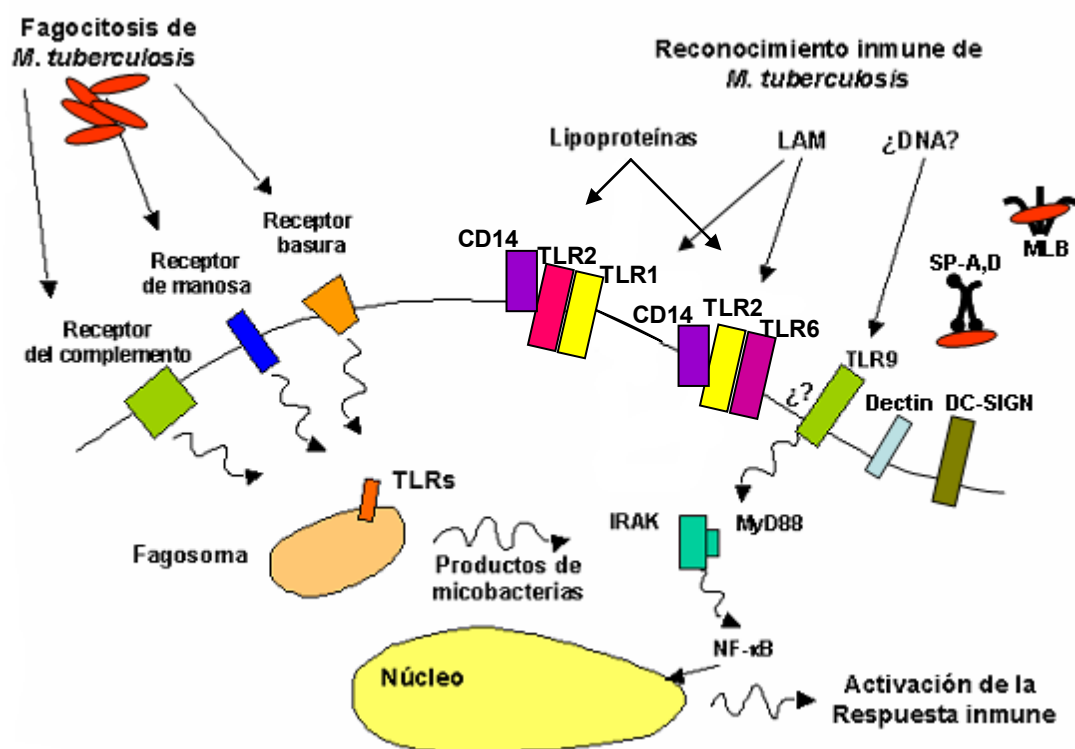


Figura 2. *Fagocitosis y reconocimiento inmune de M. tuberculosis*. Varios receptores han sido identificados para el reconocimiento de *M. tuberculosis* por macrófagos y CD (ver texto para más detalle). Luego de la unión a los TLR, vías de señalización comunes son activadas que llevan a la activación celular y la producción de citoquinas. Los TLR se expresan no solo en la superficie celular sino también en los fagosomas, por lo tanto la activación inmune puede ocurrir en presencia o ausencia de fagocitosis. Por otro lado, la fagocitosis sola, probablemente no lleva a la activación inmune sin la acción de los TLR. Sp-: receptor de las proteína surfactantes, MBL: lectinas de unión a manosa, LAM: lipoarabinomananos. (Adaptado de *Clin Microbiol Rev* 15:294).\*

El reconocimiento de *M. tuberculosis* durante la respuesta inmune innata por las células fagocíticas lleva a la activación celular y la rápida producción de citoquinas proinflamatorias (Fig. 3). Estas citoquinas y quemoquinas reclutan células inflamatorias (células T, neutrófilos, y células NK) al área de infección y coordinan la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* (10). La resolución favorable de la infección depende entonces en gran parte, de la red de citoquinas establecida. El balance entre *M. tuberculosis* y la respuesta inmune del huésped determina la resolución de la infección. Luego de que *M. tuberculosis* es fagocitado por los macrófagos alveolares, se desarrolla una respuesta inflamatoria local no específica (9). Esta respuesta, como se dijo anteriormente es regulada por una red compleja de citoquinas proinflamatorias, anti-inflamatorias y quemoquinas. La mayoría de los mediadores en este punto (IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-18, entre otros) son producidos por macrófagos o CD, pero el IFN- $\gamma$  es secretado por diversos tipos celulares, incluyendo células NK, células T  $\gamma\delta$ , y células T restringidas a CD1 (9). Aunque las células NK y las células T han sido consideradas por mucho tiempo como las fuentes exclusivas de IFN- $\gamma$ , publicaciones recientes han demostrado que esta citoquina Th1 podría también ser producida por monocitos, macrófagos y CPA (12, 13). Más aún, ha sido demostrado que las CD humanas de individuos sanos producen IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con BCG por un mecanismo dependiente de TLR2 (14).

En resumen, esta respuesta inicial determina el crecimiento local de *M. tuberculosis* o la contención de la infección. Las células fagocíticas poseen un rol clave en el inicio de la respuesta local inflamatoria, así como también en la presentación antigénica y la iniciación de la inmunidad mediada por células.

Dada la importancia de la respuesta inmune innata en la generación de una respuesta adaptativa protectora, las diferencias individuales en la resolución de la infección por *M. tuberculosis*, pueden en parte ser explicadas por la eficiencia de varios mecanismos de la respuesta innata del huésped (9).

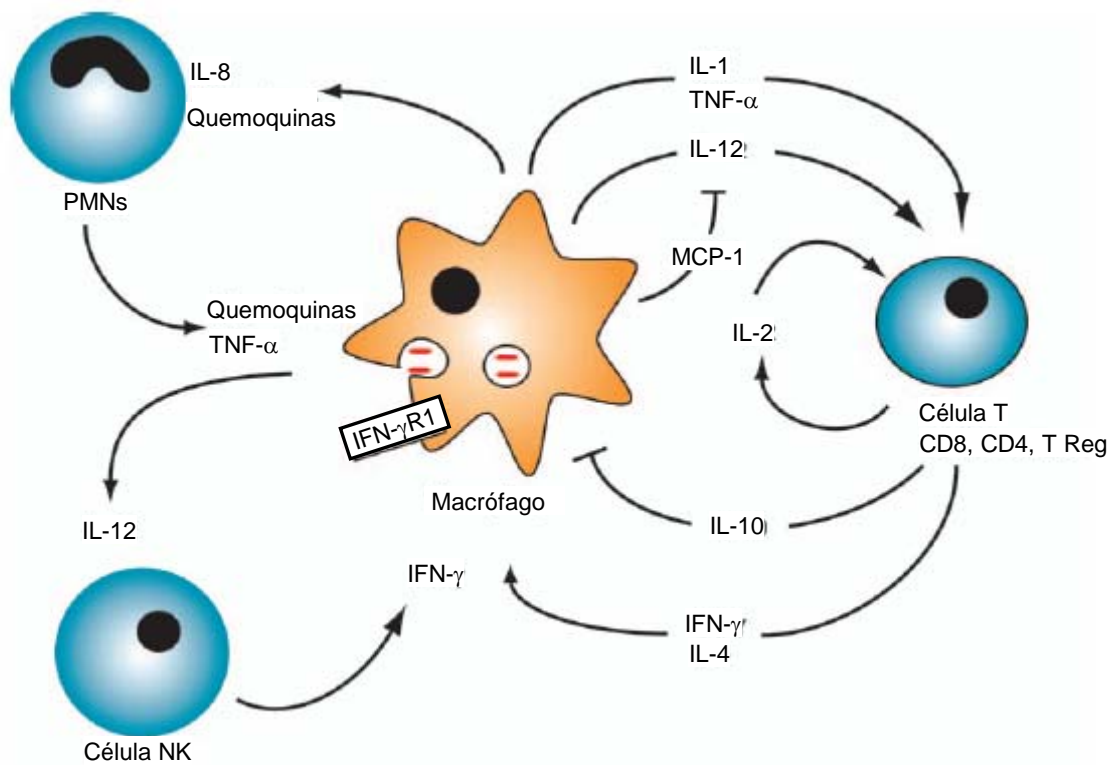


Figura 3. *Respuesta inmune celular contra M. tuberculosis.* Luego de la infección, los macrófagos activados secretan citoquinas y quemoquinas que activan macrófagos, células T, neutrófilos y células NK. Las células T y las células NK producen IFN- $\gamma$  que, junto con otras citoquinas, induce la activación de los macrófagos contribuyendo a la eliminación de *M. tuberculosis*. Adaptado de *Immunol. Rev.*, 219:167.

### **Respuesta inmune adaptativa en tuberculosis:**

**La respuesta Th1.** La inmunidad contra micobacterias consiste en una compleja serie de interacciones entre varias poblaciones celulares que deben controlar y contener la infección, así como prevenir la reactivación de la

misma. La inmunidad celular contra el patógeno involucra una crítica interrelación entre linfocitos T, células presentadoras de antígeno (CPA) (macrófagos y CD) y mediadores solubles (citoquinas y quemoquinas). La respuesta inmune protectora en tuberculosis puede ser definida como una respuesta Th1 ya que la inmunidad celular y la producción de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es crítica para el control de la enfermedad en humanos y animales (15-17). Los eventos relacionados con la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped frente a la micobacteria empiezan con el arribo de *M. tuberculosis* al pulmón, una interacción coordinada entre la respuesta innata y la adaptativa es esencial.

Luego de la fagocitosis de la micobacteria por los macrófagos, los antígenos proteicos de la bacteria son convertidos en péptidos y presentados a las células T por las CPA (18). De esta manera, cuando las células T se encuentran por primera vez en la periferia con el antígeno presentado por las CPA, se inicia un proceso de diferenciación celular que incluye el compromiso de las células T hacia la producción de un patrón de citoquinas específico. La mayoría de las funciones de las ramas humoral y celular del sistema inmune adaptativo son llevadas a cabo por células Th. Estas funciones son facilitadas por la habilidad de estas células para diferenciarse luego de activación en las subpoblaciones Th1 y Th2, favoreciendo así la inducción de funciones inmunes celulares y humorales, respectivamente, y permitiendo de esta manera al organismo responder a microorganismos intracelulares y extracelulares (19). Las células diferenciadas hacia un fenotipo Th1 secretarán IL-2, IFN- $\gamma$  y linfoxina- $\alpha$  mientras que las células Th2 producirán IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (20).

El proceso de diferenciación a linfocito Th1 o Th2 puede ser influenciado por la concentración y vía de administración del antígeno, el tiempo de interacción entre el receptor de la célula T (TCR) y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)-péptido, el tipo de CPA que estimula a la célula T y moléculas coestimuladoras presentes en las membranas celulares tanto de las CPA como de los linfocitos T, aunque los reguladores más potentes de la diferenciación Th son indudablemente las citoquinas. La IL-4, citoquina crítica producida por células Th2, ejerce su efecto sobre células Th1 a través de la vía de señalización de Stat 6 (21, 22). Por otro lado, la IL-12, que señala a través de Stat4, es el principal inductor del desarrollo de células efectoras Th1. Ha sido demostrado que los ratones deficientes en IL-12, en el receptor  $\beta 1$  de IL-12 o en Stat 4, muestran respuestas Th1 marcadamente reducidas (21, 22). De esta manera, las citoquinas producidas por cada subpoblación Th conforman redes de regulación positiva y negativa que dirigen la polarización de las células Th. La actividad de las citoquinas da como resultado el predominio de un fenotipo Th particular (21, 22).

Aunque, existe una fuerte respuesta humoral durante la tuberculosis, el rol de las células B no está bien definido. Más aún, en individuos con defectos en las vías clásica y alternativas del complemento, la vía de unión a lectinas, o neutropenia no se ha observado incremento de la susceptibilidad a la tuberculosis (23). Por el contrario, las células T son de importancia fundamental en la resistencia frente a las micobacterias, como se observa en pacientes con enfermedades hereditarias tales como inmunodeficiencias combinadas severas, en los cuales se observa infección por BCG diseminada o fatal, y en pacientes con tratamientos inmunosupresores de la función T que presentan

mayores riesgos de enfermedades micobacterianas (23). Dado que *M. tuberculosis* reside en vacuolas intracitoplasmáticas, los antígenos son presentados a las células T principalmente en el contexto de CMH II. Consecuentemente, las células T CD4<sup>+</sup> son de importancia crítica en el control de la infección, como ya ha sido demostrado exhaustivamente en modelos animales deficientes en células T CD4<sup>+</sup> (6). En humanos, el ejemplo más dramático está representado por los individuos VIH<sup>+</sup> infectados con *M. tuberculosis* en forma latente. Estos pacientes tienen un riesgo anual del 8-10% de desarrollar tuberculosis activa, comparado con un 10% de riesgo a lo largo de toda la vida en individuos VIH negativos PPD<sup>+</sup> (6, 15).

En los macrófagos, *M. tuberculosis* induce un incremento en los niveles de ARN mensajero (ARNm) de varios genes proinflamatorios, particularmente el TNF- $\alpha$  (24). Esta citoquina dispara la expresión de quemoquinas por macrófagos (24), que atraen a las células al sitio de infección y son importantes en la formación y mantenimiento del granuloma. El transporte de los antígenos micobacterianos desde los pulmones hacia el ganglio linfático es mediado por las CD pero no por los macrófagos (11). Interesantemente, en las CD, *M. tuberculosis* estimula la producción de IL-12, (6) que activa a células NK y células T, induciendo la secreción de más IFN- $\gamma$  y creando así un sistema de retroalimentación positiva que favorece la polarización de linfocitos T precursores a linfocitos T productores de citoquinas de tipo Th1 (25). Las células Th1 tienen, como dijimos anteriormente, un rol primario en la producción de IFN- $\gamma$  pero también poseen otras funciones independientes del IFN- $\gamma$ , como la producción de linfoxina, esencial para la migración de linfocitos al sitio de infección (6). La infección por *M. tuberculosis* resulta así, en la inducción de un

gran número de citoquinas, algunas de ellas tienen un rol esencial en la resistencia a la infección. Por ejemplo, los individuos con defectos Mendelianos en el gen que codifica para la subunidad p40 de IL-12 e IL-23 (importantes inductores de IFN- $\gamma$ ) o en el gen que codifica para la cadena  $\beta$ 1 de los receptores de IL-12 e IL-23 poseen una mayor susceptibilidad a infecciones por micobacterias (23). Ratones deficientes en IFN- $\gamma$  infectados con *M. tuberculosis* mueren rápidamente debido a enfermedad diseminada, con una alta carga bacteriana y granulomas necróticos y purulentos (17). Los individuos con mutaciones en los genes del receptor de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R1 y R2) o en componentes de la vía intracelular del IFN- $\gamma$  tales como la proteína STAT1, pueden desarrollar infecciones fatales diseminadas por BCG o infecciones con micobacterias no-tuberculosas, durante la niñez (16). El IFN- $\gamma$  es la principal citoquina activadora de macrófagos y en conjunto con TNF- $\alpha$ , estimulan la producción de la oxido nítrico sintetasa inducible (NOS-2), responsable de los altos niveles de oxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno que poseen funciones bactericidas frente a *M. tuberculosis* en ratón (17). El IFN- $\gamma$  también estimula la expresión de LRG-47, una nueva GTPasa que induce en los macrófagos la eliminación de *M. tuberculosis*, independientemente de NOS-2 (26). Conjuntamente con el IFN- $\gamma$ , LRG-47 induce procesos de autofagia en los macrófagos, así estas células vencen el bloqueo de la maduración del fagosoma inducido por la micobacteria e inhiben la supervivencia intracelular de la misma (27). Por lo tanto, aunque el IFN- $\gamma$  solo no puede controlar la infección por *M. tuberculosis*, es sin lugar a duda necesario para la generación de respuestas protectoras frente a este patógeno. Por último, sin bien esta citoquina podría también inducir inmunopatología; ha sido demostrado que



existen mecanismos regulatorios que controlan su propia acción y limitan la respuesta inflamatoria exacerbada (17).

Las células T CD8 han sido consideradas de menor relevancia que las CD4<sup>+</sup> en el control de la infección por micobacterias. Sin embargo, los ratones deficientes en  $\beta$ 2-microglobulina sucumben rápidamente luego del desafío con *M. tuberculosis* (28), demostrando el rol de las células T restringidas a CMH I. Recientemente ha sido descrita una vía de presentación cruzada en la tuberculosis humana y murina por vesículas apoptóticas. Este mecanismo representa una activación específica alternativa para controlar a un patógeno que no posee acceso a la vía de procesamiento del CMH I (29). Las células T CD8<sup>+</sup> podrían contribuir a la respuesta inmune frente al bacilo tuberculoso, al menos por tres mecanismos: secreción de IFN- $\gamma$ , lisis de células infectadas por la interacción Fas/Fas-ligando o mediado por las acción de perforinas y granzimas, y actividad micobactericida directa (6).

Por otro lado, tanto las células T con receptores CD1 que reconocen los lípidos y glicolípidos de *M. tuberculosis*, como las células T  $\gamma\delta$  que reconocen fosfoantígenos, participan en la generación de una respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* (6).

Por último, si la respuesta Th1 representa el patrón protector necesario para el control de la tuberculosis, entonces la IL-4 y otras citoquinas supresoras de citoquinas Th1 ¿podrían estar involucradas en la progresión de la enfermedad? IL-4 y otros marcadores de actividad Th2 tales como IgE e IgG4 se encuentran frecuentemente en pacientes con tuberculosis avanzada (30). Sin embargo, algunos estudios en animales no demuestran claramente un dicotomía del patrón Th1-Th2 en la respuesta inmune en tuberculosis (31). Más

aún, ratones deficientes en el gen de IL-4 e infectados con *M. tuberculosis* muestran cargas bacterianas similares a los ratones salvajes (32). IL-4 y TNF- $\alpha$  actúan de manera sinérgica, incrementando la patología de la enfermedad y la fibrosis, y esta función parecería ser más importante que los efectos inhibidores de las respuestas Th1 mediados por la IL-4 (33). Aún no ha sido dilucidado entonces, si IL-4 causa o simplemente refleja la actividad de la enfermedad en la tuberculosis humana. Más aún, ha sido sugerido que la falla de la respuesta inmune en tuberculosis podría explicarse por una respuesta Th1 débil o suprimida más que por una fuerte respuesta Th2. Por otro lado, la importancia de la IL-10, un fuerte supresor de la respuesta Th1, en la regulación de la respuesta inmune en tuberculosis ha tomando cada vez más fuerza. IL-10 es capaz de inducir reactivación de la enfermedad en animales (34). Han sido asociados polimorfismos de gen de la IL-10 en la posición 1082 con la tuberculosis humana, particularmente la pleuresía tuberculosa (34). Más aún, algunas poblaciones humanas muestran expresión incrementada de IL-10 la cual ha sido correlacionada con vacunación de BCG no eficiente (35). En forma similar a la IL-10, el TGF- $\beta$ 1 regula negativamente la producción de IFN- $\gamma$  y es también un factor inhibitorio de la activación de macrófagos producido en altas cantidades por los monocitos en pacientes con tuberculosis (36).

Aunque la supresión del IFN- $\gamma$  (y de las respuestas Th1) podrían ocurrir por la acción de ciertas citoquinas inhibitorias, en la mayoría de las respuestas frente a micobacterias se observa una fuerte producción de IFN- $\gamma$ , y sin embargo no se logra eliminar definitivamente a *M. tuberculosis* del huésped. Por lo tanto, la respuesta inmune observada en tuberculosis no puede ser interpretada sólo en la base del paradigma Th1-Th2 (6).

### *El nuevo paradigma: las células Th17 y su función en la respuesta inmune.*

La hipótesis Th1/Th2 fue desarrollada en un intento de responder dos preguntas claves que los inmunólogos confrontaban a mediados de los 80s: (i) ¿Existe una subpoblación distinta de células Th que media la hipersensibilidad de tipo retardada? y (ii) ¿Existe otra subpoblación Th que provee la colaboración a las células B, llevando a la producción de anticuerpos? La respuesta a estas preguntas, postulada por Robert Coffman y Tim Mosmann 20 años atrás, tuvo un gran impacto en la manera en que los inmunólogos veían el mundo de la inflamación (37).

Como todas las hipótesis, ciertos fenómenos, particularmente en el área del daño tisular mediado por las células T, no pueden ser explicados por la hipótesis Th1/Th2. Más aún, las respuestas de células T efectoras exacerbadas pueden llevar a enfermedades autoinmunes y alergias. Las células Th1 son altamente proinflamatorias y han sido asociadas a inducción y progresión de varios desórdenes autoinmunes. Sin embargo, sorprendentemente, la pérdida de la señalización de IFN- $\gamma$  en ratones deficientes para esta citoquina o su receptor no confiere resistencia a la autoinmunidad; por el contrario, estos ratones son aún más susceptibles (38-40). Estas observaciones sugirieron la existencia de una subpoblación adicional de células capaces de inducir inflamación tisular y autoinmunidad (41). A lo largo de los últimos cinco años, ha habido una importante evolución que condujo a los inmunólogos a revisar la hipótesis Th1 y a desarrollar un nuevo modelo para explicar la regulación del daño tisular que produce patología en varias condiciones autoinmunes e infecciones microbianas (37). Esta búsqueda llevó a la identificación de las células productoras de IL-17 (Th17) (42, 43), dando lugar más tarde a la

“hipótesis Th17”. Las células Th17 producen IL-17, y en menor medida IL-6 y TNF. La IL-17 es una citoquina con actividades pleiotrópicas, coordina la inflamación de los tejidos mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias (como IL-6 y TNF), quemoquinas y metaloproteasas, lo cual media la infiltración y destrucción tisular (44). Esta citoquina también está involucrada en la proliferación, maduración y quimiotaxis de los neutrófilos (41). Los ratones deficientes en el receptor de IL-17 son más susceptibles a infecciones pulmonares bacterianas debido al reclutamiento reducido de neutrófilos al pulmón (45). Similarmente, la sobreexpresión de IL-17 en el pulmón induce la expresión de quemoquinas y la inflamación tisular por leucocitos (46). Más aún, la IL-17 coestimula a las células T y aumenta la maduración de las CD (44).

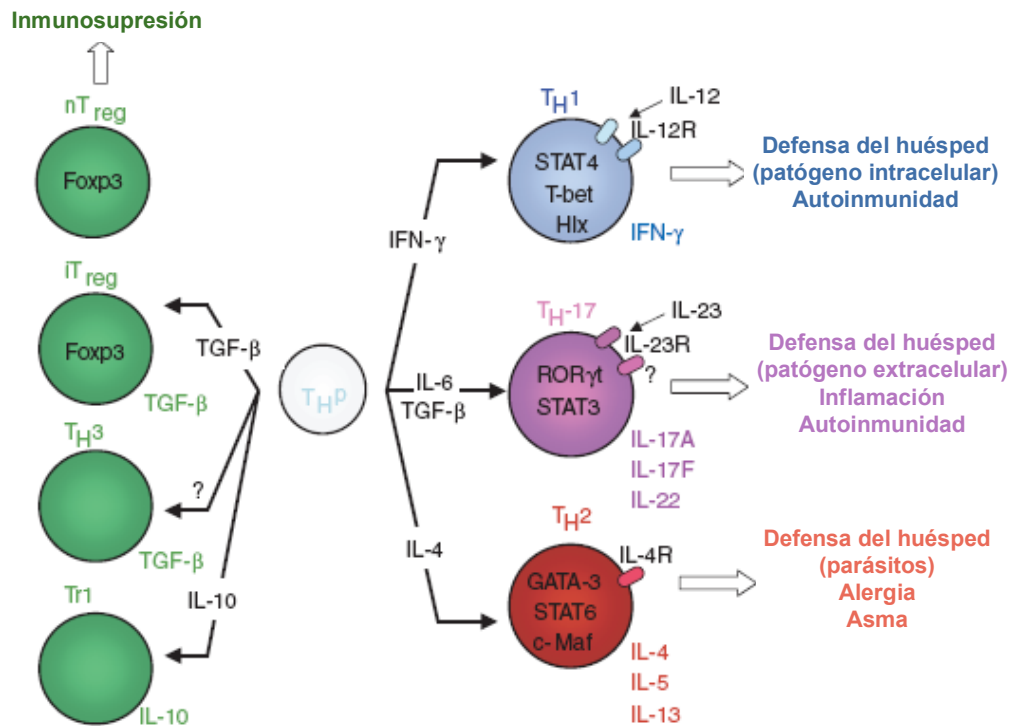
Interesantemente, ha sido demostrado por varios grupos de investigación que existe una interacción recíproca entre IFN- $\gamma$  e IL-17. Park y colaboradores, por ejemplo, demostraron que el agregado exógeno de IFN- $\gamma$  e IL-4 reduce la producción de IL-17, pero que estas citoquinas por separado no pueden atenuar la producción de IL-17 (46). Más aún, la encefalitis autoinmune experimental (EAE), causada por IL-23 e IL-17, empeora con la administración de anticuerpos neutralizantes contra IFN- $\gamma$  (42). Así, las poblaciones Th1 y TH17 son reguladas recíprocamente, y las células Th1 actuarían como un freno anti-inflamatorio, protegiendo a los tejidos del daño inducido por las células Th17 (37). A su vez, los estímulos que inducen la generación de células Th17 y las células T regulatorias (Treg) son mutuamente excluyentes. (47-49). Esta regulación cruzada reveló la característica dual de otras dos citoquinas: IL-6 y TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  funciona como un regulador crítico

tanto del daño tisular mediado por las células Th17 cuando colabora con la IL-6, como activador de células Treg FoxP3<sup>+</sup>, en ausencia de IL-6 (37).

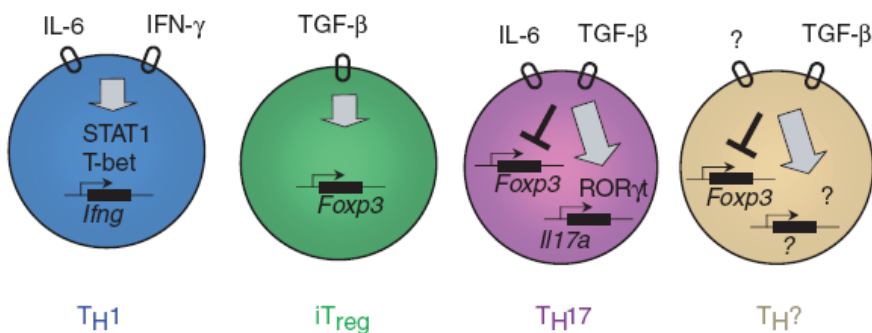
Varias poblaciones de células Treg capaces de controlar las respuestas T efectoras han sido descritas (50). Estas incluyen las células T CD4<sup>+</sup> productoras de TGF- $\beta$  (Th3), que son capaces de inhibir algunas respuestas de células T *in vivo* y las células T regulatorias CD4<sup>+</sup> (Tr1) productoras de altos niveles de IL-10 (6). Las células Tr1 y Th3 pueden desarrollarse a partir de células T CD4<sup>+</sup> convencionales cuando son expuestas a condiciones estimuladoras específicas, por lo que son llamadas células Treg "inducibles". Las células Treg naturales son originadas a partir de precursores en el timo y comprenden el 5-10% del total de las CD4<sup>+</sup> periféricas. Los efectos supresores de las Treg naturales son mediados por contacto célula-célula, aunque esto no excluye algunas acciones mediadas por citoquinas (6).

En resumen, tres poblaciones diferentes de células efectoras Th han sido hasta la fecha identificadas, células Th1, Th2 y Th17, las cuales pueden diferenciarse a partir de células T vírgenes por diferentes citoquinas y mediante la inducción de programas genéticos diferentes (Fig. 4) (41). En contraste a la diferenciación Th1 y Th2, IL-6 y TGF- $\beta$  son requeridas para la diferenciación de las células Th17 a partir de precursores vírgenes, pero IL-23 podría ser importante para la expansión y supervivencia de esta subpoblación (41). A nivel transcripcional la diferenciación de los linfocitos Th17 es dependiente del factor de transcripción ROR $\gamma$ t. Teniendo en cuenta los requerimientos de citoquinas para la diferenciación de las células Th17, ha sido propuesto que existe una relación recíproca entre las células Th17 y las células Treg Foxp3<sup>+</sup>, en la cual la IL-6, una proteína de fase aguda inducida durante la inflamación,

actúa como un "pívor" determinando si la respuesta inmune es dominada por las células Th17 altamente inflamatorias o las células Treg (Fig. 5).



**Figura 4. Diferenciación de los linajes T CD4<sup>+</sup>.** Las células T CD4 precursoras (Th) pueden diferenciarse a tres subpoblaciones de células T efectoras (Th1, Th2 y Th17) y varias subpoblaciones de células Treg, incluyendo células Treg inducibles (iTreg), células Tr1 y Th3. Las células Treg naturales (nTreg) son generadas a partir de precursores de células T CD4<sup>+</sup> del timo. La diferenciación de estas subpoblaciones es determinada por citoquinas y factores de transcripción específicos, y cada subpoblación posee funciones especializadas.



**Figura 5. Inducción selectiva de subpoblaciones celulares por TGF-β en asociación con otras citoquinas.** La señalización de STAT1 mediada por IFN-γ lleva a la inducción de T-bet y a la diferenciación de células Th1. La producción de IFN-γ es luego potenciada por citoquinas inflamatorias como IL-6. TGF-β induce la expresión de Foxp3 en células T vírgenes y su diferenciación a células Treg inducibles. IL-6 es un potente inhibidor de la inducción de Foxp3 por TGF-β. Sin embargo, la estimulación con TGF-β e IL-6 resulta en la expresión de RORγt y la consecuente diferenciación de las células TH-17. Es también posible que TGF-β antagonice y

coopere con muchas otras citoquinas, disparando la inducción selectiva de factores de transcripción y la diferenciación de otras subpoblaciones de células Th no identificadas hasta el momento.

Por lo tanto, durante un estado estacionario, cuando el sistema inmune no está activado, el TGF- $\beta$  (producido localmente y ubicuamente por varios tipos celulares, incluyendo CD y Treg naturales) favorece la generación de Treg inducibles, las cuales suprimen la inflamación y previenen el desarrollo de autoinmunidad (Fig. 6). Sin embargo, luego de la infección, la IL-6 es producida por el sistema inmune innato, inhibiendo así la generación de células Treg y, conjuntamente con el TGF- $\beta$ , induciendo la diferenciación de células Th17 proinflamatorias, mientras que el IFN- $\gamma$  llevaría a la diferenciación de células Th1.

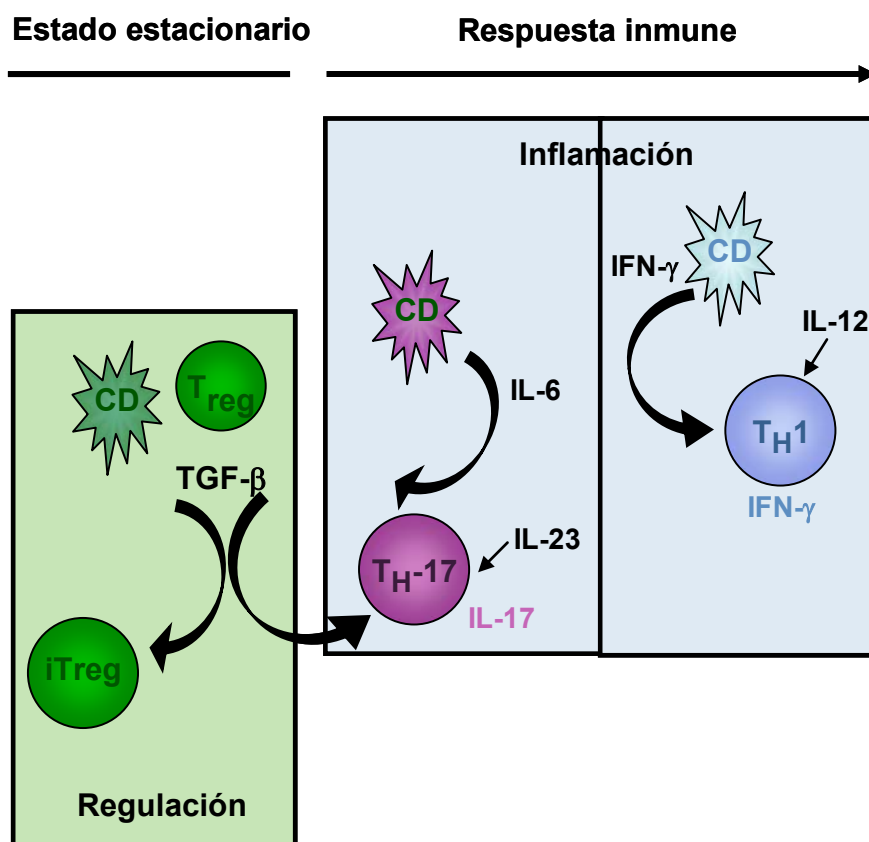


Figura 6. El microambiente de citoquinas: un factor determinante en el desarrollo de la respuesta inmune. En un estado estacionario (ausencia de infección o daño), el TGF- $\beta$  producido localmente por varios tipos celulares (incluyendo CD y nTreg), promueve la inmunosupresión y

regulación. También induce la diferenciación de células Treg que participan en la regulación inmune. Sin embargo, luego de infección y/o condiciones inflamatorias, IL-6 en combinación con TGF- $\beta$  inducen la diferenciación de las células Th17, mientras que el IFN- $\gamma$  induce la diferenciación de las células Th1. Estas dos subpoblaciones, luego actuarán independientemente o juntas en la inducción de la inflamación.

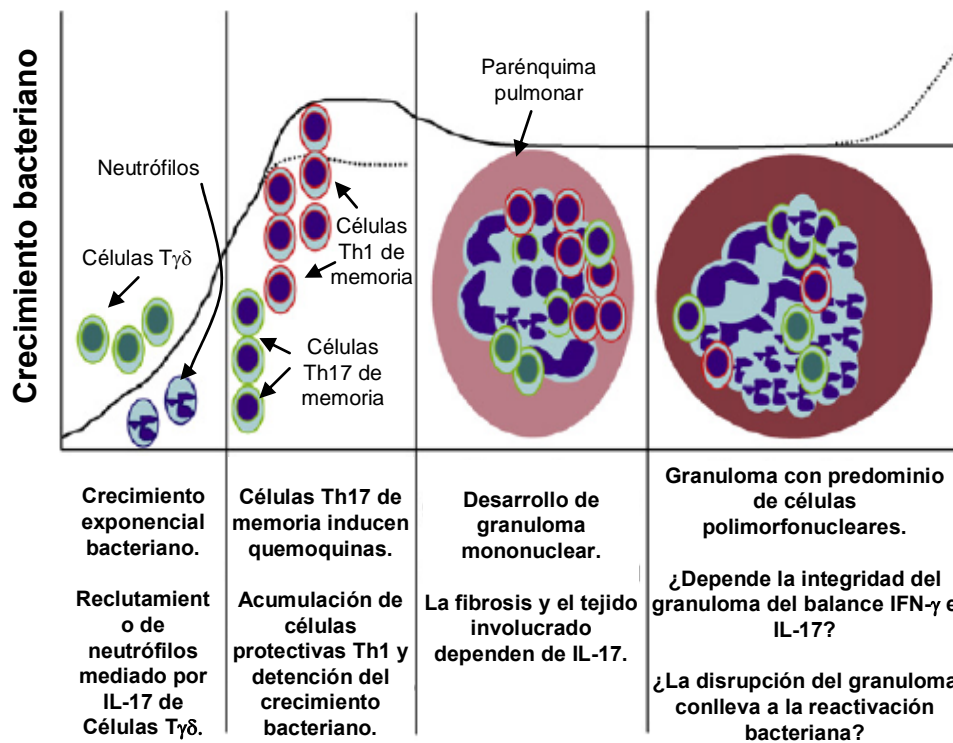
***Th17 y Tregs en tuberculosis.*** A lo largo de los últimos años, el rol de las células Th17 y de las Treg ha sido estudiado en tuberculosis. Así, ha sido reportado que *M. tuberculosis* induce la producción tanto de IL-12p70 como de IL-23 en CD (51-53). Más aún, ha sido demostrado que la IL-23 es esencial para la generación de la respuesta Th17 frente a la infección por micobacterias (54). IL-23 es también capaz de inducir células Th1 productoras de IFN- $\gamma$ , en respuesta a *M. tuberculosis*, en ausencia de IL-12p70 (51). Sin embargo, ni la respuesta Th1 ni la protección se pierden en ausencia de IL-23 (51). Contrariamente, cuando se utilizó un adenovirus de IL-23 previo a la infección, este incrementó la respuesta de IFN- $\gamma$  e IL-17 en el pulmón, confiriendo una mayor protección (55). Así, estos resultados sugieren que la IL-23 podría tener un rol secundario a IL-12 en la inducción de la respuesta inmune protectora mediada por IFN- $\gamma$  (54).

Las células T asociadas con la respuesta inmune innata pueden también producir IL-17. En particular, la células T  $\gamma\delta$  son una fuente primaria de de producción de IL-17 en respuesta a *M. tuberculosis* en modelos murinos de infección (52, 56). En ausencia de IL-17 se observó inflamación granulomatosa reducida, menor inducción de quemoquinas y de la acumulación temprana de neutrófilos (56). La ausencia de IL-23 e IL-17 en el pulmón incrementa la severidad de la inflamación. Más aún ha sido demostrado recientemente que IL-17 altera la supervivencia (57) y que esta citoquina conjuntamente con IL-23 alteran el perfil funcional de los neutrófilos (58). Estos datos sugieren que estas



citoquinas podrían estar involucradas en el mantenimiento de la integridad del granuloma (54).

En resumen, ha sido propuesto en ratón un modelo que sugiere que durante la interacción crónica entre el huésped y el patógeno en tuberculosis, IL-23 e IL-17 poseen roles a lo largo de toda la infección (Fig. 7). Las bacterias se depositan en los pulmones y las células T  $\gamma\delta$  producen IL-17 para reclutar neutrófilos. Si los ratones han sido vacunados, las células Th17 de memoria producen quemoquinas y aceleran la acumulación de células Th1. Tanto en la respuesta primaria como en la respuesta de memoria, el arribo de un número suficiente de células productoras de IFN- $\gamma$  correlaciona con la disminución o bloqueo del crecimiento bacteriano. Inicialmente se desarrolla un granuloma mononuclear en el parénquima pulmonar y el tamaño y el contenido del mismo depende de la IL-17. A medida que la infección progresa, el número de linfocitos disminuye y las células polimorfonucleares se incrementan. Más aún, Khader y Cooper proponen que el balance entre las vías IL-12/IFN- $\gamma$  e IL-23/IL-17 define la resolución de la infección por *M. tuberculosis*. El desbalance entre estas dos vías podría resultar en disrupción del parénquima pulmonar y reactivación del crecimiento bacteriano en el pulmón(54).



**Figura 7. Rol de IL-23 e IL-17 en la infección por *M. tuberculosis*.** La tuberculosis representa una interacción crónica entre el huésped y el patógeno, las citoquinas IL-23 e IL-17 desempeñan un rol crucial a lo largo de todas las etapas de la infección. Ver texto para más detalle. *Adaptado de Cytokine, 2008.*

Si bien, el rol de las células Th17 ha sido estudiado con mayor profundidad en el modelo murino, en humanos ha sido demostrado que la IL-23 también promueve la producción de IL-17 mientras que IL-12 reduce la expresión de esta citoquina (59), sugiriendo una regulación cruzada de estas dos citoquinas al igual que en ratón. Más aún, recientemente, fue reportado por primera vez que las células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17 e IL-22 contribuyen a la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* en individuos expuestos y pacientes con tuberculosis (60). Sin embargo, aún quedan muchas preguntas sin responder sobre la función de las células Th17 en humanos.

La respuesta inmune es regulada por un fino balance entre células T efectoras y células T regulatorias. El control de las células Th1 y Th2 por las

células Treg ha sido profundamente caracterizado. Sin embargo, poco se conoce acerca del efecto de condiciones inflamatorias y células T efectoras en el desarrollo y función de las células Treg.

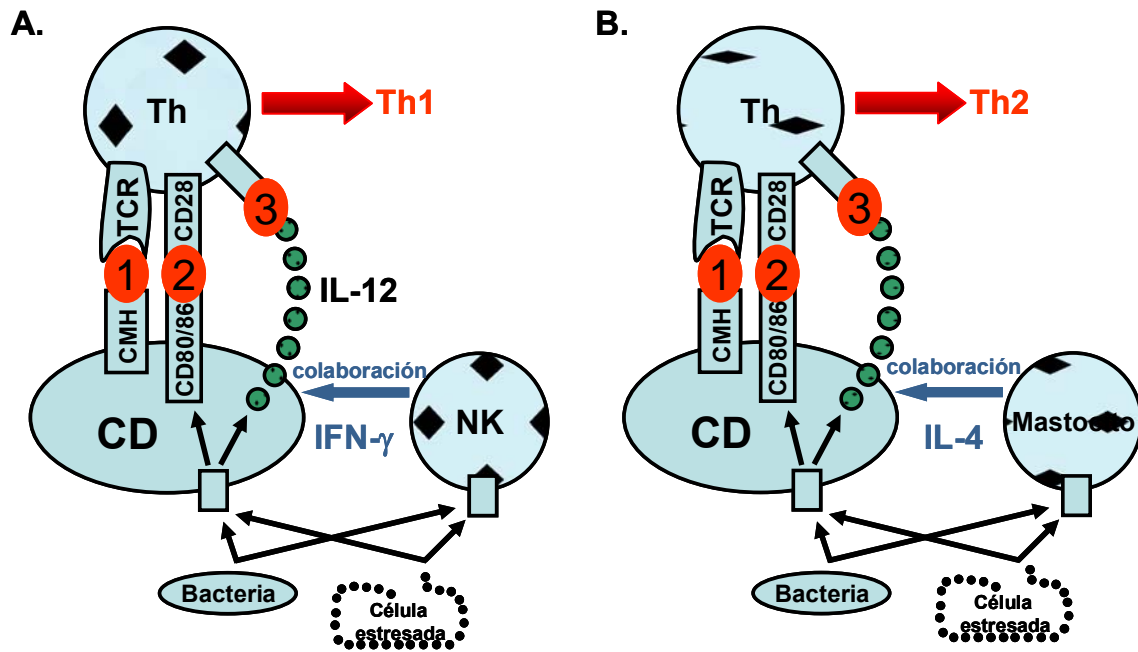
Existen cada vez más evidencias que sugieren que las células Treg suprimen la inmunidad frente a *M. tuberculosis* y podrían por lo tanto contribuir a la patogénesis de la tuberculosis humana (61-64). A este respecto, experimentos realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del Dr. Peter Barnes demuestran que las CMSP de pacientes con tuberculosis tienen porcentajes incrementados de Treg (61). Más aún, las células Treg se expanden en respuesta a estimulación con *M. tuberculosis* a través de un mecanismo que depende de ManLAM y de PGE2 (61). Finalmente, ha sido demostrado que la frecuencia de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en los fluidos pleurales correlaciona inversamente con la respuesta local específica contra *M. tuberculosis* (64).

Así, la tuberculosis es una enfermedad crónica que persiste en el huésped. Esta persistencia lleva a una compleja interacción entre el huésped y el patógeno que va evolucionando en los distintos estadios de la infección. En el huésped varias poblaciones celulares participan en este fino balance con el objetivo de crear una respuesta inmune protectora.

### **Función de moléculas coestimuladoras y proteínas de señalización en la diferenciación Th1/Th2.**

Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo del programa genético que conduce a un linfocito T hacia la diferenciación Th1 o Th2, la

señalización a través de moléculas coestimuladoras puede influenciar este proceso (65). Para activarse y subsecuentemente diferenciarse a célula efectora, el linfocito T nativo requiere de dos tipos de señales enviadas hacia el interior de la célula. Una de estas señales depende del reconocimiento específico que lleva a cabo el TCR, del complejo formado por el antígeno presentado en el contexto de moléculas del CMH sobre la CPA. La segunda señal es enviada a través de la interacción de moléculas coestimuladoras expresadas sobre la CPA, con sus ligandos específicos localizados sobre las células T. Sin embargo datos recientes presentan un nuevo desafío a este modelo de dos señales (y dos tipos celulares), ya que revelan que la polarización Th1 requiere de la presencia de IFN- $\gamma$  provista por un tercer tipo celular (66). La señal tres o polarización dirige la diferenciación de las células T hacia varios fenotipos efectores tales como Th1 y Th2 y es el resultado de la unión de productos microbianos o señales de peligro endógenas con receptores tales como los receptores tipo Toll (TLR) en las CD. Ha sido propuesto que las células NK o células T $\gamma\delta$ , podrían ser las células productoras de IFN- $\gamma$  para la polarización Th1 (Fig. 8). Similarmente, células productoras de IL-4 como mastocitos, NKT,  $\gamma\delta$ , basófilos y eosinófilos podrían determinar la diferenciación hacia el linaje Th2 (67)(Fig. 8).



**Figura 8. Un modelo de tres células para la diferenciación Th1 y Th2.** La activación y diferenciación de los linfocitos Th hacia los linajes Th1 y Th2 requiere de tres señales: la señal 1 disparada por el reconocimiento del Ag por el TCR; la señal dos mediada por la interacción de las moléculas coestimuladoras en las CD y las células T; y la señal tres mediada por la secreción de citoquinas por CD y su reconocimiento por los receptores de las mismas en la superficie de las células T. Esta tercera señal depende de la colaboración provista por otras células del sistema inmune innato tales como células NK, NKT, linfocitos  $T\gamma\delta$ , mastocitos, eosinófilos y basófilos. (A) Si la colaboración es mediada por células productoras de  $IFN-\gamma$  como las células NK, las CD producen IL-12 induciendo la polarización de las células Th hacia el linaje Th1. (B) Alternativamente, si una célula activada productora de IL-4 como los mastocitos colabora con la CD, las células Th serán polarizadas hacia un fenotipo Th2. *Adaptado de Scand. J. Immunol., 64 (2): 93-96. 2006.*

La familia del receptor CD28 posee un rol clave en la regulación de la activación de células T. La interacción de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) sobre las CPA con los receptores CD28 y CTLA-4 (CD152) sobre las células T da como resultado eventos de señalización que regulan las respuestas inmunes, incluyendo la proliferación celular y el balance entre respuestas Th1 y Th2 (68). La coestimulación de células T a través de CD28 es importante para la generación de respuestas inmunes antígeno-específicas, ya que dicha interacción incrementa la diferenciación hacia célula T efectora luego de la estimulación antigénica, la expansión clonal, la magnitud y la duración de las respuestas T, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xl y la producción

de citoquinas como IL-2 (68), previniendo la inducción de anergia y favoreciendo la formación de centros germinales (69). Por otro lado, CTLA-4 (Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos), una molécula que también interacciona con CD80 y CD86 con mayor afinidad y avidéz que CD28 (69), induce una señal negativa, limitando de este modo la activación T (70). La vía CD40/CD40L participa en la generación de respuestas Th1/Th2, ya que las interacciones entre CD40 sobre la CPA y CD40L sobre los linfocitos T aumentan el desarrollo de respuestas Th1 a través de la inducción de la producción de IL-12 por macrófagos y células dendríticas (71) y el incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras de la familia B7 sobre las CPA (72). La generación de ratones deficientes en el gen que codifica para CD28, demostró que esta molécula no es requerida para todas las respuestas de células T *in vivo*, ya que estos animales conservaban la capacidad de generar reacciones de hipersensibilidad retardada y respuestas de citotoxicidad mediada por linfocitos T (CTL) (73).

El rol de las moléculas coestimuladoras en la generación de respuestas inmunes protectoras en distintas infecciones también ha sido demostrado. En la infección por *M. leprae*, ha sido observado que pacientes con lepra lepromatosa presentan una elevada expresión de CTLA-4 constitutiva *ex vivo* en CMSP en comparación con pacientes tuberculoides e individuos sanos (74). Asimismo, ha sido reportado que la expresión de CD28 se encuentra disminuida en las células de pacientes lepromatosos (74). Más aún, se observó que la expresión de CD40, molécula involucrada en la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$ , y su ligando, CD40L, se encuentran predominantemente en lesiones de pacientes tuberculoides respondedores (75). Estos resultados demostrando

una expresión alterada de las moléculas coestimuladoras en las formas polares de lepra podrían explicar, en parte, la falla en la respuesta de linfocitos T de pacientes lepromatosos contra el antígeno específico. Con respecto a CTLA-4, Gong y col. observaron que la expresión de este receptor se encontraba disminuida en pacientes con tuberculosis en comparación con dadores sanos PPD+ (76). Asimismo, Merlo y col. demostraron que el bloqueo específico de CTLA-4 induce un incremento en respuestas citolíticas de clones T específicos (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) para *M. tuberculosis* (77). Sin embargo, en ratones ha sido descrito que si bien el bloqueo de CTLA-4 induce un aumento en la respuesta inmune específica contra *M. tuberculosis*, no se genera incremento en la eliminación de la micobacteria en el pulmón (78). Resultados de nuestro laboratorio demostraron que la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM), una proteína de señalización rápidamente expresada en linfocito T post-activación que induce IFN- $\gamma$  (79), promueve una respuesta inmune mediada por células contra *M. leprae* (80) y que existe una cascada de eventos moleculares durante la señalización de SLAM en lepra que cooperan en la inducción de IFN- $\gamma$  (81).

### ***SLAM (Molécula Linfocitaria Activadora de Señales)***

Una de las moléculas de activación temprana expresada sobre la superficie de linfocitos T es la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM, CD150). SLAM es una glicoproteína de superficie celular perteneciente a la familia de CD2, que actúa tanto como receptor de membrana transmisor de señales intracelulares, así como molécula soluble o unida a membrana,

promotora del crecimiento celular, con funciones independientes de CD28 (79, 82, 83). SLAM se expresa en linfocitos T CD45RO<sup>+</sup>, y su expresión se induce rápidamente luego de activación T (79). Asimismo, se encuentra expresado en clones Th1 y Th2, linfocitos inmaduros (79), células dendríticas (84) y monocitos activados (85). SLAM también se expresa en una población de linfocitos B periféricos, y su expresión aumenta luego de activación (79). El gen que codifica para SLAM se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1, dentro de la región 1q21.2-1q23. Dicha región contiene varios genes importantes para las interacciones célula-célula, la adhesión leucocitaria y el tráfico leucocitario (86). Además de la forma unida a membrana de SLAM (mSLAM), los linfocitos activados expresan ARNm que codifica para una forma soluble de SLAM (sSLAM). Asimismo, han sido identificadas una forma de mSLAM alternativa, con una cola citoplasmática truncada, y una forma intracitoplasmática (cSLAM) (79).

La estimulación a través de SLAM induce perfiles de citoquinas Th1/Th0 en células T activadas por antígeno, incluyendo clones Th2 (79), sugiriendo así que esta molécula tendría una función en los mecanismos que determinan las respuestas Th1 versus Th2. Ha sido reportado un incremento en la respuesta proliferativa antígeno-específica en células T de individuos sanos inmunizados con derivado proteico purificado o toxoide tetánico luego de coestimulación a través de SLAM (79). Asimismo, ha sido descrito que, durante la infección por VIH, se observa una alteración de la expresión de SLAM (87). También fue demostrado que SLAM regula la producción de citoquinas en artritis reumatoidea (88). Más aún, en pacientes con dermatitis atópica, cuyas células T se encuentran altamente polarizadas hacia el patrón Th2, el perfil de



citoquinas producido por dichas células puede ser modulado hacia la producción de citoquinas Th1 mediante señalización a través de SLAM (89). Por otro lado, si bien SLAM fue inicialmente identificado en células T activadas (79), posteriormente fue demostrada su expresión en CD maduras (84, 90). Así, SLAM podría contribuir con la capacidad de las CD de estimular a las células T dependiendo de su estado de maduración, lo cual podría ayudar a entender la regulación y colaboración entre las CD y las células T (90). Dado que SLAM está involucrado en la activación de las células T, ha sido propuesto que la expresión del mismo en las CD podría proveer una señal bidireccional en la cual las CD que interaccionan con las células T son simultáneamente y sinérgicamente activadas para montar una respuesta Th1 (84).

### ***SAP (Proteína de Unión a SLAM)***

El motivo TxYxxV/I de la cola citoplasmática de SLAM puede unirse a diferentes moléculas con motivos SH2, incluyendo tirosin e inositol fosfatasa, quinasas de las familias Src y moléculas adaptadoras. Por otro lado, la proliferación de células T inducida por estimulación a través de SLAM es susceptible a los efectos inhibitorios de ciclosporina A, por lo cual ha sido sugerida la participación de miembros de la familia NF-AT en la transmisión de señales por SLAM (82). Sin embargo poco se conoce acerca de las vías de señalización disparadas por SLAM y su regulación (91). En la determinación de los mecanismos por los cuales SLAM induce señalización, se identificó a la proteína asociada a SLAM (SAP) (92). SAP se expresa en células T y NK y en algunas células B (93). Esta proteína intracelular consta casi exclusivamente de

un único dominio SH2, además de una corta extensión carboxilo terminal cuya función se desconoce. SAP puede interactuar a través de este dominio SH2 con los miembros de la familia de receptores de SLAM. Esta familia de receptores de transmembrana de tipo inmunoglobulina incluye a SLAM, 2B4, NTB-A, Ly9, CD84, CRACC y Ly108 (92, 93). La asociación entre la región SH2 de SAP y los miembros de la familia de SLAM involucra una secuencia conservada, localizada en el dominio citoplasmático de estos receptores. Aunque esta secuencia generalmente se repite de dos a cuatro veces, sólo una de ellas suele estar involucrada en la unión a SAP. En SLAM, las demás tirosinas de este motivo consenso se asocian a otras moléculas que contienen dominios SH2. En comparación con la mayoría de las asociaciones mediadas por dominios SH2, la interacción entre SAP y SLAM es de muy alta afinidad (93, 94). Ha sido demostrado que esta interacción tiene lugar a través de un mecanismo poco usual. La mayoría de los dominios SH2 se asocian con ligandos fosforilados en tirosina a través de dos interacciones que involucran el motivo fosfo-tirosina y residuos localizados hacia el extremo carboxi-terminal. Sin embargo, la región SH2 de SAP participa en una asociación de tres pasos que involucra la tirosina fosforilada de SLAM, así como también residuos localizados hacia el COOH-terminal y NH<sub>2</sub>-terminal de este motivo. Es además interesante el hecho que la interacción SLAM/SAP puede ocurrir aún en ausencia de fosforilación, si bien el significado de este hecho es aún desconocido (93).

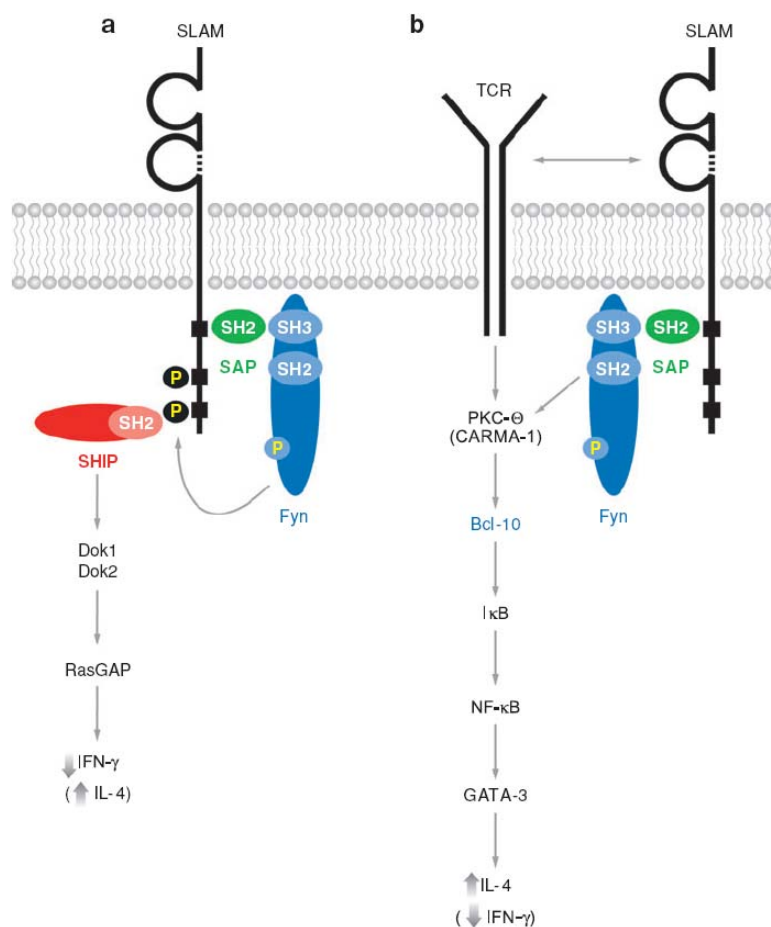
La importancia de la interacción SLAM-SAP en linfocitos T deriva de la observación que SAP se encuentra mutado en pacientes con el Síndrome Linfoproliferativo Ligado al cromosoma X (XLP, enfermedad disfuncional caracterizada por una respuesta inapropiada a la infección por el virus Epstein-

Barr) (92, 95). La ausencia de SAP en pacientes XLP afecta las interacciones inducidas por SLAM entre linfocitos T y B. Como la unión de SLAM durante la estimulación antígeno-específica de células T induce la producción de IFN- $\gamma$  y redirige fenotipos Th2 hacia respuestas Th0/Th1, una respuesta inapropiada de la subpoblación T colaboradora en pacientes XLP podría ser la consecuencia de un funcionamiento defectuoso de la vía SLAM/SAP. SAP se encuentra predominantemente en linfocitos derivados de timo, y mutaciones en el gen de SAP afectarían los eventos de transducción de señales inducidos por SLAM en linfocitos T. En ratón, la ausencia de SAP causa hiperproliferación de las células productoras de IFN- $\gamma$ , activación defectuosa del gen que codifica para IL-4 y un cambio aberrante de isotipos de inmunoglobulinas (96). Estos ratones presentan perfiles normales de linfocitos, lo cual indicaría que SAP no es crítico para el desarrollo normal de la ontogenia linfocitaria (97). Asimismo, en estos animales, se observa un incremento de la actividad citotóxica de los linfocitos y de la secreción de IFN- $\gamma$ , lo que sugiere una desregulación de múltiples ramas del sistema inmune, incluyendo linfocitos B y T. La ausencia de SAP conduce a fenotipos Th1 e inhibición de la producción de citoquinas Th2, por lo que ha sido sugerido que SAP participaría en la homeostasis linfocitaria (98). Inicialmente se propuso a SAP como un inhibidor fisiológico competitivo de moléculas de señalización con dominios SH2 (92, 99). Sin embargo, varios estudios demuestran la existencia de una vía de señalización con un importante rol en el proceso de diferenciación Th que involucraría a la proteína SAP. La señalización a través de la vía SLAM/SAP en líneas celulares T podría alterar el perfil de producción de citoquinas durante la activación celular T. Así, ha sido reportado que la producción de IFN- $\gamma$  inducida por antígeno

podría ser completamente bloqueada en células que expresan conjuntamente SLAM y SAP, mientras que no se observó impacto sobre la liberación de IFN- $\gamma$  en células conteniendo SLAM o SAP solamente (97, 100). Se observó que la expresión de SAP en células de ratón inducía inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  por dichas células, pero no producía cambios en la producción de IL-2 (100, 101), indicando que SAP modularía las respuestas Th1 en células T. Por otro lado, SAP es absolutamente requerido para la interacción entre SLAM y FynT, tirosina-quinasa relacionada con quinasas Src. Ha sido propuesto que el reclutamiento de FynT hacia SLAM, mediado por el dominio SH2 de SAP, es un factor clave en la cascada de señalización de SLAM (100). Asimismo, ha sido sugerido que, en presencia de SAP, SLAM enviaría una señal de fosforilación específica que involucraría a la fosfatasa de inositol en 5' SHIP-1, a las moléculas adaptadoras Dok1 y Dok2, y a la proteína activadora de GTPasa Ras (Ras-GAP) (97, 100). Esta señal daría como resultado una inhibición selectiva de la producción de IFN- $\gamma$  por células T activadas, una respuesta que no se observa en ausencia de SAP (Fig. 9).

Por otro lado, ha sido reportado que SLAM se une a la kinasa ERK y a Akt en células de linfoma de Hodgkin (102). Más aún, la señalización a través de SLAM, induce la vía de ERK, lo cual requiere a la fosfatasa SHIP y a Syk pero no a SAP. Mientras que, la fosforilación de Akt mediada por SLAM requiere de la presencia de Syk y de SAP, pero esta vía es independiente de SHIP (91, 102). Más aún, mutaciones en la vía de SLAM-SAP-FynT interfieren con la producción de citoquinas Th2 en respuesta a la estimulación del TCR (103). Por otro lado, la señalización a través de SLAM puede incrementar el reclutamiento de PKC- $\theta$  inducido por el TCR, los niveles de p50, y la producción de IL-4 en una manera

dependiente de SAP (104). Así, la asociación de SLAM y SAP depende al menos del patrón de localización de estas dos moléculas, y la señalización a través de SLAM podría llevar a diferentes vías de señalización dependiendo del patrón de expresión de SAP.



**Figura 9. Vías de señalización mediadas por SAP.** (a) SAP se asocia al dominio citoplásmico de SLAM. Esta interacción es mediada por la tirosina 281 (Y281) de SLAM y la arginina 32 (R32) de SAP. Esta arginina también se une al dominio SH3 de Fyn y recluta a esta proteína al complejo SLAM/SAP. Fyn luego fosforila residuos de tirosina en la cola citoplásmica de SLAM. Estos residuos fosforilados actúan como sitios de anclaje para SHIP (inositol fosfatasa que contiene dominios SH2), la cual se fosforila y une a las moléculas adaptadoras Dok1 y Dok2. Las proteínas Dok fosforiladas en tirosina se unen al dominio SH2 de RasGAP. Esta vía de señalización suprime de manera selectiva la producción de IFN- $\gamma$ . (b) SAP también contribuye a la señalización a través del TCR regulando la activación de PKC- $\theta$ , Bcl-10, y NF- $\kappa$ B. Esta vía de señalización induce la expresión de GATA-3 y la producción óptima de IL-4 por células T CD4<sup>+</sup> estimuladas a través del CD3. (Figura del *Annu. Rev. Immunol.* 2007. 25:337-79)

### *ICOS (Coestimulador Inducible)*

ICOS es el tercer miembro de la familia de CD28/CTLA-4 (105). A diferencia de CD28, que se encuentra constitutivamente expresado sobre la superficie de los linfocitos T, ICOS se expresa rápidamente en linfocitos T luego de activación (105). ICOS se une a una nueva molécula llamada B7RP-1 (B7h, GL50, LICOS, ICOSL), que se expresa constitutivamente en las CPA (106).

La coestimulación a través de CD28 induce un incremento aún mayor en la expresión de ICOS en células T activadas (107, 108). El fenotipo de los ratones ICOS<sup>-/-</sup> es muy similar al observado en ratones CD28<sup>-/-</sup>, lo cual sugiere una importante función coestimuladora en las funciones efectoras Th y la colaboración T:B (106). Tanto la coestimulación a través de CD28 como de ICOS produce incremento en la proliferación celular y producción de citoquinas. Con el fin de investigar las vías de señalización de cada uno de dichas moléculas, dos grupos de investigación demostraron que la estimulación tanto vía CD28 como ICOS induce activación de las vías PI3K (fosfatidilinositol 3 kinasa)/Akt y de las MAP kinasas Erk1/2 y p38 mientras que la activación de JNK (kinasa N-terminal de c-jun) es inducida sólo por CD28 (109, 110). Asimismo, ha sido descrito que la molécula CD28 posee los dominios YMNM y PXXP en su dominio intracitoplasmático (111, 112), que no se encuentran presentes en ICOS y que podrían ser los responsables de las diferencias observadas luego de la coestimulación a través de ambos receptores.

Ha sido postulado que ICOS estaría implicado en el mantenimiento del inicio de respuestas T. Asimismo, se ha demostrado que la señalización vía ICOS estaría involucrada en la expansión clonal inicial primaria de células Th1 y

Th2. Más aún, los ratones deficientes en el gen de ICOS presentan disminución en la producción de citoquinas tanto Th1 como Th2 frente a infección por *Leishmania major* (113, 114). También, ha sido descrito que ICOS podría inducir perfiles de citoquinas Th1 o Th2, dependiendo del contexto de la respuesta inmune, el cual es definido por el patógeno, su localización, y la cronicidad de la infección (115). Asimismo, recientemente fue publicado que en humanos ICOS participaría fundamentalmente en respuestas de tipo Th1, ya que esta molécula se ve incrementada por efecto de IL-12 e IL-23, citoquinas que favorecen una diferenciación hacia fenotipos de tipo Th1 (116). Así, aunque ICOS fue originalmente identificado como una molécula coestimuladora cuya activación inducía la diferenciación de las células T hacia un fenotipo Th2, actualmente se sabe que ICOS no actúa únicamente en el desarrollo o expansión de el linaje Th2 (106).

*Por lo mencionado, en este trabajo se postuló que las moléculas de señalización SLAM, SAP e ICOS podrían participar en la modulación del patrón de citoquinas durante la infección por M. tuberculosis, conduciendo a la eliminación o persistencia de la bacteria en pacientes con tuberculosis activa. Más aún, debido a la importancia de las CD en la generación de una respuesta y considerando que SLAM se expresa en CD maduras contribuyendo a sus funciones efectoras, uno de nuestros objetivos fue investigar el rol de SLAM en las CD de pacientes con tuberculosis y su efecto en la interacción con los linfocitos T y en la inducción de las funciones efectoras de los mismos.*

*Factores de transcripción involucrados en el establecimiento de respuestas*

*Th1.*

La interacción de distintos factores de transcripción con elementos promotores de los genes que codifican para citoquinas constituye uno de los mecanismos responsables de la expresión tejido-específica de citoquinas Th1 y Th2 (117). A este respecto, se postuló que podrían existir alteraciones en la expresión de moléculas de transducción de señales en los linfocitos T que explicarían las bases de las disfunciones celulares T en enfermedades como la lepra o la tuberculosis (118). La transmisión de señales intracelulares en los linfocitos T generalmente involucra una cascada de tirosin quinasas inducida por enlace del receptor T, moléculas accesorias de las células T y ciertos receptores de citoquinas (119). Asimismo, la activación de la familia de quinasas Src está involucrada en varias vías de transmisión de señales, incluyendo vías de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), a través de las cuales se promueve la proliferación y diferenciación celular y la producción de citoquinas.

Como se describió anteriormente la respuesta inmune protectora en tuberculosis requiere de la producción de IFN- $\gamma$ , por lo tanto es imprescindible conocer cómo se regula el gen del IFN- $\gamma$ . La regulación del gen que codifica para esta citoquina es compleja, involucra múltiples elementos estimuladores o represores río arriba del codon de inicio (120-128), así como también regiones regulatorias en los intrones (129). Luego de la estimulación a través del TCR y/o IL-12 e IL-18, se dispara la expresión de IFN- $\gamma$ . IL-12 señala a través de STAT4, que se une a un sitio -236 pb río arriba del codón de inicio de IFN- $\gamma$  (125) y la



combinación de IL-12 e IL-18 regula positivamente la unión del factor de transcripción AP-1 a las regiones -196 a -183 pb (125). La activación de las células T también incrementa los niveles de NFAT y NF- $\kappa$ B, los cuales se unen a dos sitios adicionales y regulan positivamente la transcripción de IFN- $\gamma$  (126, 127). De las regiones que regulan la expresión del gen de IFN- $\gamma$ , las más críticas son las porciones distal (-96 a -80 pb) y la proximal (-73 a -48 pb) del promotor de IFN- $\gamma$  (120, 122), las cuales están altamente conservadas en los mamíferos. Estos elementos son necesarios y suficientes para la transcripción del IFN- $\gamma$  en células T humanas activadas (120). La unión de proteínas específicas a estas regiones regulatorias afecta marcadamente la actividad promotora del IFN- $\gamma$  (120-123). Por otro lado, T-bet (T-box expresado en células T) un miembro de la familia T-box, ha sido identificado como el factor de transcripción específico Th1, responsable de la expresión de IFN- $\gamma$  (130). La expresión de T-bet se correlaciona con la expresión de IFN- $\gamma$  en células Th1, células NK y células B. Recientemente ha sido demostrado que T-bet también se expresa en CD y que su expresión en las CD es requerida para la activación de las células Th (131, 132). T-bet inicia el desarrollo de linaje Th1 a partir de células Th nativas, ya sea mediante la activación de programas genéticos Th1, como por represión de los programas Th2 (130). Es decir, que la expresión selectiva de T-bet es responsable de la expresión específica de IFN- $\gamma$  por células Th1. T-bet se expresa solamente en células Th1 y no en células Th2, y la expresión de este factor de transcripción es inducida en las células Th1 luego de la transmisión de señales a través del receptor T. Más aún, T-bet es capaz de re-programar una población estable de células Th2 completamente polarizadas hacia el fenotipo Th1, pudiendo aún reprimir la producción de IL-4 e IL-5 en clones Th2

(130). Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual la producción de IFN- $\gamma$  es regulada por T-bet no ha sido aún completamente dilucidado. Los efectos reportados de T-bet sobre la expresión de IFN- $\gamma$  son complejos, y varían entre distintos tipos celulares y códigos o procedencias genéticos. Así, ha sido demostrado que T-bet es requerido para la producción de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> pero no por las células CD8<sup>+</sup> (133), y luego de la activación a través del TCR, las células CD4<sup>+</sup> pero no las CD8<sup>+</sup> requieren de STAT4 para la producción de IFN- $\gamma$  (128), indicando que existen diferencias significativas en el control de la expresión del IFN- $\gamma$  entre las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Al respecto, nuestro laboratorio ha demostrado que la activación de SLAM regula positivamente la expresión de T-bet durante la infección por *M. leprae*, induciendo directamente este factor de transcripción, pero requiriendo señalización adicional a través del receptor T para activar completamente a la célula y disparar la síntesis de IFN- $\gamma$  contra el patógeno (81).

Asimismo, entre los factores de transcripción que controlan la secreción de IFN- $\gamma$  se encuentran además, los miembros de la familia CREB/ATF, la cual incluye a CREB, ATF-1, ATF-2, ATF-3, ATF-4 y CREM (elemento modulador de la respuesta a AMPc). Más aún, la familia AP-1 (c-Jun y c-Fos), también participa en el control de la producción de IFN- $\gamma$ . Todas estas proteínas tienen un dominio de activación transcripcional que es activado por fosforilación. Los miembros de la familia CREB/ATF poseen además un dominio de tipo de cierre de leucinas, el cual media la dimerización y unión al ADN. A través de este dominio forman homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia, y luego se unen a un sitio con la secuencia "TGACGTCA" llamado

elemento de respuesta a AMPc (CRE) en la región promotora del gen blanco (134).

Una respuesta inmune efectiva frente a una infección microbiana requiere de la activación de factores de transcripción latentes específicos, que actúan como disparadores moleculares para inducir subpoblaciones de genes críticos para la defensa del huésped. Aunque los factores de transcripción CREB/ATF/AP-1 controlan la producción de IL-2 durante la activación T (135-137), existe información limitada sobre la contribución de estas proteínas en la modulación de la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a agentes infecciosos. Ha sido demostrado que CREB se une al promotor proximal de IFN- $\gamma$ , y que la unión es aumentada luego de fosforilación de CREB (134, 138). Sin embargo, estudios en células Jurkat y en ratones transgénicos presentan resultados contradictorios, ya que muestran que CREB podría aumentar o inhibir la transcripción de IFN- $\gamma$  en diferentes sistemas experimentales (121-123). Interesantemente, ha sido demostrado que CREB regula positivamente la producción de IFN- $\gamma$  en células T humanas que responden a *M. tuberculosis* (139). Sin embargo, poco se conoce acerca del rol de este factor de transcripción en la regulación del IFN- $\gamma$  en humanos. Más aún, las vías de señalización que regulan la fosforilación de CREB tampoco se conocen en detalle. La señalización a través del receptor de las células B e ICAM-1 incrementa la fosforilación de CREB y este efecto es mediado por la proteína quinasa A (PKA) (140). Asimismo, la activación de CD3 y la coestimulación vía CD28, aumenta la fosforilación de CREB a través de una vía de señalización que es independiente de PKA y PKC o PI3K pero que es mediada por la vía de p38 MAPK (141, 142). Algunas de estas vías de señalización han sido

implicadas en la señalización a través de SLAM (91, 102), aunque no han sido reportados datos en células T primarias hasta el momento.

*Por lo tanto, dado que: i) La producción de IFN- $\gamma$  es crucial en la respuesta inmune frente a M. tuberculosis ii) la señalización a través de SLAM induce las respuestas Th1(80); iii) CREB regula positivamente la secreción de IFN- $\gamma$  en respuesta a M. tuberculosis, proponemos que las vías de señalización a través de SLAM podrían contribuir a la activación de CREB, llevando a producción de IFN- $\gamma$  durante la infección por M. tuberculosis.*

**Objetivos**

---

### Objetivo General.

La interacción inicial entre un patógeno y las células dendríticas (CD) determinará la producción de citoquinas en el microambiente celular, influenciando el tipo de respuesta adaptativa generado contra microorganismos como *M. tuberculosis*, llevando incluso a la inhibición de citoquinas cruciales para la defensa inmune efectiva del huésped contra dicho patógeno. Han sido identificados varios procesos que modulan la activación de los linfocitos T en células Th1/Th2/Th17, pero poco se conoce acerca de cómo los microorganismos pueden influenciar este proceso, incluyendo a *M. tuberculosis*.

Así, el objetivo general de este trabajo fue investigar el rol de moléculas coestimuladoras y proteínas de señalización en el establecimiento de la respuesta Th1 protectora en la infección por *M. tuberculosis*. Específicamente, en esta investigación se postuló: i) que las proteínas de señalización SLAM, SAP e ICOS participarían en la modulación del patrón de citoquinas durante la infección producida contra *M. tuberculosis*, conduciendo a la eliminación o persistencia de la bacteria en pacientes con tuberculosis activa; ii) que la molécula coestimuladora SLAM participaría en la función efectora de CD y en la interacción con los linfocitos T de pacientes con tuberculosis; iii) que las vías de señalización a través de SLAM contribuirían a la activación de factores de transcripción como CREB, reguladores de la secreción de IFN- $\gamma$  durante la infección activa por *M. tuberculosis*; iv) que existiría una regulación cruzada entre el IFN- $\gamma$  y la IL-17 en la tuberculosis pulmonar. Para dilucidar estas postulaciones se propusieron los siguientes objetivos específicos:

### Objetivos específicos.

1. Estudio de la expresión de las moléculas coestimuladoras SLAM e ICOS y del microambiente de citoquinas producido durante la infección activa por *M. tuberculosis*.

2. Investigación de la función de SLAM en la tuberculosis pulmonar activa.

2.1. Expresión de la proteína de unión a SLAM (SAP) en pacientes con tuberculosis.

2.2. Asociación entre expresión de SLAM y SAP, y la producción de IFN- $\gamma$  durante la infección activa por *M. tuberculosis*.

2.3. Función de SLAM en individuos con mutaciones en el gen de SAP (pacientes XLP).

2.4. Efecto de la señalización a través de SLAM sobre la producción de IFN- $\gamma$  en pacientes con tuberculosis.

3. Estudio de la función de ICOS en la tuberculosis activa.

3.1. Regulación de la expresión de ICOS en tuberculosis.

3.2. Efecto de la señalización a través de ICOS sobre la respuesta de citoquinas en pacientes con infección activa por *M. tuberculosis*.

3.3. Investigación de la interrelación entre SLAM-ICOS e IFN- $\gamma$  en tuberculosis activa.

4. *Estudio de la expresión y del rol de SLAM en Células Dendríticas (CD) de pacientes con tuberculosis.*

4.1. Expresión de SLAM en CD de pacientes con tuberculosis.

4.2. Producción de citoquinas inducidas por la señalización a través de SLAM en CD de pacientes con tuberculosis.

4.3. Función de SLAM en el establecimiento de una señal bidireccional entre CD y linfocitos T.

5. *Estudio de la función del factor de transcripción CREB y de la IL-17 en la regulación de producción de IFN- $\gamma$ .*

5.1. Expresión del factor de transcripción CREB en la vía de señalización de SLAM.

5.1. Regulación de la expresión de SLAM y de CREB por IL-17.



## **Materiales y Métodos**

---

### *Pacientes e individuos control participantes del estudio.*

Pacientes con tuberculosis pulmonar activa provenientes de la División de Tisioneumonología del Hospital F. J. Muñiz fueron evaluados a su ingreso. El diagnóstico de tuberculosis fue establecido según datos clínicos y radiológicos, conjuntamente con la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en esputo, mediante la coloración de Ziehl-Neelsen. Todos los pacientes habían recibido menos de dos semanas de tratamiento con drogas anti-tuberculosas y no presentaban ninguna otra patología asociada. Dos individuos con Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) diagnosticados en el "International XLP Registry Headquarters" (Centro Médico de la Universidad de Nebraska, Omaha, NE, (143)) fueron incluidos en estos estudios. Como controles se emplearon individuos sanos vacunados con BCG, PPD<sup>+</sup> y PPD<sup>-</sup>.

Se obtuvo sangre periférica de todos los individuos participantes del estudio en tubos heparinizados, luego de recibir su consentimiento informado.

### *Antígeno.*

Se utilizó un sonicado de *M. tuberculosis*, cepa virulenta H37Rv gentilmente provisto por la Universidad de Colorado (Mycobacteria Research Laboratorios, Colorado State University, Fort Collins, CO).

### *Cultivos celulares.*

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de

densidad con Ficoll-Hypaque (G.E Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Las CMSP ( $1 \times 10^6$ /ml) fueron cultivados en presencia de sonicado de *M. tuberculosis* (10  $\mu$ g/ml) o PHA-M (2.5  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en placas de 6, 24 ó 96 pocillos con medio RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA) suplementado con gentamicina, glutamina (2mM, Sigma-Aldrich) y suero humano al 10%; en estufa a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. A distintos tiempos, las células así estimuladas fueron cultivadas en presencia/ausencia de anticuerpos monoclonales, citoquinas recombinantes o ARN de interferencia como se describe posteriormente.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anticuerpos agonistas: anti-SLAM (A12, 10 $\mu$ g/ml; eBioscience, San Diego, CA); anti-ICOS (ISA3, 12.5 $\mu$ g/ml; eBioscience), anti-CD28 (CD28.2, 100ng/ml; eBioscience). Anticuerpos bloqueantes: anti-IL-12 (0.9 $\mu$ g/ml; Endogen, Cambridge, MA), anti-IL-10 (5 $\mu$ g/ml; BD Biosciences, San Jose, CA), anti-IL-4 (1 $\mu$ g/ml; Endogen), anti-IFN- $\gamma$  (10 $\mu$ g/ml; Endogen), anti-ICOSL (MIH12, 5 $\mu$ g/ml; eBioscience), anti-CD28 (CD28.6, 15 $\mu$ g/ml; eBioscience). Citoquinas recombinantes humanas: IL-12 (1ng/ml; PeproTech, Rocky Hill, NJ), IFN- $\gamma$  (7.5ng/ml; Endogen), IL-4 (5ng/ml; Endogen), IL-10 (1ng/ml; Endogen) e IL-17 (5ng/ml, eBioscience)

### ***Ensayos de Proliferación.***

Las CMSP fueron estimuladas por 5 días en presencia o ausencia de *M. tuberculosis*, se adicionó timidita tritiada ([<sup>3</sup>H]-T, 5 $\mu$ Ci/ml) durante las últimas 16 horas de cultivo. Posteriormente, las células fueron cosechadas y se midió la incorporación de [<sup>3</sup>H]-T en un contador de centelleo.

### **ELISA**

La producción de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, e IL-10 luego de 48h de estimulación con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes o anticuerpos monoclonales fue determinada por ELISA de captura siguiendo las instrucciones del fabricante (Endogen).

### ***Citometría de Flujo en CMSP.***

La expresión de SLAM e ICOS fue determinada por citometría de flujo. Las CMSP o CD purificadas fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego las células fueron lavadas mediante centrifugación a 2000rpm con buffer FACS (PBS 1 X + suero bovino fetal al 2%). Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en paraformadehído al 2% (Sigma-Aldrich).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales específicos: CD3 (OKT3, eBioscience), SLAM (A12, eBioscience), ICOS (ISA-3, eBioscience), CD28 (CD28.2, eBioscience), CD83 (HB15e, BD), CD86 (FUN-1, BD), CD80 (L307.4, BD), y CD1a (HI149, eBioscience).

Para la determinación de fosfo CREB (pCREB) las CMSP fueron incubadas con anti-CD3 y/o anti-SLAM, incubadas por 30min a 4°C, luego lavadas con PBS 1X. Las células fueron luego incubadas por 40min a 4°C con Buffer de Fijación y Permeabilización (eBioscience), luego lavadas dos veces con Buffer de Permeabilización (eBioscience). Finalmente, las células fueron incubadas a 4°C por 30min con anticuerpo pCREB (J151-21, BD) y lavadas en buffer de Permeabilización (eBioscience).

Como control de unión inespecífica, todas las muestras experimentales fueron incubadas en presencia de anticuerpos irrelevantes (controles de isotipo).

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACScalibur, BD Biosciences).

### *Detección de IFN- $\gamma$ intracelular*

Para determinar la producción de IFN- $\gamma$  a nivel de células individuales, las CMSP o las CD fueron estimuladas en presencia de Brefeldina (10 $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich) durante las últimas cinco horas de cultivo, a fin de inducir la acumulación intracelular de citoquinas sintetizadas *de novo*. Luego de fijación las células fueron marcadas en superficie con anticuerpos anti-CD3, anti-CD83 (para las CD), anti-ICOS o anti-SLAM conjugados con fluorocromos (eBioscience), y luego lavadas con PBS y suero bovino fetal al 2%. La marcación intracelular fue realizada con anticuerpo anti-IFN- $\gamma$ , utilizando un kit comercial (Cytodetect™ Kit, IQ Products, Houston, Tx), el cual utiliza saponina como agente permeabilizante. Como control negativo se utilizaron células estimuladas, que fueron incubadas en presencia de un anticuerpo monoclonal irrelevante, a fin de comparar la unión inespecífica. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACScalibur, BD Biosciences).

### *Obtención de líneas celulares T de corto término a partir de sangre periférica.*

Líneas celulares Th0, Th1 o Th2 fueron generadas como fue previamente descrito (116). Brevemente, las CMSP obtenidas de dadores sanos fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 (100ng/ml, eBioscience) y anti-CD28 (10ng/ml, eBioscience) y cultivadas en ausencia (para líneas Th0) o en presencia de IL-12r (1ng/ml, PeproTech) y anticuerpo neutralizante anti-IL-4 (0,1µg/ml, Endogen) (para líneas Th1), o en presencia de IL-4r (5ng/ml, Endogen) y anticuerpo neutralizante anti-IL-12 (0,9µg/ml, Endogen) (para líneas Th2). Para generar líneas T totalmente polarizadas, las líneas fueron re-estimuladas dos veces (cada diez días) con PHA (5µg/ml, Sigma-Aldrich) y CMSP autólogas irradiados a 5000 rad en ausencia (para las líneas Th0), o en presencia de IL-12r (1ng/ml, PeproTech) y anticuerpo neutralizante anti-IL-4 (0,1µg/ml, Endogen) (para las líneas Th1), o en presencia de IL-4r (5ng/ml, Endogen) y anticuerpo neutralizante anti-IL-12 (0,9 µg/ml, Endogen) (para las líneas Th2). A distintos tiempos, se determinó la producción de IFN-γ mediante ELISA y detección intracitoplasmática, los niveles de expresión de ICOS por citometría de flujo y la expresión de los factores de transcripción T-bet y GATA-3 por Western blot.

### ***Western blot.***

Las CMSP y las CD fueron estimuladas y se preparan extractos celulares totales. Las células fueron lavadas y solubilizadas en solución de lisis (Tris 50mM -pH 8-, Nonidet P40 1%, NaCl 200mM, Glicerol 10%, EDTA 0,5mM y Cocktail Inhibidor de Proteasas, Sigma-Aldrich), y cultivadas a 4°C por 1h. Las proteínas fueron luego cuantificadas utilizando el kit de microBCA (Pierce, Rockford, IL). Cantidades equivalentes de proteína fueron sembradas y corridas en geles de

poliacrilamida-bisacrilamida al 10% ó al 12%, luego transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, GE Healthcare) y finalmente incubadas en presencia de los anticuerpos específicos anti-ICOS (1/400, W18, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-T-bet (1/400, 39D, Santa Cruz Biotechnology), anti-GATA-3 (1/100, H-48, Santa Cruz Biotech.), anti-SLAM (1/500, N-19, Santa Cruz Biotech.), anti-SAP (1/1000, FL-128, Santa Cruz Biotech.), anti-p-CREB (1/500, E113, Epitomics, Burlingam, CA), o anti- $\beta$ -actina (1/200, C300, Santa Cruz Biotech.). Luego de sucesivos lavados, se realizó el revelado del anticuerpo unido específicamente utilizando anticuerpos policlonales anti-conejo conjugados con peroxidasa (HRP) (1/2500, Bio-Rad, Hercules, CA) o anti-ratón conjugados con peroxidasa (HRP) (1/5000, Chemicon International, Temecula, CA) mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare) y placas Kodak BioMax.

### ***Purificación y estimulación de Células Dendríticas.***

Para diferenciar las Células Dendríticas (CD), CMSP fueron cultivadas a  $5 \times 10^6$  células/ml durante 2 horas. Luego, las células no adheridas a la placa fueron removidas lavando sucesivamente con PBS 1X (GIBCO). Las células adheridas remanentes fueron luego cultivadas en medio completo, adicionando Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF, 35ng/ml) e IL-4r (10ng/ml, eBioscience) durante 6-7 días. Las células resultantes fueron identificadas por fenotipo y morfología, según el análisis por citometría de flujo, con una pureza entre el 95-99%. Las CD inmaduras fueron cosechadas, contadas por tinción con azul Tripán y re-cultivadas durante 48 horas a  $0.5 \times 10^6$  células/ml en medio fresco en presencia o ausencia del M.

*tuberculosis* y del anticuerpo monoclonal agonista anti-SLAM (A12, 10µg/ml, eBioscience).

### ***Reacción Mixta Leucocitaria (RML).***

Las CD utilizadas en las RML fueron cosechadas, luego de 6 días de cultivo, y re-cultivadas a  $4 \times 10^3$  células/pocillo en el mismo medio condicionado en placas de 96 pocillos con fondo en U, como se describió previamente (84). Las CD inmaduras fueron incubadas con *M. tuberculosis* por 48 horas, luego irradiadas (3000 rad de  $^{137}\text{Cr}$ ) y co-cultivadas con células T purificadas. Las células T, del mismo donante o de individuos diferentes, fueron obtenidas a partir de CMSP totales mediante selección negativa. Brevemente, las CMSP se cultivaron a  $5 \times 10^6$  células/ml durante 2 horas para remover las células adherentes. Las células no adherentes se colectaron y se incubaron 20 minutos a 4°C con anticuerpos monoclonales específicos anti-CD14, anti-CD56 y anti-CD19 (eBioscience) a una concentración de  $0.4 \mu\text{g}/10^6$  células. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con Buffer FACS (PBS 1X, 2% suero humano) e incubadas con las bolillas magnéticas (DynaL, Oslo, Noruega) durante 20min a 4°C con agitación suave. La fracción no magnética fue coleccionada obteniéndose una pureza >98% según el análisis de las células CD3<sup>+</sup> por citometría de flujo. Las células T purificadas fueron agregadas a las CD maduras a  $2 \times 10^5$  células/pocillo, en relación 1:50 CD:célula T. Luego de 48 horas se evaluó la producción de IL-6 e IFN-γ por ELISA.

### ***Síntesis y transfección de ARN de interferencia (ARNi) para SLAM***



La región para la síntesis del ADN de doble cadena fue seleccionada como ha sido descrito por Elbashir y col. (144). Se utilizaron los siguientes primers:

Primer 5'-3': 5' GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG AGC ATG AAC AAA AGC ATC CAC 3'

Primer 3'-5': 5' GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC TTC TGA AGA GGA CCT GGT TTC 3' (Integrated DNA Technologies, Coralville IA). Los primers fueron diseñados de manera que el templado de ADN tuviera la secuencia del sitio promotor para la ARN polimerasa T7. Los productos de PCR fueron secuenciados (Northwood DNA, Solway, MN) y la purificación de ADN fue realizada utilizando el Kit de Extracción QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA). El templado se transcribió *in vitro* con el kit de transcripción TurboScript™ (Genlantis, San Diego, CA). El ADN doble cadena fue purificado mediante precipitación con LiCl y cuantificado. El ARN de interferencia (ARNi) fue generado usando el Kit de Generación de siRNA Dicer (Genlantis) y purificado de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Genlantis). CMSP de pacientes con tuberculosis fueron transfectadas (GeneSilencer® siRNA Transfection Reagent, Genlantis) con 500-800ng de ARNi de SLAM o control (Proteína de Fluorescente verde, GFP) e incubadas durante 18 horas. Luego, las células fueron lavadas e incubadas en presencia de *M. tuberculosis* para determinar la producción de IFN- $\gamma$  e IL-6 mediante ELISA y la expresión de SLAM por western blot.

En experimentos diferentes, CD y células T autólogas (purificadas como se describió anteriormente) fueron transfectadas. Las CD fueron lavadas y estimuladas con *M. tuberculosis*. Luego de 48 horas, las CD se lavaron

nuevamente y se co-cultivaron con células T transfectadas o no transfectadas en relación 1:50 CD:célula T. La producción de IFN- $\gamma$  e IL-6 fue determinada por ELISA.

### *Análisis estadístico.*

El test de Wilcoxon fue utilizado para el análisis de muestras pareadas y el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Se realizó análisis de regresión simple y el test del coeficiente de correlación de Spearman para estudiar la relación entre variables. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

**Resultados**

---

### ***1. Caracterización del estado inmunológico de dos poblaciones de pacientes con tuberculosis.***

A fin de investigar la respuesta inmune contra *M. tuberculosis* en la población de pacientes con tuberculosis en Argentina, se examinaron diferentes parámetros inmunológicos de las CMSP de individuos con enfermedad activa en respuesta al patógeno. Así, como ha sido ampliamente demostrado que el IFN- $\gamma$  es un mediador crucial en la respuesta inmune del huésped frente a *M. tuberculosis* (15) y que SLAM, un marcador de activación inducible (79), es un regulador positivo de la producción de esta citoquina en pacientes con lepra (80), se analizó la producción de IFN- $\gamma$ , la proliferación celular (la cual en general correlaciona con al producción de IFN- $\gamma$ ), y la expresión de SLAM en respuesta al antígeno (Ag) específico. Los resultados revelaron la existencia de dos grupos de pacientes con tuberculosis activa: pacientes de Alta Respuesta (AR) y pacientes de Baja Respuesta (BR) al antígeno (Fig. 1). En los pacientes de AR se observó un significativo incremento de la proliferación celular, producción de IFN- $\gamma$  y expresión de SLAM (Fig. 1) luego de estimulación con *M. tuberculosis*. En contraste, los pacientes de BR se caracterizaron por mostrar baja respuesta proliferativa, baja producción de IFN- $\gamma$ , y bajos niveles de SLAM en respuesta al antígeno (Fig. 1A). En base a estos resultados, y a fin de asignar a los pacientes dentro de los dos grupos hallados, se utilizaron 3 criterios. En primer lugar, el criterio primario fue el índice de proliferación. Este índice fue calculado como las cpm luego de estimulación con *M. tuberculosis*/cpm luego de cultivo de las células en medio. Si este número era  $\geq 4$ , el individuo era clasificado como "Alto

Respondedor", y si el índice de proliferación era  $< 4$ , el individuo era clasificado como "Bajo Respondedor". En segundo lugar, se consideró el nivel de IFN- $\gamma$  producido en respuesta a *M. tuberculosis*. Nuevamente, si el incremento en la secreción de IFN- $\gamma$  luego de estimulación (ng/ml luego de estimulación con Ag de *M. tuberculosis*/ ng/ml luego de cultivo celular en medio) era  $\geq 34$ , el paciente era clasificado como Alto Respondedor, y  $< 34$ , el individuo era considerado Bajo Respondedor. Tercero, se consideró el incremento en el porcentaje de células SLAM positivas en respuesta a sonicado de *M. tuberculosis*. Un incremento en el % de células SLAM positivas de 8, asignaba al paciente al grupo de Altos Respondedores, mientras que con un incremento menor se consideraba Bajo respondedor. Si un paciente cumplía dos de los tres criterios, el paciente era asignado al grupo correspondiente. Interesantemente, los parámetros inmunológicos estudiados correlacionaron con los parámetros clínicos comunes analizados en pacientes con tuberculosis activa en Argentina: los individuos de AR presentaban niveles del porcentaje de linfocitos totales significativamente mayores que los pacientes de BR ( $26.1 \pm 2.7\%$  vs.  $14.4 \pm 1.6\%$ ;  $p < 0.001$ , test de Mann-Whitney); los pacientes de AR mostraban diámetros de PPD mayores que los individuos de BR ( $8.43 \pm 1.4\text{mm}$  vs.  $3.62 \pm 0.956\text{mm}$ ;  $p < 0.001$ , test de Mann-Whitney); los individuos de BR presentaban lesiones pulmonares severas, una importante pérdida de peso y mayor tiempo de evolución de la enfermedad (días desde la aparición de los síntomas hasta la admisión del paciente en el hospital) que los individuos de AR ( $64 \pm 13.92$  días vs.  $34.14 \pm 11.84$  días;  $p < 0.05$ , test de Mann-Whitney). Por lo mencionado, los siguientes estudios de este trabajo fueron realizados a fin de

investigar la potencial existencia de un mecanismo inmune que explicase la débil respuesta de las células T de los pacientes de BR.

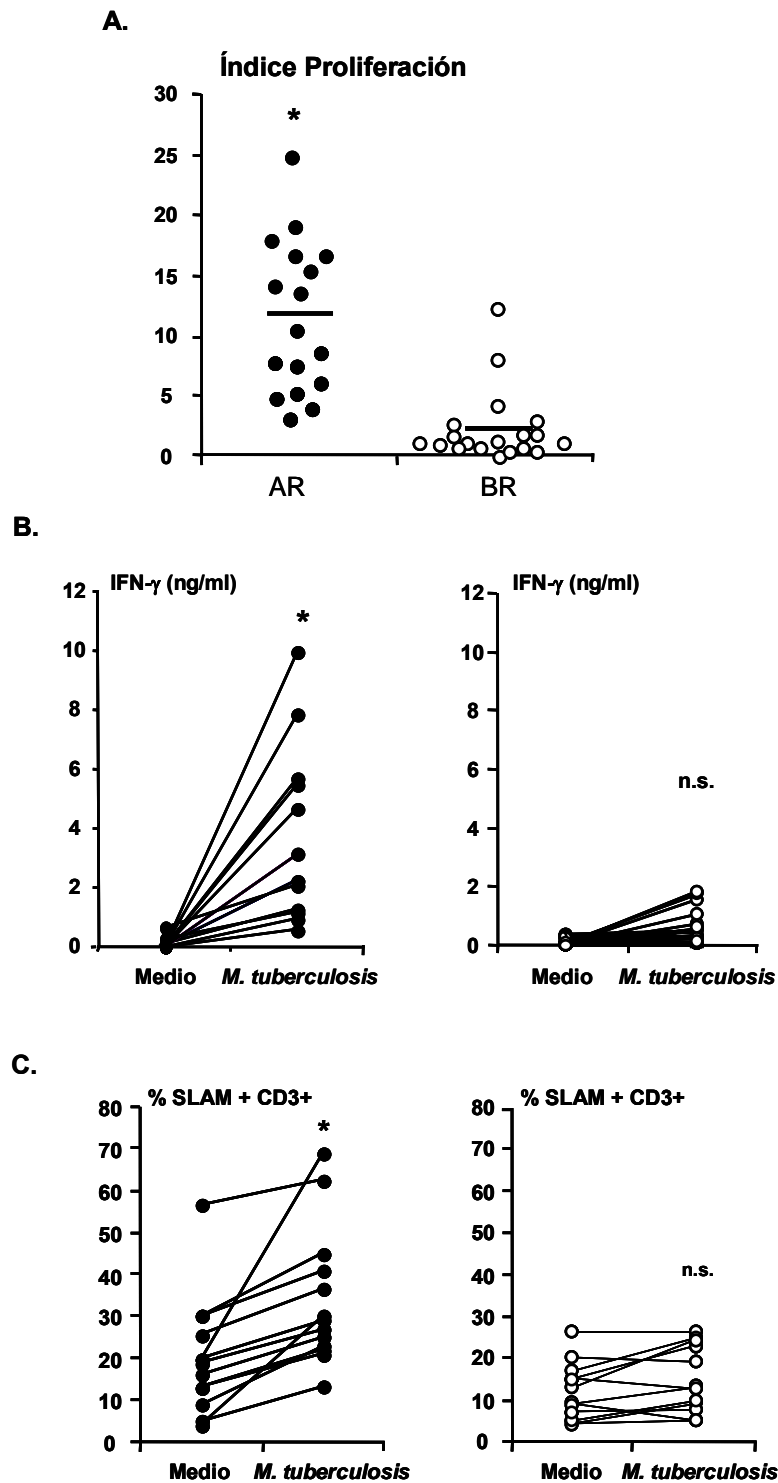


Figura 1. Clasificación de pacientes con tuberculosis pulmonar activa. A, CMSP de pacientes fueron cultivados en presencia/ausencia de antígeno por 5 días y se determinó la proliferación por incorporación de [ $^3$ H-timidina]. El índice de proliferación para cada individuo fue calculado

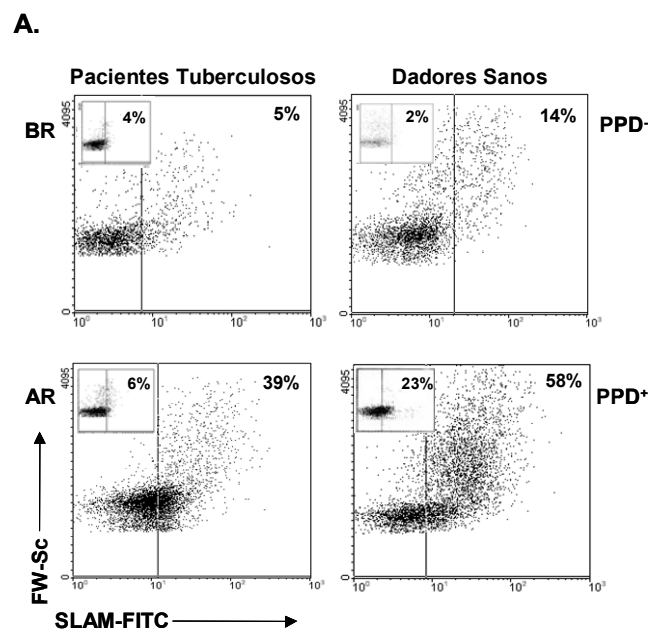
como cpm luego de estimulación con *M. tuberculosis* /cpm células cultivadas en medio. B, CMSP de pacientes fueron cultivados en presencia/ausencia de antígeno por 48h y se determinó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. C, CMSP de pacientes fueron cultivados en presencia/ausencia de antígeno por 5 días y se determinó la expresión de SLAM por citometría de flujo. La expresión de SLAM en células T se determinó primero realizando una región según FSC y SSC, luego seleccionando las células CD3<sup>+</sup>. \*p< 0.001, test de Mann Whitney, AR: pacientes con tuberculosis altos respondedores; BR: pacientes con tuberculosis bajos respondedores.

### ***Estudio de la expresión de moléculas coestimuladoras inducibles durante la infección activa por M. tuberculosis: SLAM-ICOS.***

Como se describe en la Figura 1, se observó que la estimulación antigénica con *M. tuberculosis* incrementó significativamente la expresión de SLAM en pacientes de AR (Fig. 1 y Fig. 2A, panel izquierdo inferior), mientras que el antígeno no indujo modificaciones detectables en el porcentaje de SLAM en la superficie de células T de pacientes de BR (Fig. 1 y Fig. 2A, panel izquierdo superior). A fin de profundizar el estudio de la expresión de SLAM en respuesta a *M. tuberculosis*, analizamos los niveles de esta molécula en individuos sanos. En forma similar a los pacientes de AR, las células de Individuos controles vacunados con BCG (PPD<sup>+</sup> y PPD<sup>-</sup>) cultivados con *M. tuberculosis* también mostraron un incremento significativo en la expresión de SLAM (Figura 2A, panel derecho), aunque como era esperado, los individuos PPD<sup>+</sup> mostraron un incremento mayor de la expresión del receptor.

El coestimulador inducible ICOS, tercer miembro de la familia CD28/CTLA-4 (105), es otro regulador de la diferenciación y función celular. Considerando que ha sido exhaustivamente estudiado en enfermedades infecciosas en modelos de ratón el rol de ICOS como regulador positivo de respuestas Th1 y Th2 (113, 145-149), pero no había sido investigado hasta el momento la función de ICOS en la infección humana intracelular, se evaluó la

expresión de ICOS en la tuberculosis humana. Los resultados mostraron que, en correlación con los resultados de expresión de SLAM, *M. tuberculosis* incrementó significativamente los niveles de ICOS en la superficie de linfocitos T sólo en pacientes de AR (Fig. 2B) y DS (datos nos mostrados), pero no en individuos de BR (Fig. 2B). Así, contrariamente a los datos obtenidos en modelos murinos, pero en concordancia con resultados publicados en células T humanas estimuladas policlonalmente, nuestros resultados indicaron que la expresión de ICOS en la tuberculosis humana correlacionaron con la secreción de IFN- $\gamma$  producida contra *M. tuberculosis* en pacientes con enfermedad activa.





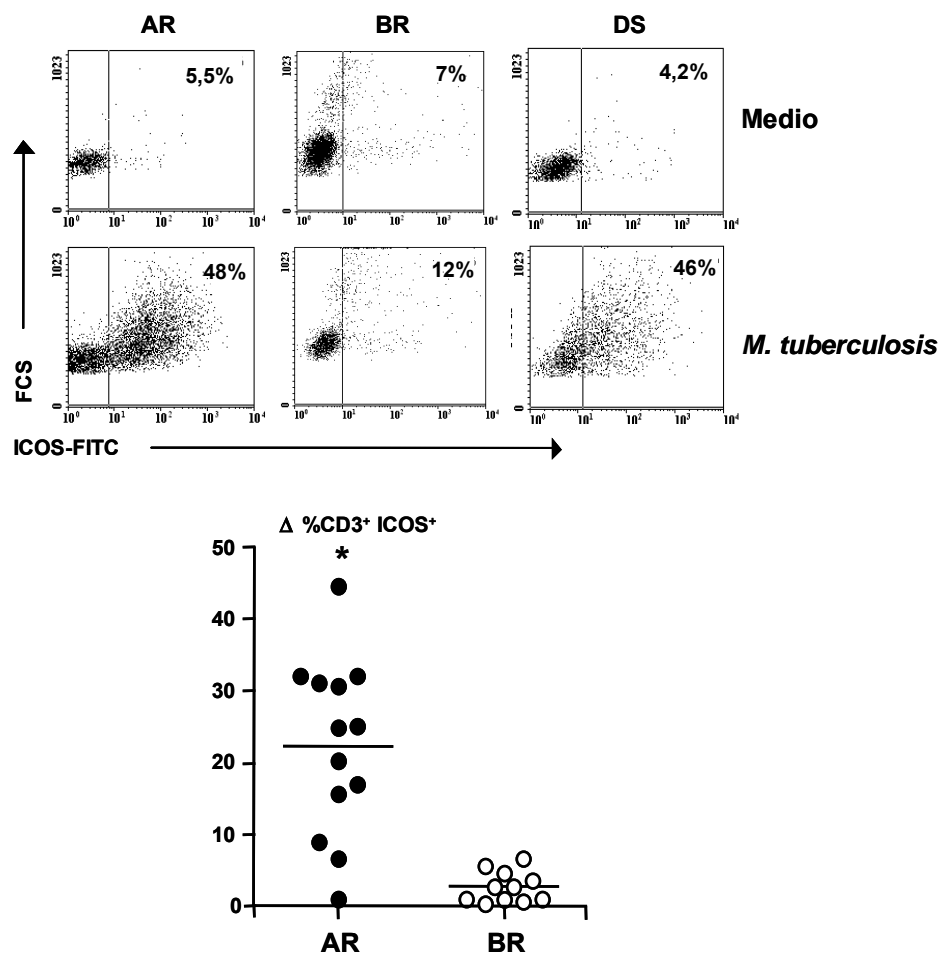
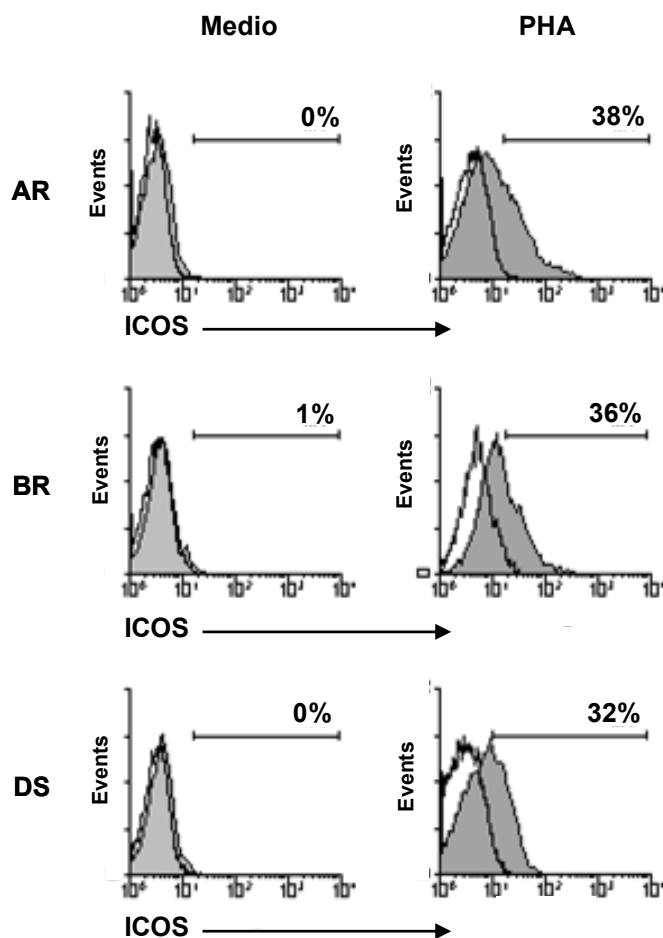


Figura 2. Incremento de SLAM e ICOS en células T de pacientes con tuberculosis. CMSP de pacientes fueron cultivados en presencia/ausencia de antígeno por 5 días y se determinó la expresión de SLAM o ICOS por citometría de flujo. A, Pacientes de AR, BR y dadores sanos PPD<sup>+</sup> y PPD<sup>-</sup> representativos. El porcentaje de células SLAM<sup>+</sup> luego de cultivar en medio (inserto) o estimular con *M. tuberculosis* (figura mayor) se muestra en la porción derecha de lo paneles. B, Expresión de ICOS en un paciente AR, BR y un DS representativo. Múltiples pacientes para cada grupo (panel inferior), cada símbolo representa un paciente individual. Los valores fueron calculados como: Porcentaje de células CD3<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> luego de estimulación con *M. tuberculosis* - Porcentaje de células CD3<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> luego de estimulación en medio. Las líneas horizontales gruesas representan la media. Los valores de p fueron calculados utilizando el test de Mann-Whitney para comparar la media del incremento en la expresión de ICOS en pacientes AR vs BR. \*, p < 0.0001

Como se mostró anteriormente (Fig. 2), frente a la estimulación Ag específica, los pacientes de BR no incrementaron los niveles de ICOS. A fin de determinar si este resultado se debía a una falta de respuesta específica contra *M. tuberculosis* o a una falla general de estos individuos en la expresión del receptor, células de pacientes y DS fueron estimuladas con PHA y se determinó la expresión de ICOS por citometría de flujo. Los datos mostraron

que en los tres grupos de individuos estudiados, los niveles de ICOS se incrementaron por estimulación policlonal (Fig. 3), demostrando de esta manera que no existe un defecto global en la capacidad de los linfocitos T de pacientes de BR para expresar ICOS.

En base a estos hallazgos, se especuló que las variaciones en la expresión de ICOS y de SLAM en células de pacientes de AR y BR podrían relacionarse con el reconocimiento específico del antígeno por los linfocitos T: así, las células de pacientes de BR reconocerían débilmente al antígeno, produciendo una débil señal a través del TCR, la que no alcanzaría para activar suficientemente a la célula T e incrementar los niveles de moléculas de activación como SLAM o ICOS.



**Figura 3.** La estimulación policlonal incrementa los niveles de ICOS en pacientes con tuberculosis y dadores sanos. Para determinar la expresión de ICOS en las células T, las CMSP fueron estimuladas con PHA por 5 días y marcadas con anticuerpos monoclonales específicos para CD3 e ICOS. Se muestra un ejemplo representativo para cada grupo de cuatro estudiados. El histograma para ICOS se muestra en gris y el control de isotipo en blanco.

### *El microambiente de citoquinas influencia la expresión de SLAM e ICOS.*

Como la expresión de SLAM y de ICOS sólo se inducía en pacientes con fuerte respuesta contra *M. tuberculosis*, seguidamente se analizó si las citoquinas presentes en el microambiente celular en los dos grupos de pacientes podrían influenciar la inducción de los niveles de ambos coestimuladores. Como se mostró en la Fig. 1, los pacientes AR producen mayores niveles de IFN- $\gamma$  en respuesta al Ag que los pacientes BR (Fig1 y Fig. 4A). Sin embargo, tanto los pacientes AR como BR producen niveles comparables de IL-10 frente a la estimulación con *M. tuberculosis* (Fig. 4A). Más aún, *M. tuberculosis* incrementó los niveles de expresión de T-bet y disminuyó la expresión de GATA-3 en pacientes AR, mientras que los pacientes de BR mostraron un marcado incremento en la expresión de GATA-3 y niveles indetectables de T-bet (Fig. 4B). Por lo tanto, estos datos sugieren que los pacientes AR que secretan IL-10 pero producen altos niveles de IFN- $\gamma$  y expresan altos niveles de T-bet en respuesta a *M. tuberculosis* podrían estar creando un microambiente de tipo Th1. En contraste, en los pacientes de BR, *M. tuberculosis* induce producción de IL-10 pero muy bajos niveles de IFN- $\gamma$  y altos niveles de GATA-3, generando un microambiente predominantemente Th2. Estos resultados indican que, de acuerdo con el estado de polarización celular, los linfocitos Th humanos expresarían niveles diferenciales de SLAM e ICOS, los cuales se incrementan ante la producción de IFN- $\gamma$ . Más aún, para determinar si existía una correlación entre la expresión de SLAM e ICOS y la producción de IFN- $\gamma$  realizamos un análisis estadístico. Como se muestra en la

Fig. 4C, se observó una correlación directa entre los niveles de SLAM e ICOS y la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T en pacientes con tuberculosis.

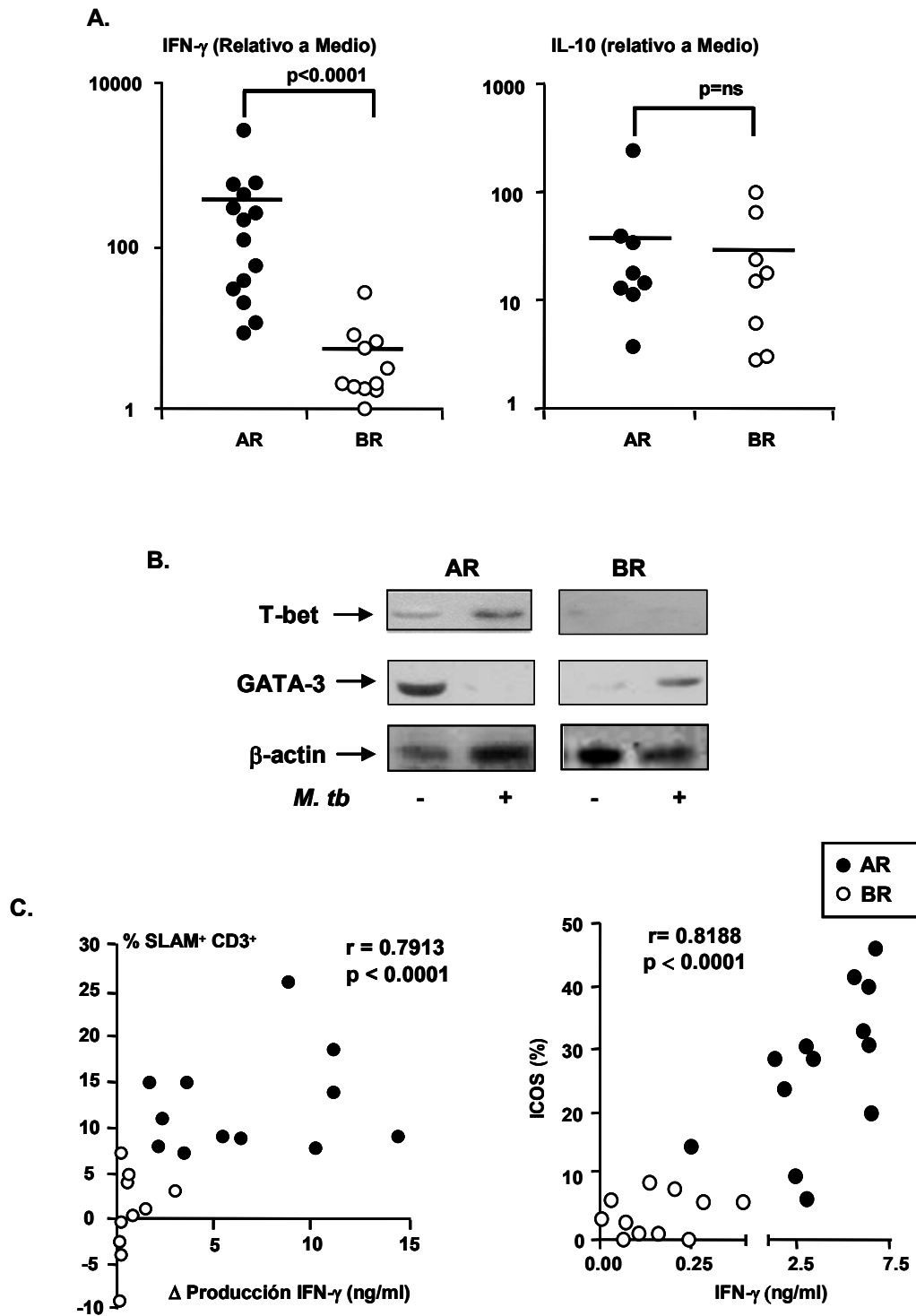


Figura 4. La respuesta de citoquinas en pacientes con tuberculosis frente al Ag específico correlaciona con la expresión de SLAM e ICOS. A, CMSP de pacientes AR y BR fueron cultivadas en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* por 48h y la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 fue determinada por ELISA. Cada símbolo representa: ng/ml de la citoquina producida en células estimuladas con *M. tuberculosis* / ng/ml de citoquinas secretadas por células cultivadas en

medio. \*  $p < 0.0001$ , test de Mann-Whitney; n.s= diferencias no significativas. B, Luego de 5 días de estimulación con *M. tuberculosis*, se prepararon extractos celulares totales y se determinó la expresión de T-bet y GATA-3 por Western blot. Un paciente AR y BR representativo de 5 es mostrado. C, Correlación Directa entre la expresión de SLAM e ICOS y la producción de IFN- $\gamma$  en pacientes con tuberculosis. Para determinar la asociación entre estos dos parámetros, se realizó un análisis estadístico utilizando el test de Spearman. Cada símbolo representa el porcentaje de células y la secreción de IFN- $\gamma$  en células estimuladas con *M. tuberculosis* menos la expresión de SLAM o la producción de IFN- $\gamma$  en medio para cada paciente con tuberculosis.

### ***II. Investigación de la función de SLAM en tuberculosis activa.***

#### ***Estudio de la expresión de SAP y SLAM en pacientes con tuberculosis según la respuesta de IFN- $\gamma$ contra M. tuberculosis.***

Dado que se encontró una expresión diferencial en los niveles de SLAM según la respuesta inmune del paciente a *M. tuberculosis*, se hipotetizó que SLAM podría participar en la regulación de dicha respuesta inmune contra el patógeno. Así, seguidamente, se iniciaron estudios para dilucidar la función de SLAM en tuberculosis. Ha sido descrito que SAP, proteína de unión a SLAM, interactúa con la cola citoplasmática de SLAM (92, 95, 99). Más aún se ha sido propuesto que la señalización a través de la vía SLAM-SAP alteraría el perfil de citoquinas producido durante la activación de células T (97). Por lo expuesto, seguidamente analizamos simultáneamente la expresión de SAP y SLAM en CMSP de pacientes y controles, luego de estimulación antigénica. Posteriormente, la expresión de SLAM y SAP fue comparada con la producción de IFN- $\gamma$  en los mismos individuos. Los resultados obtenidos mostraron expresión de proteína SLAM tanto en pacientes con tuberculosis que producían altos niveles de IFN- $\gamma$  (AR) y no expresaban SAP como en aquellos individuos que producían bajos niveles de IFN- $\gamma$  contra *M. tuberculosis* (BR) y no expresaban niveles sustanciales de SAP (Fig. 5). Como muestra la Figura 5, en aquellos individuos que producían bajos niveles de IFN- $\gamma$  frente a la estimulación con *M. tuberculosis* (BR, Fig. 1 y Fig. 5C), se detectaron sustanciales niveles de proteína SAP por western blot (Fig. 5A y 5B). En contraste, en pacientes que producían altos niveles de IFN- $\gamma$  contra el

patógeno (AR, Fig. 1 y Fig. 5C), SAP fue indetectable (Fig. 5A y 5B). Más aún, en forma similar a nuestros hallazgos en pacientes de AR, en células de dadores sanos, individuos que producían considerables niveles de IFN- $\gamma$  contra el antígeno, la estimulación con *M. tuberculosis* no indujo expresión de SAP (Fig. 5A y 5B). Estos datos indican que la expresión de SAP es mayor en el grupo de pacientes que muestra una baja respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, sugiriendo que la expresión diferencial de esta molécula de señalización podría estar involucrada en la resolución de la infección tuberculosa. Asimismo, la proteína SLAM se detectó en células de dadores sanos, individuos que producían IFN- $\gamma$  contra el antígeno pero no expresaban SAP (Fig. 5). Interesantemente, estos resultados en pacientes con tuberculosis concordaron con un modelo propuesto en ratón, donde SAP es requerido para “apagar” la producción de IFN- $\gamma$  (97). En la línea celular murina BI-14, la interacción SLAM-SAP da como resultado la inhibición selectiva de la liberación de IFN- $\gamma$  durante la activación T (97). Sin embargo, no se observa ningún efecto sobre la producción de IFN- $\gamma$  en células que expresan SLAM o SAP únicamente (97). De esta forma, estos resultados en ratón junto con los datos obtenidos en este trabajo en humanos, los cuales muestran expresión de SLAM pero niveles diferenciales de SAP en pacientes con tuberculosis, apoyan la hipótesis que la expresión diferencial de las moléculas de activación SLAM y SAP participaría en la modulación del patrón de citoquinas durante la infección tuberculosa. Así, estos resultados demuestran por primera vez el rol de SAP en una infección humana intracelular.

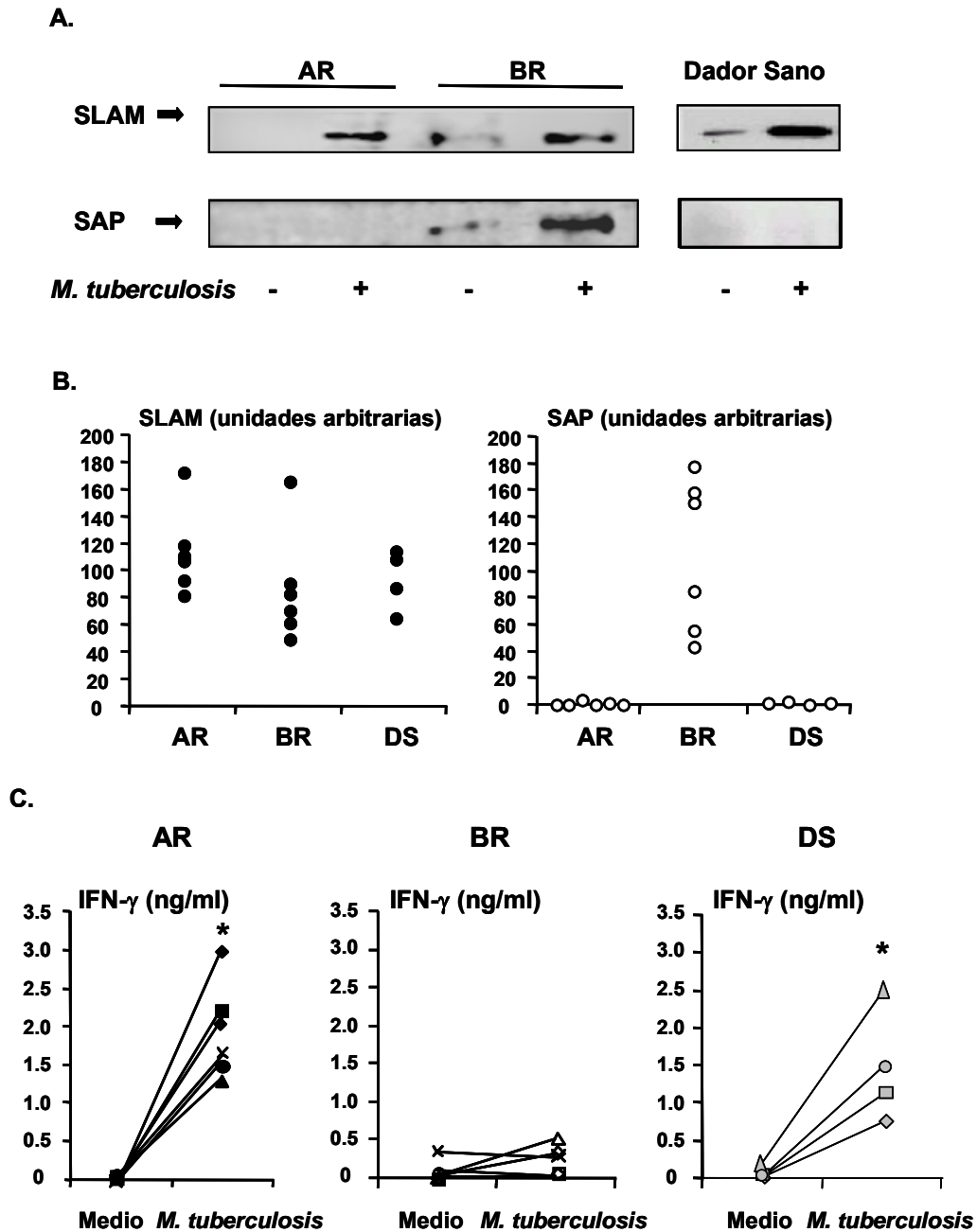


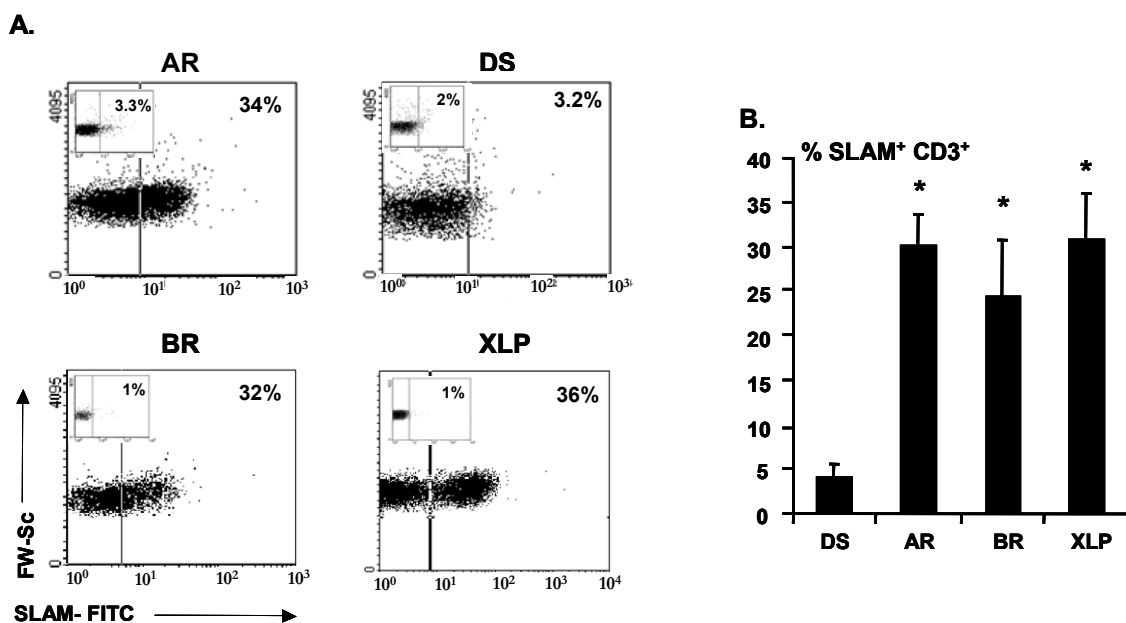
Figura 5. Efecto de *M. tuberculosis* sobre la expresión de SLAM y SAP en pacientes con tuberculosis y dadores sanos. CMSP de pacientes de AR, BR y de DS fueron estimulados con sonicado de *M. tuberculosis* y se investigó la expresión de SLAM, SAP y la producción de IFN- $\gamma$ . A, Luego de 5 días de estimulación, se prepararon extractos celulares totales para la determinación de la expresión proteica de SLAM y SAP por Western blot. Se muestran individuos representativos. B, Los gels de poliacrilamida fueron escaneados, densitometrados y los resultados se expresan como unidades arbitrarias. C, Luego de 48h de estimulación, se determinó la secreción de IFN- $\gamma$  por ELISA. Los valores se expresan como la media de los triplicados. Cada línea conecta los datos de un individuo. \* $p < 0.001$ , test de Wilcoxon.

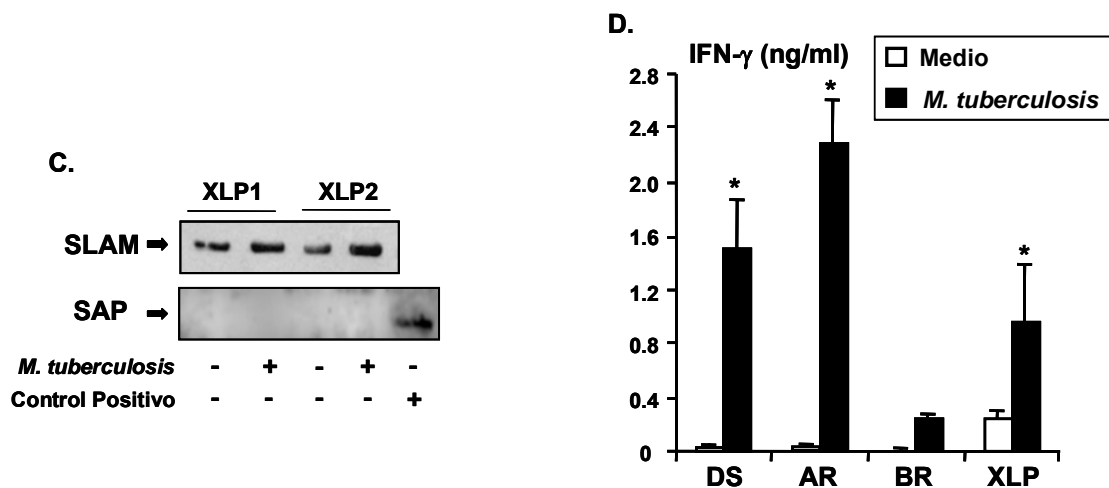


### *Estudio de la función de SLAM en individuos con el gen de SAP deficiente.*

SAP es el principal gen afectado en la enfermedad linfoproliferativa asociada al cromosoma X (XLP), y se sugirió que algunos de los estadios de esta enfermedad podrían estar causados por una regulación anormal del gen de SAP y/o de la subpoblación de células T que expresan SAP (92). Para investigar en profundidad la función de SAP en la regulación del patrón de citoquinas producido por células T activadas, se estudió la respuesta contra *M. tuberculosis* en pacientes XLP que no expresan SAP o producen una proteína no funcional. Inicialmente comparamos la expresión de SLAM en células T de sangre periférica en reposo de donadores sanos, pacientes con tuberculosis y pacientes XLP. En contraste con nuestros hallazgos en CMSP de pacientes con tuberculosis en respuesta a la estimulación antigénica, los niveles de SLAM en células T en reposo de pacientes de AR y BR resultaron similares (Fig. 6A y 6B), de acuerdo a nuestros resultados previos en pacientes con lepra (80). Las células T CD3<sup>+</sup> de pacientes XLP mostraron niveles de SLAM en superficie comparables a los expresados por pacientes con tuberculosis (Fig. 6A y 6B). Sin embargo, se hallaron niveles marcadamente superiores en la expresión de SLAM en células T CD3<sup>+</sup> de pacientes con tuberculosis y XLP en comparación con los donadores sanos (Fig. 6A y 6B), sugiriendo que sistémicamente, las células T en tuberculosis y en pacientes XLP existen en un estado activado, si bien no necesariamente en respuesta al patógeno. Más aún, en forma similar a nuestros hallazgos en pacientes de AR, *M. tuberculosis* incrementó los niveles de SLAM en individuos XLP (Fig. 6C), mientras que no se detectó proteína SAP (Fig. 6C).

Por lo tanto, seguidamente investigamos la producción de IFN- $\gamma$  por células de pacientes XLP en respuesta a *M. tuberculosis*. Como se muestra en la Figura 6D, los pacientes XLP produjeron menores niveles de IFN- $\gamma$  contra *M. tuberculosis* comparado a pacientes de AR y dadores sanos, pero mayores niveles de la citoquina en comparación con pacientes de BR, indicando que las células de pacientes XLP pueden responder a la bacteria. No es sorprendente los niveles basales relativamente altos de IFN- $\gamma$  producidos por pacientes XLP (Fig. 6D), ya que el defecto en estos individuos resulta de su incapacidad para montar una respuesta apropiada de citoquinas Th2 luego de la infección por EBV, lo que lleva a desarrollar una respuesta Th1 exacerbada, con una producción incrementada de IFN- $\gamma$  que causa daño al parénquima (150). Los presentes datos en pacientes XLP reafirman la hipótesis de que la expresión diferencial de las proteínas SLAM y SAP modularía el patrón de citoquinas durante la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*.





**Figura 6. Expresión de SAP y SLAM y producción de IFN- $\gamma$  en pacientes XLP.** A, Determinación de los niveles de superficie de SLAM en células T en reposo de pacientes y donadores sanos representativos por citometría de flujo. El porcentaje de células SLAM<sup>-</sup> (control de isotipo, inserto) o SLAM<sup>+</sup> (panel mayor) se expresa en la porción derecha de los paneles. B, Cada barra representa la media del porcentaje de la expresión de células T SLAM<sup>+</sup> en cada grupo de individuos. \* $p < 0.01$ , test de Mann-Whitney. C, Efecto de *M. tuberculosis* sobre la expresión de SLAM y SAP en pacientes XLP. CMSP de dos individuos XLP fueron estimulados con sonicatedo de *M. tuberculosis* por 5 días y se investigó la expresión de SLAM y de SAP por Western blot. D, Producción de IFN- $\gamma$  en donadores sanos, pacientes de AR y BR y pacientes XLP. Cada barra representa la media de los niveles de IFN- $\gamma$  producidos por cada grupo de individuos determinada por ELISA. \*  $p < 0.001$ , test de Wilcoxon comparando la producción de IFN- $\gamma$  por células cultivadas en medio versus *M. tuberculosis*.

***La señalización a través de SLAM induce la producción de IFN- $\gamma$  durante la infección activa por *M. tuberculosis*.***

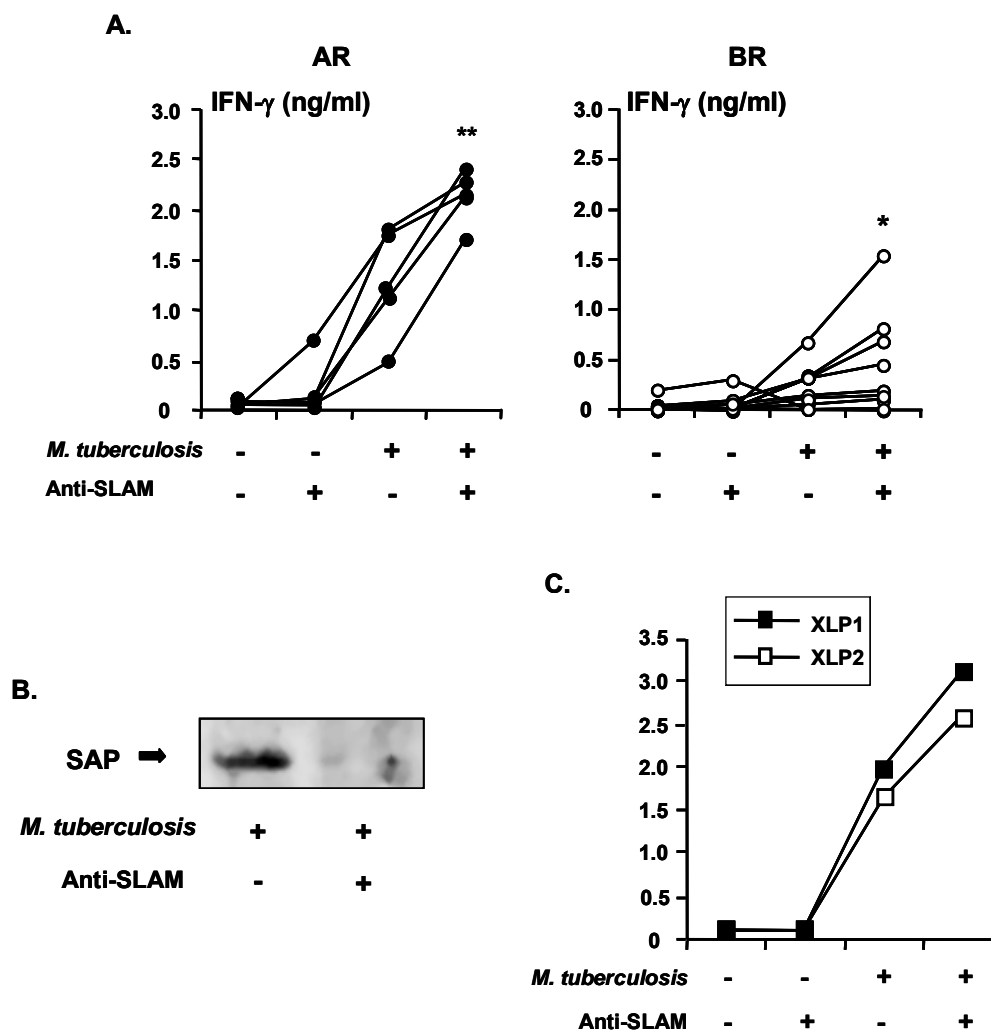
La activación de SLAM induce un aumento de la secreción de IFN- $\gamma$  por clones celulares T (89), incluyendo clones Th2. Asimismo, nosotros demostramos que la señalización vía SLAM incrementa significativamente la producción de IFN- $\gamma$  inducida por *M. leprae* en pacientes con lepra tuberculoide respondedores al antígeno (80). Por lo tanto, seguidamente investigamos el efecto de la activación de SLAM sobre la producción de IFN- $\gamma$  en pacientes con tuberculosis. Como muestra la Figura 7A, la señalización vía SLAM incrementó significativamente el IFN- $\gamma$  producido en respuesta a *M. tuberculosis* por pacientes de AR (Fig. 7A, panel izquierdo). Más aún, la activación de

SLAM aumentó los niveles de citoquinas producidos por varios pacientes de BR (Fig. 7A, panel derecho), si bien éstos no alcanzaron los niveles secretados por los pacientes de AR. La adición de anticuerpo agonista anti-SLAM no tuvo efecto sobre la producción de IL-4 por pacientes de AR y BR (dato no mostrado). Estos resultados sugieren que la activación de SLAM podría inducir respuestas de tipo 1 en pacientes con tuberculosis en respuesta al antígeno.

El incremento en IFN- $\gamma$  inducido en varios pacientes de BR luego de señalizar a través de SLAM, nos llevó a cuestionarnos si la expresión de SAP era modulada en individuos de BR. Interesantemente, como muestra la Figura 7B en células estimuladas con antígeno la señalización vía SLAM indujo una marcada disminución de la expresión de SAP. De esta forma, estos resultados mostrando que el incremento en IFN- $\gamma$  es paralelo a la disminución de la expresión de SAP, refuerzan nuestros datos sugiriendo que la presencia de SAP impide la producción de IFN- $\gamma$ .

A fin de investigar el efecto de la deficiencia en SAP sobre la producción de citoquinas luego de estimulación por *M. tuberculosis*, CMSP de pacientes XLP fueron estimulados con antígeno de *M. tuberculosis* y luego de 5 días las células se cultivaron con anti-SLAM, para determinar el IFN- $\gamma$  secretado por ELISA. La Figura 7C muestra que, de manera similar a nuestros resultados con pacientes de AR, la señalización a través de SLAM incrementó marcadamente la producción de IFN- $\gamma$  por pacientes XLP. De esta manera, los individuos con el gen de SAP no funcional que presentan expresión de SLAM en superficie, son capaces de producir IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis* y esta producción puede ser significativamente aumentada a través de señalización vía SLAM. Por otro lado, los pacientes con tuberculosis activa que

no expresan SAP pero muestran expresión de SLAM en superficie, producen niveles significativos de IFN- $\gamma$  en respuesta al antígeno específico, mientras que los pacientes con enfermedad activa que expresan SAP y SLAM no son capaces de secretar IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis*. En forma conjunta, nuestros datos indican que SAP “apagaría” la producción de IFN- $\gamma$ .



**Figura 7. Efecto de la activación de SLAM sobre la expresión de SAP y la producción de IFN- $\gamma$ .** A, CMSP de pacientes de AR (izquierda) y BR (derecha) fueron estimulados con *M. tuberculosis* y luego de 5 días las células fueron lavadas y cultivadas en presencia/ausencia de anti-SLAM. A las 48 h se recolectaron los sobrenadantes para determinar la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. Los valores se expresan como la media los triplicados. Cada línea conecta los datos para un individuo. Los valores de p se calcularon usando el test de Wilcoxon comparando la producción de IFN- $\gamma$  por células estimuladas con *M. tuberculosis* luego medio, versus células estimuladas con *M. tuberculosis* luego anti-SLAM. \*\*p<0.001, \*p<0.05. B, CMSP de pacientes de BR se cultivaron con *M. tuberculosis* en presencia/ausencia de anti-SLAM y luego de 5 días se prepararon extractos celulares totales para determinara la expresión proteica de SAP por Western blot. C, CMSP de individuos XLP fueron cultivados con *M. tuberculosis* por 5 días. Posteriormente, las

células fueron incubadas con anti-SLAM y se determinó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. Se muestra un experimento representativo de tres.

Previamente demostramos que la liberación local de IFN- $\gamma$  por células T activadas por *M. leprae* en lesiones de pacientes con lepra tuberculoide conduce a aumento de la expresión de SLAM y que la señalización a través de SLAM luego del tratamiento con IFN- $\gamma$  de células estimuladas con antígeno, incrementa la producción de IFN- $\gamma$  en pacientes no respondedores con lepra lepromatosa (80). Por lo tanto, seguidamente investigamos si la producción de IFN- $\gamma$  por pacientes de BR podía ser aumentada a través de activación de SLAM hasta niveles comparables a los producidos por pacientes de AR, mediante estimulación en presencia de citoquinas proinflamatorias. Como fue demostrado anteriormente, la coestimulación a través de SLAM indujo un incremento aún mayor de la producción de IFN- $\gamma$  en células previamente estimuladas con *M. tuberculosis* (Fig. 7A). En contraste, los pacientes de BR produjeron bajos niveles de IFN- $\gamma$  en respuesta al antígeno (Figura 6), y si bien la señalización vía SLAM incrementó el IFN- $\gamma$ , los niveles producidos no alcanzaron aquellos secretados por los individuos de AR (Fig. 7A). Sin embargo, la señalización vía SLAM luego del tratamiento con IFN- $\gamma$  recombinante en presencia de *M. tuberculosis* aumentó significativamente la producción de IFN- $\gamma$  en pacientes de BR (Fig. 8, panel izquierdo).

Luego de la fagocitosis del bacilo *M. tuberculosis* por los macrófagos y células dendríticas, se induce producción de IL-12, dirigiendo el desarrollo de respuestas Th1 con producción de IFN- $\gamma$  (151, 152). De esta forma, como la IL-12 es una citoquina crucial en el control de la infección por *M. tuberculosis*, seguidamente realizamos experimentos estimulando células de pacientes con

antígeno, en presencia/ausencia de IL-12, seguido de estimulación con anti-SLAM. El tratamiento con IL-12 más antígeno aumentó la producción de IFN- $\gamma$  luego de la activación de SLAM en pacientes de BR hasta los niveles producidos por individuos de AR (Fig. 8, panel derecho). Estos resultados sugieren que la capacidad de las células T de responder a la activación vía SLAM puede ser incrementada por cultivo con citoquinas pro-inflamatorias, sosteniendo la hipótesis que la producción disminuida de IFN- $\gamma$  sería dependiente de la incapacidad de las células T de responder al antígeno.

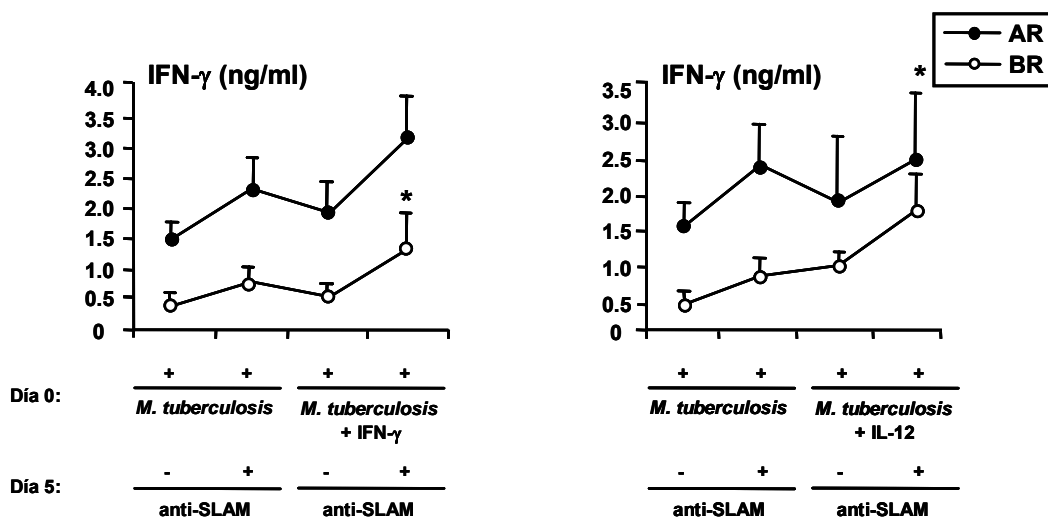


Figura 8. Efecto de la activación de SLAM sobre la producción de IFN- $\gamma$  producido en respuesta a *M. tuberculosis* luego de tratamiento con citoquinas pro-inflamatorias. Se adicionó IFN- $\gamma$  (panel izquierdo) o IL-12 (panel derecho) junto con *M. tuberculosis* a cultivos celulares de pacientes con tuberculosis y luego de 5 días las células fueron incubadas en presencia/ausencia de anti-SLAM. A las 48 h se determinó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. Los valores de p se calcularon usando el test de Wilcoxon comparando la producción de IFN- $\gamma$  por células estimuladas con *M. tuberculosis* + citoquina y luego medio, versus células estimuladas con *M. tuberculosis* + citoquina y luego anti-SLAM. \*  $p < 0.05$  para IFN- $\gamma$  y  $p < 0.01$  para IL-12 en pacientes BR.

### *III. Estudio de la función de ICOS en tuberculosis activa.*

#### *Regulación de la expresión de ICOS.*

Previamente hemos demostrado que la expresión de ICOS correlaciona con la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* (Fig. 2 y 4). Más aun, ha sido reportado en ratón, que esta molécula podría regular las respuestas Th1 y Th2 en enfermedades infecciosas (113, 145-149). Por lo mencionado, seguidamente estudiamos la regulación de la expresión de ICOS en tuberculosis. En primer lugar, dado que la estimulación vía CD28 induce la expresión de ICOS en células T de ratón estimuladas policlonalmente (116), investigamos si la señalización a través de CD28 participaba en la regulación de la expresión de ICOS en tuberculosis. Detectamos niveles similares de CD28 en células T de pacientes de AR y BR luego de estimulación con *M. tuberculosis* (células T CD28<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T, AR: 78%; BR: 80%). Sin embargo, la señalización vía CD28 incrementó marcadamente la expresión de ICOS en células de pacientes de AR estimuladas con antígeno (Fig. 9A-c), mientras que no modificó la expresión de ICOS en células de pacientes de BR (dato no mostrado). Más aún, el bloqueo con un Ac anti-CD28 disminuyó la expresión de ICOS en células T de individuos de AR estimuladas con *M. tuberculosis* (Fig. 9A-d y 9B,  $p < 0.05$ , Wilcoxon test), demostrando que la señalización a través de CD28 participa en la regulación de la expresión de ICOS. La neutralización simultánea del IFN- $\gamma$  endógeno y el bloqueo de la vía CD28 en células de pacientes de AR estimuladas con antígeno redujo significativamente la expresión de ICOS (Fig. 9A-e y 9B,  $p < 0.05$ , Wilcoxon test).



Si bien *M. tuberculosis* incrementó significativamente la expresión de ICOS en células de pacientes de AR, las condiciones polarizantes Th2 redujeron significativamente los niveles de ICOS (Fig. 9A-f y 9C,  $p < 0.05$ , Wilcoxon test), en correlación con una marcada disminución de la producción de IFN- $\gamma$  en todas las condiciones (dato no mostrado). En contraste, si bien las células T de pacientes de BR mostraron características de células Th2 y expresaron bajos niveles de ICOS en respuesta a *M. tuberculosis*, las condiciones polarizantes Th2 no modificaron significativamente la expresión de ICOS en estos pacientes (datos no mostrados). Más aún, el cultivo de células de pacientes de AR estimuladas con antígeno y con rIFN- $\gamma$ , incrementó significativamente la expresión de ICOS (Fig. 9A-g y 9D,  $p < 0.005$ , Wilcoxon test), confirmando el rol de esta citoquina en la modulación de este receptor. Por el contrario, las condiciones polarizantes Th1 sólo tuvieron un efecto leve sobre los niveles de ICOS en células de pacientes de BR estimuladas con *M. tuberculosis* (dato no mostrado). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la regulación de la expresión de ICOS podría depender de la respuesta de la célula T a *M. tuberculosis*, lo cual determinaría la subsiguiente regulación de ICOS. Más aún, demostramos por primera vez que la expresión de ICOS puede ser regulada por el microambiente de citoquinas y por la señalización a través de CD28 durante la respuesta inmune contra un antígeno bacteriano.

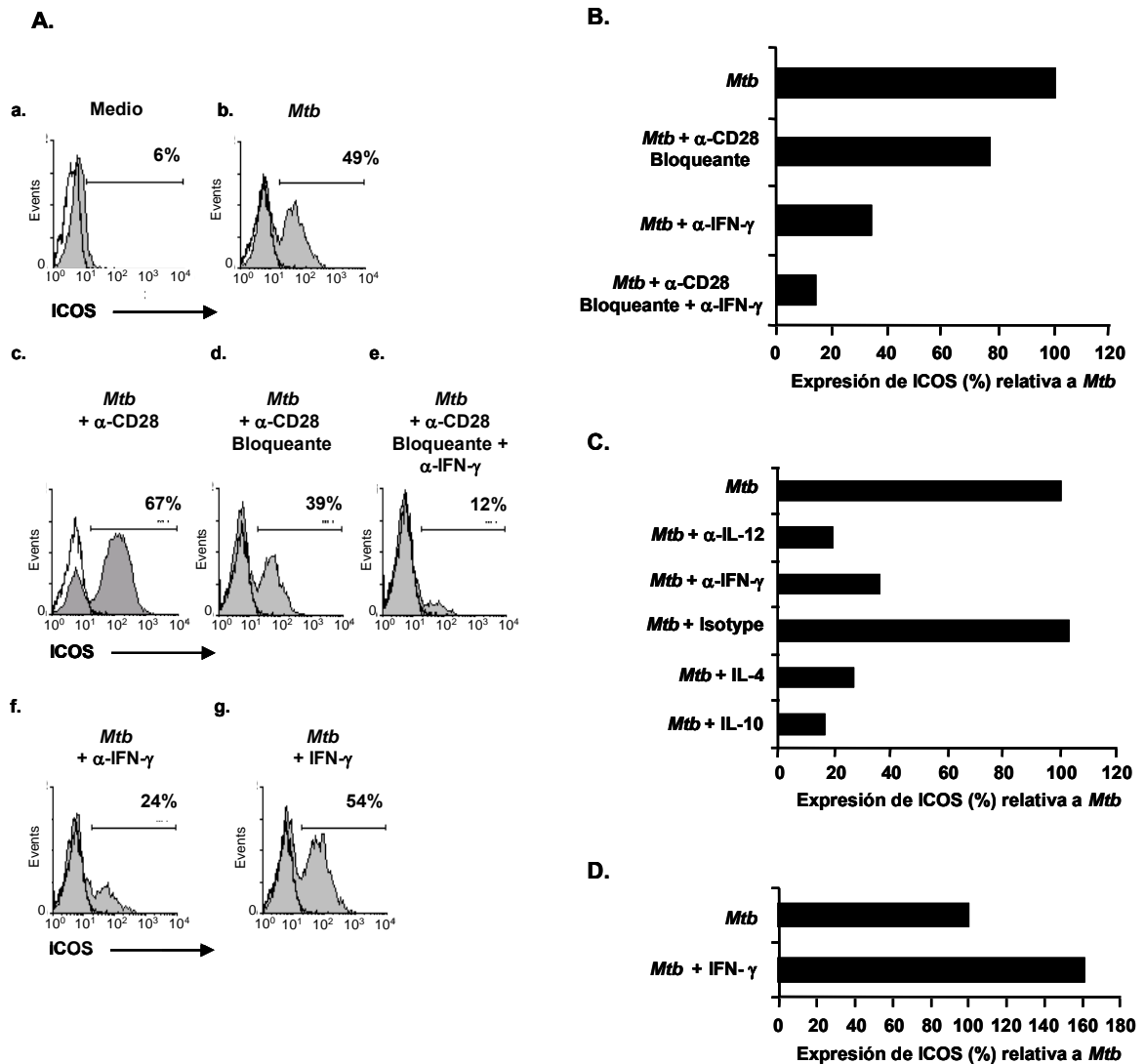
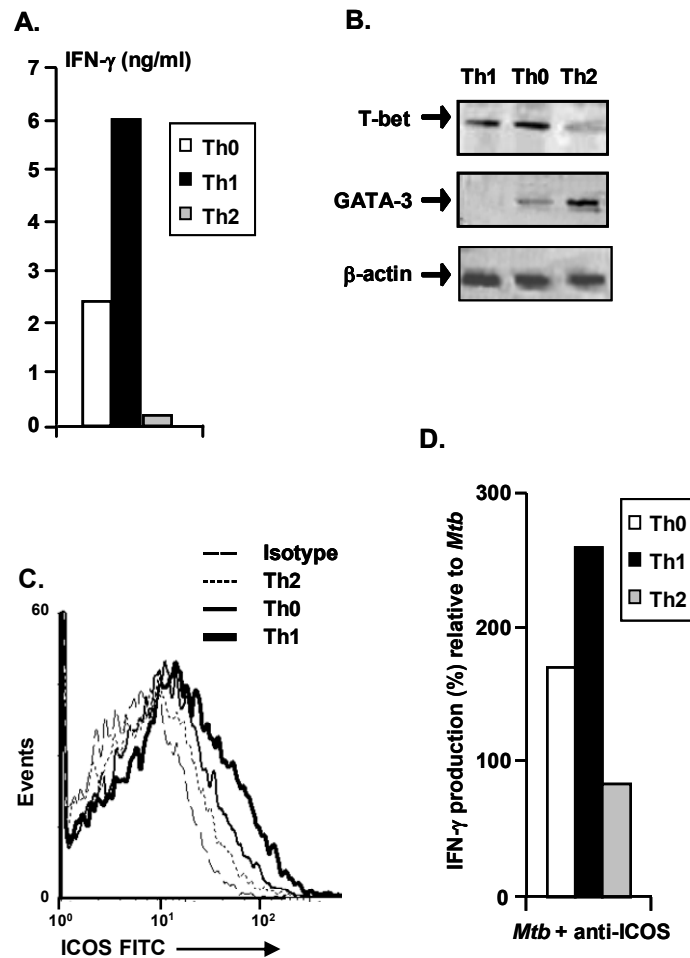


Figura 9. Modulación de la expresión de ICOS por señalización vía CD28 o citoquinas del microambiente celular. CMSP de pacientes AR fueron cultivadas en medio o con *M. tuberculosis* (*Mtb*) por 5 días en presencia o ausencia de anticuerpos estimulantes, neutralizantes y/o citoquinas recombinantes, y los niveles de ICOS fueron determinados por citometría de flujo. Aa–g, Expresión de ICOS (histograma gris) vs. control de isotipo (histograma blanco) en un paciente AR representativo de siete para cada condición. B–D, Los valores son expresados como porcentaje de expresión de ICOS en siete pacientes AR relativo a las células cultivadas con *M. tuberculosis*. Los valores fueron calculados como:  $100 \times \frac{[\text{expresión de ICOS en células estimuladas con } Mtb + \text{citoquinas recombinantes y/o Acs neutralizantes}]}{[\text{expresión de ICOS en células estimuladas con } Mtb + \text{expresión de ICOS en medio}]} \times 100$ .

### *Expresión y activación de ICOS en líneas T polarizadas.*

Ha sido reportado que los niveles de ICOS en células Th polarizadas no serían fijos, y que la IL-12 tendría un rol importante en la regulación de la expresión de ICOS en líneas celulares Th activadas (116). En este trabajo previamente demostramos que la expresión de ICOS podría ser regulada por el microambiente de citoquinas durante la infección por *M. tuberculosis*. Para continuar explorando la regulación y el rol de ICOS en células Th, CMSP provenientes de dadores sanos fueron estimuladas bajo condiciones polarizantes Th0, Th1 o Th2. Se observó que las células estimuladas bajo condiciones polarizantes Th1, las cuales secretaban elevados niveles de IFN- $\gamma$  (Fig. 10A) y mostraban una elevada expresión de T-bet (Fig. 10B) y expresaban los mayores niveles de ICOS sobre la superficie celular (Fig. 10C). Las células estimuladas bajo condiciones polarizantes Th0, que también producían considerables niveles de IFN- $\gamma$  y expresión de T-bet (Fig. 10A y B), mostraron elevados niveles de ICOS (Fig. 10C), aunque menores comparados con las células estimuladas bajo condiciones Th1 (Fig. 10C). Más aún, la menor expresión de ICOS se detectó en las células estimuladas bajo condiciones Th2, las cuales producían bajos o indetectables niveles de IFN- $\gamma$  y T-bet, pero mostraron elevada expresión de GATA-3 (Fig. 10). Estos resultados indican que de acuerdo con el estado de polarización, las células Th humanas expresan niveles diferenciales de ICOS, los cuales correlacionan con la producción de IFN- $\gamma$  por dichas células.



**Figura 10. Expresión y función de ICOS en líneas celulares humanas polarizadas de corto término.** CMSP de dadores sanos fueron estimuladas bajo condiciones polarizantes Th1 o Th2. Luego de la polarización, se determinó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA (A) y la expresión de T-bet y GATA-3 por Western blot (B). C, la expresión de ICOS en células estimuladas bajo condiciones polarizantes Th0, Th1, y Th2 fue analizada por citometría de flujo. D, Efecto de la señalización a través de ICOS en la producción de IFN- $\gamma$  por células estimuladas bajo condiciones polarizantes Th0, Th1 y Th2 en respuesta a *M. tuberculosis*. Las células T de las líneas polarizadas fueron estimuladas con *M. tuberculosis* y anticuerpo agonista anti-ICOS por 48 h y se determinó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. Los valores se expresan como el porcentaje de producción de IFN- $\gamma$  relativo a las células cultivadas con *M. tuberculosis*. Los valores se calcularon de la siguiente manera:  $100 - ((\text{producción de IFN-}\gamma \text{ por células estimuladas con } M. \text{ tuberculosis} - \text{producción de IFN-}\gamma \text{ por células estimuladas con } M. \text{ tuberculosis} + \text{anti-ICOS}) / (\text{producción de IFN-}\gamma \text{ por células estimuladas con } M. \text{ tuberculosis} - \text{producción de IFN-}\gamma \text{ por células cultivadas en medio}) \times 100$ ). Se muestra un ejemplo representativo de ocho.

Ha sido demostrado que la señalización a través de ICOS puede inducir la producción de citoquinas de tipo Th1 o Th2 durante la respuesta inicial primaria y durante las respuestas efectoras. Por lo tanto, decidimos investigar el efecto de la señalización a través de dicho receptor en la modulación de

las respuestas de citoquinas inducidas por *M. tuberculosis* en las líneas Th polarizadas. Las células fueron estimuladas con antígeno en presencia de anticuerpo monoclonal anti-ICOS y se determinó la producción de IFN- $\gamma$ . Se observó que *M. tuberculosis* indujo un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  por las células estimuladas bajo condiciones Th0 y Th1, y que dichos niveles incrementaron aún más luego de la señalización a través de ICOS (Fig. 10D). En contraste, ni la estimulación antigénica, ni la coestimulación vía ICOS modificaron los niveles de IFN- $\gamma$  secretados por las células estimuladas bajo condiciones Th2 (Fig. 10D). Nuestros resultados indican que la coestimulación vía ICOS en células Th polarizadas estimuladas con *M. tuberculosis* incrementa la producción de IFN- $\gamma$  con una magnitud proporcional a los niveles de expresión del receptor. De esta manera, estos hallazgos avalan nuestros resultados anteriores sobre el efecto modulador del microambiente de citoquinas en la expresión de ICOS en pacientes con tuberculosis.

### ***Efecto de la señalización a través de ICOS sobre la respuesta de citoquinas en pacientes con tuberculosis pulmonar activa.***

Considerando nuestros resultados sobre la expresión y función de ICOS en las células Th humanas polarizadas, y dado que el rol de ICOS en la modulación del patrón de citoquinas no ha sido aún estudiado en ninguna infección humana intracelular, decidimos investigar si la coestimulación vía ICOS podría modular las respuestas de citoquinas por linfocitos T estimulados con *M. tuberculosis*. Para ello, CMSP fueron estimuladas con *M. tuberculosis* por cinco días, y luego con un anticuerpo monoclonal agonista anti-ICOS. En

la figura 11A se muestra que la señalización vía ICOS aumenta significativamente la producción de IFN- $\gamma$  en individuos AR. Más aún, al analizar el porcentaje de células IFN- $\gamma^+$  por citometría de flujo intracelular, se halló que el incremento en la producción de IFN- $\gamma$  detectado luego de la coestimulación a través de ICOS es debido a una secreción aumentada por células previamente activadas por el Ag específico. Determinamos porcentajes similares de células productoras de IFN- $\gamma$  luego de la estimulación con ICOS (comparado con la estimulación con *M. tuberculosis* solamente), pero mayores valores de intensidad de fluorescencia media (Fig. 12A). No se observó ningún efecto en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de la estimulación a través de ICOS en células previamente cultivadas en ausencia de antígeno (dato no mostrado). Más aún, el incremento en la producción de IFN- $\gamma$  luego de la coestimulación vía ICOS correlacionó con un aumento en la expresión del factor de transcripción T-bet (Fig. 12B), y niveles indetectables de GATA-3 (datos no mostrados), sugiriendo que la activación de ICOS en pacientes AR lleva a la generación de un microambiente de tipo Th1. En contraste, la señalización a través de ICOS no modificó los niveles de IFN- $\gamma$  inducidos por el antígeno en pacientes BR (Fig. 11A), probablemente porque ICOS no se indujo considerablemente sobre la superficie de los linfocitos T en respuesta a *M. tuberculosis* (Fig. 2B). Más aún, incluso luego del agregado de IFN- $\gamma$  al cultivo, los niveles de ICOS no se vieron incrementados sobre la superficie de los linfocitos T en pacientes BR, y por lo tanto, la señalización a través de dicho receptor no incrementó la producción de IFN- $\gamma$  en dichos individuos (dato no mostrado). Sorprendentemente, la coestimulación a través de ICOS no tuvo

ningún efecto sobre la producción de IL-10 (Fig. 11A) o IL-4 (dato no mostrado) en ambos grupos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

Con el objetivo de confirmar la relación entre la producción de IFN- $\gamma$  y la señalización a través de ICOS, bloqueamos la señalización a través de este receptor mediante la utilización de un anticuerpo que interactúa específicamente con el ligando de ICOS (ICOSL) inhibiendo la interacción de este con su receptor. CMSP de pacientes de AR fueron estimuladas con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de Ac anti-ICOSL y la producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. Observamos que el bloqueo de la vía de ICOS indujo una marcada disminución en la producción de IFN- $\gamma$  en comparación con las células estimuladas con *M. tuberculosis* solamente (Fig. 12C), pero no produjo cambios en la producción de IL-10 (dato no mostrado), indicando que ICOS participa en la generación de respuestas Th1 frente a *M. tuberculosis*.

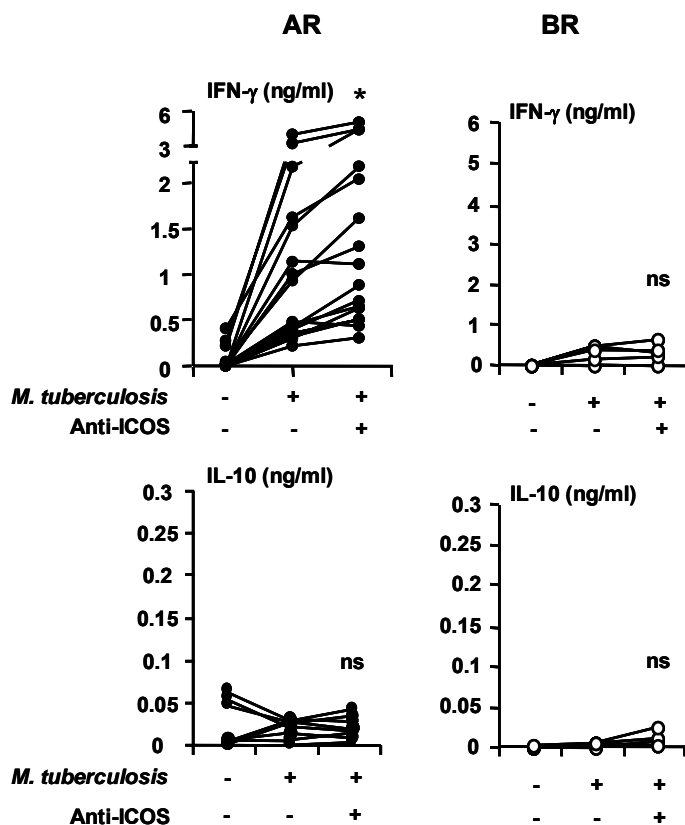


Figura 11. Efecto de la señalización a través de ICOS sobre la respuesta de citoquinas frente a la estimulación con *M. tuberculosis*. A, CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M. tuberculosis* y luego de 5 días las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de anticuerpo monoclonal agonista anti-ICOS. Luego de 48h, se tomaron los sobrenadantes de cultivo libre de células, y se midió la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 por ELISA. Los valores de p se calcularon utilizando el test de Wilcoxon comparando la producción de citoquinas de células cultivadas con *M. tuberculosis* y posteriormente en medio versus las células cultivadas con *M. tuberculosis* y posteriormente anticuerpo anti-ICOS. \* $p < 0.001$ ; n.s., diferencias no significativas. .

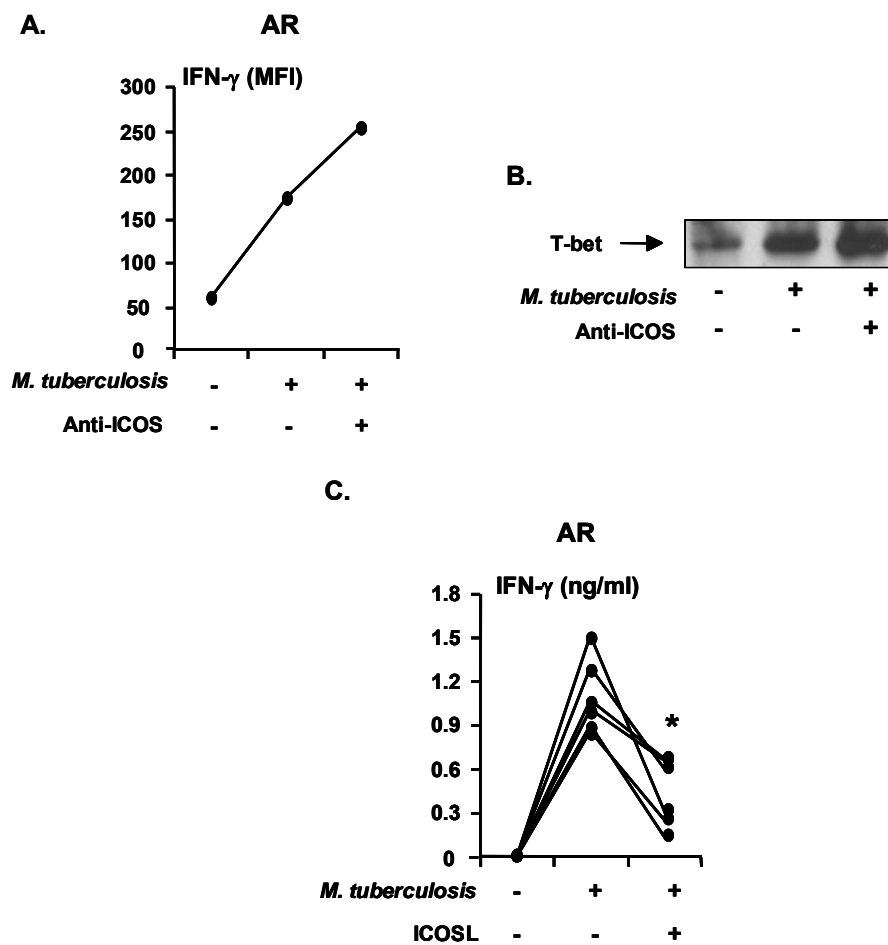


Figura 12. La activación de ICOS induce la producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de T-bet en células previamente activadas por *M. tuberculosis*. A, CMSP fueron cultivadas con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de anti-ICOS por 4 días. Luego se determinó la producción de IFN- $\gamma$  en células T CD3<sup>+</sup> por citometría de flujo intracelular. Cada símbolo representa la intensidad de fluorescencia media (IFM). Se muestra un paciente representativo de de cinco. B, CMSP de pacientes AR fueron cultivadas con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de anticuerpo monoclonal anti-ICOSL bloqueante y luego de 48 h, se determinó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. \*  $p < 0.05$ , Wilcoxon test comparando la producción de IFN- $\gamma$  en células estimuladas con *M. tuberculosis* versus células cultivadas con *M. tuberculosis* + anticuerpo anti-ICOSL. C, CMSP de pacientes AR fueron estimuladas con *M. tuberculosis* como se describió en A y se prepararon extractos celulares totales. Posteriormente se determinó la expresión proteica de T-bet por Western blot. Se muestra un ejemplo representativo de un paciente AR de cinco pacientes analizados

Debido a que ha sido reportado que la activación de ICOS induce IL-10 (106), pero los datos mostrados en este trabajo indican que la coestimulación vía este receptor aumenta IFN- $\gamma$  (pero no IL-10) en pacientes con tuberculosis, se profundizó el estudio de la secreción de IL-10 en células estimuladas con *M. tuberculosis* utilizando bolillas magnéticas conteniendo anticuerpo anti-CD3 en



concentraciones sub-óptimas y anticuerpo anti-ICOS (ICOS beads). La Figura 13 muestra que la señalización simultánea a través de ICOS y CD3 indujo un incremento en la producción de IL-10 tanto en pacientes de AR como en DS, en presencia o en ausencia del antígeno. Asimismo, dicho estímulo también indujo un incremento significativo en la producción de IFN- $\gamma$  en los mismos pacientes (Fig. 13), pero en contraste a lo ocurrido con IL-10, el aumento en la producción de IFN- $\gamma$  inducido por las ICOS beads fue mayor en las células que habían sido previamente estimuladas con *M. tuberculosis* (Fig. 13), confirmando que la señalización a través de ICOS induce una respuesta IFN- $\gamma$  específica contra *M. tuberculosis*. En contraste, en pacientes de BR, la estimulación con ICOS beads no indujo producción de IL-10, tanto en presencia como en ausencia del antígeno, pero aumentó levemente la producción de IFN- $\gamma$  en células estimuladas con *M. tuberculosis* (Fig. 13), sugiriendo que la estimulación a través de CD3 podría aumentar ligeramente la fuerza de la señalización a través del TCR en pacientes no respondedores. En conjunto, los resultados presentados indican que la estimulación con anti-CD3 podría inducir la producción de IL-10 por linfocitos T de pacientes de AR y de DS durante la señalización a través de ICOS, pero que la presencia del antígeno disminuye esos niveles de IL-10 producidos, probablemente debido a los altos niveles de IFN- $\gamma$  secretados bajo dichas condiciones.

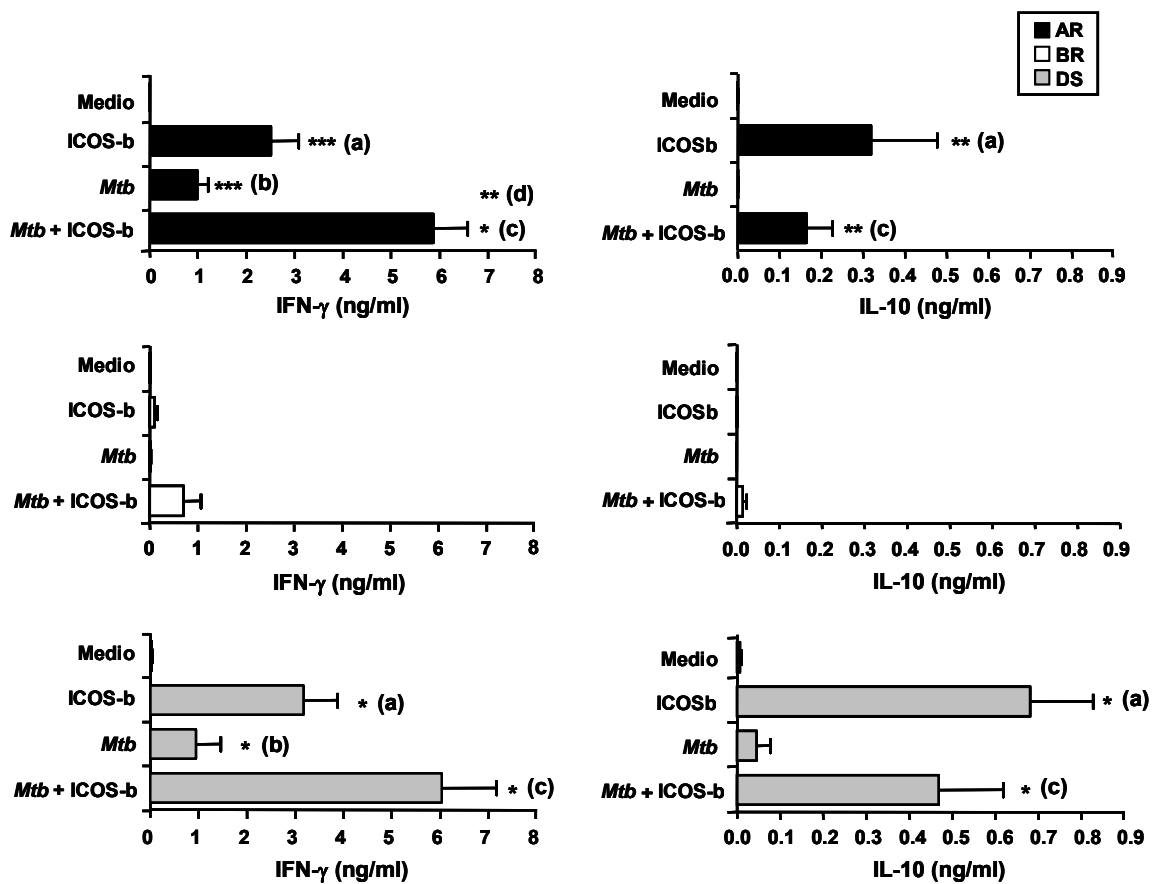


Figura 13. Efecto de la señalización vía ICOS sobre la producción de citoquinas inducida por *M. tuberculosis* utilizando bolillas magnéticas conteniendo anticuerpo anti-ICOS y concentraciones subóptimas de anti-CD3 (ICOS beads). CMSP de pacientes con tuberculosis y dadores sanos fueron estimuladas con *M. tuberculosis*. Luego de 5 días, las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de ICOS beads por 48h. La producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 fue determinada por ELISA. Los valores de p fueron calculados utilizando el test de Wilcoxon comparando: a) la producción de citoquinas de células cultivadas en medio versus células cultivadas con ICOS beads; b) la producción de citoquinas de células cultivadas en medio versus células cultivadas con *M. tuberculosis*; c) la producción de citoquinas de células cultivadas con *M. tuberculosis* y posteriormente en medio versus células cultivadas con *M. tuberculosis* y luego ICOS beads; d) la producción de citoquinas de células cultivadas con ICOS beads versus células cultivadas con *M. tuberculosis* y luego ICOS beads. \* p< 0.05; \*\* p< 0.01; \*\*\*p <0.005.

#### ***IV. Interrelación entre SLAM-ICOS e IFN- $\gamma$ durante la tuberculosis activa.***

A fin de evaluar en profundidad la relación entre la expresión de los coestimuladores ICOS y SLAM, y la producción de citoquinas por células T de pacientes con tuberculosis, determinamos los niveles de los receptores simultáneamente con la secreción de IFN- $\gamma$  luego de estimulación con *M. tuberculosis*. Observamos que en pacientes de AR, la mayoría de las células productoras IFN- $\gamma$  expresaban ICOS o SLAM, (Fig. 14A). Mas aún, encontramos un mayor porcentaje de células T IFN- $\gamma^+$  ICOS $^+$  o IFN- $\gamma^+$  SLAM $^+$  en pacientes de AR comparado con individuos de BR (Fig. 14B,  $p < 0,01$ , Mann Whitney test). Estos resultados sugerirían que las células T IFN- $\gamma^+$  podrían coexpresar estas dos moléculas coestimuladoras. Así, seguidamente determinamos la coexpresión de ICOS y SLAM, observando que el 87% de las células T coexpresaban ambos receptores en pacientes de AR (Fig. 15A, panel superior). En contraste, en pacientes de BR, se detectaron menos de 5% ya sea de células T IFN- $\gamma^+$  ICOS $^+$  o IFN- $\gamma^+$  SLAM $^+$  (Fig. 14A). Asimismo, bajos niveles de células T de pacientes no respondedores coexpresaron SLAM e ICOS en su superficie (Fig. 15A, panel inferior).

Los resultados mostrados indican que los niveles de ICOS correlacionan con los niveles de expresión de SLAM en pacientes con tuberculosis activa. Estos resultados se contraponen a datos previos de otros autores en líneas Th de ratón polarizadas que indicaron que el patrón de SLAM e ICOS era opuesto (108). Sin embargo, nosotros demostramos que tanto SLAM como ICOS son requeridos en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*. En pacientes de AR, ICOS y SLAM fueron regulados positivamente luego de la estimulación

antigénica, sugiriendo que la expresión de ambas moléculas coestimuladoras en tuberculosis correlaciona con una severidad reducida de la enfermedad. Más aún, la mayoría de las células productoras de IFN- $\gamma$  expresaron ICOS y/o SLAM en pacientes de AR, sugiriendo que ambos receptores pueden ser modulados por citoquinas Th1 y/o estar implicados en la generación de respuestas de tipo 1 frente a *M. tuberculosis*.

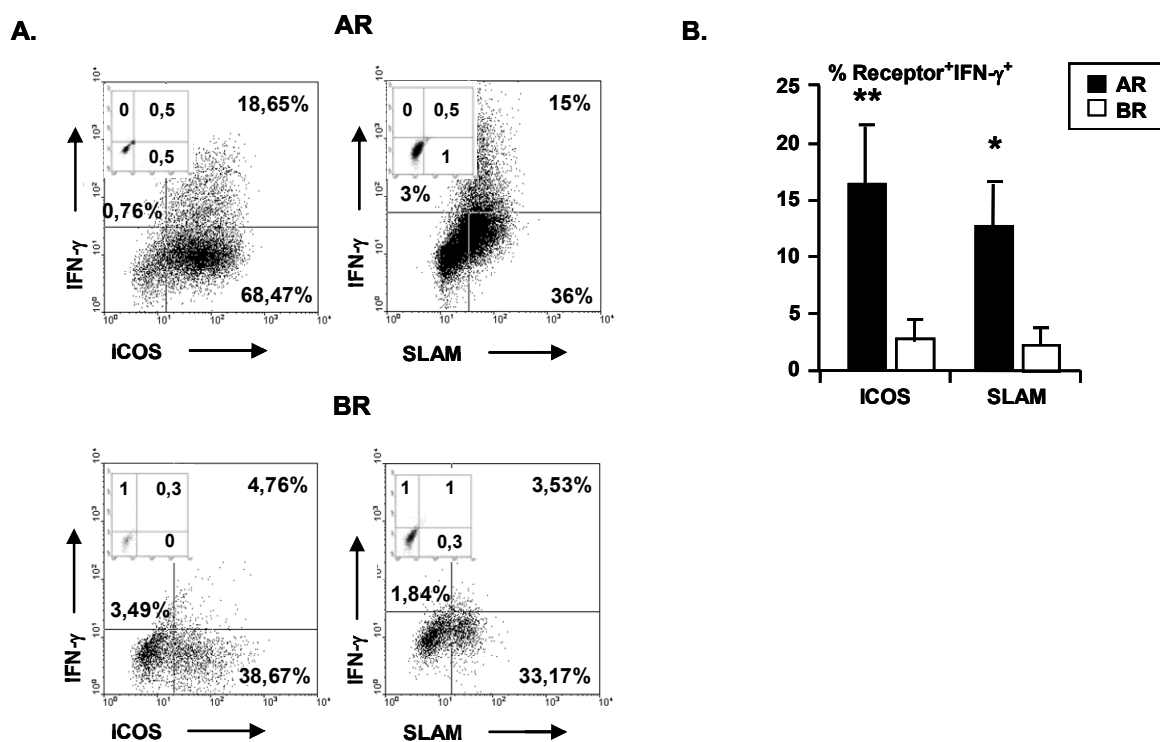


Figura 14. Efecto de *M. tuberculosis* sobre la expresión de ICOS, SLAM e IFN- $\gamma$  en pacientes con tuberculosis. A, CMSP fueron estimulados con antígeno por 4 días y se examinó la expresión de ICOS o SLAM en células T productoras de IFN- $\gamma$  reactivas a *M. tuberculosis* por citometría de flujo. La figura muestra un paciente AR y BR representativo de 5. El porcentaje de células ICOS<sup>+</sup> o SLAM<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> luego del cultivo con *M. tuberculosis* es expresado en la porción derecha de cada panel. En el panel pequeño se muestran los controles de isotipo. B, Expresión de ICOS o SLAM en células T productoras de IFN- $\gamma$  reactivas a *M. tuberculosis*. Los datos representan la media del porcentaje de células positivas para el Receptor (ICOS o SLAM) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en respuesta a la estimulación con Ag  $\pm$  error estándar para cada grupo de pacientes. \*\* p < 0,001; \* p < 0,05, test de Mann Whitney.

En base a nuestros resultados, y a fin de investigar si ICOS y SLAM podrían actuar de manera aditiva o sinérgica en la inducción de la producción de IFN- $\gamma$  en tuberculosis, células de pacientes de AR fueron estimuladas con antígeno, y posteriormente se realizó la coestimulación simultánea SLAM-ICOS. Como se muestra en la Fig. 15B la activación conjunta de ambos receptores incrementó sinérgicamente la producción de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, aunque la señalización a través de SLAM aumentó significativamente la producción de IFN- $\gamma$  en ambos grupos de pacientes (Fig. 7), la señalización a través de ICOS aumentó la secreción de IFN- $\gamma$  sólo en pacientes AR (Fig. 11). Más aún, y también en contraste a nuestros resultados con SLAM (80), la adición de IFN- $\gamma$  no incrementó la expresión de ICOS en células T de pacientes BR, y por lo tanto luego de la estimulación con Ac anti-ICOS no se observó incremento en la producción de IFN- $\gamma$  (datos no mostrados). Basados en estos resultados, concluimos que los dos moduladores de citoquinas SLAM e ICOS estarían involucrados en la generación de respuestas Th1 durante la infección por *M. tuberculosis*, pero que cada uno de ellos podría estar regulado de manera distinta y/o podría ejercer su función en diferentes estadios de la respuesta inmune del huésped contra *M. tuberculosis*.

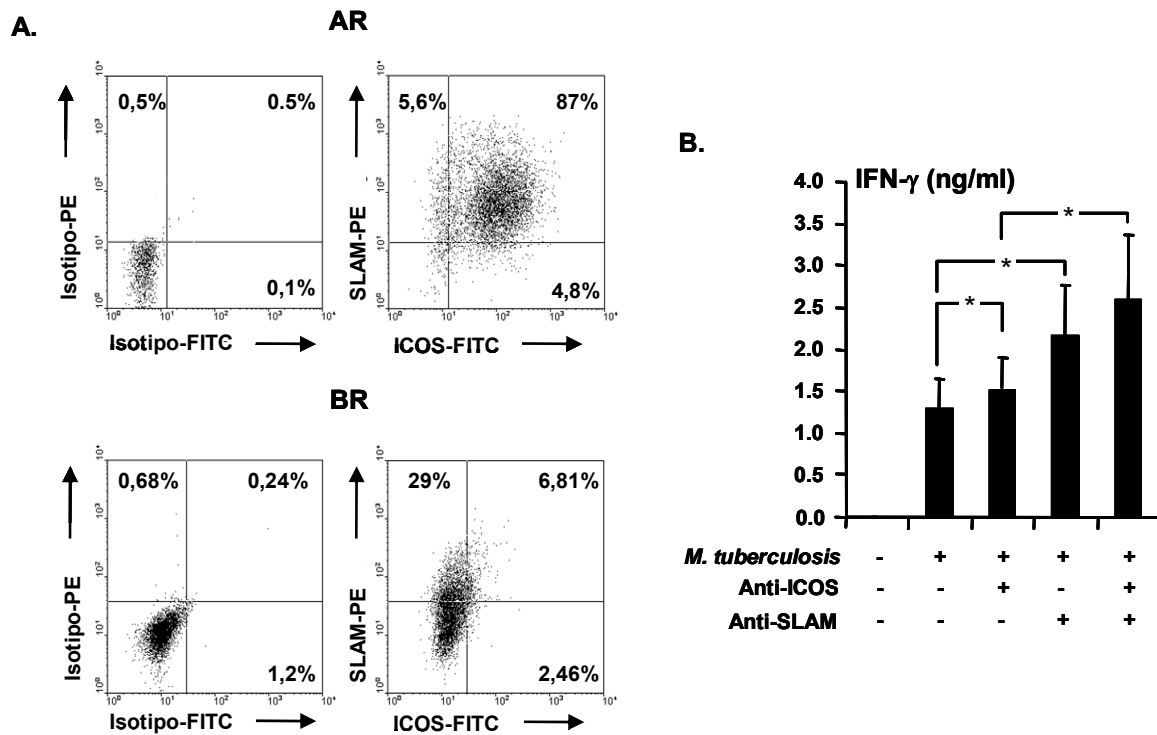
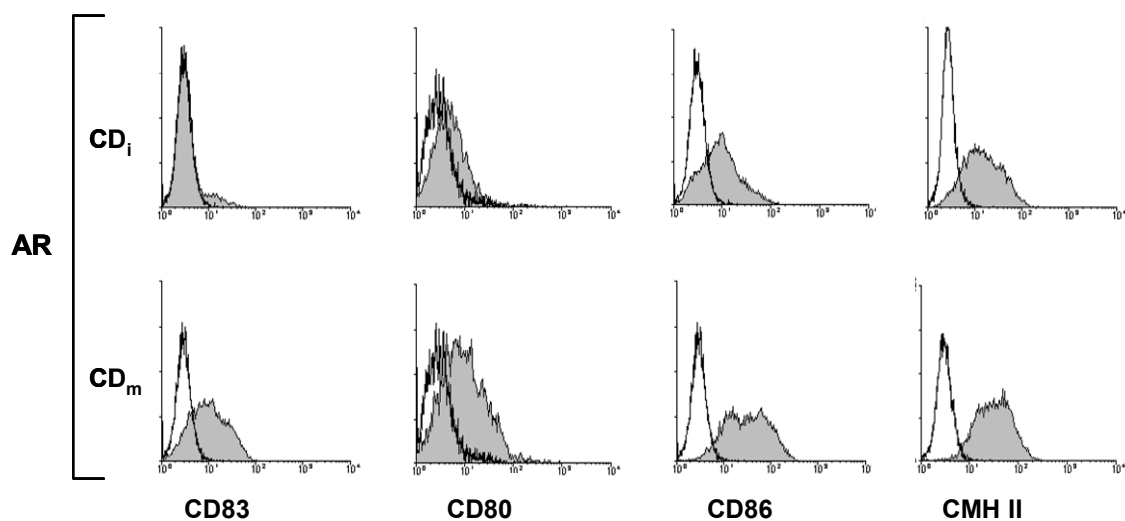


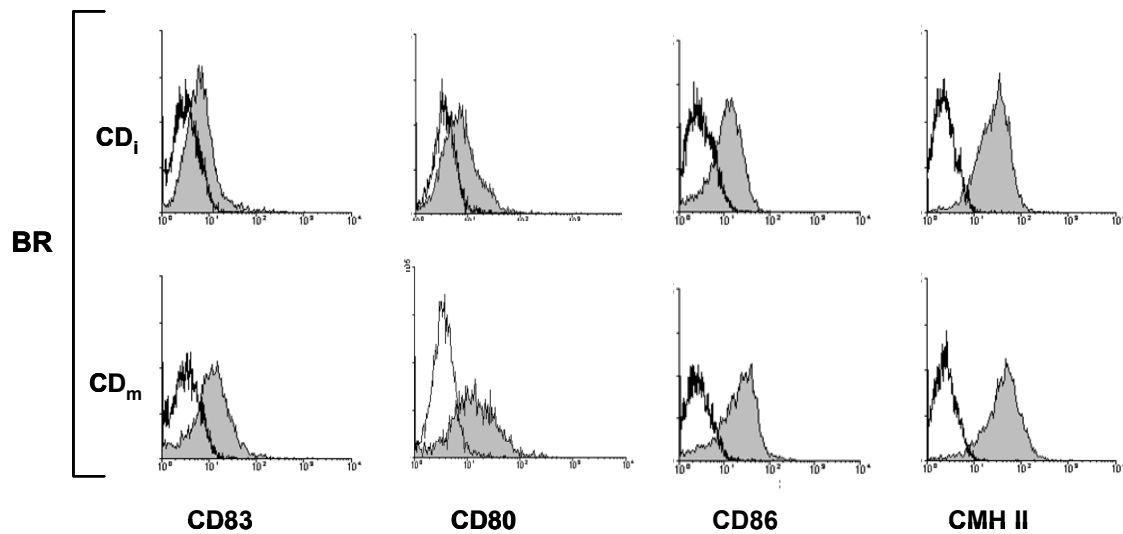
Figura 15. *Coexpresión de SLAM e ICOS y efecto sinérgico de los mismos en la producción de IFN- $\gamma$ .* A, Expresión simultánea de SLAM e ICOS en células de pacientes de AR y BR estimuladas con *M. tuberculosis*. CMSP fueron estimuladas por 5 días con antígeno y se examinó la expresión de ICOS y SLAM por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células T ICOS<sup>+</sup> SLAM<sup>+</sup> luego de estimulación con *M. tuberculosis* para un paciente AR representativo (panel superior) y un paciente BR (panel inferior) (5 pacientes totales /grupo). B, CMSP de pacientes con tuberculosis de AR fueron estimuladas en presencia de *M. tuberculosis* por 5 días. Luego las células fueron incubadas con anticuerpos agonistas anti-SLAM y/o anti-ICOS como se muestra en la figura. La producción de IFN- $\gamma$  fue determinada a las 48h por ELISA. \*  $p < 0.01$ , test de Wilcoxon.

### V. Estudio del rol de SLAM en las CD de pacientes con tuberculosis

#### *Mycobacterium tuberculosis* induce la maduración de células dendríticas de pacientes con tuberculosis.

Ha sido demostrado que los antígenos de micobacterias inducen la maduración de las células dendríticas (CD) derivadas de monocitos de individuos sanos (14, 153, 154). En este trabajo, se evaluó la activación por *M. tuberculosis* de las CD de pacientes con tuberculosis de AR y BR. Así, CD derivadas de monocitos de pacientes fueron estimuladas con *M. tuberculosis* y se determinó la expresión de moléculas coestimuladoras (CD86, CD80) y marcadores de maduración (CD83, CMH II). Como se muestra en la Fig. 16, la estimulación antigénica específica aumentó la expresión de CD80, CD86, CMH II y CD83 en las CD de los dos grupos de pacientes, indicando que *M. tuberculosis* induce la maduración de las CD tanto de individuos respondedores como no respondedores.





**Figura 16.** *M. tuberculosis induce la maduración de CD de pacientes con tuberculosis.* CD derivadas de monocitos de pacientes AR y BR fueron incubadas en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* por 48h y la expresión de CD83, CD80, CD86 y CMH II (histogramas grises) fue determinada por citometría de flujo. Los histogramas blancos muestran los controles de isotipo para cada receptor. Se muestra un paciente representativo de 8 para cada grupo.

***M. tuberculosis induce la producción de citoquinas por CD de pacientes con tuberculosis activa.***

La producción de citoquinas durante la respuesta inmune en tuberculosis juega un rol importante en la respuesta del huésped (155). Más aún, ha sido ampliamente demostrado que el IFN- $\gamma$ , citoquina Th1 producida por las células T, activa a los macrófagos y es un mediador crucial en la protección frente a *M. tuberculosis* (20, 156, 157). Debido a que la respuesta de las células T es, hasta cierto punto, determinada por las citoquinas secretadas por las CD, se investigó la producción de dichos mediadores en pacientes con tuberculosis en respuesta a estimulación Ag específica. Como se muestra en la Figura 17, tanto las CD de pacientes AR como las CD de individuos de BR secretaron niveles significativos de IFN- $\gamma$  frente a la estimulación con *M. tuberculosis*. Más aún, la especificidad de la producción



de IFN- $\gamma$  por las CD fue confirmada por citometría de flujo intracelular. Como se muestra en la Fig. 17A (panel derecho), la estimulación antigénica incrementó marcadamente los niveles de IFN- $\gamma$  en las CD.

Previamente, hemos demostrado que los pacientes AR y BR secretan niveles similares de IL-10, pero sólo los pacientes AR producen niveles significativos de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis*, sugiriendo que frente al patógeno, los pacientes respondedores crearían un microambiente de citoquinas tipo Th1, mientras que en los pacientes no respondedores predominaría un microambiente tipo Th2. Para investigar el rol potencial de las CD en la regulación de la respuesta de las células T en tuberculosis, analizamos la secreción de citoquinas Th2 por las CD. Los resultados obtenidos mostraron que las CD de ambos grupos de pacientes con enfermedad activa produjeron niveles similares de IL-6 (Fig. 17B) e IL-10 (datos no mostrados). De esta forma, las CD de los pacientes con tuberculosis activa son capaces de secretar niveles similares de IFN- $\gamma$  y citoquinas Th2 en respuesta a *M. tuberculosis*, en contraste a nuestros resultados con las células T de ambos grupos de individuos.

Dado que las CD de los pacientes con tuberculosis secretaron altos niveles de IFN- $\gamma$  frente a la estimulación con *M. tuberculosis* (Fig. 17A), investigamos la expresión de T-bet. Sorprendentemente, a pesar de los altos niveles de IFN- $\gamma$  producidos por las CD en respuesta a *M. tuberculosis*, no se detectó expresión de T-bet en las CD de los pacientes con tuberculosis (Fig. 17C). Por lo tanto, estos resultados sugerirían que los altos niveles de citoquinas Th2 (IL-6 e IL-10) producidos por las CD de pacientes con tuberculosis podrían

impedir la inducción de T-bet en estas células, o que la producción de IFN- $\gamma$  podría ocurrir por un mecanismo independiente de T-bet.

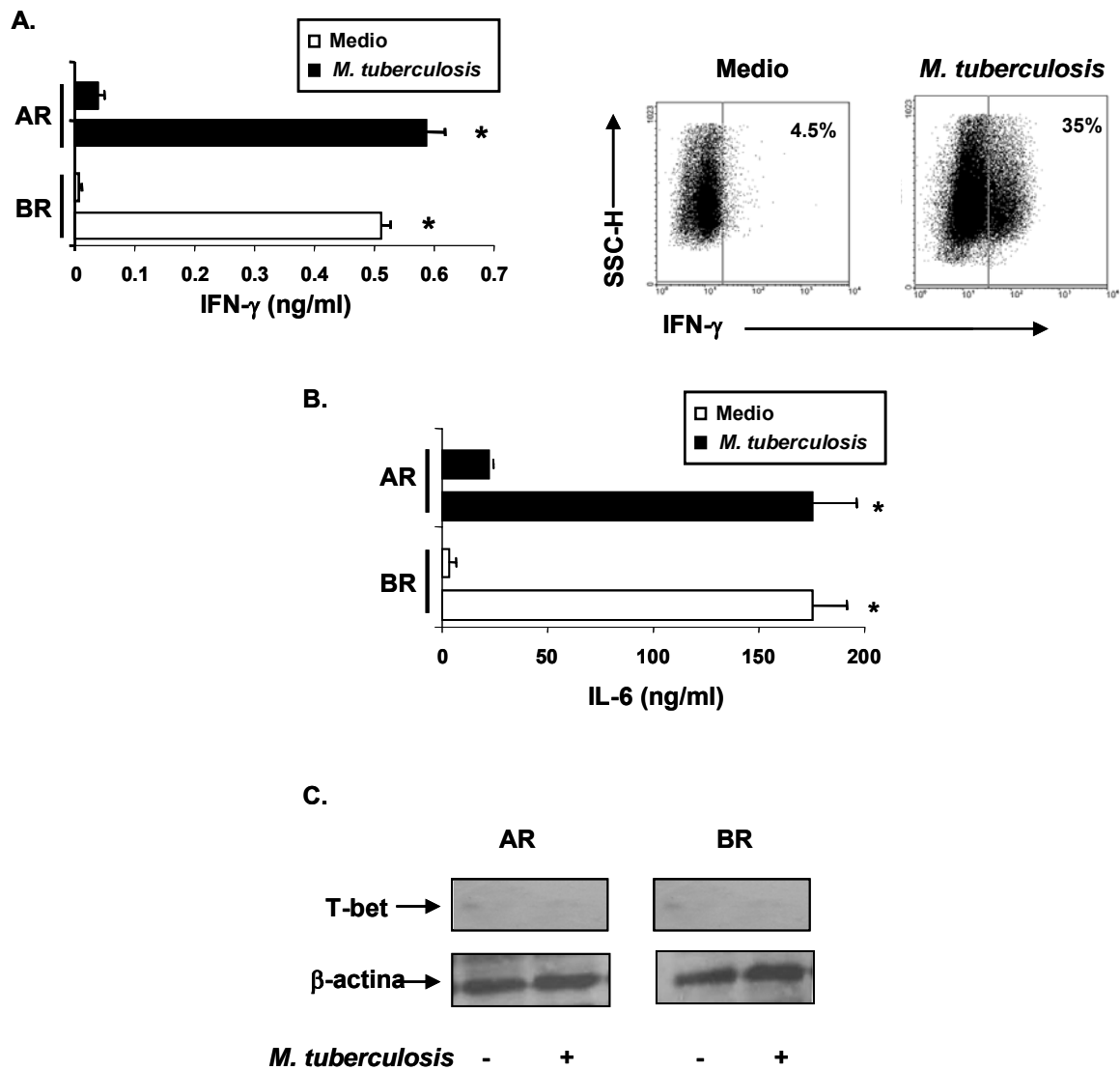


Figura 17. Producción de citoquinas por CD de pacientes con tuberculosis luego de estimulación con Ag. A, B, CD de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas por 48h en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* y la producción de citoquinas fue determinada por ELISA y/o citometría de flujo intracelular. Las CD fueron identificadas primero determinando una región en las células CD83<sup>+</sup> y luego analizando la expresión de IFN- $\gamma$ . Un paciente representativo de 7 es mostrado. \*,  $p < 0,05$ , Wilcoxon Test. C, Se prepararon extractos celulares totales de CD de pacientes AR y BR y la expresión de T-bet fue analizada por Western blot. Un paciente representativo de 5 para cada grupo es mostrado.

### *Expresión y rol de SLAM en CD de pacientes con tuberculosis.*

Las CD activadas expresan moléculas coestimuladoras esenciales para la activación de las células T (158, 159). Más aún, ha sido reportado que la molécula coestimuladora SLAM, previamente caracterizada en células T y B (79, 160) se expresa en CD luego de activación a través de CD40, facilitando la generación de respuestas proinflamatorias Th1 (84). Teniendo en cuenta que la expresión de SLAM en células T de pacientes con tuberculosis correlaciona directamente con la respuesta frente a *M. tuberculosis* (Fig. 1 y 2), decidimos investigar si la expresión de SLAM en CD de pacientes con tuberculosis podría participar en la coordinación de la activación de las funciones efectoras de los linfocitos T, determinando así protección frente a la infección por *M. tuberculosis*. Como se muestra en la Figura 18A la estimulación con *M. tuberculosis* indujo niveles significativos de SLAM en CD de ambos grupos de pacientes, en contraste con los niveles diferenciales de SLAM detectados en la superficie de las células T (Fig. 1). Considerando estos datos y que la señalización a través de SLAM induce producción de IFN- $\gamma$  por células T en tuberculosis (Fig. 7) y aumenta la secreción de IL-12 en CD (84), analizamos si la señalización a través de SLAM en las CD podría modificar el microambiente de citoquinas en pacientes con tuberculosis activa. Como se muestra en la Figura 18B, se detectó un incremento significativo en la producción de citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$  (Fig. 18B) e IL-12 (dato no mostrados), en correlación con una marcada disminución de citoquinas Th2 (IL-6 (Fig. 18B) e IL-10 (dato no mostrados). Interesantemente, la señalización a través de SLAM indujo la expresión de T-bet en las CD de ambos grupos de pacientes (Fig.

18C). Por lo tanto, aunque *M. tuberculosis* induce un aumento significativo de la producción de IFN- $\gamma$  por las CD, los altos niveles de citoquinas Th2 impedirían la expresión de T-bet, pero el aumento aún mayor en la producción de IFN- $\gamma$  conjuntamente con la marcada disminución de citoquinas Th2 luego de la estimulación a través de SLAM permitiría entonces la expresión de T-bet. Así, la activación a través de SLAM en CD de pacientes con enfermedad activa estimuladas con *M. tuberculosis* conduciría a la generación de un microambiente de citoquinas Th1.

Para explorar con mayor detalle el rol de SLAM en la función de las CD y las células T durante la respuesta inmune del huésped frente a *M. tuberculosis*, estudiamos la producción de IL-6 por las células T de pacientes AR y BR. En contraste a los resultados en CD, las células T de los pacientes BR produjeron mayores niveles de IL-6 en comparación con los individuos AR (Fig. 18D,  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). Asimismo, la señalización a través de SLAM no disminuyó la secreción de IL-6 en los individuos BR (Fig. 18D). Así, estos resultados demuestran que SLAM tendría un rol fundamental en la generación de respuestas de citoquinas Th1 en tuberculosis en los dos tipos celulares estudiados, CD y células T. Interesantemente, nuestros hallazgos indicarían que serían las células T de los pacientes BR y no sus CD las que conducirían a una respuesta no protectora frente a *M. tuberculosis*, ya que sus linfocitos T no logran aumentar la expresión de SLAM en superficie y por lo tanto sólo producen un leve incremento en la generación de citoquinas Th1 luego de la señalización a través de SLAM.

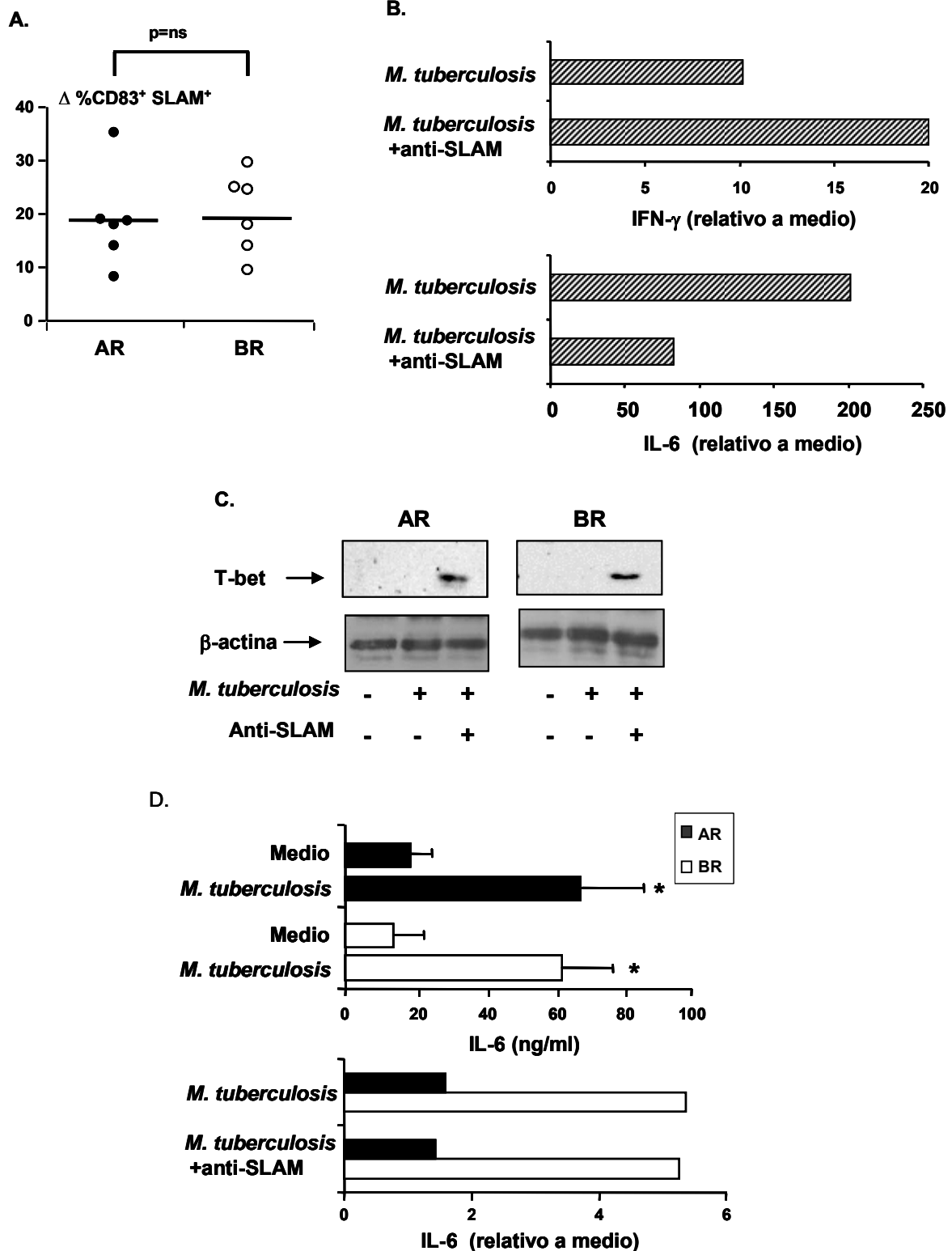


Figura 18. Expresión y rol de SLAM en CD de pacientes con tuberculosis activa. A, La expresión de SLAM en CD fue determinada realizando inicialmente una región según sus características de tamaño y granularidad y luego evaluando la expresión de SLAM y de CD83. Cada símbolo representa el porcentaje de células SLAM<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup> luego de la estimulación con *M. tuberculosis* – porcentaje de células SLAM<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup> en medio. Las líneas gruesas horizontales representan las medias. n.s.= diferencias no significativas, Mann-Whitney test. B-D, CD o CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* más Ac anti-SLAM y luego de 48h (B-C) la producción de IFN- $\gamma$  e IL-6 fue determinada por ELISA, y (C) la expresión de

T-bet y  $\beta$ -actina fue determinada por western blot. B y D (panel inferior), Los valores fueron calculados como: media de la producción de citoquina en respuesta a *M. tuberculosis* o *M. tuberculosis* + anti-SLAM / media de la producción de citoquina por células cultivadas en medio. \*  $p < 0.005$ , Wilcoxon test.

### ***Rol funcional de las CD en pacientes con tuberculosis.***

*M. tuberculosis* regula positivamente la expresión de SLAM en las CD de ambos grupos de pacientes, pero incrementa los niveles de esta molécula coestimuladora solo en las células T de los pacientes AR. Para investigar, si las CD activadas por *M. tuberculosis* de ambos grupos de pacientes poseen la capacidad funcional de activar a las células T, realizamos cultivos mixtos leucocitarios (CML). Inicialmente, CD generadas de pacientes con tuberculosis fueron tratadas con Ag por 2 días y luego co-cultivadas con linfocitos T autólogos o heterólogos, como se describe en materiales y métodos. La Figura 19 muestra que las CD de pacientes de BR activadas por Ag estimulan eficientemente la producción de IFN- $\gamma$  por células T de individuos respondedores, pero no inducen secreción de esta citoquina por parte de los linfocitos T de pacientes no respondones. En forma similar, las CD de pacientes de AR no estimularon la secreción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T de pacientes de BR, aunque sí indujeron la producción de IFN- $\gamma$  por sus células T autólogas (Fig. 19). Más aún, en concordancia con nuestros resultados en la producción de IL-6 por CMSP (Fig. 18D), sólo las células T de individuos de BR produjeron altos niveles de IL-6, ya sea luego del cultivo con CD autólogas o heterólogas, observándose los mayores niveles de esta citoquina en los cultivos autólogos. No se detectó producción de IL-6 por los linfocitos T de pacientes de AR al ser incubadas con CD de pacientes AR o BR (Fig. 19). Las CD activadas de

pacientes BR (que expresan SLAM y producen altos niveles de IFN- $\gamma$ ) tienen la capacidad de estimular la secreción de IFN- $\gamma$  por células T de pacientes respondedores pero no por células T de BR en un CML. En conclusión, nuestros datos indican que las CD de ambos grupos de pacientes con tuberculosis poseen capacidades estimulatorias funcionales. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la incapacidad de las células T de los pacientes de BR para generar una respuesta tipo Th1 contra *M. tuberculosis* estaría relacionada con una deficiencia en la respuesta del TCR de sus linfocitos al Ag específico.

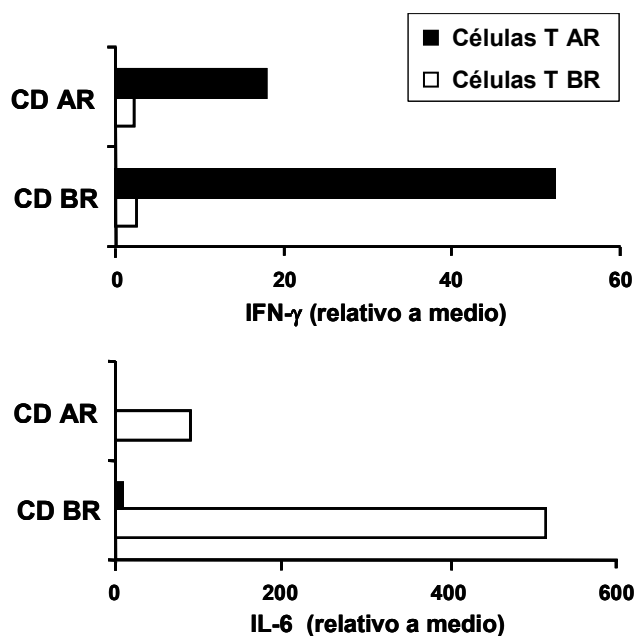


Figura 19. CD de pacientes de AR y BR activadas por *M. tuberculosis* aumentan la actividad de las células T en CML. CD inmaduras fueron cultivadas por 48h en presencia o ausencia de *M. tuberculosis*. Células T purificadas fueron co-cultivadas en relación 1:50 CD:T e incubadas por 48h adicionales para determinar la producción de IFN- $\gamma$  e IL-6 por ELISA. Los valores se expresan como: media de la producción de citoquina por células estimuladas con *M. tuberculosis*/ media de producción de citoquina por células cultivadas en medio.

*La interacción SLAM-SLAM entre CD y linfocitos T participa en la inducción de IFN- $\gamma$  contra M. tuberculosis.*

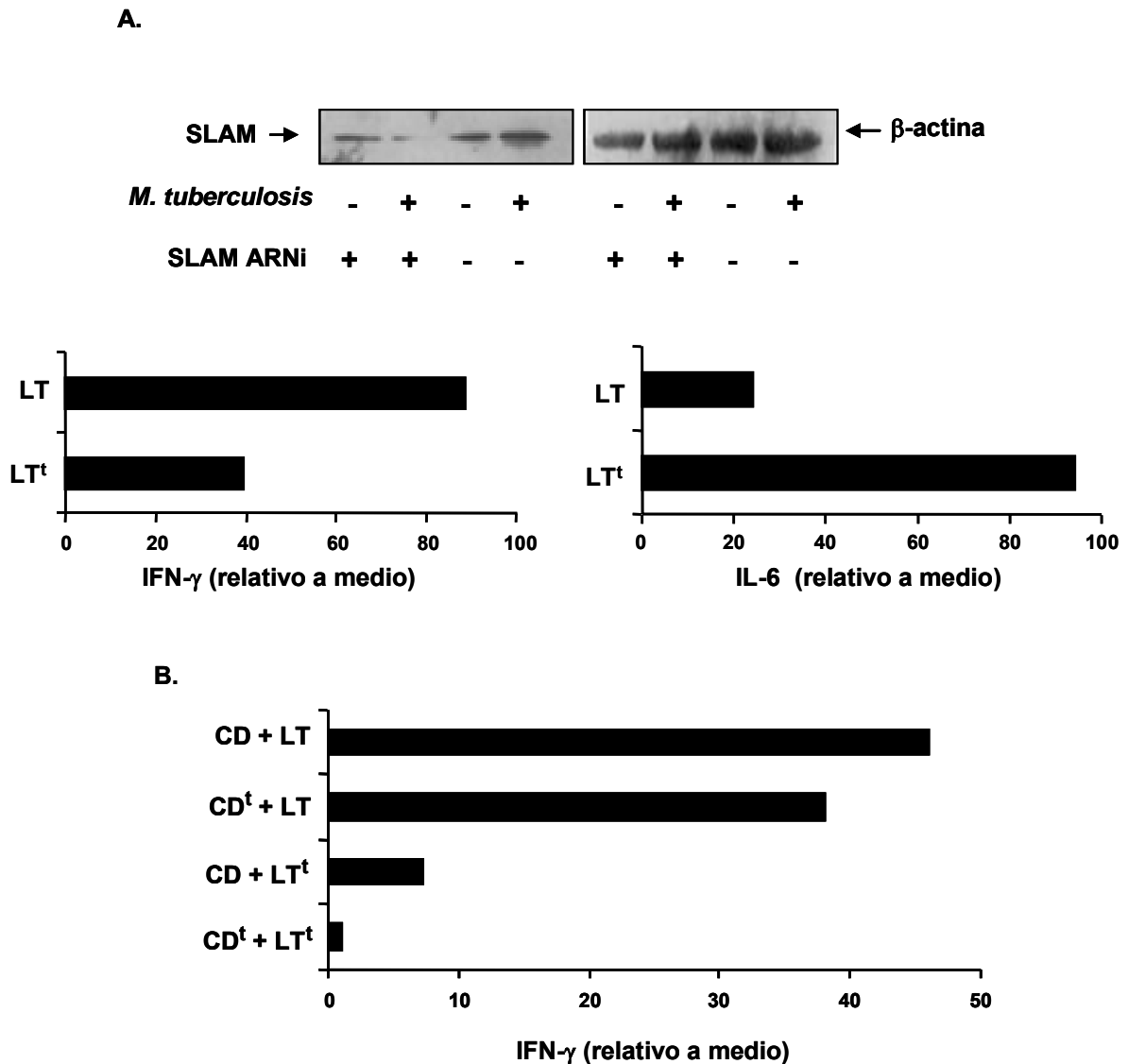
SLAM es un autoligando y su expresión es inducida luego del reconocimiento antigénico específico por el TCR. Como mostramos previamente, la señalización a través de SLAM por un anticuerpo agonista

luego de la activación de las células T por *M. tuberculosis* incrementa la producción de IFN- $\gamma$ , y la expresión de SLAM correlaciona con la generación de una respuesta inmune protectora en tuberculosis. Con el objetivo de evaluar el efecto de SLAM durante la respuesta fisiológica de las células T frente a *M. tuberculosis*, desarrollamos ARN de interferencia (ARNi) para SLAM. CMSP de pacientes con tuberculosis fueron transfectadas con ARNi para SLAM, luego estimuladas con *M. tuberculosis* por 48h y la expresión de SLAM, la producción de IFN- $\gamma$  e IL-6 fue determinada. Así, observamos una disminución significativa de la producción de IFN- $\gamma$  y un marcado incremento de la secreción de IL-6 en células T donde la expresión de SLAM fue casi completamente bloqueada con ARNi para SLAM, comparado con las células no transfectadas (Fig. 20A).

Postulamos así que la interacción SLAM-SLAM entre CD activadas por *M. tuberculosis* y células T, o como un autoligando, podría disparar una señal que llevaría a la producción de IFN- $\gamma$  contra el patógeno. Para confirmar estos resultados y determinar el rol de la interacción SLAM-SLAM entre CD y células T, transfectamos CD purificadas y/o células T de pacientes con ARNi para SLAM. Luego, las CD fueron estimuladas con *M. tuberculosis*, incubadas con las células T (1:50) y la producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. Como se muestra en la Figura 20B el bloqueo de SLAM sólo en las CD tuvo un leve efecto en la producción de IFN- $\gamma$ . Debido a la baja relación CD:T, nosotros especulamos que el IFN- $\gamma$  secretado puede deberse a la interacción SLAM-SLAM entre células T activadas. Interesantemente, cuando las células T fueron transfectadas, se observó una reducción significativa de la secreción de IFN- $\gamma$ , y este efecto fue aún mayor cuando los dos tipos celulares fueron transfectados



con el ARNi (Fig. 20B). En conjunto estos resultados, claramente demuestran que SLAM participa en la producción de IFN- $\gamma$  contra *M. tuberculosis*.



**Figura 20.** La interacción SLAM-SLAM entre CD y linfocitos T participa en la inducción de IFN- $\gamma$  contra *M. tuberculosis*. A, CMSP de pacientes con tuberculosis fueron transfectadas con ARN de interferencia (ARNi) para SLAM y luego de 48h de estimulación con *M. tuberculosis*, la expresión de SLAM fue determinada por western blot (panel superior) y la producción de IFN- $\gamma$  e IL-6 fue determinada por ELISA (panel inferior). La concentración de proteínas fue normalizada con  $\beta$ -actina. Cada barra (panel inferior) representa: media de la producción de citoquina por células estimuladas con *M. tuberculosis*/ media de producción de citoquina por células cultivadas en medio. La figura muestra un experimento representativo de de 4. B, CD y/o células T purificadas fueron tranfectadas con ARNi para SLAM o ARNi control por 48h. Las CD fueron estimuladas con *M. tuberculosis* por 48h y luego las CD maduras fueron incubadas con células T purificadas en relación 1:50 CD: LT por 48h adicionales para determinar la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. Los valores fueron calculados como en A.

### ***VI. Vías de Señalización que regulan la producción de IFN- $\gamma$ en la tuberculosis humana***

En base a los resultados descritos en este trabajo, seguidamente se iniciaron estudios para investigar las vías de señalización que controlan la secreción de IFN- $\gamma$  contra *M. tuberculosis*. Así, como se describió anteriormente, nosotros demostramos que la señalización a través de SLAM incrementa la producción de IFN- $\gamma$  contra *M. tuberculosis* en dadores sanos y en pacientes con tuberculosis de alta respuesta al antígeno (AR), resultando la expresión de SLAM anormal en pacientes de baja respuesta (BR). Por otra parte, uno de los grupos con los que este laboratorio colabora desde hace años (Dr. Peter Barnes, (CPIDC, Univesity of Texas), reportó que el factor de transcripción CREB incrementa la secreción de IFN- $\gamma$  contra *M. tuberculosis* mediante unión a la porción proximal del promotor de IFN- $\gamma$ , y que la expresión de CREB se encuentra reducida en tuberculosis (139).

Considerando que las vías de señalización inducidas por SLAM que conducen a producción de IFN- $\gamma$ , así como la regulación de la expresión de SLAM, han sido escasamente estudiadas, en esta etapa se investigó específicamente si la proteína de señalización SLAM modulaba la expresión de CREB durante la infección activa producida por *M. tuberculosis*. Asimismo, estudiamos, el rol de la IL-17 sobre la expresión de SLAM e IFN- $\gamma$ , ya que ha sido ampliamente demostrado que IL-17 inhibe la producción de IFN- $\gamma$ , para finalmente analizar la potencial interrelación entre citoquinas que participan

en la respuesta del huésped contra el patógeno, y vías de señalización que pudieran regular su producción.

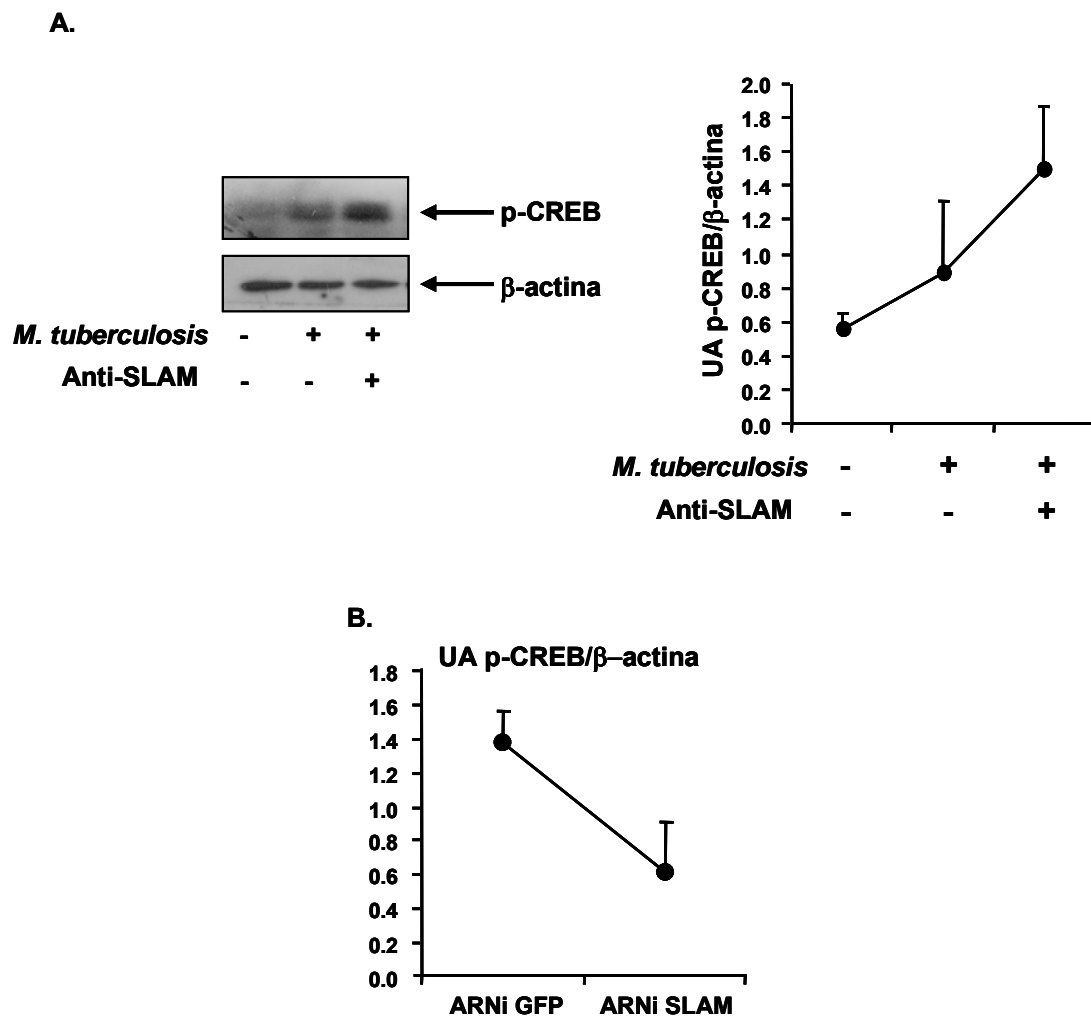
Así, se investigó: (i) la participación del factor transcripción CREB que induce la producción de IFN- $\gamma$  en tuberculosis (139) en la vía de señalización de SLAM y (ii) la regulación de SLAM y CREB por la citoquina IL-17,

### ***Rol de CREB en la vía de señalización de SLAM.***

Nosotros demostramos que SLAM es requerido para la producción óptima de IFN- $\gamma$  en tuberculosis. Sin embargo, poco se conoce acerca de las vías de señalización "río abajo" de SLAM, las cuales llevan a la producción de IFN- $\gamma$ . Interesantemente, ha sido demostrado que CREB tiene un rol crucial en la inducción de esta citoquina en tuberculosis (139), pero hasta el momento las moléculas que inducen la fosforilación de este factor de transcripción no habían sido estudiadas. Por lo tanto, a fin de determinar si la vía de señalización de SLAM inducía la fosforilación de CREB, CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de anticuerpo agonista anti-SLAM y la expresión de p-CREB fue determinada. Como se observa en la Fig. 21A, la señalización a través de SLAM incrementó la fosforilación de CREB, indicando que la activación de este factor de transcripción podría ser un mecanismo potencial por el cual SLAM induciría la secreción de IFN- $\gamma$ .

A fin de analizar en profundidad y confirmar los resultados anteriores sobre el incremento de la fosforilación de CREB luego de activación de SLAM, se realizaron tranfecciones celulares con ARNi para SLAM (o ARNi control),

como se detalla en materiales y métodos. Luego de estimular las células con *M. tuberculosis*, se determinó la fosforilación de CREB. Los resultados obtenidos mostraron que el bloqueo de la expresión de SLAM por ARNi, reduce marcadamente la activación de CREB (Fig. 21B), confirmando así, que SLAM contribuye en forma directa a la fosforilación de CREB.

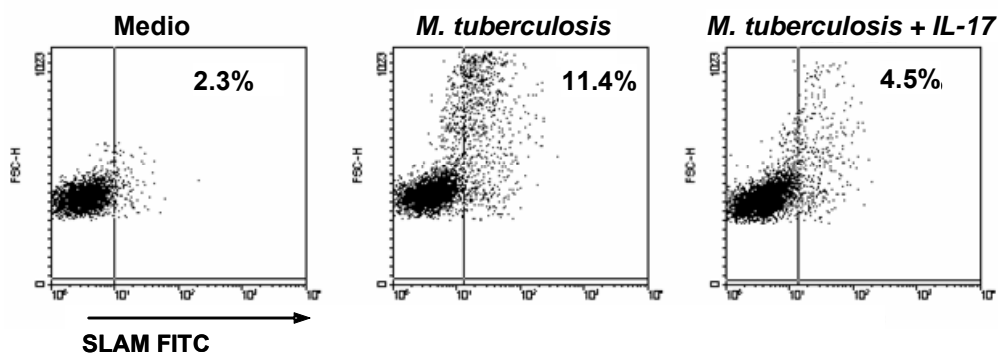


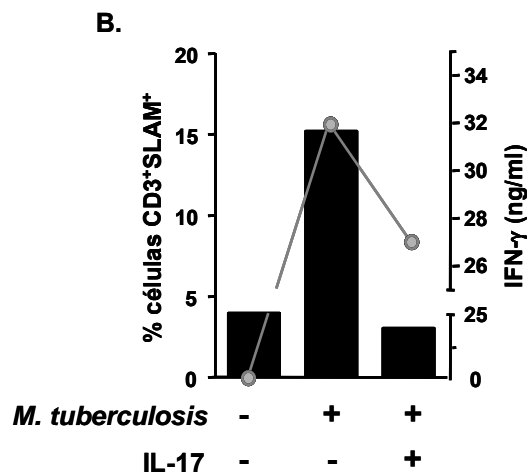
**Figure 21. La señalización a través de SLAM induce la fosforilación de CREB.** A, CMSP fueron estimuladas con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de anticuerpo agonista anti-SLAM por 24h y la expresión de p-CREB fue analizada por western blot. La figura muestra un paciente representativo de siete. Los geles de poliacrilamida fueron escaneados, densitometrados y los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) relativas a la expresión de β-actina. (B) CMSP fueron tranfectadas con ARNi para SLAM o control (GFP) y luego estimuladas con *M. tuberculosis* por 48h. La expresión de p-CREB fue determinada por western blot. Los geles de poliacrilamida fueron escaneados, densitometrados y los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) relativas a la expresión de β-actina. Se muestran las medias ± el error standard de los resultados de seis pacientes.

*Estudio de la regulación de la expresión de SLAM por IL-17.*

Las células Th17 juegan un rol crucial en la respuesta inflamatoria, pudiendo contribuir a la protección en infecciones (41). Recientemente, fue reportado por primera vez, que las células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17 e IL-22 contribuyen a la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* en personas expuestas al patógeno y en pacientes con tuberculosis (60). Sin embargo, aún quedan muchas preguntas sin responder sobre la función de las células Th17 en la tuberculosis humana. En particular, nuestro interés se centró sobre la potencial regulación negativa de IL-17 sobre la producción de IFN- $\gamma$ . Más aún, las células Th17 podrían reducir la expresión de SLAM, modulando el microambiente de citoquinas en respuesta a *M. tuberculosis*. Para investigar esta posibilidad, determinamos el efecto del agregado de IL-17 recombinante sobre la expresión de SLAM en células estimuladas con *M. tuberculosis*. Como se muestra en la Fig. 22, nuestros resultados demostraron que la IL-17 reduce los niveles de expresión de SLAM en células T de pacientes con tuberculosis. Más aún, esta disminución de la expresión de SLAM correlacionó con la inhibición de la secreción de IFN- $\gamma$  (Fig. 22B).

A.

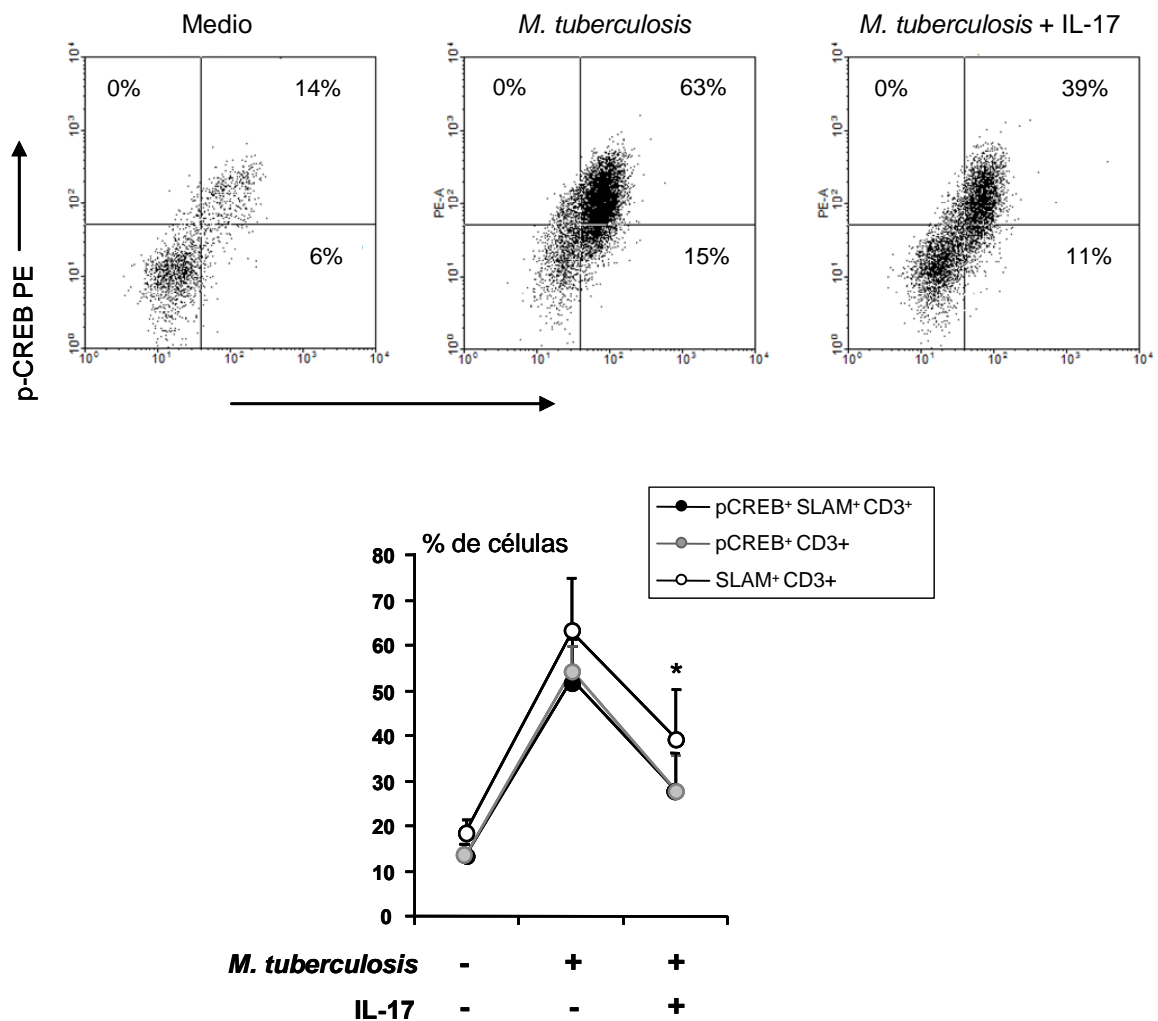




**Figura 22. Rol de IL-17 en la expresión de SLAM.** CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de IL-17 recombinante (5 ng/ml) y luego de 5 días se determinó la expresión de SLAM y la producción de IFN- $\gamma$  por citometría y ELISA, respectivamente. A, La expresión de SLAM se determinó primero seleccionando una región según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células CD3<sup>+</sup>. Se muestra un paciente representativo de 6. B, Las barras representan la expresión de SLAM en células T y los círculos la producción de IFN- $\gamma$ .

### *IL-17 inhibe la expresión de CREB*

Dado que los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la IL-17 regula negativamente la expresión de SLAM inhibiendo la producción de IFN- $\gamma$  (Fig. 22) y que CREB participa en la vía señalización de SLAM (Fig. 21), seguidamente estudiamos el efecto de IL-17 sobre la activación de CREB. Para esto, CMSP fueron estimuladas con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de IL-17 y la expresión de SLAM y de p-CREB en las células T fue determinada. Como muestra la Figura 23, la IL-17 no sólo reguló negativamente la expresión de SLAM, sino que también disminuyó significativamente la activación de CREB. Más aún, la mayoría de las células positivas para CREB expresaron SLAM, confirmando la participación de este factor de transcripción en la vía de señalización de SLAM. Así, estos resultados demuestran un nuevo mecanismo por el cual la IL-17 inhibe la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis*. Este mecanismo involucraría la regulación negativa de la expresión de SLAM y de la activación de CREB.



**Figura 23. Efecto de IL-17 sobre la activación de CREB.** CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de IL-17r (5ng/ml) y luego de 5 días la expresión de SLAM y p-CREB fue determinada por citometría de flujo. A, B. La expresión de SLAM y p-CREB se determinó primero seleccionando la región de blastos según los parámetros FSC y SSC y luego las células CD3<sup>+</sup>. A, La figura muestra un paciente representativo. B. Cada símbolo representa la media  $\pm$  el error estándar en cada condición (8 pacientes/condición).

**Discusión**

---



La defensa efectiva contra una infección intracelular como la ocasionada por *M. tuberculosis*, requiere de la activación de los linfocitos T y la generación de respuestas de citoquinas de tipo Th1, a fin de controlar y contener la infección. La activación de los linfocitos es regulada por señales disparadas por una gran cantidad de moléculas de superficie, tales como receptores de Ag, moléculas coestimuladoras, receptores de quemoquinas y citoquinas, receptores inhibitorios y TLR (161). Para lograr una respuesta inmune efectiva frente a patógenos y para el mantenimiento de la tolerancia se requiere del balance entre las señales estimuladoras e inhibitorias (162). En este trabajo se investigó el rol de moléculas coestimuladoras y factores de transcripción sobre la función efectora de células T y CD durante la infección activa por *M. tuberculosis*. Específicamente, se estudió la función de las moléculas coestimuladoras SLAM, ICOS, la proteína de señalización SAP y el factor de transcripción CREB durante la respuesta inmune del huésped frente a la infección por *M. tuberculosis*.

Interesantemente, al estudiar la respuesta *in vitro* frente a un sonicado de *M. tuberculosis* se encontraron dos grupos de pacientes con tuberculosis activa según la respuesta de los linfocitos T frente al Ag específico. Los dos grupos hallados (AR y BR) mostraron una producción diferencial de IFN- $\gamma$  y de la expresión de los marcadores de activación inducibles SLAM e ICOS, los cuales correlacionaron positivamente con la secreción de esta citoquina Th1. Más aún, se observó que los pacientes con fuerte respuesta al antígeno (AR) secretaban altos niveles de IFN- $\gamma$  en correlación con una mayor expresión de Tbet, pero no se observaron diferencias en la secreción de citoquinas Th2 comparado con los pacientes BR. Si bien, es claro que la respuesta Th1

representa el patrón protector necesario para el control de la tuberculosis, algunos estudios en animales no demuestran claramente una dicotomía del patrón Th1-Th2 en la respuesta inmune en la infección activa producida por *M. tuberculosis* (6, 31). Quedan aún muchos interrogantes sin responder, en particular, ¿es la secreción de citoquinas Th2 una causa o simplemente la consecuencia de la actividad de la enfermedad en la tuberculosis humana? Asimismo, ha sido sugerido que la falla de la respuesta inmune en tuberculosis podría explicarse por una respuesta Th1 débil o suprimida más que por una fuerte respuesta Th2 (6).

Ha sido reportado que SLAM induce respuestas de tipo Th1 (79). Más aún, previamente demostramos que SLAM induce la generación de respuestas Th1 en lepra (80). Por otro lado, existen datos contradictorios con respecto al rol de ICOS, ya que esta molécula ha sido implicada en la inducción tanto de respuestas Th1 como Th2 en ratón (113, 147). Así, uno de los objetivos de este trabajo fue el estudio de la función de estas moléculas coestimuladoras durante la respuesta inmune del huésped contra *M. tuberculosis*.

### ***Rol de la vía SLAM-SAP en tuberculosis.***

Nuestros datos demostraron que la expresión de SLAM se incrementa en pacientes repondedores frente al antígeno, pero no se modifica en pacientes anérgicos a *M. tuberculosis*. Sin embargo la coestimulación a través de SLAM aumentó los niveles de IFN- $\gamma$  en ambos grupos de individuos, aunque en diferente grado. No obstante, el agregado exógeno de citoquinas Th1 junto con el Ag, permitió que los pacientes de BR produjeran niveles significativos de IFN- $\gamma$  luego de la activación de SLAM. Con el fin de estudiar las diferencias en

las respuestas de los grupos de pacientes (AR y BR) a *M. tuberculosis* durante la activación de SLAM se investigó la proteína de unión a SLAM: SAP. SAP se expresa en células T, NK y células B (163), y consta casi exclusivamente de un dominio SH2 por el cual interacciona con otros miembros de la familia de SLAM, incluyendo a 2B4, NTB-A, CD84 y Ly-9 (161, 164). Este dominio se une con alta afinidad a SLAM a través de un residuo de tirosina en la cola citoplasmática (92, 95). La señalización a través de la vía SLAM-SAP modifica el perfil de citoquinas producido durante la activación de las células T (97). Así, seguidamente se investigó la expresión de SAP y de SLAM y su función en la regulación del patrón de citoquinas producido en pacientes con tuberculosis activa. Se observó una relación inversa entre la expresión de SAP y la producción de IFN- $\gamma$  frente a la estimulación con *M. tuberculosis* en pacientes con tuberculosis y pacientes deficientes para SAP (XLP). Nuestros datos confirman estudios realizados en ratones deficientes en SAP que mostraron que la ausencia de esta proteína produce un aumento de la activación T e hiperproliferación de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras IFN- $\gamma$  en respuesta a infección microbiana (98, 150). Más aún, células T activadas de ratones que sobreexpresan SAP disparan un incremento de producción de IL-4 así como también una disminución de la secreción de IFN- $\gamma$  (100). Nuestros resultados, junto con estos estudios de ratón, refuerzan la hipótesis de que SAP atenúa las respuestas inmunes Th1 (97).

La expresión de SAP disminuyó en pacientes BR luego de la estimulación a través de SLAM y del TCR conjuntamente. Ha sido demostrado que la expresión relativa de SAP y SLAM podría variar durante la activación linfocitaria y en algunos desordenes autoinmunes (165), y que la relación SLAM/SAP

podría tener un rol en las funciones dependientes de SLAM (96). De hecho, ha sido propuesto que la expresión diferencial de SLAM y SAP estaría relacionada con el estado de activación de las células (166). En ratones, SAP es regulado negativamente *in vitro* en células T activadas, mientras que SLAM es regulado positivamente de manera temprana en la activación de las células T. Por lo tanto, en base a lo descrito y a nuestros hallazgos, postulamos que la regulación de IFN- $\gamma$  por moléculas de señalización en tuberculosis, como SAP y SLAM, sería dependiente en primer lugar del reconocimiento del antígeno por las células T. Los linfocitos T que responden a *M. tuberculosis* rápidamente aumentarían la expresión de SLAM y estas dos señales se combinarían promoviendo la producción de IFN- $\gamma$ . Al mismo tiempo, SAP sería regulado negativamente de manera transiente en respuesta a la activación celular T. Esta cascada de señalización estaría impedida en los pacientes de BR, ya que la falta de respuesta de las células T en estos individuos prevendría la regulación positiva de SLAM y las moléculas de SAP existentes bloquearían la producción de IFN- $\gamma$ . SAP, a diferencia de otras proteínas con dominios SH2, interacciona con SLAM independientemente del estado de fosforilación de las tirosinas en el motivo ITSM de SLAM (92). Por lo cual, SAP está constitutivamente asociado a SLAM (92). Por último, si la señalización a través de SLAM fuera restaurada, como describimos en nuestro sistema experimental, la expresión de SAP sería regulada negativamente y los niveles de IFN- $\gamma$  se incrementarían significativamente. Asimismo, en este trabajo fue demostrado que la presencia de IL-12 durante la señalización del TCR, seguida por la unión de SLAM, promueve la producción de IFN- $\gamma$  en pacientes de BR. Una posible explicación del efecto observado por IL-12 podría deberse a que las citoquinas

proinflamatorias aumentan la expresión de SLAM en las células T estimuladas con la micobacteria (80).

La expresión de SAP disminuye en pacientes de BR cuando SLAM y el TCR son ligados en tandem. Estos datos sugieren un efecto coestimulador de SLAM y el TCR en la producción de IFN- $\gamma$ , como ha sido demostrado para células T CD4<sup>+</sup> (79). Aunque SLAM es inhibido por interacciones de alta afinidad con SAP, el sinergismo de SLAM y el TCR en el contexto de la tuberculosis lograría impedir el efecto negativo de SAP, en concordancia con estudios realizados por otros autores (167). Las interacciones SLAM-SLAM podrían tener lugar entre células T con otras células T activadas o con células dendríticas (84). Las células T de ratones deficientes en SAP producen más IFN- $\gamma$  que las de los ratones salvajes en respuesta a estimulación a través del CD3, pero luego de estimulación con anti-CD3 y anti-SLAM tanto los ratones salvajes como los *sap*<sup>-/-</sup> producen altos niveles de IFN- $\gamma$  (167). A través de un mecanismo en el cual SAP recluta FynT a la cola citoplasmática de SLAM (101), la unión de SHP-2 y la señalización de SLAM que lleva a la inducción de IFN- $\gamma$  es impedida (97). Estudios posteriores mostraron que la supresión de IL-4 en los ratones *sap*<sup>-/-</sup> es debida a un defecto específico en la inducción de GATA-3 en respuesta a las señales mediadas por el TCR (104). Luego de la activación T, SAP colocaliza con el TCR y una vía de señalización que involucra la unión de Fyn a SAP aumenta la activación de PKC $\theta$ /NF- $\kappa$ B1 llevando a la generación de respuestas Th2 (104).

En conjunto, nuestros resultados sugieren la participación de un componente intrínseco que podría regular la expresión de SAP durante la infección por micobacterias, determinando una mayor susceptibilidad a

desarrollar la infección. Una explicación alternativa es que SAP podría ser un marcador de severidad de la infección tuberculosa. Se necesitan nuevos estudios para analizar los niveles de SAP durante todo el curso de la infección por *M. tuberculosis*. La determinación de los niveles de SAP en pacientes con tuberculosis podría permitir mejorar el tratamiento de la enfermedad, siendo de gran importancia dilucidar en mayor detalle la regulación de la expresión y función de proteínas de señalización como SAP. Los resultados presentados en este trabajo conjuntamente con nuestros estudios en lepra (80) sugieren que la intervención de las vías de señalización del IFN- $\gamma$  podrían promover inmunidad protectora frente a la infección por patógenos intracelulares.

En este estudio demostramos que mediante la interacción con SLAM, SAP envía una señal que inhibe selectivamente la producción de IFN- $\gamma$ , mientras que la señalización a través de SLAM en ausencia de SAP enviaría una señal que llevaría a la generación de una respuesta Th1. Así, estos hallazgos muestran por primera vez el rol de la interacción SLAM-SAP en la generación de una respuesta inmune protectora en una infección humana intracelular. Más aún, de acuerdo con nuestros resultados en lepra, la activación a través de SLAM induce una vía de señalización que incluye a NF- $\kappa$ B, Stat1, y T-bet, resultando en la inducción de IFN- $\gamma$ , una vía que permanece inactiva en los pacientes lepromatosos no respondedores (81). Por otro lado, CD31, una molécula de adhesión que media señales de transducción en las células T, se une a SAP en los linfocitos T de pacientes con tuberculosis inhibiendo la producción de IFN- $\gamma$  (168). Estos hallazgos refuerzan nuestra postulación sobre la influencia de las proteínas de señalización en la

regulación de la producción de IFN- $\gamma$  durante la resolución de la infección por *M. tuberculosis*.

### ***Rol de ICOS en tuberculosis.***

En la segunda parte de este trabajo, y dado que ha sido postulado que ICOS estaría implicado en el mantenimiento del inicio de respuestas T y que la señalización a través de esta molécula estaría involucrada en la expansión clonal inicial primaria de células Th1 y Th2, se investigó el rol de ICOS en tuberculosis.

Un aspecto importante de este estudio fue la posibilidad de estudiar el rol de una molécula de señalización como ICOS, cuya función permanece controversial debido a las diferencias en la expresión y función de esta proteína entre modelos murinos y humanos. Varios trabajos avalan una relación funcional entre ICOS y el desarrollo de respuestas Th2. Así, el bloqueo o la ausencia de la interacción ICOS/ICOSL favorece la diferenciación Th1 *in vitro* (169, 170). Más aún, en ratones deficientes para ICOS, la coestimulación incompleta a través de este receptor exagera el desarrollo de la encefalitis autoinmune experimental (EAE), enfermedad autoinmune mediada por las células Th1, y disminuye la respuesta inmune frente *N. brasiliensis* y reacciones alérgicas de pulmón, las cuales son predominantemente Th2 (147, 170-172). Sin embargo, existen también evidencias de que ICOS contribuye a las respuestas Th1 en algunas circunstancias (173). La mayoría de estos datos han sido obtenidos en ratón. Los pocos estudios realizados en humanos señalan un comportamiento totalmente diferente. Así, en ratón IL-4 e ICOS forman un sistema de retroalimentación positiva (174, 175), mientras que en humanos la

expresión de ICOS es regulada positivamente por IL-12 e IL-23 (116). Por otro lado, en infección, los ratones deficientes en el gen de ICOS mostraron una disminución de la producción de citoquinas tanto Th1 como Th2 frente al parásito intracelular *L. major* (113, 114). Sin embargo, no existen hasta la fecha estudios de la expresión y funcionalidad de ICOS en la infección humana. Por este motivo, en este trabajo se investigó el rol de este receptor en la infección por *M. tuberculosis*.

Nuestros datos mostraron que la expresión de ICOS y la producción de IFN- $\gamma$  correlacionaron de manera directa en los pacientes con tuberculosis. Así, los individuos con producción de citoquinas Th1 (AR) expresaron altos niveles de ICOS en respuesta a *M. tuberculosis*, en contraste a los pacientes de BR que presentaron bajos niveles de expresión de ICOS y de IFN- $\gamma$ . Estos hallazgos nos llevaron a especular que la expresión de ICOS sería dependiente de la respuesta de las células T al antígeno. Mientras que los pacientes de AR generarían un microambiente Th1 que llevaría a incrementar la expresión de ICOS, los pacientes de BR crearían un microambiente predominantemente Th2 que impediría la regulación positiva de ICOS. Sin embargo, mientras que *M. tuberculosis* no modifica los niveles de expresión de ICOS en los pacientes de BR, la estimulación con PHA aumenta la expresión de esta molécula, sugiriendo que la falta de incremento de ICOS en estos pacientes podría estar asociada con una débil señalización del TCR frente al antígeno específico. En línea con nuestros resultados ha sido reportado que la estimulación de CMSP a través del TCR en pacientes con tuberculosis anérgicos lleva a fosforilación deficiente de TCR- $\zeta$ , Zap70 y MAPK (176).



Si bien fue propuesto que la regulación local de la expresión de ICOS por citoquinas proinflamatorias en células Th activadas policlonalmente es independiente de su estado de polarización (116), en este trabajo se demostró que las células con un fenotipo Th2 de los pacientes BR no responden al estímulo antigénico específico, impidiendo el incremento de los niveles de ICOS, aún por efecto de citoquinas Th1 exógenas. En correlación con estos resultados, ni la estimulación con *M. tuberculosis* ni la coestimulación a través de ICOS modificaron los niveles de IFN- $\gamma$  secretados por células Th2 polarizadas, las cuales expresaron bajos niveles de ICOS. En contraste, la señalización a través de este receptor aumentó la producción de IFN- $\gamma$  por células Th0 o Th1 humanas estimuladas con *M. tuberculosis*, en correlación con los altos niveles de expresión de ICOS en estas células. Así, los datos obtenidos en líneas polarizadas mostrarían que durante la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*, la regulación de la expresión de ICOS en células estimuladas con Ag dependería primariamente de la fuerza de la señalización del TCR conjuntamente con el estado de polarización de las células Th.

Dado que ICOS es regulado positivamente en un microambiente proinflamatorio, postulamos que, una vez que el linfocito T llega al sitio de infección, con elevados niveles de SLAM en superficie, el microambiente de citoquinas proinflamatorias, conjuntamente con el reconocimiento de antígenos pertenecientes a la micobacteria, incrementarían los niveles de ICOS en la superficie celular. Esta postulación sería avalada por nuestros resultados sobre el aumento de ICOS frente a la estimulación con *M. tuberculosis* en pacientes de AR y en DS. De hecho, la expresión de ICOS en los pacientes de AR es inhibida por anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ . De este modo, se

generaría un sistema de retroalimentación positivo que induciría asimismo un incremento en los niveles de IFN- $\gamma$  permitiendo así aumentar el poder microbicida de los macrófagos infectados y por lo tanto conducir a la eliminación de la micobacteria. Asimismo, los niveles de ICOS permanecerían incrementados en células de memoria para posteriormente poder migrar al sitio de la infección e inducir respuestas beneficiosas de tipo Th1. Reportes de otros autores avalarían dicha hipótesis, ya que fue observado que la señalización a través de ICOS induce la polarización y la migración transendotelial de células CD45RO<sup>+</sup> (linfocitos T de memoria) y de linfocitos Th1, pero no de células Th2 (177).

Como fue previamente descrito, en modelos murinos ha sido postulado que ICOS estaría involucrado en respuesta de tipo Th2, incrementando a su vez la expresión del factor de transcripción NF-ATc1, el cual induce un aumento en los niveles de IL-4 (175). Sin embargo, en humanos ha sido demostrado que ICOS estaría involucrado en respuestas de tipo Th1 (116). Los datos del presente trabajo confirman los mencionados resultados publicados ya que demuestran un incremento en los niveles de expresión de ICOS en líneas Th1, y un aumento en los niveles de T-bet luego de la señalización a través del receptor. Estos hallazgos sugieren por primera vez en una infección humana que ICOS participaría en la generación de respuestas de tipo Th1, contribuyendo así, junto con otras moléculas coestimuladoras como SLAM, a la eliminación de la bacteria por los macrófagos infectados.

### *Interrelación ICOS- SLAM y su función en tuberculosis.*

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que tanto SLAM como ICOS, dos moléculas coestimuladoras inducibles por *M. tuberculosis*, participarían en la respuesta inmune del huésped frente a *M. tuberculosis*. Estudios previos en líneas polarizadas de ratón indican una relación inversa en el patrón de expresión de estas dos proteínas (108). Sin embargo, en pacientes de AR, luego de la estimulación con el Ag la mayoría de las células SLAM<sup>+</sup> coexpresaron ICOS en la superficie de los linfocitos T, sugiriendo que la expresión de ambas moléculas correlacionaría con una menor severidad de la enfermedad en tuberculosis. Más aún, la mayoría de las células productoras de IFN- $\gamma$  expresaron ICOS y/o SLAM en los pacientes de AR, mientras que pocas células productoras de IFN- $\gamma$  expresaron ICOS o SLAM en los pacientes de BR. La activación simultánea a través de SLAM e ICOS produciría un aumento sinérgico de la producción de IFN- $\gamma$ . Estos resultados, sugieren que ambos receptores podrían ser modulados por citoquinas Th1 o estar implicados en la generación de respuesta inmunes de tipo 1 frente a la infección por *M. tuberculosis*. Sin embargo, mientras que la señalización a través de SLAM aumenta significativamente la producción de IFN- $\gamma$  tanto en pacientes de AR como de BR, la señalización a través de ICOS incrementa los niveles de esta citoquinas sólo en los pacientes de AR. Además, la adición de IFN- $\gamma$  no modifica la expresión de ICOS en las células T de pacientes de BR, en contraste a los resultados obtenidos con SLAM, y en consecuencia la subsecuente estimulación a través de ICOS no incrementa la producción de IFN- $\gamma$  (datos no mostrados). La expresión constitutiva de ICOS en pacientes con tuberculosis y dadores sanos fue prácticamente indetectable, mientras que SLAM se expresa

en altos niveles en pacientes de AR y de BR pero no en DS. Así, si bien tanto ICOS como SLAM participarían en la generación de respuestas de citoquinas tipo Th1 durante la infección por *M. tuberculosis*, cada una de estas moléculas de señalización funcionaría en diferentes etapas de la infección bacteriana. A este respecto, fue sugerido que ICOS participaría en etapas más tardías de la respuesta inmune, mientras que SLAM es una molécula que se induce muy rápidamente luego de la activación del linfocito T (79). Asimismo, ha sido demostrado que ICOS regula la supervivencia de células T efectoras activadas así como también de células T de memoria. Como resultado de esto, ICOS influenciaría significativamente la disponibilidad de células T Ag específicas en las fases más tardías de la respuesta inmune (178). ICOS también influencia la supervivencia de células T regulatorias FoxP3<sup>+</sup> (178). Estos resultados podrían contribuir a resolver las discrepancias sobre las funciones de ICOS observadas *in vivo*. Basados en un gran número de estudios, Burmeister y col. han propuesto que ICOS actuaría como una molécula agonista de todos los tipos celulares que expresan altos niveles de este receptor, incluyendo células T efectoras, células T regulatorias FoxP3<sup>+</sup>, células Th1 o Th2, o células Th17. En todos los casos, ICOS inducirá la expansión y supervivencia de estas subpoblaciones. Consecuentemente, la ausencia de ICOS en los modelos animales llevaría a un fenotipo que reflejará la deficiencia del tipo de células T efectora dominante (178). Por lo tanto, se podría postular que en tuberculosis, ICOS induciría la supervivencia y expansión de células efectoras Th1 en los pacientes de AR y podría estar implicado en el mantenimiento de las respuestas de memoria. Por otro lado, SLAM tendría un rol más temprano en la generación de las respuestas Th1 durante la infección por *M. tuberculosis*.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que SLAM e ICOS podrían actuar en forma concertada durante la generación y mantenimiento de la respuesta Th1 protectora en tuberculosis. Así, estas dos moléculas coestimuladoras podrían ser blancos potenciales para la modulación de los niveles de citoquinas en infecciones causadas por micobacterias.

### ***Rol de las CD en la infección activa por M. tuberculosis.***

Las CD presentes en los espacios alveolares en el pulmón (159), constituyen la primera línea de defensa contra patógenos microbianos inhalados como *M. tuberculosis* (179). Dado que las CD son importantes reguladores de las respuestas efectoras de las células T, el grado de estimulación de estas células, el patrón de moléculas coestimuladoras que expresan y las citoquinas secretadas por ellas, dictarán la naturaleza de las células efectoras y de memoria generadas (180). Asimismo, como se describió anteriormente, luego de la interacción TCR-CMH, las señales coestimuladoras son cruciales para una eficiente activación de los linfocitos T. Esto involucra a las moléculas expresadas en las células T, tales como CD28, ICOS, SLAM, y a sus receptores correspondientes en las CPA. Es interesante destacar que si bien SLAM fue inicialmente identificado en células T activadas (79), posteriormente se demostró su expresión en CD maduras (84, 90). Por lo tanto, puede postularse que SLAM podría contribuir a la capacidad de las CD de estimular a los linfocitos T, dependiendo de su estado de maduración, lo cual podría aportar conocimientos sobre la regulación de la interacción entre CD y células T (90).

Dada la crucial importancia del IFN- $\gamma$  para lograr una defensa efectiva del huésped contra *M. tuberculosis*, no es sorprendente que el patógeno haya desarrollado mecanismos que inhiban al IFN- $\gamma$  o que evadan ciertas respuestas efectoras de esta citoquina. Uno de los roles más significativos de las CD en el establecimiento de la respuesta inmune protectora es la determinación de la expansión y diferenciación de los linfocitos T hacia el linaje Th1 o Th2 (159). Aunque las células NK y las células T han sido consideradas por mucho tiempo como las fuentes exclusivas de IFN- $\gamma$ , publicaciones recientes han demostrado que esta citoquina Th1 podría también ser producida por monocitos, macrófagos y CPA (12, 13). Al respecto se demostró que la estimulación con BCG induce la producción de IFN- $\gamma$  vía TLR2 en CD de DS (14).

Teniendo en cuenta que la expresión de SLAM en células T de pacientes con tuberculosis correlaciona directamente con la respuesta frente a *M. tuberculosis*, seguidamente se investigó la función de SLAM en las CD de pacientes con tuberculosis. En particular, se estudió si SLAM podría participar en la coordinación de la activación de las funciones efectoras de los linfocitos T, determinando protección frente a la infección por *M. tuberculosis*.

Inicialmente se analizó el fenotipo de las CD de pacientes con tuberculosis de AR y BR luego de la estimulación específica con el antígeno. Los resultados obtenidos mostraron una regulación positiva de distintos marcadores de superficie (CD80, CD83, CD86, y CMHII), indicando que las CD de pacientes con tuberculosis son totalmente activadas por efecto de *M. tuberculosis*. Asimismo, la estimulación antigénica indujo altos niveles de SLAM en las CD de ambos grupos de pacientes (AR y BR). Dado que ha sido demostrado que las citoquinas inflamatorias secretadas durante la

maduración de las CD no afectan la expresión de SLAM (84), la regulación positiva de esta molécula coestimuladora podría ser resultado directo de la inducción del proceso de maduración. Así, los niveles elevados de SLAM inducidos por *M. tuberculosis* en las CD de pacientes indicarían que estas células son capaces de inducir una respuesta proinflamatoria efectiva para el control de la bacteria intracelular. De hecho, las CD son transformadas en células altamente especializadas durante el proceso de maduración, aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas, lo cual aumenta su capacidad de activar a los linfocitos circundantes (158, 181, 182). SLAM podría entonces tener un rol importante en la modulación de las funciones de las CD, tales como la regulación de la respuesta inflamatoria y el control de vías de señalización que promueven la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia células Th1 efectoras (183). Dado que SLAM está involucrado en la activación de las células T, ha sido propuesto que la expresión del mismo en las CD podría proveer una señal bidireccional en la cual las CD que interaccionan con las células T son simultáneamente y sinérgicamente activadas para montar una respuesta Th1 (84). Este mecanismo podría entonces ocurrir en los pacientes con tuberculosis de AR, individuos que luego de estimulación antigénica expresan altos niveles de SLAM tanto en las CD como en los linfocitos T, lo cuál les permitiría montar una respuesta de citoquinas Th1 frente a la infección por *M. tuberculosis*. En contraste, aunque las CD de los pacientes de BR expresan altos niveles de SLAM luego de la estimulación con *M. tuberculosis*, sus células T no son activadas por el Ag y por lo tanto SLAM no se incrementa en estas células,

impidiendo así la señal bidireccional entre CD y linfocitos T y por lo tanto la generación de una respuesta Th1.

Nuestros datos mostraron que las CD de ambos grupos de pacientes con tuberculosis expresaron SLAM y secretaron IFN- $\gamma$  luego de estimulación con *M. tuberculosis*. Más aún, la señalización a través de SLAM incrementó significativamente los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-12, reduciendo marcadamente la producción de IL-6, una citoquina regulatoria implicada en el control temprano de la respuesta inmune inflamatoria en la infección por *M. tuberculosis*, que podría llevar a inmunosupresión durante la progresión de la enfermedad (184). Asimismo, la señalización a través de SLAM en las CD condujo a la expresión de T-bet, un factor de transcripción considerado esencial para la producción óptima de IFN- $\gamma$  por estas células y para la activación de células Th1 antígeno específicas (185). La expresión de T-bet es regulada por IFN- $\gamma$  en un sistema de retroalimentación positiva, de manera similar a lo que fue observado en células T (186, 187). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que las CD de pacientes con tuberculosis no expresan T-bet luego de estimulación antigénica, sugiriendo que la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis* podría ser independiente de T-bet. De acuerdo con esto, ha sido demostrado que T-bet no se expresa en macrófagos luego del tratamiento con IFN- $\gamma$ , indicando que la producción de esta citoquina por estas células sería controlada por otro factor de transcripción distinto de T-bet, probablemente Stat4 (186). Interesantemente, la activación de SLAM en CD estimuladas por *M. tuberculosis* incrementó la producción de IFN- $\gamma$  induciendo la expresión de T-bet y demostrando así que T-bet podría ser esencial para la óptima producción de IFN- $\gamma$  por CD en tuberculosis. En concordancia con



estos resultados, se demostró que T-bet es esencial para la óptima secreción de IFN- $\gamma$  por CD de ratón, un rol que sería selectivo para el IFN- $\gamma$ , dado que la expresión de otras citoquinas como IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-1 secretadas por las CD no fueron afectadas en las CD T-bet<sup>-/-</sup> (186). Sin embargo, y en correlación con nuestros resultados, la expresión de T-bet en las CD sólo fue inducida por cultivo con IFN- $\gamma$  (186). En base a estos resultados, Lugo-Villarino y colaboradores propusieron que luego de la interacción con los TLR, las CD secretarían IL-12 e IFN- $\gamma$  activando las vías de Stat1 y Stat4. Así, Stat1 podría entonces controlar la expresión de T-bet y de Stat4, polarizando simultáneamente los precursores Th hacia un fenotipo Th1 y maximizando la producción de IFN- $\gamma$  (186).

SLAM es un autoligando y las interacciones SLAM-SLAM entre CD y/o CD y linfocitos T podría tener lugar durante la estimulación con *M. tuberculosis*, incrementando la producción de IFN- $\gamma$ . Por lo tanto, seguidamente confirmamos el rol de SLAM en la activación de IFN- $\gamma$  mediante el bloqueo de la expresión de este receptor. Los resultados demostraron que la señalización a través de SLAM está implicada en la producción de IFN- $\gamma$ , así como también en la regulación negativa de los niveles de IL-6 durante la estimulación con *M. tuberculosis*. Más aún, el bloqueo de la expresión de SLAM tanto en las CD como en las células T produjo una inhibición casi del 100% de la producción de IFN- $\gamma$ , confirmando el rol de la interacción SLAM-SLAM entre CD y linfocitos en la generación de una respuesta Th1 en tuberculosis.

Considerando que, en contraste a los resultados obtenidos en células T, las CD de ambos grupos de pacientes con tuberculosis presentan el mismo patrón de activación y producción de citoquinas, se investigó la capacidad

de estas CD en la inducción de respuestas Th1 por los linfocitos. Como se mostró en la sección resultados, las CD de los pacientes de BR indujeron producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T de los pacientes de AR, indicando que las CD de los pacientes no respondedores son funcionales y que la generación del microambiente de citoquinas durante la infección por *M. tuberculosis* dependería primariamente de las células T. Así, se demuestra que la falta de respuesta observada en los pacientes de BR se relaciona a una débil señalización a través del TCR pero no a un defecto en la presentación o maduración de sus CD. Asimismo, estudios recientes en ratón han sugerido que las variaciones en el transporte de la bacteria desde el pulmón a los ganglios linfáticos locales (donde se inicia la respuesta inmune adaptativa) podrían explicar las resoluciones diferenciales de la infección por *M. tuberculosis* en humanos (188). Así, la falta de respuesta observada en los pacientes de BR podría deberse a una migración reducida de las CD a los ganglios linfáticos en el inicio de la infección, lo cual se vería reflejado en una muy baja expansión de clones reactivos específicos para *M. tuberculosis*.

En resumen, las CD de ambos grupos de pacientes con tuberculosis maduran en respuesta a estimulación con *M. tuberculosis*, expresando SLAM y produciendo altos niveles de citoquinas Th1. Asimismo, demostramos que la estimulación a través de SLAM posee un rol clave en la interacción CD-linfocito T llevando a la generación de IFN- $\gamma$ , lo cual podría tener un rol crucial en la resolución de la tuberculosis. En base a los resultados de nuestros estudios en CD y en linfocitos T, en el caso de los pacientes de BR que presentan una respuesta Th1 disminuida, postulamos que esto podría deberse a la anergia de las células T de estos individuos al antígeno específico o, como se mencionó, a

una reducida migración de sus CD a los ganglios linfáticos, ambas situaciones serían las que conducirían a la baja expansión de clones reactivos específicos para *M. tuberculosis* necesarios para la respuesta inmune efectiva contra el patógeno.

### ***Vías de señalización activadas por SLAM que conducen a producción de IFN- $\gamma$ durante la tuberculosis activa.***

Dado que la coestimulación a través de SLAM incrementa la producción de IFN- $\gamma$  en tuberculosis y CREB regula la secreción de IFN- $\gamma$  frente a *M. tuberculosis*(139), postulamos que las vías de señalización de SLAM y CREB participarían en la activación del gen de IFN- $\gamma$  conduciendo, en último término, al desarrollo de tuberculosis activa o infección latente. CREB es expresado constitutivamente y su fosforilación incrementa la afinidad de unión a los promotores de los genes regulados por este factor de transcripción. Asimismo, una vez fosforilado, CREB facilita el reclutamiento de la proteína de unión a CREB (CBP) y de P300, activadores transcripcionales con actividad de histonas acetiltransferasas, favoreciendo así la iniciación de la transcripción (134). Por lo tanto, en este trabajo evaluamos el efecto de la coestimulación a través de SLAM en la fosforilación de CREB en células de pacientes estimuladas con *M. tuberculosis*. Los resultados obtenidos mostraron que SLAM incrementa la fosforilación de CREB, de acuerdo con nuestra postulación. Utilizando citometría de flujo observamos que la mayoría de las células que expresaban CREB fosforilado intracelularmente, eran positivas para la expresión de SLAM. Así, nuestros hallazgos sobre la asociación fosforilación de CREB y activación

de SLAM, señalan un potencial mecanismo mediante el cual SLAM induciría la producción de IFN- $\gamma$  en tuberculosis. Más aún, la transfección de CMSP con ARN de interferencia para SLAM redujo marcadamente la fosforilación de CREB, indicando que SLAM contribuiría en forma directa a la activación de este factor de transcripción.

Dado que ha sido ampliamente demostrado que IL-17 e IFN- $\gamma$  se regulan recíprocamente (47), estudiamos el efecto de IL-17 sobre la expresión de SLAM, a fin de profundizar el rol de SLAM en tuberculosis. Nuestros resultados demostraron que el agregado exógeno de IL-17 disminuyó la expresión de SLAM en células T de pacientes con tuberculosis, en correlación con una inhibición de la secreción de IFN- $\gamma$ . Más aún, la IL-17 inhibió la expresión de células SLAM<sup>+</sup>CREB<sup>+</sup>. Dado que a lo largo de este trabajo hemos demostrado que la expresión de SLAM y la señalización bidireccional establecida por esta molécula coestimuladora entre CD y linfocitos T es crucial para la producción de IFN- $\gamma$  en tuberculosis, y que SLAM es regulado positivamente por IFN- $\gamma$  creando un sistema de retroalimentación positivo (80), estos hallazgos sugieren un nuevo mecanismo por el cual IL-17 podría inhibir la generación de respuestas Th1 en tuberculosis.

El rol de IL-17 en la tuberculosis humana no ha sido completamente dilucidado, en particular aún no se conoce si la subpoblación Th17 tiene un rol perjudicial o benéfico en la resolución de la infección. Ha sido propuesto que el balance entre las vías IL-12/IFN- $\gamma$  e IL-23/IL-17 define la resolución de la infección por *M. tuberculosis* (54). Más aún, varias publicaciones demuestran que IL-17 podría estar involucrada en el mantenimiento de la integridad del granuloma y que la ausencia de esta citoquina genera una deficiencia en la

migración de los neutrófilos al sitio de infección (54, 56-58). Por lo tanto, la subpoblación Th17 podría ser clave en el inicio de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, especialmente en la generación del granuloma que permite contener la infección y el crecimiento bacteriano. Sin embargo, son las células Th1 las que correlacionan luego con la inhibición del crecimiento bacteriano y la generación de una respuesta inmune protectora en tuberculosis. Dado que SLAM inhibe la producción de IL-6 (citoquina clave en la generación de células Th17) e induce la producción de IFN- $\gamma$ , esta molécula tendría un rol clave en la generación de respuestas Th1 durante la respuesta inmune adaptativa, llevando a un predominio de células Th1. Sin embargo, como fue demostrado IL-17 inhibe la expresión de este receptor llevando a una marcada disminución de la producción de IFN- $\gamma$ , sugiriendo que las células Th17 podrían actuar de modo regulatorio según las concentraciones de IFN- $\gamma$  presentes en el microambiente. Así, nuestros resultados sugieren que IFN- $\gamma$  e IL-17 se regularían recíprocamente en la infección humana por *M. tuberculosis* mediante un mecanismo dependiente de SLAM y del factor de transcripción CREB.

**Conclusión**

---

En base a los resultados presentados en este trabajo, proponemos que la regulación de la producción de IFN- $\gamma$  por moléculas de señalización en la tuberculosis humana dependería principalmente del reconocimiento antigénico por linfocitos T. Las CD mediante la expresión de SLAM y secreción de citoquinas proinflamatorias, inducirían la diferenciación de las células T hacia un perfil Th1. Las células T respondedoras a *M. tuberculosis* rápidamente incrementarían los niveles de SLAM y estas dos señales se combinarían para inducir la producción de IFN- $\gamma$  por un mecanismo que sería dependiente de la fosforilación del factor de transcripción CREB y de la activación de T-bet. Los linfocitos T activados serían reclutados al sitio de la infección con elevados niveles de SLAM sobre su superficie celular. Así, el reconocimiento antigénico induciría la liberación a nivel local de citoquinas proinflamatorias, llevando al aumento en los niveles de SLAM e ICOS. La ulterior señalización a través de ambos receptores incrementaría aún más los niveles de IFN- $\gamma$  en el microambiente celular, creándose un sistema de retroalimentación positivo. A su vez, los niveles de ICOS permanecerían elevados en los linfocitos T de memoria en pacientes de AR, facilitando la migración al sitio de infección e induciendo respuestas benéficas Th1. La falla de los linfocitos T de pacientes de BR para responder a *M. tuberculosis* impediría el incremento de SLAM y la producción de IFN- $\gamma$ , contribuyendo a una reducida expresión de ICOS. Por otro lado, la expresión de SAP y/o de CD31 (168) en los pacientes de BR induciría señales que inhibirían la producción de IFN- $\gamma$ . Asimismo, la IL-17 participaría en la modulación de respuestas de citoquinas en el microambiente, impidiendo la exacerbación de una respuesta Th1 mediante inhibición de la expresión de SLAM y fosforilación de CREB, corroborando la

regulación recíproca de IL-17 e IFN- $\gamma$  (47). De esta forma, nuestros hallazgos demuestran que diferentes proteínas de señalización, activadoras (SLAM, ICOS) o inhibitoras (SAP, CD31) participan en la respuesta inmune del huésped contra *M. tuberculosis*, conduciendo a producción de citoquinas en el microambiente celular (IFN- $\gamma$ , IL-17) que determinan la protección contra el patógeno o el desarrollo de enfermedad.



## Referencias

---

1. Condos, R., B. Raju, A. Canova, B. Y. Zhao, M. Weiden, W. N. Rom, and R. Pine. 2003. Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients. *Infect Immun* 71:2058.
2. Subramanyam, S., L. E. Hanna, P. Venkatesan, K. Sankaran, P. R. Narayanan, and S. Swaminathan. 2004. VIH alters plasma and M. tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res* 24:101.
3. Hertoghe, T., A. Wajja, L. Ntambi, A. Okwera, M. A. Aziz, C. Hirsch, J. Johnson, Z. Toossi, R. Mugerwa, P. Mugenyi, R. Colebunders, J. Ellner, and G. Vanham. 2000. T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of VIH and pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol* 122:350.
4. Toossi, Z. 2003. Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Infect Dis* 188:1146.
5. Small, P. M., and P. I. Fujiwara. 2001. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med* 345:189.
6. Ferraz, J. C., F. B. Melo, M. F. Albuquerque, S. M. Montenegro, and F. G. Abath. 2006. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res* 39:1387.
7. Fenton, M. J., and M. W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 64:683.
8. Stenger, S., and M. Rollinghoff. 2001. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3:iii43.
9. van Crevel, R., T. H. Ottenhoff, and J. W. van der Meer. 2002. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 15:294.
10. Berrington, W. R., and T. R. Hawn. 2007. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 219:167.
11. Salgame, P. 2005. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Curr Opin Immunol* 17:374.
12. Schindler, H., M. B. Lutz, M. Rollinghoff, and C. Bogdan. 2001. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol* 166:3075.

13. Wang, J., J. Wakeham, R. Harkness, and Z. Xing. 1999. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest* 103:1023.
14. Fricke, I., D. Mitchell, J. Mittelstadt, N. Lehan, H. Heine, T. Goldmann, A. Bohle, and S. Brandau. 2006. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* 176:5173.
15. Flynn, J. L. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 84:93.
16. Ottenhoff, T. H., F. A. Verreck, M. A. Hoeve, and E. van de Vosse. 2005. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 85:53.
17. Cooper, A. M., L. B. Adams, D. K. Dalton, R. Appelberg, and S. Ehlers. 2002. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol* 10:221.
18. Kampmann, B. Y., Douglas. 1998. Childhood tuberculosis: advances in immunopathogenesis, treatment and prevention. *Current Opinion in infectious diseases* 11:331.
19. Fields, P. E., and R. A. Flavell. 2001. Helper T cell differentiation: a role for SAP? *Nat Immunol* 2:382.
20. Spellberg, B., and J. E. Edwards, Jr. 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 32:76.
21. Yamamura, M., K. Uyemura, R. J. Deans, K. Weinberg, T. H. Rea, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254:277.
22. Salgame, P., J. S. Abrams, C. Clayberger, H. Goldstein, J. Convit, R. L. Modlin, and B. R. Bloom. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254:279.
23. Doffinger, R., S. Patel, and D. S. Kumararatne. 2005. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol* 17:440.
24. Algood, H. M., J. Chan, and J. L. Flynn. 2003. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:467.
25. Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo, and B. R. Bloom. 1992. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 175:1111.
26. MacMicking, J. D., G. A. Taylor, and J. D. McKinney. 2003. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 302:654.

27. Gutierrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, and V. Deretic. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119:753.
28. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, K. J. Triebold, B. Koller, and B. R. Bloom. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12013.
29. Winau, F., S. Weber, S. Sad, J. de Diego, S. L. Hoops, B. Breiden, K. Sandhoff, V. Brinkmann, S. H. Kaufmann, and U. E. Schaible. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24:105.
30. Lienhardt, C., A. Azzurri, A. Amedei, K. Fielding, J. Sillah, O. Y. Sow, B. Bah, M. Benagiano, A. Diallo, R. Manetti, K. Manneh, P. Gustafson, S. Bennett, M. M. D'Elia, K. McAdam, and G. Del Prete. 2002. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol* 32:1605.
31. Jung, Y. J., R. LaCourse, L. Ryan, and R. J. North. 2002. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice. *Infect Immun* 70:6436.
32. North, R. J. 1998. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 113:55.
33. Rook, G. A., R. Hernandez-Pando, K. Dheda, and G. Teng Seah. 2004. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* 25:483.
34. Henao, M. I., C. Montes, S. C. Paris, and L. F. Garcia. 2006. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86:11.
35. Weir, R. E., G. F. Black, H. M. Dockrell, S. Floyd, P. E. Fine, S. D. Chaguluka, S. Stenson, E. King, B. Nazareth, D. K. Warndorff, B. Ngwira, A. C. Crampin, L. Mwaungulu, L. Sichali, E. Jarman, L. Donovan, and J. M. Blackwell. 2004. Mycobacterial purified protein derivatives stimulate innate immunity: Malawians show enhanced tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), and IL-10 responses compared to those of adolescents in the United Kingdom. *Infect Immun* 72:1807.
36. Toossi, Z., P. Gogate, H. Shiratsuchi, T. Young, and J. J. Ellner. 1995. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active

- tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol* 154:465.
37. Steinman, L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13:139.
  38. Willenborg, D. O., S. Fordham, C. C. Bernard, W. B. Cowden, and I. A. Ramshaw. 1996. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 157:3223.
  39. Krakowski, M., and T. Owens. 1996. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 26:1641.
  40. Willenborg, D. O., S. A. Fordham, M. A. Staykova, I. A. Ramshaw, and W. B. Cowden. 1999. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol* 163:5278.
  41. Bettelli, E., M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8:345.
  42. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233.
  43. Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein, and J. D. Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744.
  44. Kolls, J. K., and A. Linden. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467.
  45. Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon, and J. K. Kolls. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194:519.
  46. Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133.

47. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235.
48. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179.
49. Tato, C. M., and J. J. O'Shea. 2006. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 441:166.
50. Shevach, E. M. 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25:195.
51. Khader, S. A., J. E. Pearl, K. Sakamoto, L. Gilmartin, G. K. Bell, D. M. Jelley-Gibbs, N. Ghilardi, F. deSavauge, and A. M. Cooper. 2005. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 175:788.
52. Lockhart, E., A. M. Green, and J. L. Flynn. 2006. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 177:4662.
53. Wozniak, T. M., A. A. Ryan, J. A. Triccas, and W. J. Britton. 2006. Plasmid interleukin-23 (IL-23), but not plasmid IL-27, enhances the protective efficacy of a DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 74:557.
54. Khader, S. A., and A. M. Cooper. 2008. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*.
55. Happel, K. I., E. A. Lockhart, C. M. Mason, E. Porretta, E. Keoshkerian, A. R. Odden, S. Nelson, and A. J. Ramsay. 2005. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs. *Infect Immun* 73:5782.
56. Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M. D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, T. Suda, K. Sudo, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 178:3786.
57. Dragon, S., A. S. Saffar, L. Shan, and A. S. Gounni. 2008. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol* 45:160.
58. Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, M. L. Belladonna, C. Vacca, C. Conte, P. Mosci, F. Bistoni, P. Puccetti, R. A. Kastelein,

- M. Kopf, and L. Romani. 2007. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 37:2695.
59. Hoeve, M. A., N. D. Savage, T. de Boer, D. M. Langenberg, R. de Waal Malefyt, T. H. Ottenhoff, and F. A. Verreck. 2006. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *Eur J Immunol* 36:661.
60. Scriba, T. J., B. Kalsdorf, D. A. Abrahams, F. Isaacs, J. Hofmeister, G. Black, H. Y. Hassan, R. J. Wilkinson, G. Walzl, S. J. Gelderbloem, H. Mahomed, G. D. Hussey, and W. A. Hanekom. 2008. Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4+ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response. *J Immunol* 180:1962.
61. Garg, A., P. F. Barnes, S. Roy, M. F. Quiroga, S. Wu, V. E. Garcia, S. R. Krutzik, S. E. Weis, and R. Vankayalapati. 2008. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol*.
62. Li, L., S. H. Lao, and C. Y. Wu. 2007. Increased frequency of CD4(+)CD25(high) Treg cells inhibit BCG-specific induction of IFN-gamma by CD4(+) T cells from TB patients. *Tuberculosis (Edinb)* 87:526.
63. Hougardy, J. M., S. Place, M. Hildebrand, A. Drowart, A. S. Debrie, C. Locht, and F. Mascarot. 2007. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:409.
64. Chen, X., B. Zhou, M. Li, Q. Deng, X. Wu, X. Le, C. Wu, N. Larmonier, W. Zhang, H. Zhang, H. Wang, and E. Katsanis. 2007. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* 123:50.
65. Dong, C., R. I. Nurieva, and D. V. Prasad. 2003. Immune regulation by novel costimulatory molecules. *Immunol Res* 28:39.
66. Abdi, K., N. Singh, and P. Matzinger. 2006. T-cell control of IL-12p75 production. *Scand J Immunol* 64:83.
67. Corthay, A. 2006. A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol* 64:93.
68. Aicher, A., M. Hayden-Ledbetter, W. A. Brady, A. Pezzutto, G. Richter, D. Magaletti, S. Buckwalter, J. A. Ledbetter, and E. A. Clark. 2000. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* 164:4689.
69. Chambers, C. A. 2001. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 22:217.

70. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233.
71. McDyer, J. F., T. J. Goletz, E. Thomas, C. H. June, and R. A. Seder. 1998. CD40 ligand/CD40 stimulation regulates the production of IFN-gamma from human peripheral blood mononuclear cells in an IL-12- and/or CD28-dependent manner. *J Immunol* 160:1701.
72. Yang, Y., and J. M. Wilson. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862.
73. Fallarino, F., U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CD40 ligand and CTLA-4 are reciprocally regulated in the Th1 cell proliferative response sustained by CD8(+) dendritic cells. *J Immunol* 169:1182.
74. Sridevi, K., K. Neena, K. T. Chitrakleha, A. K. Arif, D. Tomar, and D. N. Rao. 2004. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alpha beta, TCR gamma delta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using Mycobacterium leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trt protein. *Int Immunopharmacol* 4:1.
75. Yamauchi, P. S., J. R. Bleharski, K. Uyemura, J. Kim, P. A. Sieling, A. Miller, H. Brightbill, K. Schlienger, T. H. Rea, and R. L. Modlin. 2000. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. *J Immunol* 165:1506.
76. Gong, J. H., M. Zhang, R. L. Modlin, P. S. Linsley, D. Iyer, Y. Lin, and P. F. Barnes. 1996. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun* 64:913.
77. Merlo, A., D. Saverino, C. Tenca, C. E. Grossi, S. Bruno, and E. Ciccone. 2001. CD85/LIR-1/ILT2 and CD152 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) inhibitory molecules down-regulate the cytolytic activity of human CD4+ T-cell clones specific for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 69:6022.
78. Kirman, J., K. McCoy, S. Hook, M. Prout, B. Delahunt, I. Orme, A. Frank, and G. Le Gros. 1999. CTLA-4 blockade enhances the immune response induced by mycobacterial infection but does not lead to increased protection. *Infect Immun* 67:3786.
79. Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries, and G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376:260.
80. Garcia, V. E., M. F. Quiroga, M. T. Ochoa, L. Ochoa, V. Pasquinelli, L. Fainboim, L. M. Olivares, R. Valdez, D. O. Sordelli, G. Aversa, R. L. Modlin, and P. A. Sieling.



2001. Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. *J Immunol* 167:5719.
81. Quiroga, M. F., G. J. Martinez, V. Pasquinelli, M. A. Costas, M. M. Bracco, A. Malbran, L. M. Olivares, P. A. Sieling, and V. E. Garcia. 2004. Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol* 173:4120.
  82. Aversa, G., C. C. Chang, J. M. Carballido, B. G. Cocks, and J. E. de Vries. 1997. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 158:4036.
  83. Punnonen, J., B. G. Cocks, J. M. Carballido, B. Bennett, D. Peterson, G. Aversa, and J. E. de Vries. 1997. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 185:993.
  84. Bleharski, J. R., K. R. Niazi, P. A. Sieling, G. Cheng, and R. L. Modlin. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* 167:3174.
  85. Minagawa, H., K. Tanaka, N. Ono, H. Tatsuo, and Y. Yanagi. 2001. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol* 82:2913.
  86. Aversa, G., J. Carballido, J. Punnonen, C. C. Chang, T. Hauser, B. G. Cocks, and J. E. De Vries. 1997. SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol Cell Biol* 75:202.
  87. Meroni, L., M. L. Fusi, S. Varchetta, M. Biasin, S. Rusconi, M. L. Villa, J. E. De Vries, G. Aversa, M. Galli, and M. Clerici. 1999. Altered signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) expression in VIH infection and redirection of VIH-specific responses via SLAM triggering. *Clin Immunol* 92:276.
  88. Isomaki, P., G. Aversa, B. G. Cocks, R. Luukkainen, R. Saario, P. Toivanen, J. E. de Vries, and J. Punnonen. 1997. Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J Immunol* 159:2986.
  89. Carballido, J. M., G. Aversa, K. Kaltoft, B. G. Cocks, J. Punnonen, H. Yssel, K. Thestrup-Pedersen, and J. E. de Vries. 1997. Reversal of human allergic T helper 2 responses by engagement of signaling lymphocytic activation molecule. *J Immunol* 159:4316.

90. Kruse, M., E. Meinl, G. Henning, C. Kuhnt, S. Berchtold, T. Berger, G. Schuler, and A. Steinkasserer. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* 167:1989.
91. Mikhalap, S. V., L. M. Shlapatska, O. V. Yurchenko, M. Y. Yurchenko, G. G. Berdova, K. E. Nichols, E. A. Clark, and S. P. Sidorenko. 2004. The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells. *Blood* 104:4063.
92. Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462.
93. Veillette, A. 2002. The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Sci STKE* 2002:PE8.
94. Howie, D., M. Simarro, J. Sayos, M. Guirado, J. Sancho, and C. Terhorst. 2002. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* 99:957.
95. Howie, D., J. Sayos, C. Terhorst, and M. Morra. 2000. The gene defective in X-linked lymphoproliferative disease controls T cell dependent immune surveillance against Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol* 12:474.
96. Nichols, K. E., G. A. Koretzky, and C. H. June. 2001. SAP: natural inhibitor or grand SLAM of T cell activation? *Nat Immunol* 2:665.
97. Latour, S., G. Gish, C. D. Helgason, R. K. Humphries, T. Pawson, and A. Veillette. 2001. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* 2:681.
98. Czar, M. J., E. N. Kersh, L. A. Mijares, G. Lanier, J. Lewis, G. Yap, A. Chen, A. Sher, C. S. Duckett, R. Ahmed, and P. L. Schwartzberg. 2001. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7449.
99. Morra, M., D. Howie, M. S. Grande, J. Sayos, N. Wang, C. Wu, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* 19:657.
100. Latour, S., R. Roncagalli, R. Chen, M. Bakinowski, X. Shi, P. L. Schwartzberg, D. Davidson, and A. Veillette. 2003. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 5:149.

101. Chan, B., A. Lanyi, H. K. Song, J. Griesbach, M. Simarro-Grande, F. Poy, D. Howie, J. Sumegi, C. Terhorst, and M. J. Eck. 2003. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* 5:155.
102. Yurchenko, M. Y., E. V. Kashuba, L. M. Shlapatska, S. A. Sivkovich, and S. P. Sidorenko. 2005. The role of CD150-SH2D1A association in CD150 signaling in Hodgkin's lymphoma cell lines. *Exp Oncol* 27:24.
103. Davidson, D., X. Shi, S. Zhang, H. Wang, M. Nemer, N. Ono, S. Ohno, Y. Yanagi, and A. Veillette. 2004. Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* 21:707.
104. Cannons, J. L., L. J. Yu, B. Hill, L. A. Mijares, D. Dombroski, K. E. Nichols, A. Antonellis, G. A. Koretzky, K. Gardner, and P. L. Schwartzberg. 2004. SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity* 21:693.
105. Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Kroczeck. 1999. ICOS is an inducible T-cell costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263.
106. van Berkel, M. E., and M. A. Oosterwegel. 2006. CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol Lett* 105:115.
107. Beier, K. C., A. Hutloff, A. M. Dittrich, C. Heuck, A. Rauch, K. Buchner, B. Ludewig, H. D. Ochs, H. W. Mages, and R. A. Kroczeck. 2000. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 30:3707.
108. McAdam, A. J., T. T. Chang, A. E. Lumelsky, E. A. Greenfield, V. A. Boussiotis, J. S. Duke-Cohan, T. Chernova, N. Malenkovich, C. Jabs, V. K. Kuchroo, V. Ling, M. Collins, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2000. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol* 165:5035.
109. Okamoto, N., K. Tezuka, M. Kato, R. Abe, and T. Tsuji. 2003. PI3-kinase and MAP-kinase signaling cascades in ALLM/ICOS- and CD28-costimulated T-cells have distinct functions between cell proliferation and IL-10 production. *Biochem Biophys Res Commun* 310:691.
110. Parry, R. V., C. A. Rumbley, L. H. Vandenberghe, C. H. June, and J. L. Riley. 2003. CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 171:166.

111. Okkenhaug, K., and R. Rottapel. 1998. Grb2 forms an inducible protein complex with CD28 through a Src homology 3 domain-proline interaction. *J Biol Chem* 273:21194.
112. Okkenhaug, K., L. Wu, K. M. Garza, J. La Rose, W. Khoo, B. Odermatt, T. W. Mak, P. S. Ohashi, and R. Rottapel. 2001. A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nat Immunol* 2:325.
113. Greenwald, R. J., A. J. McAdam, D. Van der Woude, A. R. Satoskar, and A. H. Sharpe. 2002. Cutting edge: inducible costimulator protein regulates both Th1 and Th2 responses to cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 168:991.
114. Miyahira, Y., H. Akiba, S. H. Ogawa, T. Ishi, S. Watanabe, S. Kobayashi, T. Takeuchi, T. Aoki, K. Tezuka, R. Abe, K. Okumura, H. Yagita, and N. Watanabe. 2003. Involvement of ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in the regulation of immune responses to *Leishmania major* and *Nippostrongylus brasiliensis* infections. *Immunol Lett* 89:193.
115. Bonhagen, K., O. Liesenfeld, M. J. Stadecker, A. Hutloff, K. Erb, A. J. Coyle, M. Lipp, R. A. Kroccek, and T. Kamradt. 2003. ICOS+ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses. *Eur J Immunol* 33:392.
116. Wassink, L., P. L. Vieira, H. H. Smits, G. A. Kingsbury, A. J. Coyle, M. L. Kapsenberg, and E. A. Wierenga. 2004. ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 173:1779.
117. Li-Weber, M., P. Salgame, C. Hu, I. V. Davydov, O. Laur, S. Klevenz, and P. H. Krammer. 1998. Th2-specific protein/DNA interactions at the proximal nuclear factor-AT site contribute to the functional activity of the human IL-4 promoter. *J Immunol* 161:1380.
118. Gonzalo, J. A., T. Delaney, J. Corcoran, A. Goodearl, J. C. Gutierrez-Ramos, and A. J. Coyle. 2001. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 166:1.
119. Chan, A. C., D. M. Desai, and A. Weiss. 1994. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 12:555.
120. Penix, L., W. M. Weaver, Y. Pang, H. A. Young, and C. B. Wilson. 1993. Two essential regulatory elements in the human interferon gamma promoter confer activation specific expression in T cells. *J Exp Med* 178:1483.

121. Cippitelli, M., A. Sica, V. Viggiano, J. Ye, P. Ghosh, M. J. Birrer, and H. A. Young. 1995. Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. *J Biol Chem* 270:12548.
122. Penix, L. A., M. T. Sweetser, W. M. Weaver, J. P. Hoeffler, T. K. Kerppola, and C. B. Wilson. 1996. The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates selective expression in T cells. *J Biol Chem* 271:31964.
123. Zhang, F., D. Z. Wang, M. Boothby, L. Penix, R. A. Flavell, and T. M. Aune. 1998. Regulation of the activity of IFN-gamma promoter elements during Th cell differentiation. *J Immunol* 161:6105.
124. Zhu, H., J. Yang, T. L. Murphy, W. Ouyang, F. Wagner, A. Saparov, C. T. Weaver, and K. M. Murphy. 2001. Unexpected characteristics of the IFN-gamma reporters in nontransformed T cells. *J Immunol* 167:855.
125. Barbulescu, K., C. Becker, J. F. Schlaak, E. Schmitt, K. H. Meyer zum Buschenfelde, and M. F. Neurath. 1998. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 160:3642.
126. Sica, A., L. Dorman, V. Viggiano, M. Cippitelli, P. Ghosh, N. Rice, and H. A. Young. 1997. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 272:30412.
127. Sweetser, M. T., T. Hoey, Y. L. Sun, W. M. Weaver, G. A. Price, and C. B. Wilson. 1998. The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon-gamma promoter in T cells. *J Biol Chem* 273:34775.
128. Carter, L. L., and K. M. Murphy. 1999. Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells. *J Exp Med* 189:1355.
129. Shnyreva, M., W. M. Weaver, M. Blanchette, S. L. Taylor, M. Tompa, D. R. Fitzpatrick, and C. B. Wilson. 2004. Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN-gamma expression in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12622.
130. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655.
131. Li, H., W. Wojciechowski, C. Dell'Agnola, N. E. Lopez, and I. Espinoza-Delgado. 2006. IFN-gamma and T-bet expression in human dendritic cells from normal

- donors and cancer patients is controlled through mechanisms involving ERK-1/2-dependent and IL-12-independent pathways. *J Immunol* 177:3554.
132. Wang, J., J. W. Fathman, G. Lugo-Villarino, L. Scimone, U. von Andrian, D. M. Dorfman, and L. H. Glimcher. 2006. Transcription factor T-bet regulates inflammatory arthritis through its function in dendritic cells. *J Clin Invest* 116:414.
  133. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemmann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295:338.
  134. Mayr, B., and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599.
  135. Smith, J. L., I. Collins, G. V. Chandramouli, W. G. Butscher, E. Zaitseva, W. J. Freebern, C. M. Haggerty, V. Doseeva, and K. Gardner. 2003. Targeting combinatorial transcriptional complex assembly at specific modules within the interleukin-2 promoter by the immunosuppressant SB203580. *J Biol Chem* 278:41034.
  136. Butscher, W. G., C. Powers, M. Olive, C. Vinson, and K. Gardner. 1998. Coordinate transactivation of the interleukin-2 CD28 response element by c-Rel and ATF-1/CREB2. *J Biol Chem* 273:552.
  137. Tenbrock, K., Y. T. Juang, M. Tolnay, and G. C. Tsokos. 2003. The cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator suppresses IL-2 production in stimulated T cells by a chromatin-dependent mechanism. *J Immunol* 170:2971.
  138. Nichols, M., F. Weih, W. Schmid, C. DeVack, E. Kowenz-Leutz, B. Luckow, M. Boshart, and G. Schutz. 1992. Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *Embo J* 11:3337.
  139. Samten, B., S. T. Howard, S. E. Weis, S. Wu, H. Shams, J. C. Townsend, H. Safi, and P. F. Barnes. 2005. Cyclic AMP response element-binding protein positively regulates production of IFN-gamma by T cells in response to a microbial pathogen. *J Immunol* 174:6357.
  140. Natarajan, K., N. C. Sahoo, and K. V. Rao. 2001. Signal thresholds and modular synergy during expression of costimulatory molecules in B lymphocytes. *J Immunol* 167:114.
  141. Hsueh, Y. P., H. E. Liang, S. Y. Ng, and M. Z. Lai. 1997. CD28-costimulation activates cyclic AMP-responsive element-binding protein in T lymphocytes. *J Immunol* 158:85.

142. Yu, C. T., H. M. Shih, and M. Z. Lai. 2001. Multiple signals required for cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) binding protein interaction induced by CD3/CD28 costimulation. *J Immunol* 166:284.
143. Hamilton, J. K., L. A. Paquin, J. L. Sullivan, H. S. Maurer, F. G. Cruzei, A. J. Provisor, C. P. Steuber, E. Hawkins, D. Yawn, J. A. Cornet, K. Clausen, G. Z. Finkelstein, B. Landing, M. Grunnet, and D. T. Putilo. 1980. X-linked lymphoproliferative syndrome registry report. *J Pediatr* 96:669.
144. Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199.
145. Mittrucker, H. W., M. Kursar, A. Kohler, D. Yanagihara, S. K. Yoshinaga, and S. H. Kaufmann. 2002. Inducible costimulator protein controls the protective T cell response against *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 169:5813.
146. Villegas, E. N., L. A. Lieberman, N. Mason, S. L. Blass, V. P. Zediak, R. Peach, T. Horan, S. Yoshinaga, and C. A. Hunter. 2002. A role for inducible costimulator protein in the CD28- independent mechanism of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 169:937.
147. Kopf, M., A. J. Coyle, N. Schmitz, M. Barner, A. Oxenius, A. Gallimore, J. C. Gutierrez-Ramos, and M. F. Bachmann. 2000. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med* 192:53.
148. Bertram, E. M., A. Tafuri, A. Shahinian, V. S. Chan, L. Hunziker, M. Recher, P. S. Ohashi, T. W. Mak, and T. H. Watts. 2002. Role of ICOS versus CD28 in antiviral immunity. *Eur J Immunol* 32:3376.
149. Loke, P., X. Zang, L. Hsuan, R. Waitz, R. M. Locksley, J. E. Allen, and J. P. Allison. 2005. Inducible costimulator is required for type 2 antibody isotype switching but not T helper cell type 2 responses in chronic nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9872.
150. Wu, C., K. B. Nguyen, G. C. Pien, N. Wang, C. Gullo, D. Howie, M. R. Sosa, M. J. Edwards, P. Borrow, A. R. Satoskar, A. H. Sharpe, C. A. Biron, and C. Terhorst. 2001. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat Immunol* 2:410.
151. Henderson, R. A., S. C. Watkins, and J. L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 159:635.

152. Ladel, C. H., G. Szalay, D. Riedel, and S. H. Kaufmann. 1997. Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Infect Immun* 65:1936.
153. Hertz, C. J., S. M. Kiertscher, P. J. Godowski, D. A. Bouis, M. V. Norgard, M. D. Roth, and R. L. Modlin. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 166:2444.
154. Giacomini, E., E. Iona, L. Ferroni, M. Miettinen, L. Fattorini, G. Orefici, I. Julkunen, and E. M. Coccia. 2001. Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* 166:7033.
155. Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178:2243.
156. Chan, E. D., J. Chan, and N. W. Schluger. 2001. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:606.
157. Dorman, S. E., and S. M. Holland. 2000. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:321.
158. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
159. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767.
160. Sidorenko, S. P., and E. A. Clark. 1993. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol* 151:4614.
161. Ma, C. S., K. E. Nichols, and S. G. Tangye. 2007. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* 25:337.
162. Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515.
163. Sawada, S., M. Takei, and T. Ishiwata. 2007. SAP discovery: the sword edges--beneficial and harmful. *Autoimmun Rev* 6:444.
164. Cannons, J. L., L. J. Yu, D. Jankovic, S. Crotty, R. Horai, M. Kirby, S. Anderson, A. W. Cheever, A. Sher, and P. L. Schwartzberg. 2006. SAP regulates T cell-



- mediated help for humoral immunity by a mechanism distinct from cytokine regulation. *J Exp Med* 203:1551.
165. Takei, M., T. Ishiwata, K. Mitamura, S. Fujiwara, K. Sasaki, T. Nishi, T. Kuga, T. Ookubo, T. Horie, J. Ryu, H. Ohi, and S. Sawada. 2001. Decreased expression of signaling lymphocytic-activation molecule-associated protein (SAP) transcripts in T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunol* 13:559.
  166. Wu, C., J. Sayos, N. Wang, D. Howie, A. Coyle, and C. Terhorst. 2000. Genomic organization and characterization of mouse SAP, the gene that is altered in X-linked lymphoproliferative disease. *Immunogenetics* 51:805.
  167. Howie, D., S. Okamoto, S. Rietdijk, K. Clarke, N. Wang, C. Gullo, J. P. Bruggeman, S. Manning, A. J. Coyle, E. Greenfield, V. Kuchroo, and C. Terhorst. 2002. The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production. *Blood* 100:2899.
  168. Quiroga, M. F., J. O. Jurado, G. J. Martinez, V. Pasquinelli, R. M. Musella, E. Abbate, A. C. Issekutz, M. M. Bracco, A. Malbran, P. A. Sieling, E. Chuluyan, and V. E. Garcia. 2007. Cross-talk between CD31 and the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein during interferon- gamma production against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 196:1369.
  169. Gonzalo, J. A., J. Tian, T. Delaney, J. Corcoran, J. B. Rottman, J. Lora, A. Algarawi, R. Kroczeck, J. C. Gutierrez-Ramos, and A. J. Coyle. 2001. ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol* 2:597.
  170. Dong, C., A. E. Juedes, U. A. Temann, S. Shresta, J. P. Allison, N. H. Ruddle, and R. A. Flavell. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409:97.
  171. Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8:1024.
  172. Rottman, J. B., T. Smith, J. R. Tonra, K. Ganley, T. Bloom, R. Silva, B. Pierce, J. C. Gutierrez-Ramos, E. Ozkaynak, and A. J. Coyle. 2001. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol* 2:605.
  173. Mesturini, R., S. Nicola, A. Chiocchetti, I. S. Bernardone, L. Castelli, T. Bensi, M. Ferretti, C. Comi, C. Dong, J. M. Rojo, J. Yagi, and U. Dianzani. 2006. ICOS

- cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naive CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 36:2601.
174. Yagi, J., Y. Arimura, U. Dianzani, T. Uede, T. Okamoto, and T. Uchiyama. 2003. Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4+ T cells during Th cell development. *J Immunol* 171:783.
  175. Nurieva, R. I., J. Duong, H. Kishikawa, U. Dianzani, J. M. Rojo, I. Ho, R. A. Flavell, and C. Dong. 2003. Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* 18:801.
  176. Bousiotis, V. A., E. Y. Tsai, E. J. Yunis, S. Thim, J. C. Delgado, C. C. Dascher, A. Berezovskaya, D. Rousset, J. M. Reynes, and A. E. Goldfeld. 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 105:1317.
  177. Okamoto, N., Y. Nukada, K. Tezuka, K. Ohashi, K. Mizuno, and T. Tsuji. 2004. ALLIM/ICOS signaling induces T-cell migration/polarization of memory/effector T-cells. *Int Immunol* 16:1515.
  178. Burmeister, Y., T. Lischke, A. C. Dahler, H. W. Mages, K. P. Lam, A. J. Coyle, R. A. Kroczek, and A. Hutloff. 2008. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 180:774.
  179. Holt, P. G. 2000. Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 162:S151.
  180. Radhakrishnan, S., K. R. Wiehagen, V. Pulko, V. Van Keulen, W. A. Faubion, K. L. Knutson, and L. R. Pease. 2007. Induction of a Th1 response from Th2-polarized T cells by activated dendritic cells: dependence on TCR:peptide-MHC interaction, ICAM-1, IL-12, and IFN-gamma. *J Immunol* 178:3583.
  181. Croft, M., D. D. Duncan, and S. L. Swain. 1992. Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J Exp Med* 176:1431.
  182. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184:747.
  183. Rethi, B., P. Gogolak, I. Szatmari, A. Veres, E. Erdos, L. Nagy, E. Rajnavolgyi, C. Terhorst, and A. Lanyi. 2006. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 107:2821.

184. Jang, S., S. Uematsu, S. Akira, and P. Salgame. 2004. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol* 173:3392.
185. Lugo-Villarino, G., S. Ito, D. M. Klinman, and L. H. Glimcher. 2005. The adjuvant activity of CpG DNA requires T-bet expression in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13248.
186. Lugo-Villarino, G., R. Maldonado-Lopez, R. Possemato, C. Penaranda, and L. H. Glimcher. 2003. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7749.
187. Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, and J. J. O'Shea. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15137.
188. Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. 2008. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med* 205:105.

**Agradecimientos**

---

*A Verónica García, por ayudarme a crecer, por enseñarme todo lo que sé de ciencia y muchísimo más...*

*A mi familia, que me enseñó que uno es feliz cuando hace lo que le gusta y que hacer las cosas con pasión es lo único que nos mantiene enteros. Por apoyarme siempre y cuidarme constantemente. A mis abuelos y mis primos.*

*A mis amigas de siempre, Vicky, Mer, Lau y Lu, por escucharme, aguantarme y hacerme la vida tanto más linda y más fácil. Por estar siempre y especialmente por apuntalarme en los malos momentos.*

*A Caro y Noe por la complicidad en tantas cosas, por la amistad a través de los años.*

*A Juli, por escucharme y ser nuestra hermana mayor.*

*A Pin por hacerme reír tanto cuando me hacía tanta falta!*

*A Flor, Javi y Bel, por hacer las horas de trabajo mucho más que sólo trabajo. Por el trabajo en equipo!*

*A las chicas del BARC, nada más oportuno en mi vida que haber empezado a jugar al hockey con ustedes. A Marce, Luti, Clari, Zambo, Sol, Pachu, por las horas de psicología gratuita y por dejarme entrar en sus vidas.*

*A mis amigos de la infancia, que a pesar de la distancia y los años, todavía siguen siendo una parte muy importante de mi vida (Pipa, Debo, Guille y María).*

*A Marcos, por ser parte de más de la mitad de mi vida, por tratar de entenderme aunque sea una de las cosas más difíciles del mundo.*

*A los chicos del Lab Satz, aunque ya todos estamos desperdigados por distintos labs, siempre seguiremos siendo "los chicos del Lab Satz" con todo lo que eso implica....*

*A Pete y a Renata y a todas las personas que de maneras diferentes marcaron mi vida y me ayudaron a reinventarme a mí misma.*

*“Tenemos memoria, tenemos amigos, tenemos los trenes, la risa, el morbo, los celos, la sangre,...*

*Tenemos la duda y la fe, sumo y sigo...*

*Más de cien palabras, más de cien motivos...*

*Más de cien pupilas donde vernos vivos... que valen la pena”*