Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

# Evaluación de la respuesta inmune frente a cepas locales de Mycobacterium tuberculosis multirresistentes a drogas

Yokobori, Noemí

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Yokobori, Noemí. (2010). Evaluación de la respuesta inmune frente a cepas locales de Mycobacterium tuberculosis multirresistentes a drogas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Yokobori, Noemí. "Evaluación de la respuesta inmune frente a cepas locales de Mycobacterium tuberculosis multirresistentes a drogas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

**Dirección:** Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

**Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

# EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A CEPAS LOCALES DE *Mycobacterium tuberculosis* MULTIRRESISTENTES A DROGAS

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Noemí Yokobori**

Director de tesis: **Dra. María del Carmen Sasiain**

Consejero de Estudios: **Dra. Rosa Wainstok**

Lugar de trabajo: **Instituto de Investigaciones Hematológicas Dr. M. Castex. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires**

Buenos Aires, 2010

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A CEPAS LOCALES DE *Mycobacterium tuberculosis* MULTIRRESISTENTES A DROGAS**


## Resumen

La tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB) representa un gran desafío sanitario. En el presente trabajo evaluamos en monocitos (Mo) y macrófagos (MΦ), las estrategias de evasión de la respuesta inmune de dos aislados clínicos MDR de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) relacionados genéticamente: la cepa M causante de un extenso brote y la cepa 410 de baja virulencia.

Nuestros resultados muestran que: **1)** la inducción de citoquinas (CK) y respuesta linfoproliferativa *Mtb*-específica dependen tanto del *status* inmunológico del huésped como del genotipo de *Mtb*, **2)** estas diferencias podrían deberse en parte al aumento en el *subset* de Mo-CD16$^+$ en sangre periférica, **3)** la cepa M es pobre inductora de TNF-α tanto en Mo como en MΦ, **4)** ambas cepas MDR indujeron una cinética retardada de expresión de IL-1β en Mo, **5)** algunos mecanismos de evasión, como la *down*-regulación del receptor de IFN-γ serían comunes a las cepas estudiadas, **6)** la replicación intracelular de la cepa M fue lenta, mientras que 410 se multiplicó rápidamente dentro del MΦ, **7)** la infección del MΦ con la cepa 410 induce tempranamente una fuerte secreción de TNF-α e IL-10, **8)** la cepa M es capaz de interferir con señales proapoptóticas de la vía intrínseca y probablemente de la vía extrínseca, **9)** la cepa 410 indujo predominantemente muerte por necrosis.

En base a estos resultados, y a diferencia de lo reportado para otros genotipos virulentos de *Mtb*, proponemos que el éxito de M se debería a su capacidad de mantenerse en un estado de quiescencia, preservando su nicho y minimizando la respuesta inflamatoria en las etapas tempranas de la infección.



**Palabras claves: tuberculosis multirresistente a drogas, macrófagos, apoptosis, *Mycobacterium tuberculosis*, TNF-α**

**EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE AGAINST LOCAL STRAINS OF MULTIDRUG-RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis***


## Summary

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is a major challenge to public health. We tested in monocytes (Mo) and macrophages (MΦ), the immune evasion strategies of two MDR clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) genetically related: strain M, responsible for a large outbreak and the low virulence strain 410.

Our results show that: **1)** induction of cytokines (CK) and *Mtb*-specific T-cell proliferation are dependent on both the host's immune status and the genotype of *Mtb*, **2)** these differences could be, in part, due to the increase in $CD16^{+}$Mo-subset in peripheral blood, **3)** strain M is poor inducer of TNF-α in both Mo and MΦ, **4)** both MDR strains induced a delayed kinetics of IL-1β expression in Mo, **5)** some immune evasion mechanisms such as the down-regulation IFN-γ receptor would be common to the strains tested, **6)** intracellular replication of strain M was slow, while 410 multiplied rapidly within the MΦ, **7)** infection of MΦ with strain 410 induces an early and strong secretion of TNF-α and IL-10, **8)** strain M is capable of interfering with proapoptotic signaling of the intrinsic and, probably, also the extrinsic pathways, **9)** 410-induced cell death was predominantly by necrosis.

Our results suggest that, in contrast with previous reports with other virulent genotypes *Mtb*, the success of M is due to its ability to stay in a state of quiescence, preserving its niche and minimizing the inflammatory response in the early stages of infection.



**Keywords: multidrug-resistant tuberculosis, macrophages, apoptosis, *Mycobacterium tuberculosis*, TNF-α**

## Agradecimientos

Quisiera agradecer de corazón,

A Javi, mi compañero de la vida, por bancarme siempre.

A mis padres, por haberme dado la libertad de elegir este camino y las herramientas para poder seguirlo. A mis hermanas por el apoyo incondicional.

A mis amigos musiqueros que me ayudaron a equilibrar mi cerebro con esa cosa que te llena el alma. A mis amigos de la vida, la cual sin ellos sería muy aburrida.

A mi directora Maricarmen, por confiar en mí y enseñarme tantas cosas. Su pasión por lo que hace nos contagia y nos llena de entusiasmo. A Silvia de la Barrera, por su constante apoyo y asistencia.

A mis compañeros de Inmuno1 Bar, Carmen, Connie, Evi, Juan, Lau, Lu, Marta Finiaz, Martín Isturiz, Mer Alemán, Merceditas, Pablo, Paula, Susana Fink y Vero, por la ayuda, por los mates, cafés y risas compartidos. A Pilar, Mabel y muy especialmente a Evelia por su buena onda.

Al resto de mis compañeros de la Academia, por estar siempre dispuestos a ayudar y compartir: las chicas de citometría, Gaby Salamone y todos sus compañeros de InmunoOnco, las chicas de Marina Palermo, los chicos de Trombosis, de Citogenética, de Viro, Química y del ILEX. A Flor Quiroga por el espacio en el CNRS.

Hubiera sido imposible realizar este trabajo sin la colaboración del personal de Tisioneumonología del Hospital Muñiz y del Servicio de Micobacterias del Instituto ANLIS-Malbrán. Muchas gracias: Dra. Ana García, Dra. Marisa Vescovo, Dr. González Montaner, Dr. Abbate; Med. Vet. Beatriz López, Lic. Lucía Barrera, Dra. Viviana Ritacco, por las muestras, las cepas de *Mtb*, la ayuda y sobre todo por el conocimiento que nos trasmitieron. Gracias Bety por tu esfuerzo y tu infinita paciencia.

Las siguientes Instituciones aportaron los fondos, las becas, el espacio físico y el equipamiento necesario para la ejecución del trabajo: IIHema de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, CONICET, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Fundación A. Roemmers. A sus miembros y autoridades, muchas gracias.

Esta tesis está dedicada a los pacientes de tuberculosis, víctimas no sólo de la enfermedad, sino también de la marginalidad.

También quiero dedicarla a mis abuelos quienes se sacrificaron por un gran sueño.

# 1.ÍNDICE

**Resumen** ..... i
**Summary** ..... ii
**Agradecimientos** ..... iii
**Dedicatoria** ..... iv
**1.ÍNDICE** ..... v
**ABREVIATURAS y GLOSARIO** ..... viii

**2. INTRODUCCIÓN** ..... 2

**2.1. La tuberculosis** ..... 2
2.1.1. La era pre-antibiótica ..... 2
2.1.2. La tuberculosis es prevenible y curable ..... 4
2.1.3. Emergencia Sanitaria Global ..... 6

**2.2. Tuberculosis Multirresistente a Drogas** ..... 6
2.2.1. La emergencia de la tuberculosis multirresistente a drogas y su problemática ..... 6
2.2.2. Mecanismos genéticos y moleculares de la resistencia a drogas ..... 10
2.2.3. Aportes de la epidemiología molecular ..... 12
2.2.4. MDR-TB en Argentina ..... 14

**2.3. Inmunología de la tuberculosis** ..... 17
2.3.1. La respuesta inmune contra *M. tuberculosis* ..... 17
2.3.2. El macrófago: nicho preferido de *M. tuberculosis* ..... 21
2.3.3. La apoptosis y su inhibición como mecanismo de escape ..... 26

**2.4. OBJETIVOS** ..... 30
2.4.1. Objetivo general ..... 30
2.4.2. Objetivos específicos ..... 30

**3. MATERIALES Y MÉTODOS** ..... 32
**3.1. Pacientes** ..... 32
**3.2. Obtención de células mononucleares (PBMC)** ..... 33
**3.3. Obtención de macrófagos derivados de monocitos** ..... 33

**3.4. Antígenos y cepas de *Mycobacterium tuberculosis*** .....33
**3.5. Cultivos celulares y tratamientos** .....34
3.5.1. Estimulación in vitro de PBMC .....34
3.5.2. Estimulación *in vitro* de MΦ.....34
**3.6. Determinación de moléculas de superficie**.....35
**3.7. Determinación de moléculas citoplasmáticas** .....36
3.7.1. Bcl-2, caspasa 3.....36
3.7.2. Citoquinas (CK).....36
**3.8. Determinación de CK secretadas** .....37
**3.9. Determinación de Apoptosis/Necrosis**.....37
3.9.1. Exposición en superficie de la fosfatidilserina .....37
3.9.2. Pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) .....38
**3.10. Infección de MΦ con cepas viables de *Mtb***.....38
3.10.1. Recuento de UFC .....38
3.10.2. Tinción ácido alcohol resistente .....39
**3.11. Proliferación celular**.....39
**3.12. Análisis Estadístico** .....39
3.12.1. Estadística descriptiva.....39
3.12.2. Inferencia Estadística.....40

**4. RESULTADOS** .....42

**4.1. Caracterización de la línea monocito-macrofágica en pacientes y dadores sanos** .....42
4.1.1. Caracterización de los pacientes MDR-TB .....42
4.1.2. Caracterización de subsets de monocitos circulantes .....44
4.1.3. Producción de citoquinas intracelulares por monocitos .....45
4.1.4. Análisis de correlación con datos clínicos .....50
4.1.5. Proliferación de PBMC.....53

**4.2. Evaluación de la interacción de las distintas cepas de *Mtb* con macrófagos (MΦ) derivados de monocitos**.....55
4.2.1. Marcadores de superficie en MΦ .....55
4.2.2. Producción de citoquinas por MΦ .....58

**4.3. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata por cepas de *Mycobacterium tuberculosis*** ....61
4.3.1. Modulación del receptor de IFN-γ ....61
4.3.2. Replicación intracelular ....62
4.3.3. Determinación de la carga bacilar en MΦ ....63
4.3.4. Evaluación de CK en MΦ infectados con *Mtb* viable ....65
4.3.5. Apoptosis de macrófagos inducida por *Mtb* ....66
4.3.5.a. Determinación de apoptosis en macrófagos ....66
4.3.5.b. Posibles mecanismos involucrados ....69
4.3.5.c. Evaluación de la vía intrínseca de apoptosis ....71
4.3.5.d. Evaluación de la vía extrínseca de apoptosis ....73

**5. DISCUSIÓN** ....77

**5.1. Interacción de las cepas MDR con los monocitos y PBMC en pacientes S- y MDR-TB** ....77
5.1.1. La respuesta inmune frente a *Mtb* depende del *status* inmunológico del dador ....77
5.1.2. La respuesta linfoproliferativa y de producción de CK en Mo es la resultante de la interacción del huésped con los distintos genotipos de *Mtb* ....81
5.1.3. Interacción de las cepas MDR con el MΦ ....84

**5.2. Interacción de las cepas MDR con el sistema inmune y su relación con el éxito o fracaso epidemiológico** ....85

**5.3. CONCLUSIONES FINALES** ....93

**6. BIBLIOGRAFÍA** ....96

# ABREVIATURAS y GLOSARIO

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**AV** Anexina V

**BAAR Bacilo ácido alcohol resistente**

**BCG** *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin

**CD** Células dendríticas

**CK** Citoquinas

**CPA** Célula presentadora de antígenos

**DD** Dominio de muerte

**DOTS** Tratamiento directamente observado acortado

**EMB (E)** Etambutol

**FLQ** Fluoroquinolona

**FSC** *Forward scatter* (tamaño celular)

**Infecciosidad** Frecuencia de intradermo reacción al PPD 2 UT mayor a 10 mm [1]

**INH (H)** Isoniazida

**IP** Ioduro de propidio

**LM** Lipomanano

**LPS** Lipopolisacárido

**Ly** Linfocitos

**mAb** Anticuerpo monoclonal

**ManLAM** Lipoarabino-manano manosilado en el extremo aminofurasil terminal

**MDR-TB** Tuberculosis multirresistente a drogas. Resistente, por lo menos, a INH y RMP

**MIF** Mediana de intensidad de fluorescencia

**Mo** Monocito

**MOI** Multiplicidad de infección

**MR** Receptor de manosa

***Mtb*** *Mycobacterium tuberculosis*

**MTBC** Complejo *Mtb*. Incluye los géneros *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*, entre otros

**MΦ** Macrófagos

**NK** Linfocitos *Natural killer*

**NO** óxido nítrico

**PAMP** Patrones moleculares asociados a patógenos

**PAS** Ácido p-aminosalicílico

**PBMC** Células mononucleares de sangre periférica

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDTC** *pyrrolidine dithiocarbamate*

**PG** Péptidoglicano

**PIM** Fosfatidil mioinositol

**PMN** Polimorfonucleares neutrófilos

**PPD** Derivado proteico purificado

**PRR** Receptor de reconocimiento de patrones

**PS** Fosfatidil serina

**PSD** Prueba de sensibilidad a drogas

**PZA (Z)** Pirazinamida

**QK** Quemoquinas

**RD** Resistencia a drogas

**RFLP** Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

**rhTNF-α** TNF-α recombinante humano

**RMP (R)** Rifampicina

**SIDA** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SSC** *Side scatter* (complejidad celular)

**S-TB** Tuberculosis sensible a drogas

**STM** Estreptomicina

**TB** Tuberculosis

**TLR** Receptores tipo *Toll*

**UFC** Unidades formadoras de colonias

**VIH** Virus de inmunodeficiencia humana

**Virulencia** Aparición de casos de TB bacteriológicamente confirmados [1]

**XDR-TB** Tuberculosis extremadamente resistente a drogas. Resistente, por lo menos, a INH, RMP, una FLQ y una droga inyectable de segunda línea

**$\Delta\Psi_m$** Potencial de membrana mitocondrial

# 2. INTRODUCCIÓN

# 2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) continúa siendo un gran problema sanitario mundial y la irrupción de cepas multirresistentes a drogas (MDR) agrava esta situación. En las últimas décadas se ha acumulado una gran cantidad de información acerca de la epidemiología de la MDR-TB. Sin embargo, poco se sabe de la interacción de estas cepas con su hospedador y la relevancia de la variabilidad genética dentro de la especie *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

## 2.1. La tuberculosis

### 2.1.1. La era pre-antibiótica

La historia de la TB está estrechamente vinculada con la historia de su hospedador, el hombre. Las herramientas de genotipificación molecular han permitido en los últimos años determinar que el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (grupo filogenético que incluye a las especies patógenas *Mtb* y *M. bovis*) se habría originado hace unos 15.000-40.000 años [2-5] estimación cercana a la del éxodo del *Homo sapiens* desde del Cuerno de África (Figura 2.1.1) [3].

La TB fue documentada por los antiguos egipcios, indios y chinos hace 5000, 3300 y 2300 años respectivamente en sus diversas manifestaciones [6]. Durante el imperio romano, Galeno observó que el tratamiento de la TB era casi siempre inútil y se cree que recomendaba a sus colegas no visitar a los enfermos avanzados, ya que la inevitable muerte podría afectar la reputación del médico [7].

A comienzos del siglo XVII, estalla la gran epidemia tuberculosa en Europa. El hacinamiento y las pobres condiciones higiénicas de las crecientes ciudades de la época crearon el escenario perfecto para la transmisión de la mortal *Peste Blanca*.

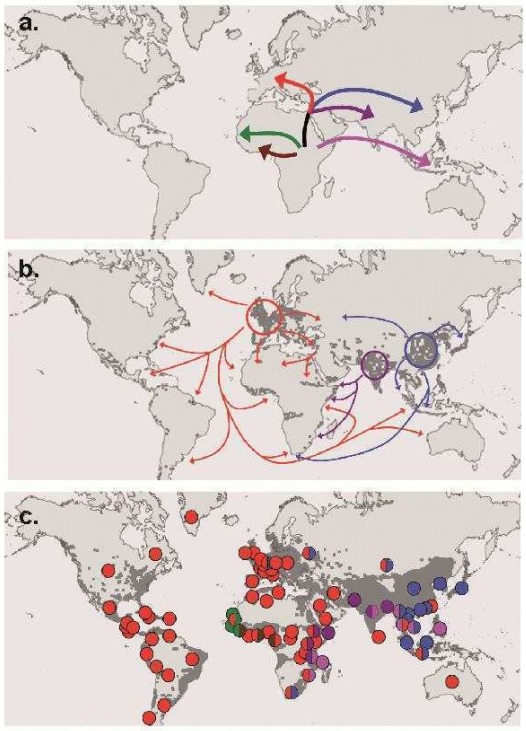



**Figura 2.1.1:** Evolución del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). **a.** Migración hipotética desde África de los antiguos linajes del MTBC. **b.** Rutas de migración desde el crecimiento demográfico moderno. Las zonas en gris oscuro corresponden a regiones con más de 1 millón de habitantes. Los linajes modernos salieron de las regiones más densamente pobladas durante la colonización, migración e intercambio comercial. **c.** La población mundial ha llegado a los 6000 millones. Distribución actual de los seis principales linajes modernos del MTBC. ■Linaje Indo-Oceánico, ■Oeste Africano 1, ■Oeste Africano 2, ■Este Africano e India, ■Este Asiático, ■Europa y América.
Fuente: Hershberg *et. al.*, PLoS Biology, 2008

Las creencias populares y los debates académicos perfilaron la concepción de esta enfermedad en las distintas culturas y épocas, respecto a la etiología (castigo divino, vampirismo, herencia), medidas sanitarias preventivas a tomar y posibles tratamientos (ninguno de ellos exitoso).

Pero no es hasta entrado el siglo XIX que la ciencia hace los aportes más significativos sobre estas cuestiones. En 1865 Jean-Antoine Villemin demuestra experimentalmente la inoculabilidad de la TB humana en animales y de animal a animal, los cuales desarrollaban las lesiones histopatológicas características [8]. Finalmente en 1882 Robert Koch demuestra de manera exhaustiva que el bacilo tuberculoso es el causante único de la tuberculosis en todas sus variantes [9]. A Koch debemos además el desarrollo de la tinción ácido-alcohol resistente y de la producción del derivado proteico purificado (PPD), dos técnicas que, junto con la radiografía de tórax, aún hoy son el *gold standard* en el diagnóstico de la TB.

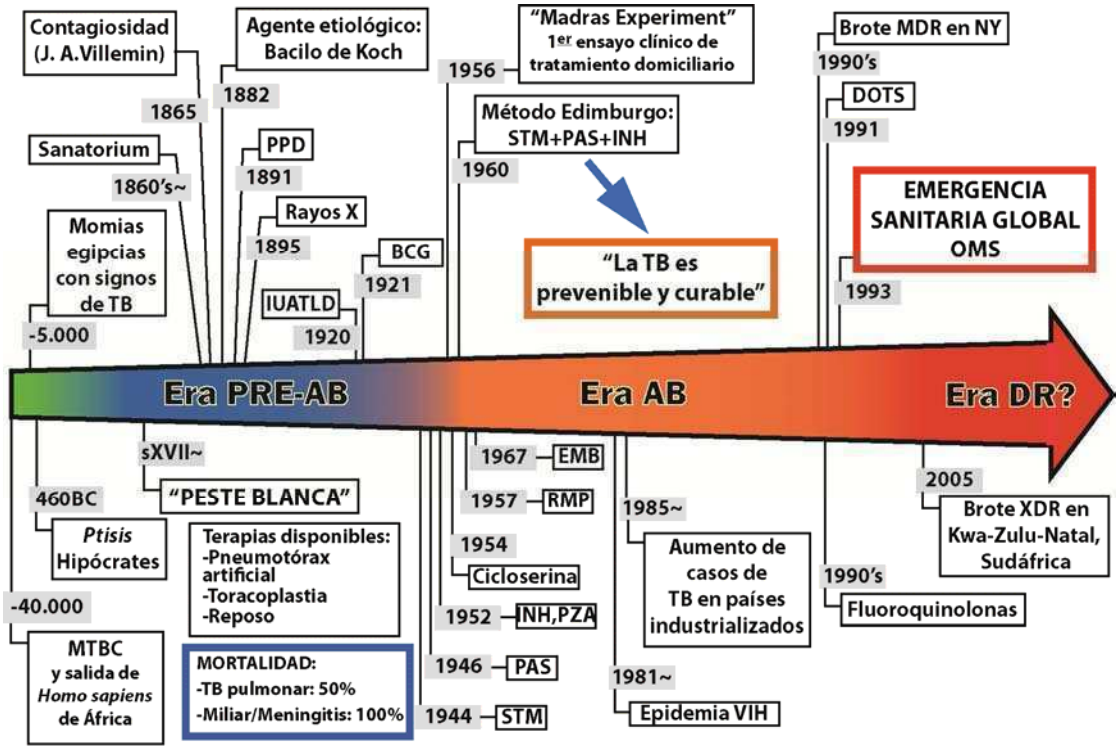



**Figura 2.1.2:** Historia de la tuberculosis (TB). La historia de la TB está estrechamente relacionada con la historia del hombre. Pasó de ser una enfermedad con alta tasa de mortalidad en la era pre-antibiótica (AB) a una afección prevenible y curable en la era de los AB. Desde la década de 1990' la irrupción de cepas resistentes a drogas (DR) alarma a las autoridades sanitarias ya que en estos casos la mortalidad sería similar a la de la era pre-AB. Modelos matemáticos predicen que de no tomarse medidas específicas contra la TB-DR, estas cepas podrían ser las dominantes en el futuro (Cohen, 2004, *Nat Med*). PPD: derivado proteico purificado. IUATLD: *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*. BCG: *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. STM: estreptomicina. PAS: Ácido p-aminosalicílico. INH: isoniazida. PZA: pirazinamida. RMP: rifampicina. EMB: etambutol. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. NY: Nueva York. DOTS: tratamiento directamente observado de corto plazo. MDR: multirresistente a drogas. XDR: extremadamente resistente a drogas.

## 2.1.2. La tuberculosis es prevenible y curable

"…estamos en presencia de un parásito visible y tangible…"
Koch, R. *Über Tuberculose*. 1882

A mediados del siglo XIX comenzaron a proliferar en Europa los sanatorios para tuberculosos, los cuales contribuyeron a cortar la cadena de transmisión. Por otro lado, a pesar de que las terapias disponibles a principio del siglo XX eran de escasa eficacia [6]

(Fig. 2.1.2), gracias a la mejora progresiva de las condiciones de vida los casos de TB comenzaron a disminuir en los países industrializados incluso antes de la aparición de los primeros fármacos [9, 10].

La confirmación de que la tuberculosis no era heredable, sino transmisible, alentó a las autoridades sanitarias a montar campañas de prevención para educar a la comunidad (Fig. 2.1.3). En 1921 es administrada al hombre por primera vez la vacuna desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin, una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* llamada BCG. La inmunización solo resultó ser efectiva contra la meningitis tuberculosa infantil, pero aún en la actualidad es la única vacuna disponible [11].

**Figura 2.1.3:** Un póster de 1935 el cual afirma que "la tuberculosis es prevenible y curable".
Fuente: *Visual culture and Public health posters, NLM, NIH,* EEUU.

El descubrimiento de la estreptomicina (STM, S) y sus propiedades micobactericidas en 1944 por Albert Schatz y Selman Waksman dieron inicio a la era de los antibióticos en la historia de la tuberculosis [6, 9] (Fig. 2.1.2). La sucesiva síntesis de la isoniazida (INH, H), la droga antituberculosa más potente descubierta hasta ese momento [12], y el ácido p-aminosalicílico (PAS), condujo al desarrollo de la terapia combinada la cual logró una tasa de negativización del 90% en la década de 1960' [6]. Otras drogas se sumaron a la lista de agentes con acción antituberculosa: rifampicina (RMP, R), pirazinamida (PZA, Z), etambutol (EMB, E), cicloserina y etionamida [6]. La quimioterapia efectiva sumada a la los intensos programas de lucha contra la TB lograron reducir notablemente las tasas de infección y muerte: la TB pasó a ser una enfermedad prevenible y curable. Pero quedó latente en aquellos lugares donde la terapia no estaba disponible para todos.

### 2.1.3. Emergencia Sanitaria Global

"Un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo de la tuberculosis"

OMS, *10 facts about tuberculosis*, 2009

"Two million deaths each year. (...) Reduced to numbers (...), tuberculosis patients don't seem like us. They live in faraway places, come from obscure cultures, speak incomprehensible languages, have disreputable comorbid disease, or exhibit antisocial behavior. They are "the other". Maybe they do not even exist"

Morens D. At the Deathbed of Consumptive Art. *EID*. 2002 [13]

Hacia el año 1985, la incidencia de la TB comenzó a crecer en los países industrializados. Diversos fenómenos sociales estarían asociados con la re-emergencia de esta enfermedad: aumento de la población en las prisiones, la indigencia, el abuso de drogas inyectables, el hacinamiento y la inmigración desde los países en los que la TB continuaba siendo endémica. Sin embargo, el debilitamiento de las medidas de control de la TB y la epidemia de VIH/SIDA (virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida) fueron los dos factores sinérgicos que detonaron la epidemia [6].

En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara la tuberculosis como una emergencia sanitaria global. A diferencia de la situación vivida en el Medioevo o el Renacimiento la humanidad dispondría en este caso de antibióticos efectivos. Sin embargo, estos resultaron ser un arma de doble filo: la irrupción de cepas multirresistentes a drogas alarmó a las autoridades sanitarias.

## 2.2. Tuberculosis Multirresistente a Drogas

### 2.2.1. La emergencia de la tuberculosis multirresistente a drogas y su problemática

En 1991 la OMS adopta oficialmente el programa DOTS (*directly observed treatment short-course*, tratamiento directamente observado acortado), una estrategia altamente efectiva para el tratamiento de la TB sensible a drogas [6]. El camino recorrido

hasta la implementación del DOTS es el reflejo de las dos facetas del milagro de la quimioterapia [7].

| **Tabla 2.1 Componentes de la estrategia DOTS:** |
| --- |
| **1.** Compromiso político, con financiamiento adecuado y sostenido |
| **2.** Asegurar la rápida identificación de casos y diagnóstico por medio de prácticas de bacteriología de calidad |
| **3.** Proveer un régimen de tratamiento estandarizado con supervisión (DOT) y apoyo a los pacientes |
| **4.** Asegurar el suministro regular e ininterrumpido de las drogas esenciales y su correcta administración |
| **5.** Monitorear y evaluar la *performance* e impacto del programa mediante sistemas estandarizados de registro |

Adaptado de WHO REPORT 2009. *Global Tuberculosis Control.*

Tan sólo unos meses después del descubrimiento de la STM, los médicos notaron que la primera droga antituberculosa de la historia perdía rápidamente su eficacia en un alto número de casos [7]. El primer ensayo clínico controlado realizado en Gran Bretaña en 1947 describió también las primeras cepas de *Mtb* resistentes a la STM [14]. La experiencia se repitió con los subsiguientes intentos de monoterapia con las nuevas drogas disponibles [12, 15]. Si bien la efectividad de la terapia combinada fue demostrada tempranamente, no fue hasta la aparición de la INH y RMP que fue posible disponer de una estrategia compatible con contextos de bajos recursos. Estas dos drogas, por su alta efectividad y bajo costo, lograron acortar el tiempo de tratamiento (unos pocos meses comparado con los 18~24 meses recomendados para el tratamiento con PAS) y su baja toxicidad permitió el tratamiento ambulatorio [7]. Por otro lado, la observación directa fue necesaria para aumentar la tasa de cumplimiento y así el DOTS fue tomando su forma actual. Cabe destacar que uno de los pilares de esta estrategia es el compromiso político de las autoridades sanitarias, ya que depende de la supervisión profesional durante el tratamiento, de la disponibilidad de drogas específicas y del correcto uso de las mismas.

A principios de la década de los 90’ la ciudad de Nueva York, EEUU, se convierte en el epicentro de una epidemia de tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB) [16, 17]. La MDR-TB es definida como la TB causada por bacilos de *Mtb* resistentes a, al

menos, las dos drogas más efectivas: INH y RMP [18]. Las variantes de *Mtb* resistentes a drogas emergieron de los sectores marginales gracias a un sistema de salud que había bajado la guardia en la lucha contra la TB. Los enfermos de SIDA eran particularmente vulnerables a esta forma de TB. Ya en el tercer milenio, mientras se seguía discutiendo la problemática de la MDR-TB, se produce en Kwa-Zulu-Natal, Sudáfrica, un brote en una población con alta prevalencia de VIH/SIDA causado por una cepa luego bautizada como XDR (extremadamente resistente a drogas) [19], por ser resistente a INH, RMP, una fluoroquinolona y una droga inyectable de segunda línea. Desde entonces la XDR-TB se ha detectado en todo el mundo. Estos pacientes serían virtualmente intratables y el pronóstico para ellos es aún peor que para los pacientes con MDR-TB.

**Tabla 2.2. Drogas antituberculosas en uso**

| | | |
|---|---|---|
| Grupo I | Drogas de primera línea de administración oral | Isoniazida (H)<br>Rifampicina (R)<br>Etambutol (E)<br>Pirazinamida (Z)<br>Rifabutina |
| Grupo II | Drogas inyectables | Kanamicina<br>Amikacina<br>Capreomicina<br>Estreptomicina |
| Grupo III | Fluoroquinolonas | Levofloxacina<br>Moxifloxacina<br>Ofloxacina |
| Grupo IV | Drogas de segunda línea bacteriostáticas de administración oral | Etionamida<br>Protionamida<br>Cicloserina<br>Terizidone<br>PAS |
| Grupo V | Drogas con rol o eficacia poco clara en el tratamiento de la MDR-TB (no recomendadas por la OMS para el tratamiento de rutina de pacientes MDR) | Clofazimine<br>Linezolid<br>Amoxicillina/Clavu-lanato<br>Tioacetazona<br>Claritromicina<br>Imipenem |

Adaptado de *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*, WHO, 2008

**Tabla 2.3. Tratamiento de la TB**

| | |
|---|---|
| Fase inicial | 2 meses de HRZE |
| Fase de continuación | 4 a 7 meses de HR |

**Tabla 2.4. Tratamiento de la MDR-TB**

Tratamiento basado en la PSD* con 4 drogas seleccionando sucesivamente aquellas que sean efectivas del grupo I, II, III, IV y V. Se recomienda tratar a los pacientes por 18 meses desde la negativización del cultivo de esputo.

*PSD: prueba de sensibilidad a drogas

Según estimaciones de la OMS, en el 2007 hubo 0,5 millones de nuevos casos de MDR-TB en el mundo (5% de todos los casos de TB), de los cuales sólo el 6% habría sido

reportado [20]. Los casos prevalentes podrían ser dos o tres veces mayores y los individuos con infección latente aun más numerosos [21, 22]. Para tratar a estos pacientes se necesitó recurrir a drogas antiguas como el PAS y la cicloserina (Tablas 2.2.2 y 2.2.4, Fig. 2.1.2), las cuales habían sido dejadas de producir por no ser económicamente redituables. El elevado costo de las drogas de segunda línea y su escasa disponibilidad en los países en desarrollo fueron los dos mayores escollos en el desarrollo de una estrategia global contra la MDR-TB. La efectividad de estas drogas es menor, por lo cual el tiempo de tratamiento es mayor al de la TB sensible (Tablas 2.2.3 y 2.2.4), y se requiere del monitoreo cercano de los pacientes debido a que la aparición de efectos secundarios es mucho más frecuente que para las drogas de primera línea. Para el diagnóstico rápido y el diseño de un tratamiento eficaz para cada caso, es necesario realizar pruebas de sensibilidad a drogas (PSD) las cuales requieren de equipamientos específicos [18].

La resistencia a drogas se origina en los casos inicialmente sensibles luego del tratamiento incorrecto o abandono del mismo; estos casos son denominados adquiridos. Los brotes antes mencionados demostraron que algunas de estas cepas resistentes podrían transmitirse a otro huésped. En este caso, cuando la primo-infección es producida por un bacilo MDR se los denomina primarios[1]. En caso de fracaso terapéutico o epidemiología positiva para MDR-TB, se realiza una PSD para determinar el patrón de resistencia a drogas. Esta prueba no se realiza de rutina en los nuevos pacientes diagnosticados con TB.

Los desafíos planteados en el tratamiento de la MDR-TB llevaron a la OMS a incluir recomendaciones específicas dentro de la estrategia *Stop TB*, entre las cuales está la creación del *Green Light Committee*, el cual supervisará el uso racional de las drogas de segunda línea y trabajará para garantizar la disponibilidad de estas drogas en los países en desarrollo [18].

[1] Según la OMS el episodio es **adquirido** si se hizo una PSD al paciente antes del tratamiento, se confirma la sensibilidad y luego de un tiempo al realizar de nuevo la prueba se determina que corresponde al mismo genotipo original que adquirió las resistencias. Si el paciente se infecta con un genotipo que ya era MDR, se denomina **primario**. Como esta información no suele estar disponible, los pacientes se clasifican según su historia de tratamientos (con o sin historia de abandono).

WHO. *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*. 2008. [18]

La terapia estandarizada dirigida únicamente a la TB sensible a drogas surgió de dos consideraciones: en primer lugar, debido al costo y la complejidad de la detección y el tratamiento de la TB resistente a drogas, y segundo de la percepción que se tenía de que las cepas resistentes a drogas tendrían menor capacidad de provocar epidemias. Este fenómeno fue descripto tempranamente por Middlebrook y sus colaboradores en 1954 en cepas resistentes a INH [23]. Los numerosos brotes reportados en el mundo demuestran que este supuesto era incorrecto. Más aún, modelos matemáticos y análisis epidemiológicos predicen que de no tomarse medidas específicas para controlar la MDR-TB, estas cepas serán una verdadera amenaza para la salud pública en el futuro [24-26].

### 2.2.2. Mecanismos genéticos y moleculares de la resistencia a drogas

*Mtb* es naturalmente resistente a muchos de los agentes antimicrobianos de uso común, y debe esta particularidad a su pared bacteriana altamente impermeable [27, 28]. El componente estructural de la pared está formada por los ácidos micólicos (ác. grasos de alto peso molecular, de 60~90 carbonos de longitud; AM), el arabinogalactano (AG) y el péptidoglicano (PG), los cuales forman capas superpuestas y unidas entre sí de manera covalente (Fig. 2.2.1) [6, 28]. Por otro lado, se ha descripto que *Mtb* posee bombas de eflujo especializadas para el transporte extracelular de drogas [27, 29] y también podría utilizar mecanismos de tolerancia fenotípica a drogas (reversible y no codificada en los genes) en situaciones de estrés. Su largo tiempo de replicación (*Mtb*: cada 24 horas; mayoría de las bacterias: cada 15 minutos a una hora), su capacidad de quedar en un estado metabólico quiescente por largos períodos y algunos nichos que ocupa dentro del hospedador, los cuales no pueden ser alcanzados por los antibióticos, hacen de *Mtb* un patógeno difícil de combatir [27].

Las cepas de *Mtb* resistentes a drogas resultaron de la alta presión de selección que ejerció el hombre desde el descubrimiento de los antibióticos, y probablemente la vacunación masiva con BCG favoreció la emergencia de los genotipos mejor adaptados [30]. Debido a su modo de vida intracelular, la expansión de *Mtb* es básicamente clonal y la transferencia horizontal de genes se considera un evento extremadamente raro [3]. La resistencia genética a antibióticos siempre está codificada en el cromosoma, y surge exclusivamente de mutaciones cromosomales, siendo la inactivación de genes por

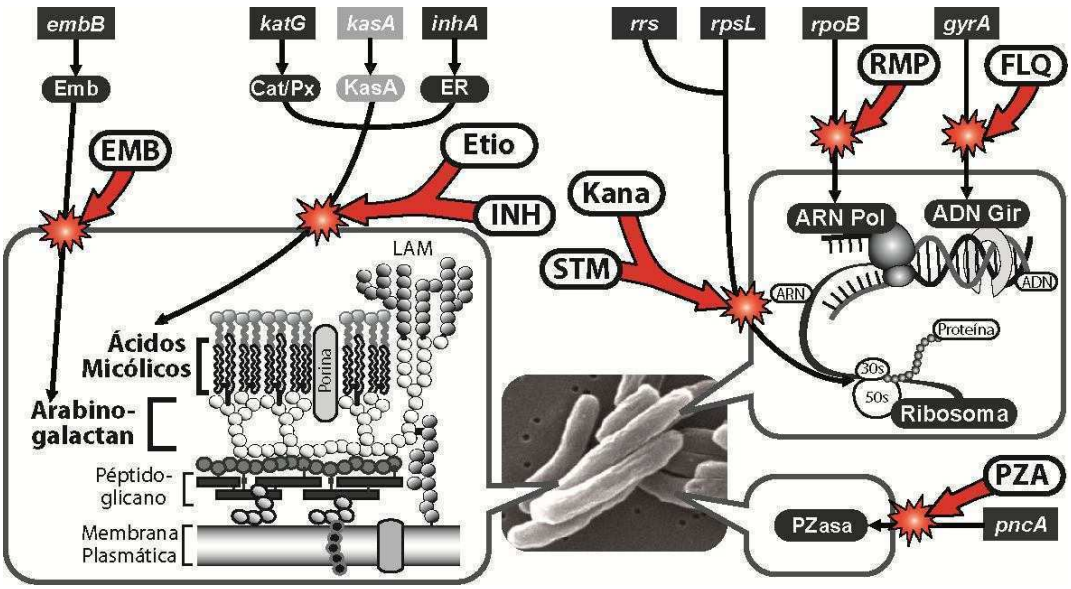



**Figura 2.2.1:** Mecanismos de acción de las distintas drogas antituberculosas y los genes de resistencia asociados (en letra cursiva). En el panel izquierdo se esquematiza la estructura de la pared bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis*, y en el panel derecho la maquinaria de transcripción y traducción. Etio: etionamida; Kana: kanamicina; FLQ: fluoroquinolonas. LAM: lipoarabinomanano. PZasa: pirazinamidasa. Adaptado de *Scientific Illustrations, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH.*

elementos transponibles poco frecuente [27]. Sin embargo se ha descripto que la tasa de mutación de *Mtb* podría variar de manera dinámica en situaciones de estrés dentro de ciertos microambientes, dando lugar, en algunos casos, a mutantes resistentes que luego serán seleccionados por los antibióticos [27].

Desde el punto de vista teórico, la probabilidad de que un genotipo resistente adquiera una segunda mutación sería baja [31]. Sin embargo, se ha descripto que la adquisición de resistencias puede ser secuencial y de hecho, los aislados clínicos monorresitentes a rifampicina son raros [32]. La acumulación de resistencias puede darse cuando un paciente infectado con una cepa resistente es tratado con un régimen estándar (equivalente a dos meses de tratamiento con menos drogas) o debido al tratamiento inadecuado [26, 33]. Este fenómeno de amplificación de la resistencia a drogas ocurre con frecuencia dando lugar a las cepas MDR, XDR y con otras múltiples resistencias [17, 25, 34].

Inicialmente se postuló que aquellas cepas que adquirieron alguna resistencia a drogas serían menos transmisibles o virulentas debido a que las mutaciones que confieren resistencia suelen estar asociadas a genes cuyos productos son vitales para la

supervivencia del patógeno (Fig. 2.2.1), como la síntesis de la pared bacteriana. Estas mutaciones implicarían un costo de *fitness* (en este contexto, capacidad de un microorganismo para sobrevivir, replicarse y diseminarse) para el mutante [24]. Sin embargo, se ha descripto que en los aislados clínicos pueden acumularse mutaciones compensatorias que restauran la función biológica perdida [35].

En la figura 2.2.1 se resumen los mecanismos de acción de las principales drogas antituberculosas y los genes cuya mutación ha sido asociada al fenotipo resistente. Si bien se ha acumulado gran cantidad de información, existirían mecanismos de resistencia alternativos a los mencionados, ya que se han encontrado aislados clínicos resistentes que no poseen ninguna de las mutaciones conocidas [21].

### 2.2.3. Aportes de la epidemiología molecular

En las últimas dos décadas, las técnicas de *fingerprinting* del ácido desoxirribonucleico (ADN), verdaderas huellas digitales de los microorganismos, han permitido estudiar la epidemiología molecular de la TB, integrando la biología molecular, la clínica médica, la estadística y la epidemiología clásica. Si se cuenta con el marcador genético adecuado, la transmisión de una misma cepa entre diversos huéspedes resultará en aislamientos con genotipos o *fingerprints* idénticos [36]. A comienzos de los 90' se ha establecido un estándar internacional basado en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) generado por la secuencia de inserción IS*6110*, un elemento transponible específico del MTBC. Los aislados de *Mtb* poseen entre 2 y 20 copias del elemento ubicadas en diferentes posiciones dentro del cromosoma las cuales son reveladas por la técnica de *Southern blotting* luego de una digestión enzimática del ADN bacteriano (Fig. 2.2.2). El polimorfismo genético que se genera y su relativa estabilidad hacen de este marcador un blanco ideal para estudios epidemiológicos [37]. La aplicación más directa de esta técnica consiste en documentar la expansión clonal de una cepa cuando existe sospecha epidemiológica de transmisión, ya sea en una institución o en la comunidad. También puso en evidencia la posibilidad de reinfección por cepas MDR durante el curso, o luego de la recuperación de una tuberculosis por bacilos sensibles en individuos inmunosuprimidos por HIV [37]. La técnica tiene sus limitaciones; es muy laboriosa, requiere grandes cantidades de ADN y es poco útil en aquellas cepas con bajo número de copias de IS*6110*.

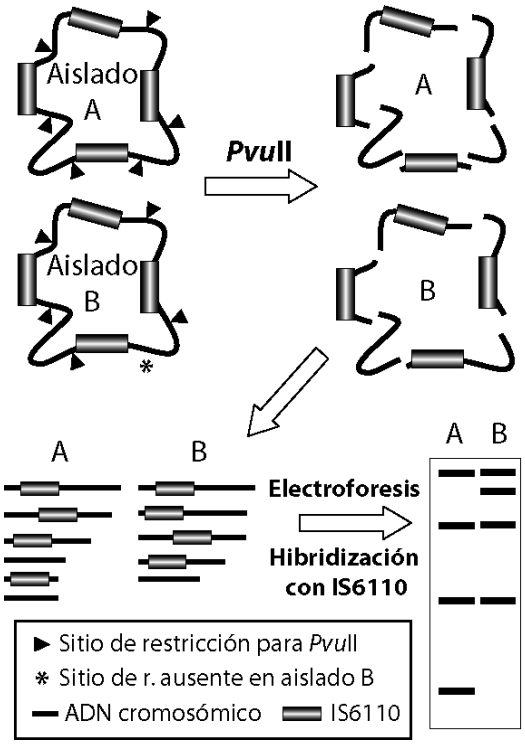



**Figura 2.2.2:** Representación esquemática de la técnica de RFLP. El ADN cromosomal de la bacteria es digerido con una enzima de restricción (PvuII). Luego los fragmentos son separados por electroforesis según su tamaño y revelados con una sonda radioactiva específica para la secuencia IS*6110*. En este ejemplo, el aislado B perdió por mutación un sitio de restricción (*****), lo cual genera un fragmento de mayor tamaño y un patrón de bandas diferente.

Diversos métodos alternativos de genotipificación han sido descriptos, en su mayoría basados en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de segmentos hipervariables del cromosoma. El *spoligotyping* es uno de los más utilizados y explora polimorfismos en la región DR (*direct repeat*) del cromosoma de *Mtb*. Si bien su poder de diferenciación es menor, se lo suele utilizar como marcador genético complementario para confirmar la información epidemiológica. El método revela la presencia/ausencia de 43 segmentos variables interpuestos entre los segmentos repetitivos de dicha región, mediante amplificación por PCR del segmento DR e hibridización reversa con oligonucleótidos inmovilizados en una membrana [37].

Tal como hemos mencionado anteriormente, el *fingerprinting* del ADN permite detectar un foco de transmisión en una población. Un *cluster* se define como un grupo de dos o más casos con idéntico *fingerprint* y confirma la sospecha epidemiológica de transmisión directa o fuente común de infección. Diferencias mínimas en el *fingerprinting* no invalidan el origen clonal de la infección, que puede ser confirmado mediante el empleo de otro marcador genético [36]. Diversos reportes han puesto en evidencia que las

cadenas de transmisión constituyen redes complejas, ya que los casos incluidos en un mismo *cluster* suelen superar a aquellos interrelacionados epidemiológicamente [21].

Otro aporte de la genotipificación molecular fueron los análisis filogénicos y determinación de familias de cepas de *Mtb*. Basados en los patrones de *spoligotyping*, se definieron las familias EAI, Beijing, CAS, Haarlem, LAM y otras de menor tamaño. Estas familias tienen un patrón de distribución geográfico, siendo predominantes en la costa este de África e India, Asia, Medio oriente, Latinoamérica y Mediterráneo respectivamente [21]. Varios trabajos basados en distintos marcadores genéticos llegan a clasificaciones similares, las cuales serían reflejo de la historia de co-evolución del hombre y de *Mtb* (Fig. 2.1.1) [2, 3, 5, 38].

En la actualidad se cree que *Mtb* es una especie con una variabilidad genética considerable a pesar de su expansión casi exclusivamente clonal, dando lugar a cepas con diferencias en términos genéticos, epidemiológicos y clínicos [39, 40]. Estas observaciones serían relevantes en el diseño de nuevos tratamientos y vacunas [41].

### 2.2.4. MDR-TB en Argentina

Durante el año 2006 se notificaron en Argentina 11.068 casos nuevos de TB (28,4 casos por cada 100.000 habitantes). Se estima que los casos reales son muchos más, ya que se sabe por informes de la OMS que en los países en desarrollo la incidencia suele estar subestimada. Si bien la tasa de incidencia tiende ligeramente al descenso, en nuestro país la TB continúa siendo una enfermedad endémica que afecta principalmente a la población económicamente activa (70% de los casos correspondieron a personas entre 20 a 64 años de edad) [42]. La tasa de MDR-TB en nuestro país es semejante a la comunicada a nivel mundial, o sea del 5%, por lo cual se deberían calcular unos 600 pacientes con MDR-TB diagnosticados anualmente. Asimismo, nuestro país tampoco está exento de XDR-TB, de la cual se han comunicado 40 casos hasta el presente (Lic. L. Barrera, ANLIS-Malbrán).

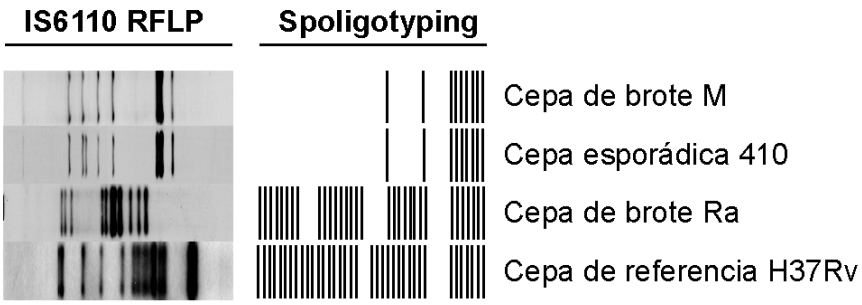



**Figura 2.2.3:** Patrones de RFLP y *spoligotyping* de las cepas M (cepa de brote de la ciudad de Buenos Aires), 410 (aparición esporádica, relacionada con la M), Ra (cepa de brote de Rosario) y H37Rv (cepa de referencia).

Fuente: Laboratorio de Micobacterias, ANLIS-Malbrán.

La técnica de RFLP IS*6110* permitió caracterizar en nuestro país las cepas involucradas en varios brotes de MDR-TB asociados a SIDA que se originaron en grandes conglomerados urbanos a principios de la década de los ´90. Entre ellas, la más conspicua es la cepa M (Fig. 2.2.3), responsable de un extenso brote iniciado en el Hospital F. J. Muñiz de la Ciudad de Buenos Aires. Aunque el brote adquirió magnitud considerable a partir de 1994, la cepa M pudo ser rastreada en 2 de los 5 pacientes con SIDA y MDR-TB internados en ese hospital en 1992 [43]. Desde entonces fueron descritas 7 variantes RFLP IS*6110* de esta cepa, y se documentó su propagación secundaria en tres grandes hospitales del Gran Buenos Aires entre 1995 y 1997 [44, 45]. Otros brotes de menor magnitud asociados a SIDA tuvieron lugar en algunos hospitales de la Ciudad de Buenos Aires (cepa C) y en el hospital Carrasco de la Ciudad de Rosario (cepas Ra, Rb, Rc) [46-48]. Distintos estudios realizados a partir de 1998 para monitorear estos brotes demostraron que varios años después de iniciar su expansión clonal, unas pocas cepas MDR de origen hospitalario se están perpetuando en nuestras grandes urbes y son responsables de uno de cada dos casos ocurridos en el país (Fig. 2.2.4a), y se cree que los casos de infección primaria son tan infecciosos y virulentos como los de TB sensible a drogas [1]. Los pacientes con SIDA atendidos sucesivamente en diferentes centros de salud acarrean la infección de un hospital a otro, y aún a provincias distantes. Si bien estos pacientes inmunodeprimidos con historia de internaciones frecuentes continúan siendo el blanco preferido de las cepas hospitalarias, la infección se está propagando alarmantemente a la población HIV negativa, incluido personal de salud (Fig. 2.2.4b). La ciudad de Buenos Aires se ha convertido en un '*hot spot*' de MDR-TB, principalmente debido a la agresiva expansión de la cepa M, que continúa siendo la más

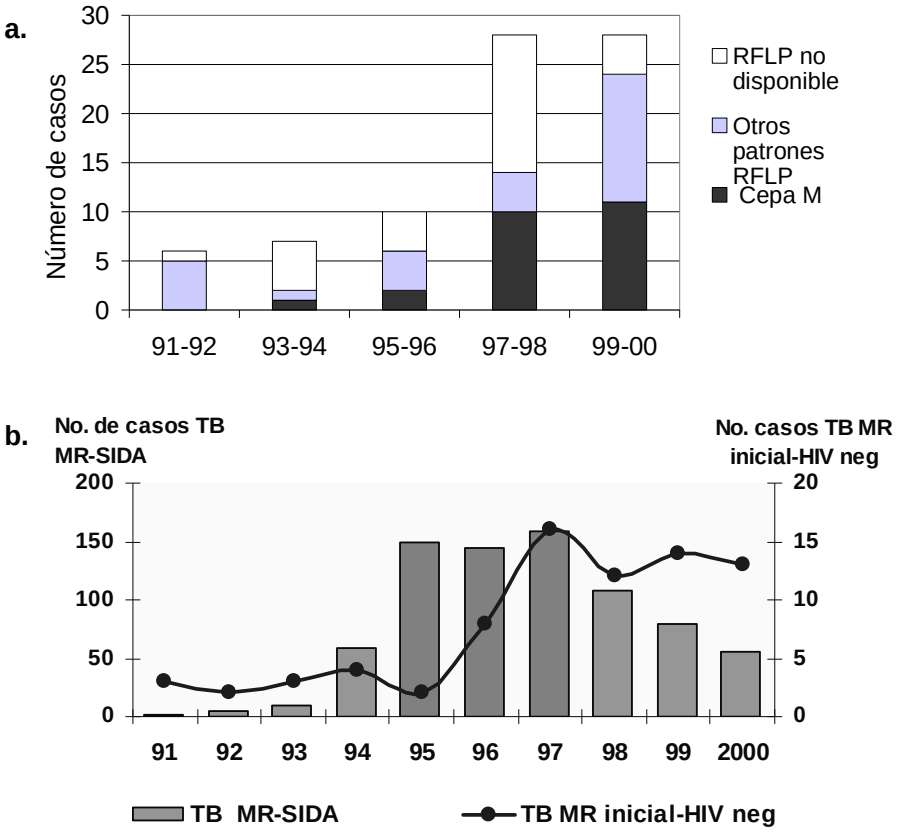



**Figura 2.2.4:** MDR-TB en Argentina. **a.** Desde su aparición a principios de los '90, la cepa M logró perpetuarse en la comunidad. **b.** La MDR-TB fue propagándose desde la población con SIDA a la población inmunocompetente.

Fuente: Servicio de Micobacterias, Instituto ANLIS-Malbrán. 2009

prevalente. La cepa M pertenece a la familia Haarlem y se caracteriza por carecer de 36 de los 43 oligonucleótidos de la región DR. Las 7 variantes de esta cepa identificadas hasta el presente presentan idéntico *spoligotipo*, lo que confirma su origen clonal. Esta composición del DR es altamente inusual y similar sólo a la de la familia Beijing. Llamativamente, la cepa MDR W, causante de un extenso brote en EEUU antes mencionado pertenece a la familia Beijing [17, 49]. Se podría especular que ciertas características genéticas de estas cepas están vinculadas a su extraordinaria habilidad para propagarse [49].

# 2.3. Inmunología de la tuberculosis

## 2.3.1. La respuesta inmune contra *M. tuberculosis*

El resultado final del encuentro de un patógeno con su huésped depende de la interacción entre el invasor y el sistema inmune que intenta combatirlo. La complejidad del ciclo de vida y los mecanismos de virulencia de *Mtb* siguen dejando grandes incógnitas. Un mayor conocimiento de la inmunología de la TB es necesario para el desarrollo racional de una vacuna eficaz, métodos diagnósticos rápidos y certeros, y tratamientos alternativos a la quimioterapia [41].

Luego de llegar al pulmón en microgotas, *Mtb* infecta a los macrófagos (MΦ) residentes en el alvéolo y probablemente a las células dendríticas (CD) intersticiales. En esta primera etapa, serían de gran importancia estos componentes innatos de la respuesta inmune, junto con las células *natural killer* (NK), los neutrófilos (PMN) y las células $\gamma\delta$T. Estos tipos celulares migran tempranamente al sitio de infección iniciando la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas (CK) y reclutando otros tipos celulares como monocitos (Mo) y linfocitos (Ly) circulantes por medio de las quemoquinas (QK).

Los MΦ y CD infectados migran a los ganglios linfáticos drenantes, en donde se produce la estimulación/diferenciación de los Ly T antígeno específicos. Por otro lado, estos fagocitos mononucleares se acumulan en el foco infeccioso dando inicio a la formación del granuloma (Fig. 2.3.1, 2.3.2). El granuloma está formado por una zona central de células infectadas rodeada por otra de células fagocíticas no infectadas y células espumosas multinucleadas, y una capa externa de linfocitos que rodean e infiltran en la zona de MΦ [50, 51]. La estructura puede ser sellada por una cápsula fibrótica, conformando una barrera física que contiene al bacilo en un ambiente con hipoxia y escasez de nutrientes. Por otro lado, este espacio delimitado favorece la interacción entre las células inmunes, siendo las CK TNF-α e IFN-γ cruciales para su formación y mantenimiento. En aproximadamente el 90% de los casos, esta estructura logra controlar la infección sin que se manifieste la enfermedad, manteniendo un fino balance entre la respuesta inmune del huésped y la replicación del patógeno. *Mtb* es capaz de permanecer dentro de los MΦ en un estado de letargo por largos períodos de tiempo [11]. Sin embargo, se cree que en cuanto la respuesta inmune del huésped cede, algunos de los

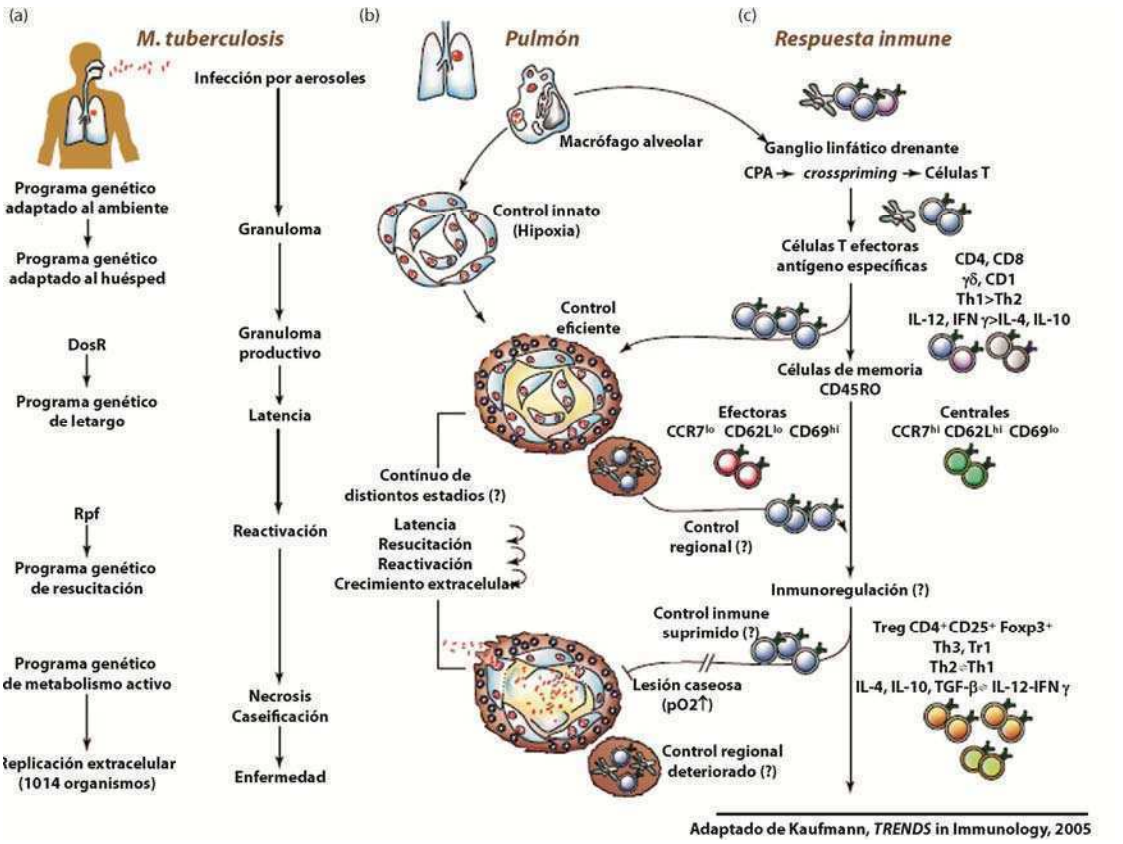



**Figura 2.3.1:** Representación esquemática de la interacción entre *Mtb* y su huésped. Las distintas etapas de la enfermedad correlacionarían con estados metabólicos específicos de la bacteria (**a**), del granuloma (**b**) y de la respuesta inmunológica (**c**).

bacilos despiertan para comenzar a replicarse (Fig. 2.3.1). Algunos de los granulomas pueden presentar necrosis en sus centros, la cual puede progresar hasta tener un aspecto caseoso; si la replicación bacteriana no es controlada, este material puede licuarse y de esta manera los granulomas caseosos pueden progresar para dar lugar a las cavidades [50]. Basados en observaciones recientes de material removido quirúrgicamente de pacientes con MDR-TB, Ulrichs *y col.* proponen que estas estructuras son un “campo de batalla abandonado” y que las interacciones huésped-patógeno se darían en la zona de infiltración linfocítica. La ausencia de *Mtb* en la zona necrótica y la presencia de material micobacteriano en la zona de infiltración apoyan esta idea [52]. *Mtb* habría desarrollado la capacidad de adaptarse a su entorno cambiante, y recientemente se ha propuesto que el regulón *DosR* controla su inactividad metabólica y replicativa. Los genes *Rpf* han sido asociados con la fase de resucitación; estas moléculas podrían despertar a los otros bacilos durmientes actuando de manera similar a las feromonas [52].

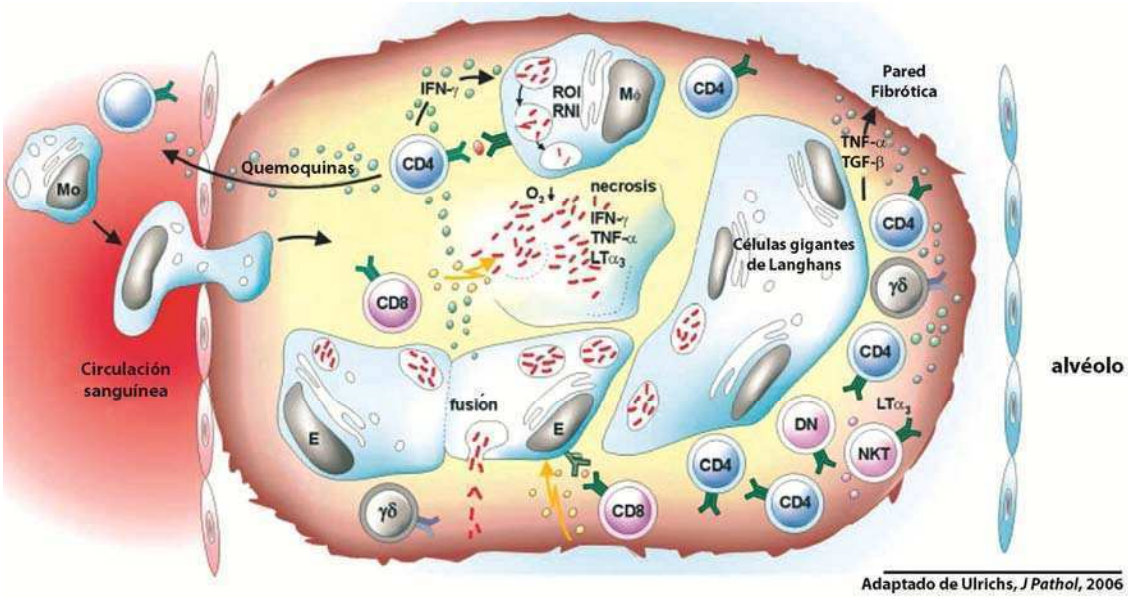



**Figura 2.3.2:** Estructura clásica del granuloma y las respuestas inmunes locales propuestas. MΦ: macrófago alveolar; E: células epiteloides; células gigantes de Langerhans (generadas a partir de la fusión de células epiteloides); Mo: monocito circulante; ROI: intermediarios reactivos del oxígeno; RNI: intermediarios reactivos del nitrógeno; LTα3: lifotoxina α3. MF, E y CGL infectados con *Mtb* forman el centro del granuloma. Presentan antígenos a los linfocitos T y los activan para que produzcan CK y QK o maten a las células infectadas y a las micobacterias intracelulares. Las QK reclutan otras células desde la sangre al sitio de infección. El IFN-γ activa a los MΦ y otras células presentadoras de antígenos para matar a las bacterias intracelulares por medio de los ROI o RNI. Los linfocitos $CD4^+$ y MΦ producen TNF-α y LTα3 los cuales son necesarios para la formación de la pared que rodea al granuloma. En el centro del granuloma, la baja presión de $O_2$ genera un ambiente hostil para *Mtb*. Las células T $CD8^+$ activadas matan a *Mtb* a través de la perforina y granulisina. Sin embargo la muerte de las células infectadas debe estar controlada para mantener la integridad del granuloma.

Los antígenos proteicos fagocitados de *Mtb* son presentados en el contexto de la molécula de histocompatibilidad (MHC)-II, las cuales estimulan a los Ly CD4. En los pacientes con SIDA, los cuales tienen una tasa de progresión a la enfermedad mucho mayor, se pone en evidencia la importancia de este subset [20]. Si bien recientemente se ha reportado que *Mtb* es capaz de salir del fagosoma al citosol [53], se cree que la presentación por MHC-I para la activación de Ly CD8 se da principalmente por la vía de la *cross*-presentación [54, 55]. El tipo de presentación y coestimulación, así como el perfil de CK secretadas al medio activan o reprimen distintos *subsets* de Ly, polarizando la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil Th1 (favorecido por IFN-γ) o Th2 (favorecido por IL-4). La respuesta protectora en la TB estaría mediada por un perfil Th1, sin embargo

recientemente se ha propuesto que los Ly Th17 también podrían ser relevantes [56]. Por otro lado, los Ly T no convencionales específicos para glicolípidos tendrían una función particular en la TB humana ya que son capaces de reconocer antígenos no proteicos presentados por las moléculas presentadoras de antígenos CD1 del grupo 1 (CD1a, CD1b y CD1c). La pared bacteriana de *Mtb* es rica en glicolípidos como el fosfatidil mioinositol (PIM), lipoarabinomanano manosilado (ManLAM), ácidos micólicos (Fig. 2.2.1) y hexosil-1-fosfoisoprenoides, los cuales podrían ser *cross*-presentados por las CD [57].

La memoria inmunológica en la TB sigue teniendo preguntas sin responder como por qué la vacuna BCG no protege contra la TB pulmonar en adultos. Más aún, la genotipificación molecular ha demostrado que pacientes con historia de tratamiento previo exitoso pueden reinfectarse, lo cual deja en evidencia que en estos casos el episodio inicial no confiere una respuesta inmune protectora [11, 21]. *Subsets* de Ly T específicos se desarrollan en el ganglio, entre ellos los T efectores ($T_{EM}$; $CCR7^{low}$, $CD62L^{low}$, $CD69^{high}$) y los de memoria central ($T_{CM}$, $CCR7^{high}$, $CD62L^{high}$, $CD69^{low}$; Fig. 2.3.1). Estos últimos que repondrían a los primeros en caso de un nuevo desafío. Sin embargo, se ha propuesto que antígenos persistentes, los cuales activan los Ly T durante períodos de tiempo prolongados, termina dejando exhausta la memoria. Este sería el caso en la TB, en donde la memoria no se generaría y la protección dependería enteramente de las células efectoras [11, 27].

En los pacientes con enfermedad severa se han detectado altos niveles de IL-4 e IL-10, lo cual podría estar asociado a la patología de la TB [58]. Estas CK podrían inhibir la respuesta Th1, polarizando el sistema hacia un perfil Th2 no protector. Más recientemente se ha asociado a los Ly T regulatorios ($T_{reg}$; $CD25^{high}$, $Foxp3^{+}$) con la inmunomodulación en este estadio, por ser fuente de IL-10 y TGF-$\beta$ (Fig. 2.3.1) [59]. La hipótesis actual propone que la respuesta inmune protectora es suprimida por mecanismos regulatorios, facilitando la reactivación. Probablemente el destino final de la infección (latencia, reactivación, enfermedad) depende del balance entre factores bacterianos y del huésped.

La complejidad de la red de interacción de estos elementos ha quedado en evidencia tanto en estudios de inmunología básica como clínica. El desarrollo de una vacuna efectiva contra la TB pulmonar en adultos es prioritario ya que la vacunación masiva es considerada la estrategia sanitaria más efectiva debido al costo y la complejidad de la quimioterapia (Sección 2.2.1). Por otro lado, se está invirtiendo gran

esfuerzo en la caracterización de marcadores biológicos (por ej. perfil de producción de CK frente a antígenos específicos) que permitan discriminar entre el individuo vacunado con BCG, el infectado en estado de latencia, el enfermo y el individuo susceptible a la recaída. Distintas vacunas candidatas ya se encuentran en las fases I a III de prueba clínica [41], pero dado el largo período de latencia de la TB, el desarrollo de marcadores biológicos precisos para monitorear la eficacia de las mismas sería de gran ayuda para acelerar las fases de evaluación. Un mayor conocimiento de la inmunología de la TB es necesario para cumplir con estas metas.

### 2.3.2. El macrófago: nicho preferido de *M. tuberculosis*

El MΦ es una célula mieloide fagocítica que cumple diversas funciones, como la eliminación de patógenos y de homeostasis tanto en invertebrados como en vertebrados [60]. Es un componente prototípico de la respuesta inmune innata, aunque también cumple un rol importante en la respuesta inmune adaptativa como célula presentadora de antígenos (CPA) profesional. Su función efectora puede ser modulada por estímulos endógenos como las CK y exógenos como los antígenos, dando lugar a distintos fenotipos [60].

Los MΦ se caracterizan por tener un gran número de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), estructuras altamente conservadas, características de los microorganismos cuya función es vital para estos [61]. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) pueden ser clasificados según su estructura en receptores tipo *Toll* (TLR), receptores tipo *scavenger*, lectinas de tipo C, receptores tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) e integrinas $\beta_2$ (Fig. 2.3.3) Cuando un MΦ reconoce al patógeno a través de estos PRR, se dispara una respuesta inflamatoria y la fagocitosis, procesamiento y presentación en superficie de los antígenos, conectando así con la respuesta inmune adaptativa. Gran parte de los mecanismos efectores de la respuesta adaptativa son nuevamente mediados por células de la respuesta inmune innata, entre ellos el MΦ. Por ejemplo, su capacidad microbicida aumenta luego de ser estimulados por el IFN-$\gamma$, generando radicales de oxígeno o nitrógeno (Fig. 2.3.2).

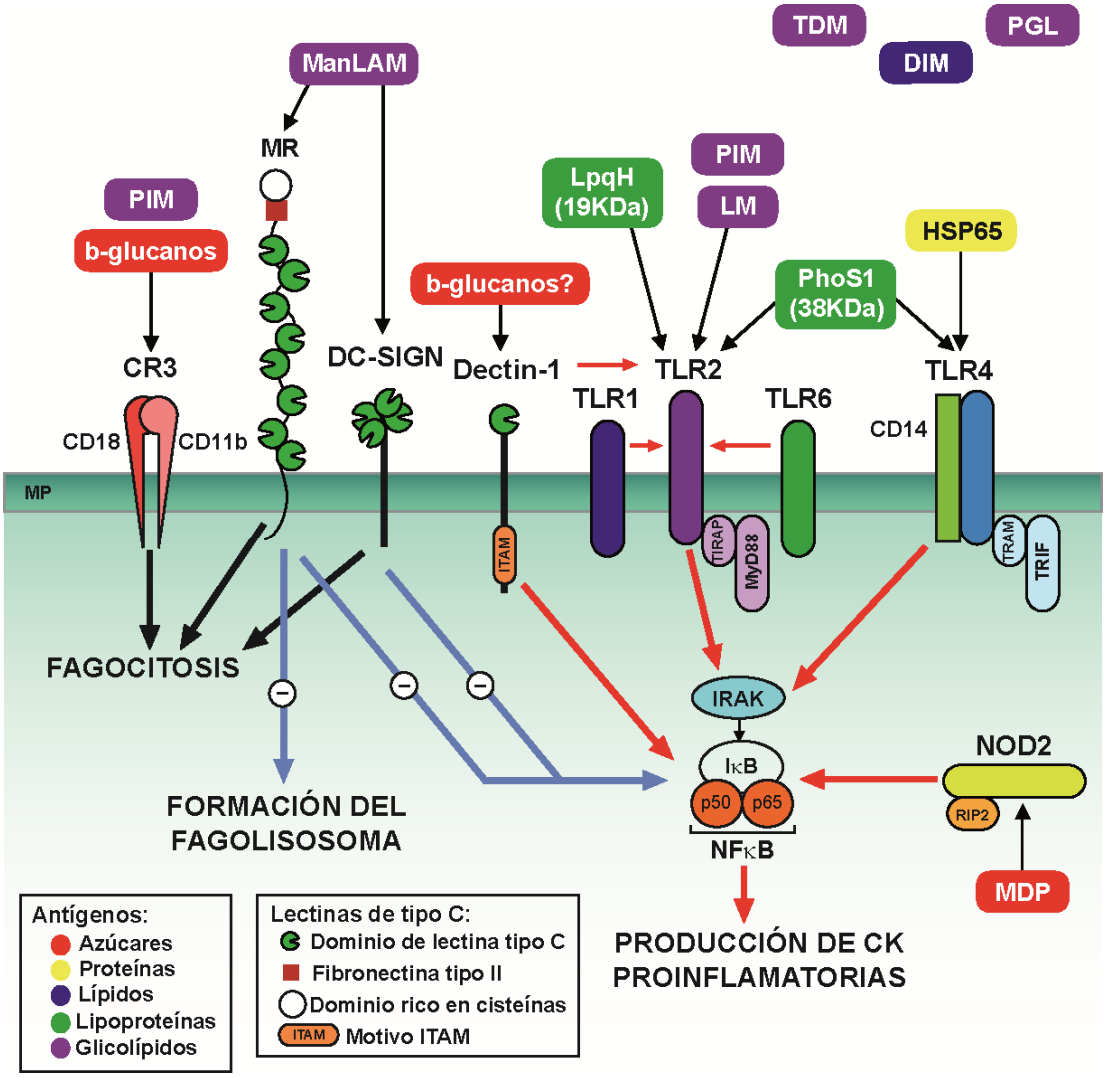



**Figura 2.3.3:** Receptores involucrados en el reconocimiento innato de *Mtb* y sus posibles ligandos. Los distintos receptores transducen señales positivas y negativas en las CPA modulando su respuesta. *Mtb* es capaz de inhibir los mecanismos efectores (función bactericida, producción de CK, presentación antigénica) interactuando con receptores como el MR y DC-SIGN. Esta característica estaría determinada en gran medida por los antígenos presentes en la superficie de *Mtb* como PIM (fosfatidil mioinositol), LM (lipomanano), ManLAM (lipoarabinomanano manosilado), MDP (muramil dipéptido) y las lipoproteínas de 19KDa y 38KDa. Otros antígenos de superficie reconocidos por el sistema inmune son TDM (trehalosa dimicolato o *cord factor*), DIM (*phtiocerol dimicoserosate*) y PGL (glicolípido fenólico). MP: membrana plasmática.

Los receptores *Toll* fueron inicialmente descriptos en el desarrollo de *Drosophila*, organismo que carece que sistema inmune adaptativo, y llamó la atención por su rol en la defensa contra una infección fúngica. Más tarde se descubrió la familia de los TLR en

mamíferos, los cuales a través de su dominio rico en leucinas de su extremo amino terminal permiten el reconocimiento de PAMP. Al unirse su ligando, los TLR inician una cascada de señalización a través del dominio *Toll-IL-1 receptor* (TIR) presente en el extremo carboxilo terminal [62]. TLR2 y TLR4 fueron inicialmente caracterizados como los receptores de reconocimiento de péptidoglicano y lipopolisacárido bacterianos respectivamente, y su estimulación induce señales de activación para la respuesta inflamatoria y antimicrobiana a través del factor de transcripción NFκB. La relevancia de estos TLR en la respuesta inmune contra *Mtb* fue demostrada en ratones *knock out* (*KO*) para estos genes [63, 64] y se han asociado polimorfismos en el gen de *TLR2* humano con la susceptibilidad a la TB [65, 66]. Numerosos antígenos de *Mtb* fueron descriptos como ligandos de TLR entre ellos el lipomanano (LM), el PIM (Fig. 2.3.3, 2.3.4) y la lipoproteína de 19KDa (también llamada LpqH) para TLR2, HSP65 para TLR4 y la glicoproteína de 38KDa (PhoS1) que interactuaría con ambos receptores [67]. La especificidad estaría dada por la cooperación con otros receptores como TLR1/TLR2, TLR6/TLR2 y CD14/TLR4 (Fig. 2.3.3). La señalización a través de estos receptores suele culminar en la producción de CK proinflamatorias necesarias para una respuesta protectora [68, 69], aunque se ha propuesto que la proteína secretoria ESAT-6 de *Mtb* es capaz de interactuar con TLR2 induciendo una señal inhibitoria [70].

La familia de PRR citoplasmáticos NOD, estructuralmente relacionados con los TLR, pueden iniciar cascadas de señalización que culminan en la producción de IL-1β o la activación de NFκB. Si bien los ratones NOD2$^{-/-}$ no son más susceptibles a la infección por *Mtb*, se observó *in vitro* que MΦ y CD de estos animales tienen menor capacidad de producir CK proinflamatorias y óxido nítrico [71] lo cual sugiere que podría ser una vía redundante. NOD2 reconoce al MDP (muramil dipéptido), el producto de degradación del péptidoglicano [72] (Fig. 2.3.3).

Las lectinas de tipo C son receptores especializados en el reconocimiento de carbohidratos de manera $Ca^{2+}$-dependiente. Tres miembros de esta familia han sido asociados con el reconocimiento de *Mtb*: el receptor de manosa (MR), DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin*) y Dectin-1. El MR se expresa en MΦ y CD, y tendría un rol en la homeostasis de glicoproteínas séricas [73]. La fagocitosis de *Mtb* por los MΦ a través del MR es inhibe la producción de IL-12 [74] y la fusión del fagolisosoma [75] lo cual podría constituir un mecanismo de escape. DC-SIGN es el principal receptor que media la entrada de *Mtb* en CD [76], y ha sido descripto que la

señalización a través de este receptor induce la producción de IL-10 e inhibe la maduración de las CD [77]. Si bien inicialmente DC-SIGN se describió como un receptor específico de CD, se ha demostrado que su expresión se encuentra aumentada en MΦ alveolares de pacientes con TB [78]. Tanto DC-SIGN como MR reconocen el ManLAM en la pared de *Mtb* por las manosas terminales (Fig. 2.3.4), y se ha propuesto que esta

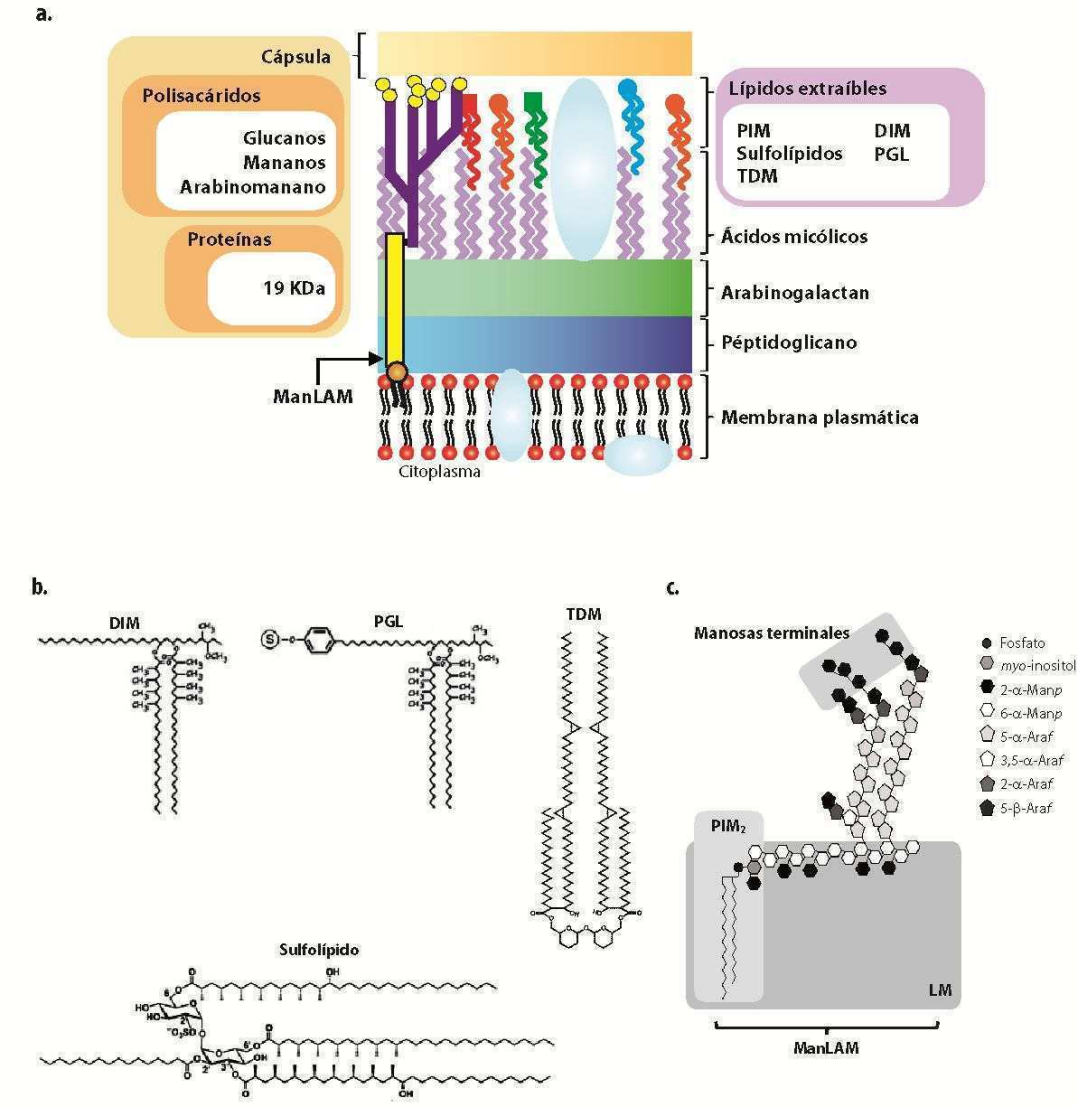



**Figura 2.3.4:** Representación esquemática de la pared bacteriana de *Mtb* y sus componentes. **a.** La membrana plasmática de *Mtb* está rodeada por una gruesa pared bacteriana cuyo componente estructural se forma a partir de la unión covalente del péptidoglicano con el arabinogalactano y los ácidos micólicos. Estos a su vez están rodeados por otros lípidos mediante uniones hidrofóbicas. La estructura más externa es la cápsula, formada de polisacáridos y proteínas. **b.** Estructuras químicas de los lípidos extraíbles de la pared de *Mtb*. A todos ellos se les ha atribuido un rol en la respuesta inmune frente a *Mtb*. **c.** Estructura del ManLAM. Sus precursores, el LM y los PIM (los cuales se clasifican según el número de manosas unidas) también forman parte de la pared. Ara: arabinosa; Man: manosa.

estructura imitaría a la de ligandos endógenos [79] induciendo una respuesta antiinflamatoria favorable al patógeno [69]. La ausencia de estas manosas terminales en los LAM de micobacterias no patógenas como *M. smegmatis* o *M. chelonae* refuerzan esta hipótesis [80]. Más aún, como hemos mencionado antes, tanto el LM como los PIM inducen una respuesta inflamatoria en el MΦ. Dectin-1 ha sido asociado con una respuesta protectora en infecciones por hongos, y se diferencia de las lectinas de tipo C descriptas por poseer un motivo ITAM activador en su porción intracitoplasmática [81]. Las micobacterias no patógenas inducen señales proinflamatorias a través de Dectin-1, el cual podría colaborar con el TLR2 [82], y también se ha observado que este receptor media la producción de IL12p40 en CD de bazo [83].

Si bien el MΦ es capaz de eliminar a muchos microorganismos que fagocita, *Mtb* posee distintos mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Luego de ser fagocitado, principalmente a través del CR3 (CD11b/CD18) y el MR, *Mtb* es capaz de detener la maduración del fagosoma en un estadio temprano, evitando la fusión con el lisosoma y la acidificación [57]. De esta manera, *Mtb* puede persistir y replicarse dentro del MΦ.

Por otro lado, el MΦ activado es un productor temprano de CK inflamatorias, como el TNF-α, IL-1β e IL-6, así como de IL-12. El TNF-α es una CK crucial para la formación y el mantenimiento del granuloma, ya que induce la producción de QK en los MΦ para reclutar las células inmunes al sitio de inflamación [84] (Fig. 2.3.2). IL-12 es producida por MΦ y CD y promueve la diferenciación de los Ly CD4 en células Th1 [57]. Cepas virulentas de *Mtb* serían capaces de interferir con la producción de estas citoquinas [85, 86].

Parte de esta capacidad de manipular la respuesta inmune es atribuida al ManLAM de la pared de *Mtb* [69, 87, 88] aunque se han descripto muchos otros factores de virulencia [89, 90].

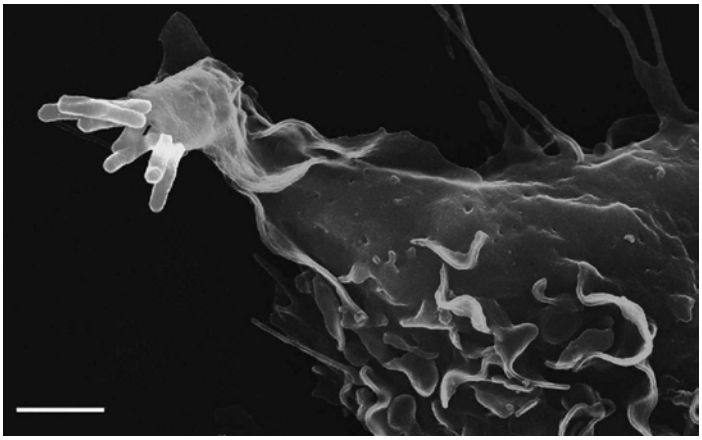


**Figura 2.3.5:** Al llegar al pulmón, *Mtb* se une al macrófago por el TLR2. Barra de escala: 2µm. Fuente: Kaufmann, *Nature*, 2008.

## 2.3.3. La apoptosis y su inhibición como mecanismo de escape

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que resulta en cambios morfológicos en la célula como reducción del tamaño celular, condensación de núcleo, fragmentación de la cromatina, exposición de la fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos. Dichos cuerpos están compuestos por organelas fuertemente compactadas y envueltas por una membrana plasmática intacta que evita la liberación de material intracelular al medio [91]. La apoptosis cumple un rol fundamental en el desarrollo y la homeostasis de los metazoos, y se considera que es una muerte controlada que no genera inflamación. Cuando la muerte celular ocurre por algún tipo de trauma o injuria se denomina necrosis, la cual inicia una respuesta inflamatoria que llevará a la reparación del daño.

Se han descripto numerosos ejemplos de manipulación de la apoptosis de las células del hospedador por microorganismos patógenos, destruyendo a los ejecutores de la respuesta inmune como en el caso de *Shigella* y *Salmonella* o preservando su nicho como hacen algunos virus [92]. La inhibición de la apoptosis por patógenos bacterianos ha sido descripta más recientemente en los géneros *Neisseria* y *Chlamydia* [91, 93], así como en *Mtb* [94, 95].

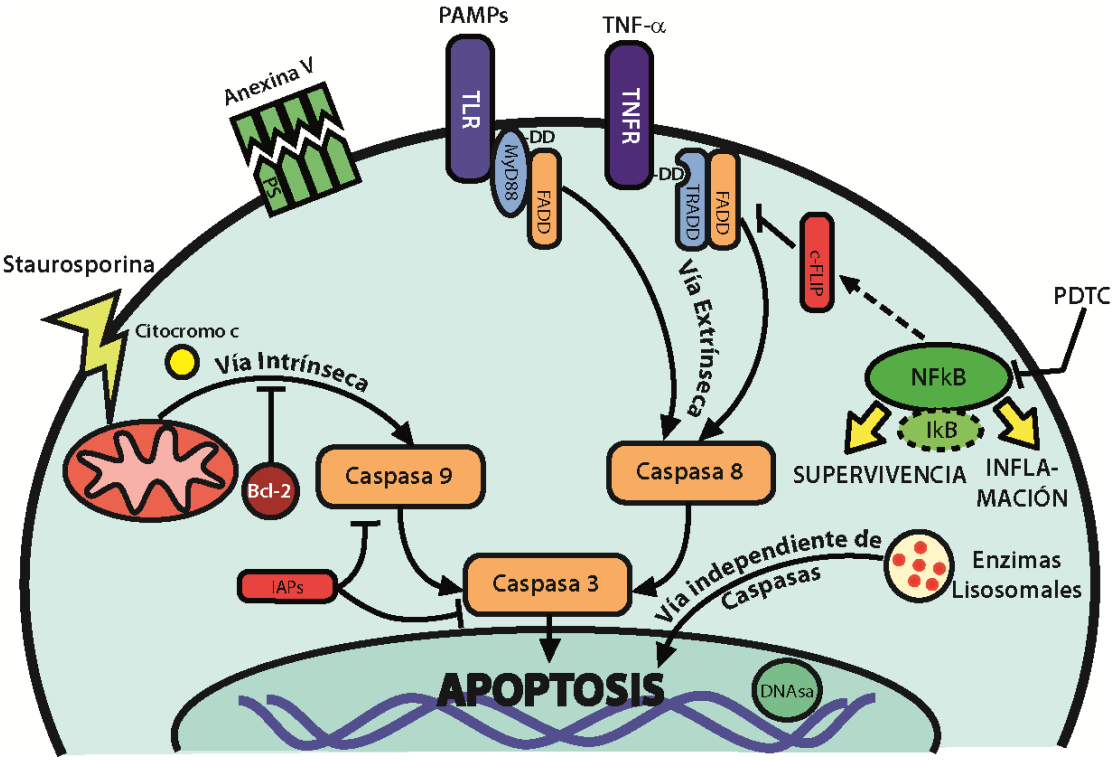



**Figura 2.3.6:** Representación esquemática de las vías de señalización de la apoptosis. Además de las vías extrínseca e intrínseca, *Mtb* es capaz de inducir una vía no clásica independiente de caspasas. PS: fosfatidil serina. TLR: receptor tipo *Toll*. PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos. TNFR: receptor de TNF-α. PDTC: *pyrrolidine dithiocarbamate.*

Existen dos vías principales de inducción de la apoptosis: la vía extrínseca o de los receptores de muerte y la intrínseca o mitocondrial (Fig. 2.3.6). La vía extrínseca se inicia con la unión de su ligando a algún receptor de superficie de la familia de los receptores de muerte como el receptor de TNF-α (TNFR), Fas o TRAIL [96]. Estos receptores poseen un dominio de muerte (DD) capaz de reclutar moléculas adaptadoras como el FADD que llevan a la activación de la caspasa 8. Las caspasas son cisteín proteasas que regulan la cascada proteolítica característica de la apoptosis. El complejo formado por FADD y la caspasa 8 activada se denomina DISC (*death-inducing signalling complex*), una gran plataforma de señalización la cual puede ser inhibida por la molécula cFLIP [96]. En la vía intrínseca juegan un papel central las moléculas de la familia Bcl-2 (*B-cell leukemia-2*), cuyos miembros proapoptóticos Bid, Bad y Bax alteran la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial permitiendo la liberación al citoplasma del citocromo c. Esta vía puede ser inducida por daño en el ADN por agentes químicos o irradiación, estrés

oxidativo o falta de factores de crecimiento. El citocromo c se una a la molécula APAF-1 formando junto con la caspasa 9 un complejo heptamérico conocido como apoptosoma. Ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3, una de las caspasas efectoras que a su vez activa las distintas enzimas encargadas del desmantelamiento celular, como la ADNasa (Figura 2.3.6). También se sabe que la caspasa 8 es capaz de clivar a Bid a su forma activa, amplificando la señal apoptótica [96].

La manipulación de la muerte celular por *Mtb* ha llamado la atención de los investigadores en la última década por varios motivos. En la actualidad se cree que, por lo menos cuando los MΦ son infectados con una baja cantidad de bacilos, *Mtb* es capaz de inhibir la muerte de su célula huésped preferida [94, 95]. Esta característica sería exclusiva de los miembros patogénicos de este género, ya que tanto *M. smegmatis*, *M. kansasii* y *M. bovis* BCG como la cepa atenuada de *Mtb* H37Ra son potentes inductores de apoptosis, lo cual hace sospechar de un rol en la virulencia [94]. Por otro lado, se ha descripto que la muerte por apoptosis, pero no por necrosis, tendría características micobactericidas [97, 98] aunque se desconoce por qué mecanismo [95]. Los cuerpos apoptóticos exponen en su superficie marcadores específicos para su fagocitosis. Experimentos *in vitro* sugieren que existe una ventana de tiempo en la cual la viabilidad de los bacilos dentro de los MΦ infectados y muertos por apoptosis puede ser reducida por MΦ frescos agregados posteriormente, probablemente porque de esta manera *Mtb* perdería su capacidad de inhibir la fusión del lisosoma [99]. Además, los cuerpos apoptóticos podrían ser fagocitados por CD, las cuales estimularían la respuesta adaptativa activando los Ly CD8 específicos por el mecanismo de presentación cruzada [54, 55]. Todo esto indicaría que la apoptosis de los MΦ sería un beneficio para el huésped y perjudicial para *Mtb*.

La capacidad de inhibir la apoptosis estaría genéticamente codificada y los genes *nuoG*, *secA2* y *pknE* han sido asociados con esta característica de *Mtb*, ya que su transfección en micobacterias no patogénicas redujo la inducción de muerte por estas [94]. Uno de los mecanismos propuestos estaría mediado por la acción autócrina del TNF-α y los bacilos no patogénicos como la cepa avirulenta H37Ra volverían susceptible al MΦ a este estímulo, al cual es naturalmente resistente [100]. Más aún, *Mtb* podría inducir resistencia a la muerte por otros estímulos proapoptóticos como el FasL [101] mediada en parte por la *up*-regulación de cFLIP [102]. También se ha descripto que *Mtb*

es capaz de interferir con la vía intrínseca de la apoptosis, induciendo la expresión de los genes antiapoptóticos *bcl-2*, *mcl*-1 y *A1* [94].

Resumiendo, el resultado final de la infección del MΦ dependería de un balance entre señales pro y antiapoptóticas, el cual podría variar con el genotipo de *Mtb* y el tipo celular utilizado en cada modelo experimental [94].

Además de las vías clásicas, se han descripto formas no convencionales de muerte inducidas por *Mtb*. Lee y col. proponen que cuando la multiplicidad de infección (MOI) es alta (alrededor de 20 bacilos por MΦ) *Mtb* es capaz de inducir un tipo de muerte celular independiente de caspasas, que tendría características fenotípicas similares a la apoptosis como la exposición de la PS en la cara externa de la membrana plasmática y condensación nuclear, pero con mínima fragmentación del núcleo y ADN. Estas células progresarían rápidamente a la necrosis secundaria. Los autores proponen que *Mtb* utilizaría este mecanismo para liberarse del MΦ y volver al medio extracelular para infectar al próximo hospedador [99].

Por otro lado, se ha descripto que los TLR también podrían ser iniciadoras de la vía extrínseca de muerte programada [103]. La molécula adaptadora prototípica de esta vía, MyD88, tendría un motivo DD y las lipoproteínas de 19 KDa y 38KDa de *Mtb* han sido asociadas con la apoptosis iniciada por TLR2 [104, 105].

Si bien se ha reportado la presencia de MΦ apoptóticos en los lavados broncoalveolares de pacientes con TB [106, 107], se desconoce la relación entre estas observaciones y la inducción de apoptosis *in vitro* antes mencionada.

# 2.4. OBJETIVOS

## 2.4.1. Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis fue caracterizar la respuesta inmune innata inducida por dos cepas locales de *Mtb* multirresistentes a drogas que presentan epidemiológicamente diferencias muy marcadas. Para ello se seleccionaron dos aislados clínicos pertenecientes a la familia Haarlem: el aislamiento 6548 (cepa M) con el típico patrón de RFLP del brote descripto en la Sección 2.2.3, y el 410 con una única banda de diferencia con M (Fig. 2.2.3) que fue aislada solamente en dos pacientes en más una década, por lo cual se la considera una cepa no próspera (baja virulencia).

## 2.4.2. Objetivos específicos

**1.** Caracterizar la población monocito-macrofágica en pacientes con MDR. Para ello se caracterizaron los *subsets* de monocitos en función de los marcadores CD14/CD16 y se determinó la capacidad de los mismos de expresar citoquinas de fase aguda y tardía en respuesta a las cepas M y 410, y como control la cepa H37Rv. Paralelamente en macrófagos diferenciados a partir de monocitos se evaluó la expresión de citoquinas y marcadores de superficie (receptores innatos, CD86 y MHC clase I y II). Se trató de correlacionar estos datos con parámetros clínicos y con el genotipo de *Mtb* infectante.

**2.** Investigar si las diferencias en la virulencia podrían deberse a mecanismos de evasión de la respuesta inmune de la célula huésped, el macrófago. Para ello se evaluó el crecimiento intracelular, mecanismos de muerte del macrófago y posibles vías involucradas.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1. Pacientes

Los pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar (S-TB) sensible a drogas fueron identificados en el Servicio de Tisioneumonología del Hospital Francisco J. Muñiz de Buenos Aires entre los años 2005 y 2009. Se obtuvo el consentimiento escrito de los pacientes según lo establecido por los Comités de Ética del Hospital F. J. Muñiz y de la Academia Nacional de Medicina. Los pacientes fueron sometidos a exámenes clínico, epidemiológico y de laboratorio como hemograma, electrolitos, serodiagnóstico para HIV y radiografía de tórax. El criterio de exclusión involucró positividad para HIV y presencia de infecciones concomitantes. Un total de 39 pacientes S-TB fueron incluidos en este estudio. Los pacientes S-TB fueron clasificados de acuerdo al examen radiológico en leves-moderadas (n=13), avanzadas (n=16) y miliares (n=2). El diagnóstico de TB incluyó identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes por tinción positiva con el colorante Ziehl-Neelsen en el examen de baciloscopía de esputo directa (BAARD+ en 34/38) y/o en cultivo en medio Lowenstein-Jensen. Por otro lado se les realizó la prueba cutánea de tuberculina o PPD que fue positiva en 50% de los pacientes. Los pacientes recibieron durante los primeros seis meses el tratamiento antituberculoso estándar que consiste en: isoniazida (INH: 5 mg/kg/día, hasta 300 mg/día), rifampicina (RMP: 10 mg/kg/día, hasta 600 mg/día), etambutol (EMB: 20-25 mg/kg/día) y pirazinamida (PZA: 25 mg/kg/día, hasta 2000 mg/día) y estreptomicina (15mg/kg/día, hasta 1 g/día).

En caso de fracaso terapéutico y/o epidemiología positiva, los pacientes fueron considerados casos de tuberculosis resistente a drogas, lo cual fue confirmado realizando un cultivo de la muestra de esputo en sistema BACTEC para determinar la sensibilidad o resistencia a las drogas de primera línea incluidos en el tratamiento convencional. Por otro lado se realizaron en el Servicio de Micobacterias del instituto ANLIS-Malbrán estudios genéticos de las cepas de *Mtb* aisladas por el método de RFLP IS6110 para determinar si se trata de un caso aislado o perteneciente a un *cluster*. Los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes estudiados se resumen en la tabla 4.1.

## 3.2. Obtención de células mononucleares (PBMC)

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron aisladas por medio de centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (30 min a 1550 rpm, 4℃) a partir de muestras heparinizadas de pacientes. También se utilizaron las capas leucocitarias (*buffy coats*) remanentes de la preparación de concentrados de glóbulos rojos por gradiente de centrifugación para transfusión. Los *buffy coats* fueron desplaquetizados mediante dos lavados con solución fisiológica (SF) a baja velocidad (10 min a 1000 rpm, 4℃) y luego se aislaron las PBMC como se describió más arriba. El halo de PBMC fue lavado 2 veces consecutivas en SF y resuspendido en medio de cultivo RPMI 1640 (HyClone, UT, USA) conteniendo penicilina/estreptomicina (100 U/ml) y suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (10% v/v) (Gibco/Natocor; medio completo). La viabilidad celular fue analizada por exclusión del colorante Trypan-Blue y la pureza y concentración fue estimada empleando el colorante de Turk. Para los ensayos de proliferación celular se aislaron los PBMC de voluntarios sanos positivos para la prueba de tuberculina (PPD). No se conocía la respuesta a PPD de los dadores de *buffy coats*.

## 3.3. Obtención de macrófagos derivados de monocitos

Para obtener macrófagos derivados de monocitos (MΦ), las PBMC fueron resuspendidas en medio RPMI sin suero con 2 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, NJ, USA) a una densidad de $10x10^6$ células/ml y luego incubadas durante 2 hs a 37ºC en placas de 12, 24 o 96 *wells* según el experimento. Las células no adherentes fueron removidas por lavado con solución fisiológica tibia. El rendimiento fue de entre 5 y 10% de los PBMC plaqueados. Los monocitos adheridos fueron diferenciados durante 5-7 días en medio completo con 1 ng/ml de GM-CSF. La viabilidad y la pureza de los cultivos fueron confirmadas por Trypan-Blue y citometría de flujo.

## 3.4. Antígenos y cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Los aislados clínicos MDR 6548 (cepa M) y 410, así como la cepa de referencia H37Rv fueron crecidos en medio Lowenstein-Jensen durante 15 días (fase logarítmica). Las bacterias fueron disgregadas mediante agitación en *vortex* y luego fueron alicuotadas

a la concentración de uso y conservadas a -20℃ hasta su uso. Por otro lado, se prepararon inóculos inactivados por calor (121℃ 30 min) o γ-irradiadas (2.4 megaRads, CNEA). La inactivación fue confirmada cultivando las bacterias tratadas en medio sólido por 60 días.

El antígeno PPD se obtuvo del Staten Seruminstitut (Copenhagen, Dinamarca) y la cepa vacunal de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) fue cedida por la Lic. Claudia Argüelles (Servicio Derivados de Micobacterias, ANLIS-Malbrán). Los bacilos de BCG viables fueron alicuotados y conservados a -70℃ hasta su utilización.

En todos los casos, los inóculos fueron ajustados a $1OD_{600nm}$ con SF ($\approx 10^8$ bacterias/ml).

## 3.5. Cultivos celulares y tratamientos

### 3.5.1. Estimulación in vitro de PBMC

PBMC aisladas de dadores sanos, pacientes TB y MDR fueron resuspendidas en medio completo ($1 \times 10^6$ células/ml) y cultivadas en tubos de polipropileno Falcon 2063 (Becton Dickinson, Lincoln, NJ) durante 5 o 18-24h a 37º en atmósfera humidificada con 5% de $CO_2$ en presencia o ausencia de las distintas cepas de *Mtb* (relación PBMC:bacteria=1:2).

### 3.5.2. Estimulación *in vitro* de MΦ

Los MΦ diferenciados entre 5 y 7 días en placas de cultivo fueron estimulados con las distintas cepas de *Mtb* o con BCG. Las relaciones de MΦ a bacteria variaron según el experimento, entre 1:2 y 1:50.

En los experimentos de inducción de apoptosis (Sección 4.3.5) se utilizaron como agentes inductores la staurosporina (1µM; Sigma, MO, USA) y TNF-α humano recombinante (rhTNF-α). Además se utilizó la droga *ammonium pyrrolidinedithiocarbamate* (PDTC; 50 µM; Sigma;) un inhibidor de la activación del factor de transcripción NFκB [108].

Los MΦ fueron despegados por incubación a 4℃ durante 20 minutos y *scrapping* para su posterior uso.

## 3.6. Determinación de moléculas de superficie

La expresión de moléculas de superficie en monocitos de sangre periférica (SP) recientemente aislados se determinó por citometría de flujo. Para ello, 0,5-1x$10^6$ PBMC fueron incubadas 30 min a 4℃ con los anticuerpos monoclonales (m Ab) conjugados con fluorocromos (Tabla 3.1). Las células marcadas fueron analizadas en un citómetro FACScan (Becton Dickinson) adquiriendo 10,000-20,000 eventos específicos. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando los programas Cell Quest (BD) y FCS Express (De novo software, Los Angeles, CA). Las regiones de análisis (*gates*) correspondientes a monocitos (Mo) fueron circunscriptas de acuerdo a tamaño y complejidad celular (parámetros FSC y SSC respectivamente) y también por la expresión del marcador CD14 en su superficie.

Los MΦ fueron identificados de manera similar, por FSC-H/SSC-H y expresión de CD 14. La diferenciación de monocito a macrófago fue confirmada por la adquisición del receptor de manosa (MR; datos no mostrados).

**Tabla 3.1. mAb utilizados en marcación de superficie**

| Clon | Especificidad | Fluorocromo | Proveedor | Población de análisis |
|---|---|---|---|---|
| MφP9 | CD14 | PerCP | BD | Mo/MΦ |
| 19.2 | MR (CD206) | FITC | | |
| LN3 | HLA-DR | PE | eBioscience | |
| 3G8 | CD16 | FITC | BD | Mo |
| TL2.1 | TLR2 | FITC | eBioscience | MΦ |
| HTA125 | TLR4 | PE | | |
| IT2.2 | CD86 | PE-Cy5 | | |
| W6/32 | HLA-abc | FITC | | |
| GIR-94 | IFNR | PE | BD | |
| 259931 | Dectin-1 | PE | R&D | |
| 2H10 | TNFR1 | PE | Caltag | |
| 4D1B10 | TNFR2 | PE | | |
| K5-1B8 | CD1b | PE | Ancell | |
| 5E2 | Fas | PE | | |

# 3.7. Determinación de moléculas citoplasmáticas

## 3.7.1. Bcl-2, caspasa 3

Luego de tratarlos con las distintas cepas de *Mtb* (relación 1:20), 0,5x$10^6$ MΦ fueron marcadas superficialmente por inmunofluorescencia directa para identificar esta población. Luego fueron fijadas con paraformaldehido (PFA) al 0.5% en buffer fosfato salino (PBS) durante 15 min a temperatura ambiente (T°amb) y en oscuridad, lavadas y permeabilizadas con 500µl de Perm2 (BD) 10 min a T°amb. Luego las células fueron lavadas con PBS 1% SFB y resuspendidas en este mismo buffer, e incubadas 30min a T°amb en presencia del mAb anti-Bcl-2 o Caspasa-3 activa (Tabla 3.2). Finalmente, las células fueron resuspendidas en Isoflow™ (BD) y analizadas por citometría de flujo.

## 3.7.2. Citoquinas (CK)

Para determinar CK intracitoplasmáticas 1x$10^6$ PBMC/ml o 0.5x$10^6$ MΦ/1,5ml fueron cultivadas en presencia o ausencia de las distintas cepas de *Mtb* por 5 o 18/24h. A fin de bloquear la secreción celular dependiente del aparato de Golgi se agregó al cultivo Brefeldina A (5µg/ml, Sigma) durante las últimas 4-6h de incubación. Posteriormente, las células fueron marcadas superficialmente, fijadas, permeabilizadas y marcadas intracelularmente como se describió en la Sección 3.8.1.

**Tabla 3.2. mAb utilizados en marcación intracelular**

| Clon | Especificidad | Fluorocromo | Proveedor | Población de análisis |
|---|---|---|---|---|
| B27 | IFN-γ | FITC | Caltag | Mo/MΦ |
| JES3-9D7 | IL-10 | FITC | | |
| C8.6 | IL12 p40/p70 | PE | eBioscience | |
| MAb11 | TNF-α | FITC | | |
| CRM56 | IL-1β | PE/FITC | | |
| 100 | Bcl-2 | PE | Ancell | MΦ |
| C92-605 | Caspasa-3 | FITC | BD | |

## 3.8. Determinación de CK secretadas

La secreción de CK por los MΦ (TNF-α, IL-10, IL12p70) determinada confirmada por la técnica de ELISA siguiendo las especificaciones del fabricante (Ready-SET-Go!, eBioscience). Los sobrenadantes de $1x10^6$ MΦ/ml estimuladas o no con las distintas cepas de *Mtb* durante 5 o 18h fueron analizados en duplicado y en dos diluciones distintas según la citoquina (1/1 y 1/2 o 1/10). La sensibilidad del ensayo fue de 4,7 pg/ml para la IL-10 y de 7,8 pg/ml para TNF-α e IL-12.

## 3.9. Determinación de Apoptosis/Necrosis

### 3.9.1. Exposición en superficie de la fosfatidilserina

La apoptosis se determinó por la unión específica de la proteína Anexina V conjugada con FITC a la fosfatidilserina (PS), la cual se expone en la cara externa de las células apoptóticas tempranas, utilizando un kit comercial (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma-Aldrich, EEUU). Para ello, al cabo de la incubación (5-24h) con distintas relaciones MΦ:bacteria, las células fueron resuspendidas en 150µl de *binding buffer* en presencia de 5µl de AV y se incubaron 20 min a Tºamb y luego se agregaron 5µl de ioduro de propidio (IP). La muestra fue adquirida inmediatamente en citómetro de flujo. Los datos se expresaron como porcentaje de MΦ $AV^+IP^-$ (apoptóticas tempranas) o $IP^+$ (necróticas/apoptóticas tardías; Figura 3.1). Para los tratamientos combinados con drogas (Sección 4.3.5.b, c, d), se siguió el mismo protocolo luego de cada esquema de incubación.

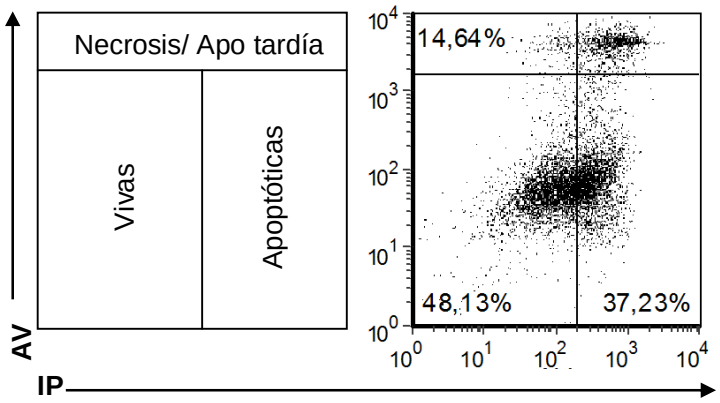



**Figura 3.1: Interpretación del ensayo de Anexina V- IP.** Las células viables tienen la PS en la cara interna de la membrana celular que se encuentra intacta, por lo que son $AV^-IP^-$. Cuando entran en apoptosis, la PS se expone en la superficie pero la integridad de membrana se mantiene ($AV^+IP^-$). Si la muerte celular fue necrótica o el proceso apoptótico avanza, la membrana plásmática se hace permeable al IP.

### 3.9.2. Pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

La pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) fue determinado con el colorante $DIOC_6(3)$ (Invitrogen, EEUU), el cual marca con alta intensidad las células cuyas mitocondrias se encuentran intactas. Cuando se induce la pérdida del $\Delta\Psi_m$, baja la intensidad de la marca (Fig. 4.3.11). Los MΦ estimulados fueron resuspendidos en 200 µl de una solución 2nM de $DIOC_6(3)$ en PBS. Luego de 15 minutos de incubación a 37℃, los MΦ fueron lavados con PBS y se agregó IP para discriminar las células necróticas. La muestra fue adquirida inmediatamente en citómetro de flujo.

## 3.10. Infección de MΦ con cepas viables de *Mtb*

Todos los ensayos con bacilos viables, así como su cultivo se realizaron en el Servicio de Micobacterias del Instituto ANLIS-Malbrán bajo estrictas normas de bioseguridad.

### 3.10.1. Recuento de UFC

Con el fin de evaluar la capacidad de replicación intracelular de las distintas cepas de *Mtb*, se diferenciaron MΦ en placas de 96 *wells* de fondo plano (entre 50.000 y 200.000 MΦ/*well*) en medio RPMI con 10% de SFB sin antibióticos. Los MΦ fueron infectados por triplicado durante cuatro horas con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 con las cepas H37Rv, M y 410. Transcurrido este tiempo, los MΦ fueron lavados tres veces con SF a 37℃. Este punto fue considerado el tiempo cero. A las placas para la determinación de crecimiento intracelular a los 2, 5 y 9 días se les agregó 150µl de medio completo sin antibióticos por pocillo y se incubaron en estufa a 37°C con 5% de $CO_2$. En cada tiempo post-infección (0, 2, 5 y 9) se retiraron los sobrenadantes para la determinación de CK liberadas al medio y se realizó un lavado con SF a 37℃ con el fin de eliminar las bacterias extracelulares. Luego se agregó 100µl de SF a cada pocillo y se incubó 10 minutos a 4°C para despegar los MΦ, los cuales fueron centrifugados a 1500 RPM por 10 minutos y resuspendidos en un volumen de 50µl. De esta suspensión se dispensaron 20 µl en una nueva placa y se les agregaron 50µl de solución de lisis (0.067% SDS en Middlebrook 7H9/OADC; BD) y 50µl de PBS con 20% de BSA a cada pocillo. Se realizaron cuatro diluciones al décimo del lisado y se sembraron 10µl de cada dilución en placas con medio 7H10/OADC, las cuales fueron incubadas a 5% $CO_2$ a 37℃

entre 2 y 5 semanas hasta que las colonias de *Mtb* fueron visibles para ser contadas. Los resultados se expresan como UFC por ml de lisado de MΦ infectados.

### 3.10.2. Tinción ácido alcohol resistente

Del mismo ensayo anterior, 10µl de cada suspensión de MΦ infectados con las cepas M, 410 y H37Rv para los 0, 2 y 5 días post-infección fueron dispensados en un portaobjetos que contenía 10µl de BSA al 0,2% con el fin de favorecer el pegado de los MΦ al vidrio. La eficiencia de la infección y la carga bacilar por MΦ fue determinada en preparados coloreados con la tinción ácido alcohol resistente o tinción de Ziehl-Neelsen. Brevemente, primero se aplicó la fucsina-fenicada durante 5 min, calentado 3 veces hasta la emisión de vapores. El colorante fue lavado con agua corriente fría antes de realizar la decoloración con alcohol-ácido durante 3 min. Luego de otro lavado con agua corriente fría se realizó la decoloración con alcohol-ácido durante 30 segundos. Después de otro lavado con agua se realizó la coloración de contraste utilizando el azul de metileno durante 1 min. Una vez secos los preparados, estos fueron analizados en un microscopio óptico con objetivo de de inmersión de 100x de aumento. Se determinó el porcentaje de infección y la carga bacilar contando entre 40 y 50 MΦ por duplicado para cada muestra.

## 3.11. Proliferación celular

$2x10^5$ PBMC/*well* fueron cultivados por triplicado en placas de 96 *wells* de fondo plano durante 6 días en presencia o ausencia de las diferentes cepas a distintas relaciones PBMC:*Mtb*. En el día 5, se agregó 0.5 µCi/*well* de $^3$H-timidina, y la radioactividad incorporada al ADN fue medida en un contador de centelleo β como cuentas por minuto (cpm) detectadas. Como control se utilizó PPD (10µg/ml). Los resultados fueron expresados como índice de estimulación (IE=cpm tratado/cpm control).

## 3.12. Análisis Estadístico

### 3.12.1. Estadística descriptiva

Los datos clínicos y personales de los pacientes fueron ingresados rutinariamente en una base de datos. Las determinaciones de estadística descriptiva (media, mediana,

intervalo de confianza, etc.) fueron realizadas alternativamente con los programas Excel (Microsoft) y Prism (GraphPad Software Inc.).

### 3.12.2. Inferencia Estadística

Los resultados experimentales y las determinaciones realizadas *ex vivo* sobre las muestras de PBMC y MΦ fueron comparadas estadísticamente empleando la prueba de Wilcoxon para los análisis pareados no paramétricos y la prueba Mann-Whitney (no pareada, no paramétrica) para muestras provenientes de distintos individuos. En todos los casos anteriores utilizamos el software Prism. Los valores de $p<0.05$ se asumieron como estadísticamente significativos.

# 4. RESULTADOS

# 4. RESULTADOS

## 4.1. Caracterización de la línea monocito-macrofágica en pacientes y dadores sanos

Debido a su reproducción clonal, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) fue considerada por mucho tiempo como una especie altamente conservada. Sin embargo, se sabe en la actualidad que existe un grado de variabilidad importante, probablemente relacionado con diferencias en los factores de virulencia y antígenos reconocidos por el huésped. En el presente trabajo nos propusimos caracterizar la respuesta inducida por las cepas M (MDR próspera, familia Haarlem, resistente a HRZES) y 410 (MDR no próspera, familia Haarlem, resistente a HRZES) estrechamente relacionadas por su genotipo pero con diferencias en la virulencia. Se utilizó como control la cepa de laboratorio H37Rv (cepa de referencia, familia Tuscany, pansensible a drogas).

Siendo la serie monocito-macrofágica la población blanco del *Mtb*, y teniendo en cuenta que ante la infección con *Mtb* los monocitos (Mo) circulantes son una de las primeras células mononucleares en arribar al foco inflamatorio, en primer lugar evaluamos dicha población en pacientes con tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB). Como controles se emplearon muestras de pacientes con tuberculosis sensible a drogas (S-TB) e individuos sanos vacunados con BCG (N).

### 4.1.1. Caracterización de los pacientes MDR-TB

En el presente trabajo fueron incluidos un total de 34 pacientes con TB resistente a drogas diagnosticados en el Hospital Muñiz de la Ciudad de Buenos Aires entre los años 2006 y 2009, la mayoría de ellos con compromiso pulmonar severo (Tabla 4.1.1). 29 de estos casos fueron confirmados como MDR-TB según su antibiograma, y se detectó un caso de XDR-TB (resistente a H, R, E, S, etionamida, PAS, kanamicina, capreomicina y ofloxacina). Más del 80% de los casos fueron resistentes a 3 o más drogas. Si bien predominaron los pacientes con historia de abandono de tratamiento, aproximadamente en un tercio de los pacientes estudiados no existieron antecedentes previos de TB, por lo

**Tabla 4.1: Caracterización de los pacientes MDR-TB**

| **Parámetro** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Género** | 21 F | 13 M | Total: 34 | |
| **Edad** | 32±2 (18-56)[1] | | | |
| **GB/mm3** | 8127±544 (5500-13300) [1] | | | |
| **Tiempo de negativización (días)** | 141±33 (25-730) [1] | | | |
| **Rx tórax** | 28 CC (93%)<br>9 unilateral<br>19 bilateral | | 2 SC (7%)<br>1 unilateral<br>1 bilateral | |
| **Tipo de RD** | Adquirida: 21 (64%) | | Primaria: 12 (36%) | |
| **Resistencia** | 29 MDR-TB | 4 Poli-DR | 1 XDR-TB | |
| **N° de resistencias** | 5,0±0,4 (2-9) [1] | | | |
| **Familia** | Haarlem: 10<br>*Cluster* M: 6 | LAM: 12 | T: 2 | Orphan:1 |

[1]Media±ES (Rango). F: femenino; M: masculino; Rx: radiografía; CC: con cavidades; SC: sin cavidades; RD: resistencia a drogas; MDR-TB: tuberculosis multirresistente a drogas; Poli-DR: tuberculosis causada por *Mtb* resistente a drogas distintas a rifampicina e isoniazida; XDR-TB: tuberculosis extremadamente resistente a drogas (Sección 2.2.1); LAM: linaje Latino Americano-Europeo; T: linaje Tuscany

tanto fueron considerados como MDR primarios por contagio directo. Se dispuso de la genotipificación por RFLP en 25 de los casos estudiados, los cuales correspondieron en su mayoría a las familias Haarlem (40%) y LAM (48%). 6 de los aislados fueron clasificados dentro de la familia M según su patrón de bandas. La negativización del esputo (ausencia de BAAR) es un parámetro que indica una evolución favorable frente al tratamiento. En la gran mayoría de los casos de S-TB, el esputo se negativiza al final de la fase inicial, es decir a los dos meses de tratamiento [109]. El promedio del tiempo de negativización del esputo en los pacientes con resistencia a drogas fue cercano a los 5 meses, aunque la evolución fue muy variable. El tiempo de negativización no correlacionó con la historia de abandono del tratamiento ni el número de resistencias (datos no mostrados). Los dos casos de MDR-TB por cepas de la familia Tuscany respondieron rápidamente al tratamiento de segunda línea (esputo negativo a los 31 y 59 días respectivamente), aunque esta tendencia deberá ser confirmada con una mayor casuística.

## 4.1.2. Caracterización de *subsets* de monocitos circulantes

Los Mo circulantes constituyen una población heterogénea en cuanto a fenotipo y función. En el humano, el *subset* mayoritario (80~90% en dadores sanos) se caracteriza por la alta expresión de CD14 y la ausencia del receptor FcγR-III (CD16) en la superficie, una alta actividad fagocítica y menor producción de citoquinas (CK)[110]. El resto de los Mo se caracterizan por ser $CD14^{+}CD16^{+}$ y fueron inicialmente llamados inflamatorios debido a su capacidad de producir TNF-α e IL-1β en respuesta al LPS. Se ha reportado el aumento de este *subset* en la sangre periférica durante distintos procesos inflamatorios, incluida la tuberculosis [111-116].

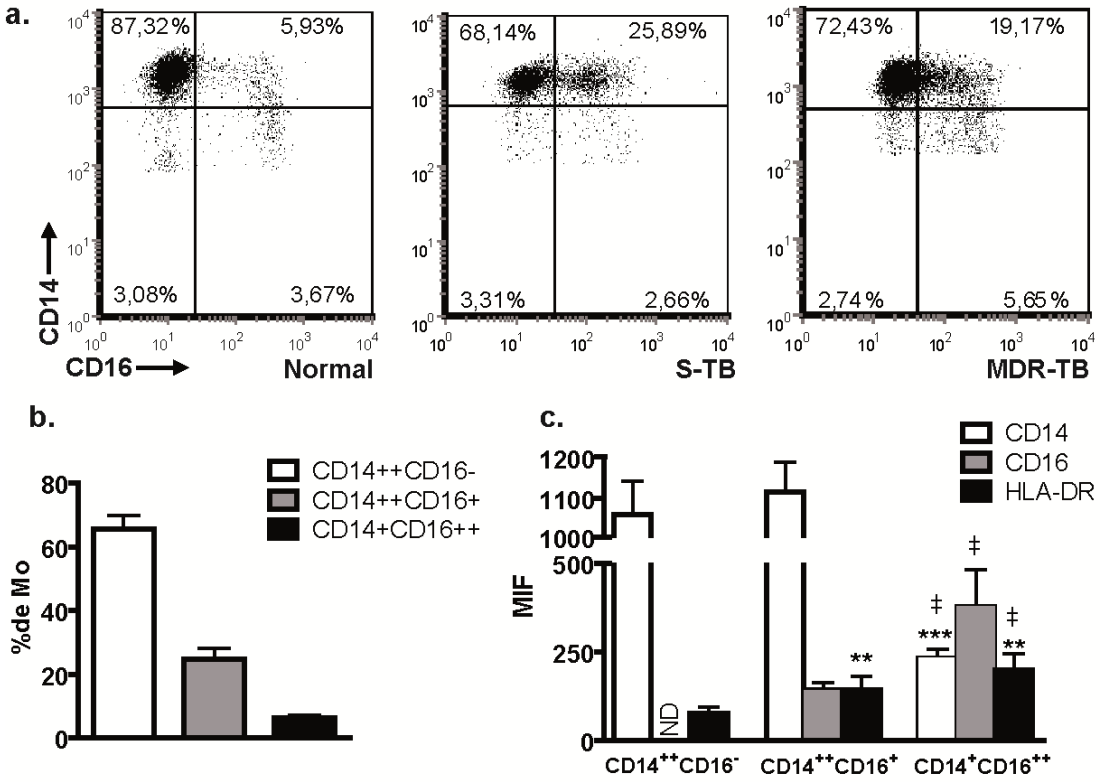



**Figura 4.1.1: Caracterización ex vivo de los monocitos (Mo) circulantes en pacientes MDR-TB en función de la expresión de CD16. a.** *Dot plots* representativos de un dador sano, un paciente S-TB y un MDR-TB (*Gate* de Mo). Los Mo fueron clasificados en $CD14^{++}CD16^{-}$, $CD14^{++}CD16^{+}$ y $CD14^{+}CD16^{++}$ de acuerdo a los niveles de expresión de estos marcadores. **b.** Porcentajes de cada *subset* en los pacientes MDR-TB. **c.** Mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) para los marcadores CD14, CD16 y HLA-DR en las tres subpoblaciones de Mo de pacientes MDR-TB. Diferencias estadísticas: $CD14^{++}CD16^{+}/CD14^{+}$ $CD16^{++}$ vs. $CD14^{++}CD16^{-}$: **p<0.01, ***p<0,005. $CD14^{++}CD16^{+}$ vs. $CD14^{+}$ $CD16^{++}$: ‡p<0,01. ND: no determinado. n=20

Para caracterizar estas subpoblaciones realizamos una marcación de superficie y análisis por citometría de flujo con Mo frescos de muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes MDR-TB, S-TB y dadores normales (N; Figura 4.1.1). Observamos que los pacientes MDR-TB tienen aumentado el *subset* $CD14^+CD16^+$ de manera similar a los S-TB (Fig. 4.1.1a; Media±SEM. N: 12,8±1,3%; S-TB: 23,7±2.0; MDR: 23,84±2,8, N vs. S-TB/MDR-TB: p<0,001. n=20). En los pacientes MDR-TB se pudo identificar un pequeño porcentaje (6,2±0,8%) de Mo $CD16^+$ con bajos niveles de CD14 (Fig. 4.2.4a, b) cuyo fenotipo coincide con lo descripto en bibliografía (alta expresión de CD16 y HLA-DR; Figura 4.1.1c) [117].

**◈ La población de Mo circulantes en pacientes con MDR-TB y S-TB es semejante, y está constituida por un alto porcentaje de Mo inflamatorios $CD14^+CD16^+$.**

## 4.1.3. Producción de citoquinas intracelulares por monocitos

Los Mo son células de la respuesta inmune innata con una gran variedad de receptores de superficie para el reconocimiento directo de patógenos, y en respuesta a ellos producen distintas CK de fase aguda como TNFα e IL-1β y tardías como IL-12, IFNγ e IL-10. Habiendo determinado que ambos grupos de pacientes presentan aumentada la población de Mo inflamatorios, nos propusimos caracterizar el patrón de producción de estas CK en los Mo de pacientes y dadores sanos.

El TNF-α es una CK de producción temprana con un rol central tanto en la respuesta protectora en la TB como en la formación del granuloma (Sección 2.3.1). Para determinar la expresión de TNF-α, las PBMC fueron incubadas con las cepas H37Rv, M y 410 inactivadas por calor durante 5 y 18 horas, con la adición durante las últimas 4 h de Brefeldina A, y determinándose posteriormente la expresión por citometría de flujo. En la Figura 4.1.2 se observa el patrón de producción intracelular de esta CK a las 5 y 18 h de incubación con las distintas cepas en dadores sanos, S-TB y MDR-TB. La expresión de TNF-α fue dependiente tanto de la cepa de *Mtb* como del grupo evaluado, sin embargo, el pico de expresión se observó a las 5 h post-estimulación en los tres grupos, decayendo a las 18 h en N y S-TB independientemente de la cepa empleada (Fig. 4.1.2a-c). En los MDR-TB solamente se observó este perfil para H37Rv (Fig. 4.1.2c).

En la Fig. 4.1.2d se resumen las significancias de las pruebas realizadas para evaluar la diferencia de expresión de TNF-α según la cepa (prueba pareada de Wilcoxon) y el dador (prueba de Mann Whitney). A las 5 h post-estimulación, la expresión de TNF-α inducida por H37Rv en los pacientes tanto sensibles a drogas como MDR, fue menor que en los dadores sanos (Fig. 4.1.2d, panel derecho). No se observaron diferencias significativas en la expresión espontánea de esta CK entre los grupos. H37Rv indujo una

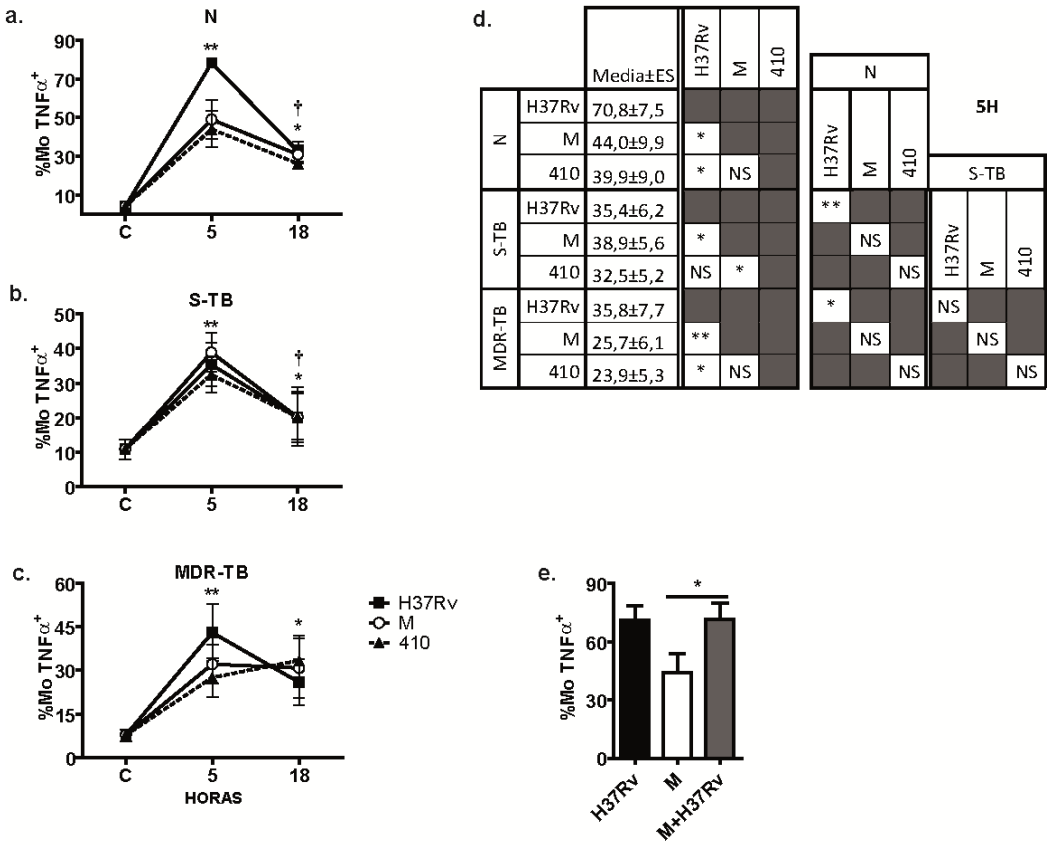
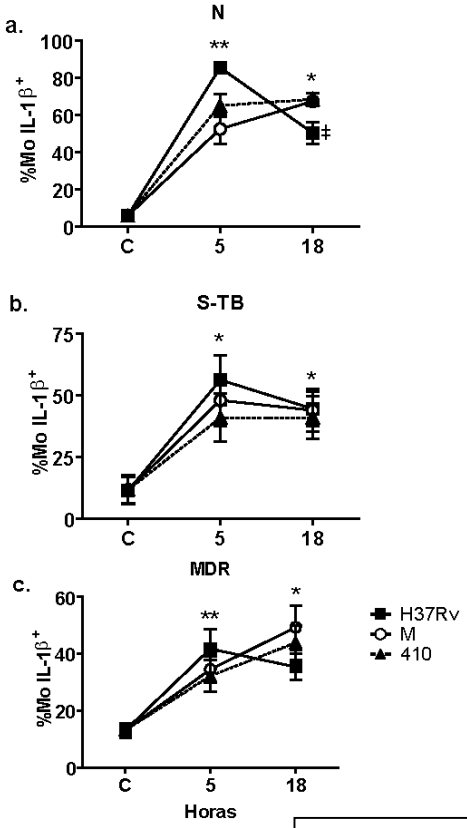



**Figura 4.1.2: La expresión de TNF-α inducida por *Mtb* en Mo depende de la cepa empleada y del dador.** Monocitos (Mo) de sangre periférica de 8 dadores sanos (N; **a**), 10 pacientes S-TB (**b**) y 12 MDR-TB (**c**) fueron cultivados durante 5 y 18 horas solos (C) o con la cepa de laboratorio H37Rv y las cepas MDR M y 410 en una relación de 1 PBMC:2 *Mtb.* Se determinó la expresión intracitoplasmática de TNF-α por citometría de flujo en el *gate* de Mo. Los resultados se expresan como media ± ES. Para simplificar las figuras solo se ha graficado el control de 5 horas ya que no hay diferencia con C de 18 horas. Diferencias estadísticas: Mo control (C) vs estimulados durante 5h: **p<0,01; C vs 18h: *p<0,05. La expresión decae a las 18h en N y S-TB (5h vs 18h: †p<0,05). **d.** Resumen de las significancias estadísticas para las diferencias entre cepas (prueba pareada de Wilcoxon, panel izquierdo) y entre grupos (prueba de Mann Whitney, panel derecho) a las 5h de estimulación. No se observaron diferencias a las 18 h. **e.** La preincubación con la cepa M no inhibe la producción de TNF-α inducida por H37Rv en Mo de N. *p<0,05.

mayor producción de TNF-α que M y 410 en N y MDR-TB (Fig. 4.1.2d, panel izquierdo). No se observaron diferencias entre cepas a las 18 h post-estimulación (Fig. 4.1.2a-c). Estos resultados sugieren que los Mo de pacientes con TB, independientemente de que estén infectados con una cepa resistente o sensible a drogas, producen menos TNF-α en respuesta a las cepas evaluadas, y especialmente M y 410 son pobres inductoras de dicha CK.




d.

| | | Media±ES | H37Rv | M | 410 |
|---|---|---|---|---|---|
| N | H37Rv | 81,3±4,9 | | | |
| | M | 50,1±7,5 | ** | | |
| | 410 | 60,8±6,9 | ** | NS | |
| S-TB | H37Rv | 56,2±10,0 | | | |
| | M | 48,0±10,6 | * | | |
| | 410 | 40,9±9,7 | * | NS | |
| MDR-TB | H37Rv | 41,7±7,0 | | | |
| | M | 34,5±4,8 | NS | | |
| | 410 | 32,2±5,7 | NS | NS | |

5H

| | N H37Rv | N M | N 410 | S-TB H37Rv | S-TB M | S-TB 410 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| N H37Rv | | | | | | |
| N M | | | | | | |
| N 410 | | | | | | |
| S-TB H37Rv | * | | | | | |
| S-TB M | | NS | | | | |
| S-TB 410 | | | NS | | | |
| MDR-TB H37Rv | * | | | NS | | |
| MDR-TB M | | NS | | | NS | |
| MDR-TB 410 | | | * | | | NS |

| | | Media±ES | H37Rv | M | 410 |
|---|---|---|---|---|---|
| N | H37Rv | 55,4±7,5 | | | |
| | M | 68,23±4,9 | * | | |
| | 410 | 67,7±6,8 | * | NS | |
| S-TB | H37Rv | 44,5± 7,1 | | | |
| | M | 43,9±8,6 | NS | | |
| | 410 | 40,9±8,6 | NS | NS | |
| MDR-TB | H37Rv | 34,9±5,6 | | | |
| | M | 52,5±9,4 | * | | |
| | 410 | 48,2±8,1 | * | NS | |

18H

| | N H37Rv | N M | N 410 | S-TB H37Rv | S-TB M | S-TB 410 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| N H37Rv | | | | | | |
| N M | | | | | | |
| N 410 | | | | | | |
| S-TB H37Rv | NS | | | | | |
| S-TB M | | * | | | | |
| S-TB 410 | | | * | | | |
| MDR-TB H37Rv | * | | | NS | | |
| MDR-TB M | | NS | | | NS | |
| MDR-TB 410 | | | NS | | | NS |

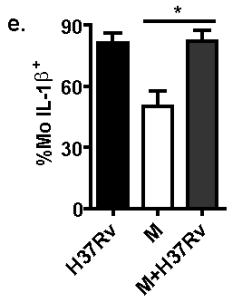



**Figura 4.1.3: Expresión diferencial de IL-1β inducida por H37Rv, M y 410 en pacientes con TB y dadores sanos. E**xpresión intracitoplasmática de IL-1β en Mo control (C) y estimulados 5 y 18 horas con las cepas H37Rv, M y 410 en 10 dadores sanos (**a**), 10 pacientes S-TB (**b**) y 10 MDR-TB (**c**) (relación 1 PBMC:2 *Mtb)*. C vs 5h/18h: *p<0,05, **p<0,01. La expresión decae a la 18h en N estimulados con H37Rv (**a**, ‡ p<0,01), mientras que la máxima inducción con la cepa M se logró a las 18h (**c**, 5h vs 18h: † p<0,05). **d**. Resumen de las diferencias estadísticas entre cepas (prueba pareada de Wilcoxon, panel izquierdo) y entre grupos a las 5h y 18h de estimulación (prueba de Mann Whitney, panel derecho). En resumen, la cinética de inducción de IL-1β con las cepas M y 410 es diferente a la observada con H37Rv. **e.** La preincubación de los Mo con la cepa M no previene la inducción de IL-1β por H37Rv.

En función de lo observado, nos preguntamos si la baja expresión de TNF-α inducida por M se debería a un mecanismo inhibitorio empleado por esta cepa. Para responder esta pregunta, preincubamos los Mo con la cepa M durante 30 min y luego agregamos H37Rv al mismo cultivo, hasta completar las 5 h de incubación (M+H37Rv, Fig. 4.1.2e). Se observó que los niveles de expresión de TNF-α inducidos por M se revertían por la posterior incubación con H37Rv en los tres grupos, sugiriendo que la cepa M tendría *per se* una menor capacidad de inducir la expresión de esta CK.

IL-1β es otra CK proinflamatoria de producción aguda que, a diferencia del TNF-α, debe ser procesada en el citoplasma por la enzima caspasa-1 para pasar a su forma activa. Este proceso está regulado por un complejo multiproteico llamado inflamasoma [118]. Empleando el mismo sistema de estimulación que para TNF-α, observamos que la expresión de IL-1β también varió según el huésped y la cepa utilizada, y el máximo de producción se observó a las 5 h en dadores normales y S-TB (Fig. 4.1.4a, b). Llamativamente, en los N el porcentaje de Mo-IL-1β$^{+}$ inducido por M y 410 se mantuvo constante a las 18 h mientras que disminuyó significativamente para H37Rv (Fig. 4.1.4a). Por el contrario, en los MDR-TB la cepa M indujo la máxima expresión a las 18h (Fig. 4.1.4c, d).

Más aún, siguiendo un esquema de preincubación similar al utilizado para el TNF-α, observamos que la cepa M tampoco fue capaz de inhibir la producción de IL-1β inducida por H37Rv en los tres grupos (Fig. 4.1.4e). Independientemente de la cepa evaluada, los pacientes S-TB y MDR-TB presentaron menor porcentaje de Mo-IL-1β$^{+}$ que los dadores sanos a 5 h de estimulación (Fig. 4.1.4d, panel derecho).

- **Si bien los pacientes con TB tienen aumentado en circulación el *subset* de Mo inflamatorios, éstos tienen disminuida su capacidad para producir TNF-α e IL-1β por estimulación con *Mtb*.**

- **Ambas cepas MDR son pobres inductoras de TNF-α, y tienen una cinética de inducción de la expresión de IL-1β más retardada que H37Rv.**

A continuación se estudiaron otras CK de producción tardía. En la Figura 4.1.4a se grafica la inducción de IL-12 en Mo estimulados por 18h con las cepas H37Rv, M y 410.

Tanto en los dadores sanos como en los pacientes MDR-TB, la cepa que indujo mayor IL-12 fue 410. Esta diferencia no se observó en los S-TB. El IFN-γ es la CK característica de una respuesta Th1, siendo su principal fuente los linfocitos T y las células NK. Sin embargo, se ha descripto más recientemente que las células mieloides como los macrófagos (MΦ), células dendríticas (CD) y los Mo también pueden producirla [119]. La producción de IFN-γ por Mo no varió con la cepa utilizada, pero sí dependió del dador: el porcentaje de Mo IFN-$\gamma^+$ fue mayor en los pacientes (Fig. 4.1.4b). Asimismo, la inducción de IL-10, CK antiinflamatoria, tampoco dependió de la cepa, y fue mayor en los pacientes S-TB pero no en los MDR (Fig. 4.1.4c).

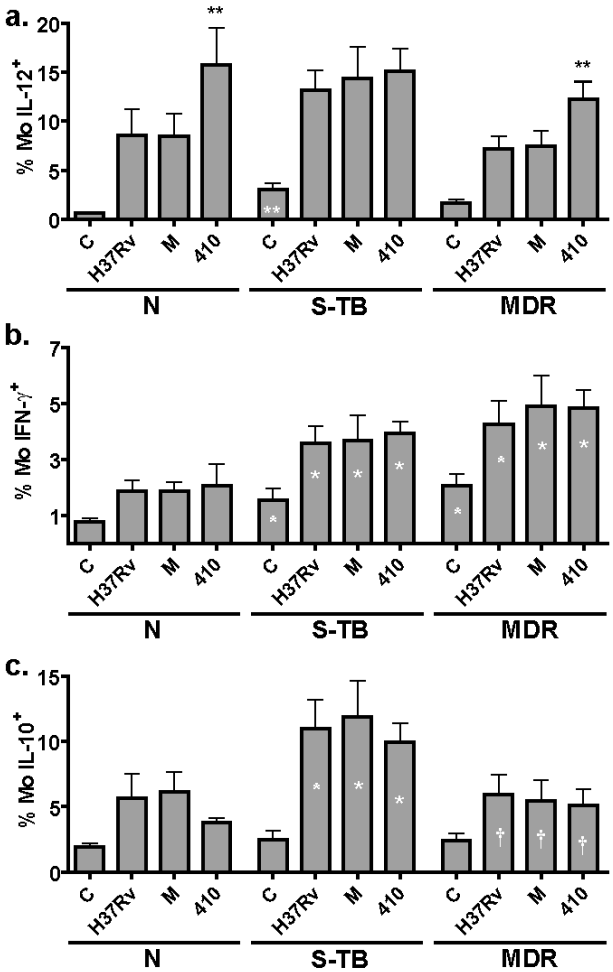



**Figura 4.1.4: La cepa 410 induce mayor expresión de IL-12, mientras que la expresión IFN-γ e IL-10 depende del dador.** Expresión intracitoplasmática de IL-12 (**a**), IFN-γ (**b**) e IL-10 (**c**) en Mo a las 18 h de estimulación con las cepas H37Rv, M y 410. Relación 1 PBMC:2 *Mtb*. N y S-TB: n=8; MDR-TB: n=12. **a.** Las cepas indujeron la expresión de IL-12 en los tres grupos (C vs H37Rv/M/410: p<0,01), pero en N y MDR-TB la respuesta fue mayor con la cepa 410 (**p<0,01). La expresión basal de IL-12 fue mayor en los S-TB (dentro de la barra: **p<0,01). **b.** Las cepas estudiadas indujeron niveles semejantes de IFN-γ en Mo de S-TB y MDR-TB (C vs. H37Rv/M/410: p<0,05 para todos los grupos). Tanto la expresión espontánea como la inducida fue mayor en los pacientes (dentro de las barras, N vs. TB/MDR-TB: *p<0,05). **c.** No se observaron diferencias en la inducción de IL-10 entre cepas (C vs H37Rv/M/410: p<0,05), pero la respuesta fue mayor en los S-TB (dentro de las barras, N vs. TB: *p<0,05; TB vs. MDR-TB: †p<0,05).

- **Las diferencias en la producción de CK de fase tardía dependerían de la cepa y del *status* inmunológico del huésped.**

- **La cepa 410 es una fuerte inductora de IL-12 en Mo de dadores sanos, en cambio, la expresión de IFN-γ e IL-10 es más dependiente del dador que de la cepa.**

## 4.1.4. Análisis de correlación con datos clínicos

Tal como mencionamos anteriormente, los Mo circulantes que expresan el CD16$^+$ han sido denominados inflamatorios por su capacidad de producir TNF-α al ser estimulados con ligandos de TLR2 y TLR4 [120]. Por lo tanto evaluamos si el incremento en la población de Mo inflamatorios correlacionaba con la producción de esta CK, clasificando a los pacientes en dos grupos según la mediana del %Mo-CD16$^+$ en los grupos estudiados (20%). Como se observa en la Figura 4.1.5a, tanto los pacientes con %Mo-CD16$^+$ menor o igual a 20% como aquellos con más del 20% produjeron niveles semejantes de expresión de TNF-α en respuesta a H37Rv. Sin embargo, la expresión de IL-1β fue significativamente menor en aquellos pacientes con un alto %Mo-CD16$^+$ tanto en pacientes S-TB como MDR-TB (Fig. 4.1.5b). No se hallaron diferencias en la expresión de IL-12, IL-10 ni IFN-γ (datos no mostrados).

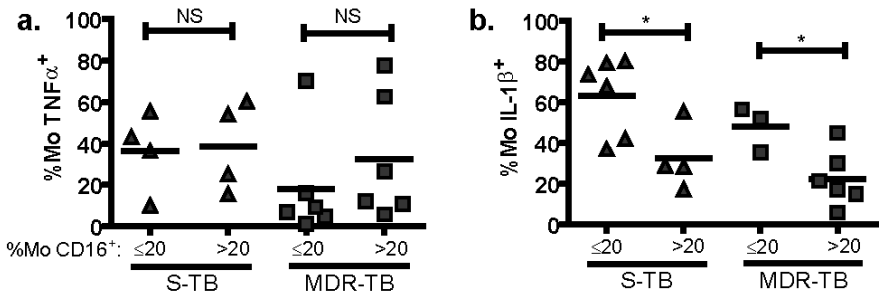



**Figura 4.1.5: Los pacientes con mayor porcentaje de Mo-CD16$^+$ circulantes expresan menos IL-1β.** Expresión de de CK proinflamatorias inducidas por H37Rv en pacientes S- y MDR-TB clasificados según el porcentaje de Mo-CD16$^+$ a las 0h. Se tomó como valor de corte la mediana del porcentaje de Mo-CD16$^+$ (20% de los Mo totales). **a.** No se observan diferencias significativas en la expresión de TNF-α. **b.** La expresión de IL-1β fue menor en los pacientes con más del 20% de Mo-CD16$^+$ (*p<0,05).

Nos preguntamos si los datos clínicos y epidemiológicos de pacientes MDR-TB podrían asociarse con algunos de los parámetros determinados en los Mo. Para ello, realizamos un análisis retrospectivo según las historias clínicas de cada paciente estudiado. En primer lugar, evaluamos si la respuesta favorable al tratamiento podría estar asociado con el %Mo-CD16$^+$ o la expresión de CK proinflamatorias en respuesta a la cepa de laboratorio H37Rv (Fig. 4.1.6). Los pacientes MDR-TB fueron clasificados de acuerdo al tiempo de negativización del esputo, tomando como valor de corte los 60 días, puesto que es el tiempo que con el tratamiento de primera línea negativiza el esputo en la mayoría de los S-TB. Como se puede observar en la Figura 4.1.6c, los Mo de los pacientes MDR-TB que respondieron al tratamiento dentro de los primeros dos meses fueron los que más IL-1β expresaron. No se observaron diferencias en el %Mo-CD16$^+$ o expresión de TNF-α.

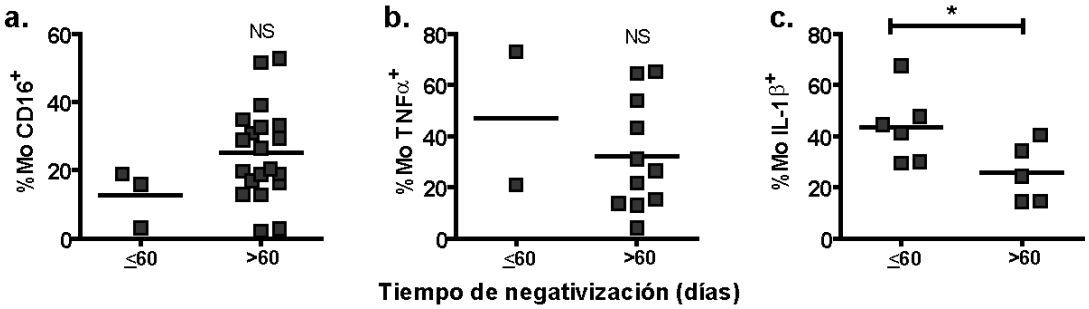



**Figura 4.1.6: La mayor expresión de IL-1β correlaciona con un menor tiempo de negativización del esputo.** Porcentaje de Mo-CD16$^+$ y expresión de CK proinflamatorias inducidas por H37Rv en pacientes MDR-TB clasificados según el tiempo de negativización del esputo. Se tomó como valor de corte al lapso de 60 días, tiempo en el que negativizan los pacientes S-TB que responden favorablemente al tratamiento. No se observan diferencias significativas en el % Mo-CD16$^+$ ni en la expresión de TNF-α entre los dos grupos (**a, b**). **c.** La expresión de IL-1β al momento de la extracción fue menor en los pacientes que permanecieron con la baciloscopía positiva por más de 60 días (*p<0,05).

Como se mencionó en la Sección 2.2.1, la TB resistente a drogas puede ser clasificada en dos grupos: adquirida (debida a tratamientos incompletos o incorrectos en el pasado) o primaria (por contagio directo con un bacilo MDR). Evaluamos si estos dos grupos de pacientes diferían entre sí en los parámetros determinados, pero no hallamos

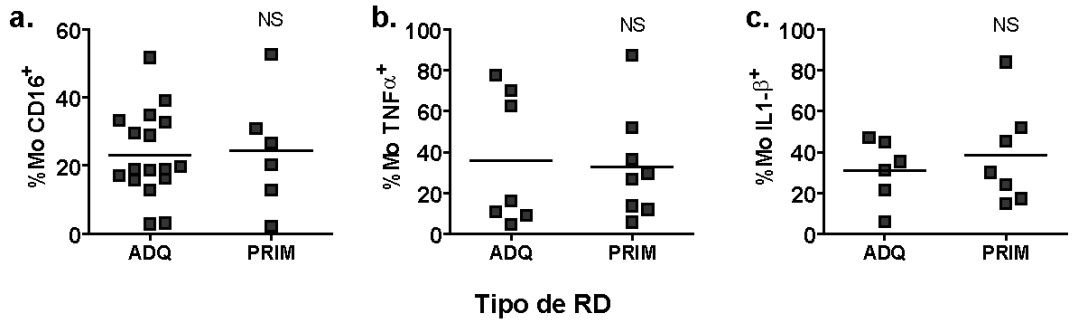



**Figura 4.1.7: El porcentaje de Mo-CD16$^+$ y la inducción de CK proinflamatorias no estaría asociada con la historia de tratamiento previo.** Porcentaje de Mo-CD16$^+$ y Mo-TNF-α+ y Mo-IL-1β+ inducidos por H37Rv en pacientes MDR-TB con (MDR-TB adquirida, ADQ) y sin (MDR-TB primaria, PRIM) historia de abandono de tratamiento previo. No se observan diferencias significativas en el % Mo-CD16$^+$(**a**) ni en la expresión de TNF-α (**b**) e IL-1β (**c**) entre los dos grupos.

diferencias significativas en el %Mo-CD16$^+$ (Fig. 4.1.7a), ni en la expresión de TNF-α (b), IL-1β (c) y CK de fase tardía (datos no mostrados).

Finalmente, determinamos si el genotipo de la cepa causante de MDR-TB en cada paciente podía estar relacionado con los parámetros inmunológicos evaluados. En la Figura 4.1.8 se puede observar que los pacientes infectados con cepas de la familia Haarlem y LAM no difieren en el %Mo-CD16$^+$ (a) ni en la expresión de CK (b, c y datos no mostrados). La influencia de la familia T no pudo ser evaluada por su baja representación en la población estudiada.

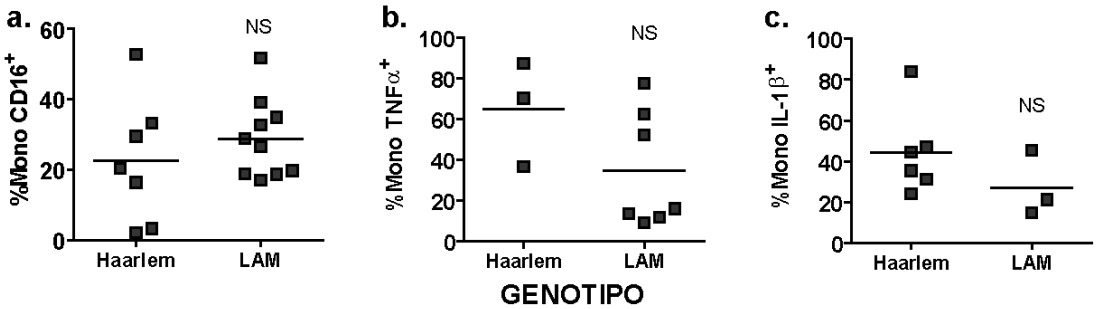



**Figura 4.1.8: El porcentaje de Mo-CD16$^+$ y la inducción de CK proinflamatorias no estaría asociada con el genotipo de la cepa causante de la MDR-TB.** Porcentaje de Mo-CD16$^+$ y de Mo-TNF-α+ y Mo-IL-1β+ inducidos por H37Rv en pacientes MDR-TB clasificados según el genotipo de *Mtb* causante de la MDR-TB. No se observan diferencias significativas en el % Mo-CD16$^+$(**a**) ni en la expresión de TNF-α (**b**) e IL-1β (**c**) entre los dos grupos.

- **El aumento de Mo inflamatorios estaría asociado a una menor expresión de IL-1β tanto en S-TB como en MDR-TB.**

- **Aquellos pacientes MDR-TB que respondieron favorablemente al tratamiento tuvieron una mayor expresión de IL-1β frente a *Mtb* al momento de estudio.**

## 4.1.5. Proliferación de PBMC

Posteriormente, evaluamos si diferencias antigénicas entre las distintas cepas de *Mtb* podrían ponerse de manifiesto en un ensayo de proliferación celular. Brevemente, PBMC de dadores sanos PPD negativos (N-PPD-) y positivos (N-PPD+), pacientes con S-TB y MDR-TB se estimularon en tres relaciones PBMC:*Mtb* con las cepas H37Rv, M y 410 inactivadas por calor, se incubaron durante 5 días y se determinó la proliferación por incorporación de timidina tritiada (Fig. 4.1.9). Paralelamente, se realizó un cultivo control empleando PPD (10 µg/ml). Se consideró como una respuesta proliferativa positiva aquella en la que el índice de estimulación (IE: cpm tratado/cpm control) fue mayor a 5. En la Figura 4.1.9a se puede observar la curva dosis respuesta para los N-PPD+. Se tomó la relación 1:5 para las comparaciones siguientes (Fig. 4.1.9b). Como era de esperarse, los N-PPD-, que si bien fueron vacunados con BCG nunca estuvieron en contacto con *Mtb*, no proliferaron en respuesta a las cepas. Tanto los pacientes S-TB como los MDR-TB tuvieron una respuesta proliferativa menor frente a la estimulación con el antígeno PPD comparados con los N-PPD+ (IE Media±SEM en N-PPD+: 8,5±1,3; S-TB: 5,4±1,1; MDR-TB: 5,3±1,4; N-PPD+ vs. S-TB/MDR-TB: $p<0,05$) tal como se ha descripto previamente [121]. En consonancia con este resultado, los pacientes S-TB también presentaron una menor respuesta proliferativa frente a *Mtb* pero sólo con las cepas H37Rv y 410 (Fig. 4.1.9b). La respuesta frente a las distintas cepas varió según el grupo estudiado, siendo M una pobre inductora de la respuesta proliferativa tanto en N-PPD+ como en MDR-TB. Sin embargo, en los S-TB el patrón fue inverso siendo la respuesta inducida por M ligeramente mayor.

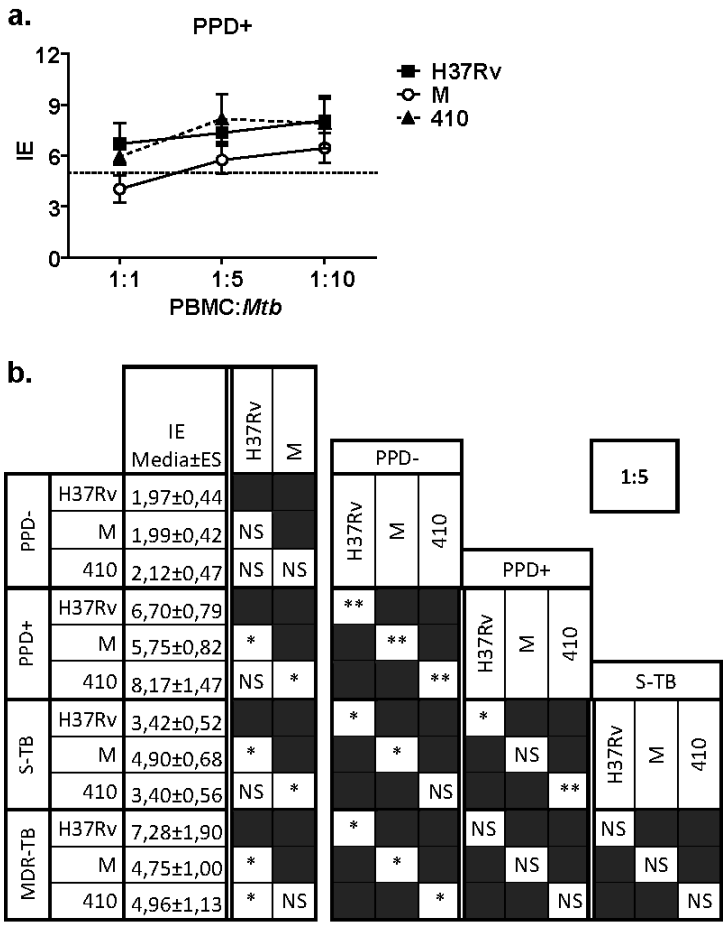



**Figura 4.1.9: La respuesta proliferativa inducida por *Mtb* varía según el dador y la cepa utilizada.** Ensayo de proliferación por incorporación de timidina -$^{3}$H luego de 5 días de cultivo de PBMC con las cepas H37Rv, M y 410 a distintas relaciones de PBMC:*Mtb*. Dadores sanos negativos para la prueba de Mantoux (N-PPD-): n=7, dadores sanos positivos (N-PPD+): n=8, S-TB: n=10, MDR-TB: n=6. **a.** Curva dosis respuesta para los N- PPD+. IE: índice de estimulación. La respuesta fue considerada positiva cuando fue superior a IE=5 (línea de puntos). **b.** Media ± ES de los IE de los grupos estudiados y resumen de las diferencias estadísticas entre cepas (panel izquierdo, prueba de Wilcoxon) y entre grupos (panel derecho, prueba de Mann Whitney) para la relación 1 PBMC: 5 *Mtb*. La respuesta proliferativa en los S-TB fue mayor que en los N-PPD-, pero menor que en los N-PPD+. La cepa M indujo menor proliferación en los N-PPD+ y MDR-TB. *p<0,05, **p<0,01.

- **Los pacientes S-TB y MDR-TB tendrían una respuesta proliferativa deprimida frente a antígenos de *Mtb*, en concordancia con reportes previos.**

- **Las cepas estudiadas son capaces de inducir diferentes niveles de proliferación en los individuos N-PPD$^+$ y en los pacientes. Además, los resultados observados en individuos N-PPD$^+$ sugieren que las cepas evaluadas diferirían en componentes antigénicos.**

## 4.2. Evaluación de la interacción de las distintas cepas de *Mtb* con macrófagos (MΦ) derivados de monocitos

### 4.2.1. Marcadores de superficie en MΦ

Teniendo en cuenta que el MΦ es el nicho preferido de *Mtb*, nos propusimos investigar su interacción con las cepas a través de la determinación de moléculas involucradas en la presentación antigénica, coetimulatorias y receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno. Para ello utilizamos como modelo MΦ derivados de monocitos periféricos de individuos sanos diferenciados *in vitro* durante 5 a 7 días y estimulados por 18 h con las cepas. Posteriormente se determinó la expresión de diferentes marcadores de superficie por citometría de flujo.

Primeramente evaluamos algunos marcadores relacionados con la presentación antigénica y coestimulación. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) son las encargadas de la presentación de antígenos de origen citosólicos, siendo los productos de los genes *hla-a*, *b* y *c* los principales subtipos en humanos. Si bien el porcentaje de MΦ HLAabc$^+$ se mantuvo constante con las distintas cepas (datos no mostrados), la mediana de intensidad de fluorescencia (MIF), la cual representa el nivel de expresión, se redujo significativamente en las células tratadas con la cepa 410 (Fig. 4.2.1a). HLA-DR es la principal molécula MHC tipo II en humanos, y es la encargada de la presentación de antígenos fagocitados por las CPA. Como se puede observar en la Figura 4.2.1b, tanto H37Rv como M inducen un aumento en la expresión de HLA-DR,

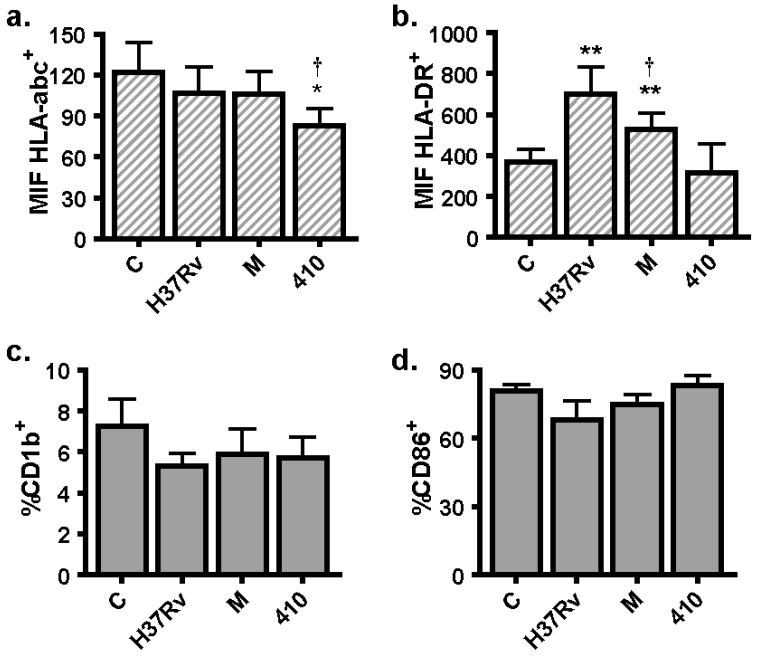



**Figura 4.2.1: H37Rv induce mayor expresión de HLA-DR en macrófagos (MΦ) que M y 410.** Expresión de marcadores asociados a la presentación antigénica y coestimulación en la superficie de macrófagos derivados de monocitos (MΦ) de dadores sanos (n=7) luego de 18h de estimulación, H37Rv, M y 410 (relación 1MΦ:2*Mtb*; citometría de flujo). **a.** Modulación de la expresión de HLA-abc expresada como mediana de intensidad de fluorescencia (MIF). La cepa 410 indujo una disminución en la expresión de HLA-abc (C vs. 410: *p<0,05; H37Rv/M vs. 410: †p<0,05). **b.** H37Rv y M indujeron un aumento en la expresión de HLA-DR (C vs H37Rv/M: **p<0,01), aunque en menor grado para M (H37Rv vs. M: †p<0,05). No se observaron diferencias en el % de MΦ $CD1b^+$ (**c**) y $CD86^+$ (**d**).

siendo menor con M. No se observaron diferencias significativas con la cepa 410. CD1b es una molécula presentadora de antígenos lipídicos a la cual se le atribuye parte de la respuesta protectora frente a *Mtb* [57]. El porcentaje de MΦ que expresan CD1b es muy bajo y este valor no se modificó por el tratamiento con las cepas (Fig. 4.2.1c), como tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión (dato no mostrado). Además, la expresión de CD86, necesaria para la interacción entre CPA y linfocitos, no mostró diferencias significativas entre las cepas (Fig. 4.2.1d).

◈ **No habría diferencias significativas entre las cepas en la modulación de la expresión de moléculas presentadoras de antígenos HLA-abc y CD1b, así como en CD86, que puedan explicar las diferencias observadas en el ensayo de proliferación (Fig. 4.1.9).**

### ◈ La baja respuesta proliferativa inducida por M podría deberse en parte a la menor *up*-regulación de HLA-DR.

Los PRR (Sección 2.3.2) inducen señales asociadas a la activación o inhibición en las funciones del MΦ (Fig. 2.3.5); por los tanto evaluamos ciertos receptores asociados al reconocimiento innato de *Mtb*. La expresión de TLR2, TLR4 y su co-receptor CD14 fue determinada en MΦ incubados durante 5 y 18 h con las cepas H37Rv, M y 410. La modulación de los receptores TLR2 y TLR4 ocurrió tempranamente y de manera transitoria, aumentando su expresión a las 5 h de estimulación con las cepas H37Rv y M (Fig. 4.2.2a, b), mientras que CD14 fue *down*-regulado por las tres cepas a las 18 h (Fig. 4.2.2c).

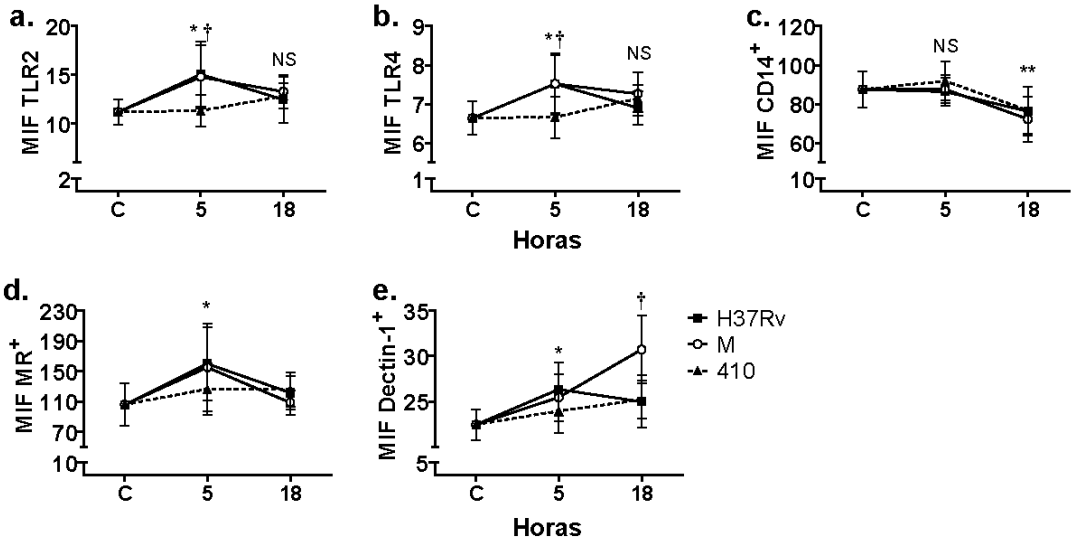
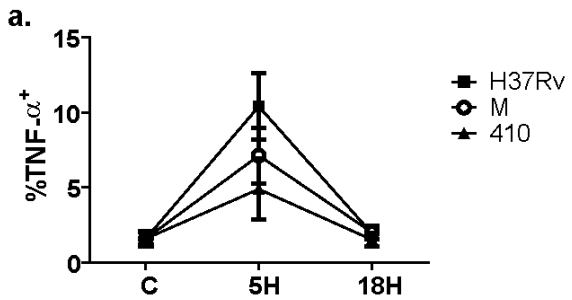



**Figura 4.2.2: Modulación diferencial de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) por las distintas cepas de *Mtb*.** Expresión de receptores de reconocimiento de patrones en la superficie de MΦ de dadores sanos (n=8) incubados solos (C) o con H37Rv, M y 410 durante 5 y 18 h (relación 1MΦ:2*Mtb*). La mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) de los receptores TLR2 (**a**) y TLR4 (**b**) aumenta transitoriamente a las 5 h de estimulación con las cepas H37Rv y M (*p<0,05), mientras que con 410 no se observaron diferencias (410 vs H37Rv/M: †p<0,05). **c.** Las tres cepas *down*-regularon la expresión de CD14 a las 18h (**p<0,01). **d.** La expresión del receptor de manosa (MR) aumenta a las 5h (C vs. H37Rv/M/410: p<0,05) y vuelve a los niveles basales a las 18 h. **e.** Dectin-1 aumenta a las 5h de estimulación con las tres cepas (C vs. H37Rv/M/410: p<0,05) y se mantiene elevado a las 18 h de tratamiento con M (C vs M, M vs H37Rv/410: †p<0,05). En todas las figuras se muestra C de 5 horas ya que no difiere de C de 18 horas.

Otro grupo de receptores en MΦ vinculados con el reconocimiento y la fagocitosis de *Mtb* lo constituyen los receptores de la familia de las lectinas de tipo C. El receptor de manosa (MR) y Dectin-1 tienen alta expresión en MΦ y se ha propuesto que tendrían funciones antagónicas en la activación del mismo (Fig. 2.3.5). Si bien no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de MΦ $MR^+$ (datos no mostrados), la expresión de este receptor aumentó de manera transitoria a las 5 h de estimulación con las tres cepas (Fig. 4.2.2d). Tanto el porcentaje de MΦ Dectin-$1^+$ como su expresión aumentaron a las 5 h con las tres cepas evaluadas, pero solamente la cepa M *up*-reguló su expresión a las 18h (Fig. 4.2.2e y datos no mostrados). Si bien recientemente se ha demostrado que los MΦ alveolares de pacientes con TB pulmonar activa expresan DC-SIGN, otro miembro de la familia de las lectinas de alta expresión en CD [78], ésta sería una particularidad del *subset* de MΦ alveolares, ya que en nuestro sistema el porcentaje de MΦ-DC-$SIGN^+$ fue bajo (Media±SEM: 3,9±1,3%) y no se alteró con las distintas cepas (datos no mostrados).

## 4.2.2. Producción de citoquinas por MΦ

Dada la inducción diferencial de CK observadas en los Mo (Sección 4.1.2), evaluamos la producción de las mismas en los MΦ. Primeramente determinamos la expresión de TNF-α a las 5 y 18 h de estimulación. Como se puede observar en la Figura 4.2.3a, la máxima expresión de TNF-α en el MΦ fue observada con las tres cepas a las 5 h post-estimulación. La inducción con ambas cepas MDR fue significativamente menor que con H37Rv (Fig. 4.2.3b). Este resultado fue confirmado por el método de ELISA en los sobrenadantes de cultivo de las 5 h de estimulación (C: 2,5±1,5 pg/ml; H37Rv: 54,5±4,0; M:17,1±4,9; 410: 23,4±5,5. H37Rv vs. M/410: $p<0,05$. n=6). Dada la baja expresión y producción de TNF-α inducida por la cepa M, determinamos si esta cepa era pobre inductora o utilizaba algún mecanismo inhibitorio en la producción de esta CK. Para ello, preincubamos los MΦ durante 30 min con la cepa M y posteriormente estimulamos con H37Rv. Al igual que en Mo, M tampoco redujo la producción de TNF- α inducida por H37Rv (Fig. 4.2.5b). Llamativamente el % de MΦ que respondieron a *Mtb* fue significativamente menor que en los Mo (Mo vs. MΦ estimulados con H37Rv, M y 410, $p<0,01$). Dicha disminución en la respuesta fue más pronunciada para las cepas de *Mtb*




b.

| 5H | %TNF-α+ Media±ES | C | H37Rv | M |
|---|---|---|---|---|
| C | 1,6±0,4 | | | |
| H37Rv | 10,4±2,2 | ** | | |
| M | 7,1±1,8 | ** | * | |
| 410 | 4,8±2,0 | * | * | NS |

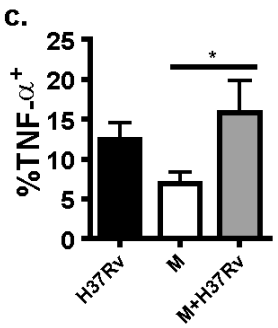



**Figura 4.2.3: Las cepas MDR inducen menores niveles de TNF-α.** MΦ de dadores sanos (n=9) se cultivaron solos (C) o con H37Rv, M y 410 (relación 1MΦ:2*Mtb*) durante 5 y 18 horas determinándose el % de MΦ-TNF-α$^+$ por citometría de flujo. **a.** Curva de expresión de TNF-α. **b.** Si bien las tres cepas indujeron la expresión de TNF-α, ésta fue significativamente mayor con H37Rv. **c.** La preincubación de los MΦ con la cepa M no fue capaz de revertir la expresión inducida por H37Rv (M vs. M+H37Rv: *p<0,05).

ya que BCG indujo una mayor expresión de TNF-α en los MΦ (Media±SEM: 35±5; BCG vs. H37Rv: p<0,05).

Llamativamente, a diferencia de lo observado en Mo, la producción de IL-1β por los MΦ tuvo su máximo a las 18 h (Fig. 4.2.4), y no se observaron diferencias entre las cepas utilizadas.

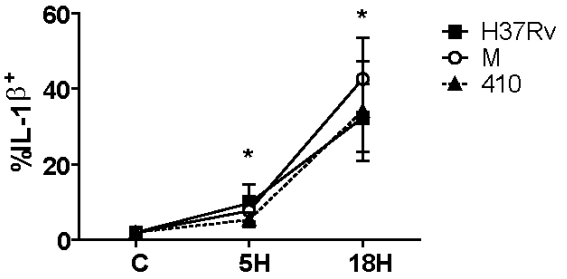



**Figura 4.2.4: Las cepas H37Rv, M y 410 inducen niveles similares de IL-1β.** MΦ de dadores sanos fueron cultivados solos (C) o con H37Rv, M y 410 durante 5 y18 h (relación 1MΦ:2*Mtb*, n=7) determinándose el % MΦ- IL-1β$^+$ por marcación intracelular (C vs H37Rv/M/410: *p<0,05). No se observaron diferencias significativas entre cepas.

Además, evaluamos la expresión intracitoplasmática de IL-12, IFN-γ e IL-10 a las 18 h de estimulación. No se observaron diferencias en la expresión de IL-12 con las cepas H37Rv, M y 410 (Fig. 4.2.5a). La expresión de IFN-γ fue inducida por H37Rv y M pero no por 410 (Fig. 4.2.7B), mientras que solo se obtuvo inducción de IL-10 por H37Rv (Fig. 4.2.7c). Este último resultado fue confirmado por el método de ELISA en sobrenadantes de cultivo de MΦ estimulados durante 18h (C: 3±2pg/ml; H37Rv:27±4; M: 13±5; 410: 10±3. H37Rv vs. M/410: p<0,05).

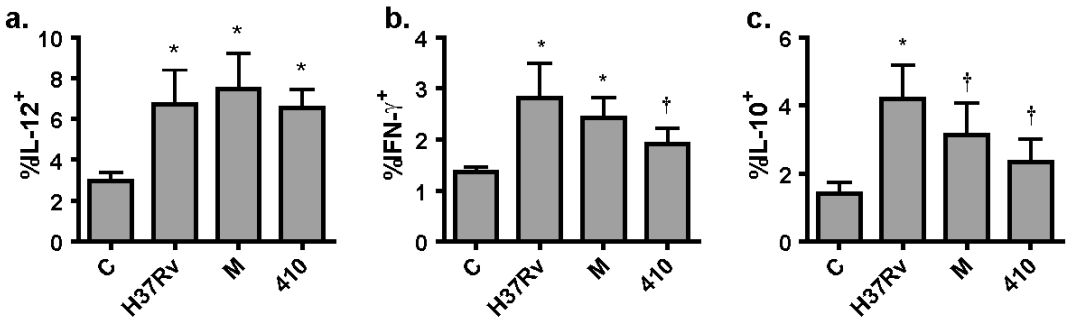



**Figura 4.2.5: Las cepas MDR inducen menor expresión de IL-10 en MΦ.** Determinación del porcentaje de MΦ que expresan IL-12 (a), IFN-γ (b) e IL-10 (c) por citometría de flujo luego de 18h de de cultivo solos (C) o con H37Rv, M y 410, relación 1MΦ:2*Mtb*, n=9. Las tres cepas estudiadas indujeron niveles similares de IL-12 (**a.** C vs. H37Rv/M/410: *p<0,05), mientras que la expresión de IFNγ aumentó únicamente con las cepas H37Rv y M (**b.** C vsH37Rv/M: *p<0,05; 410 vs. H37Rv/M: †p<0.05). **c.** No se observó inducción de IL-10 con las cepas MDR (C vs H37Rv: *p<0,05. H37Rv vs. M/410: †p<0.05).

- **Los Mo circulantes y los MΦ responden de manera diferente frente a los mismos estímulos.**
- **La producción de TNF-α en MΦ estimulados con las cepas MDR fue menor que con H37Rv, y M no fue capaz de inhibir la expresión inducida por H37Rv, por lo tanto, la cepa M es pobre inductora de TNF-α tanto en Mo como MΦ humanos.**

# 4.3. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata por cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

*Mtb* ha desarrollado diferentes mecanismos para sobrevivir en ambientes hostiles manipulando la respuesta inmune del huésped a su favor (Sección 2.3). Se han descripto numerosos mecanismos de evasión, dentro de los cuales la inhibición de la formación de fagolisosoma y su acidificación [75, 122], modulación de la producción de CK [85], *down*-regulación del receptor de IFN-γ [123] y la inhibición de la muerte por apoptosis [94, 95] han sido asociados con el MΦ. La diversidad de los mecanismos empleados y la complejidad de la interacción huésped-patógeno hablan de la larga historia de co-evolución entre *Mtb* y el hombre. Por lo tanto, investigamos si existen diferencias en estos mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata que pudieran explicar la diferente virulencia entre las cepas MDR (M y 410) en comparación con H37Rv.

## 4.3.1. Modulación del receptor de IFN-γ

El IFN-γ es una CK central de la respuesta inmune frente a *Mtb* (Sección 2.3.1), y se ha descripto que el bacilo podría regular negativamente la expresión del receptor en los MΦ como parte de un mecanismo de evasión [123]. Como se puede observar en la Figura 4.3.1, las tres cepas estudiadas indujeron una disminución en la expresión del receptor de IFN-γ (IFNR) de manera similar. Se observó la misma tendencia para el porcentaje de MΦ $IFNR^+$ (datos no mostrados). Estas diferencias no se observaron a las 5 h de estimulación.

◈ **La *down*-regulación del IFNR sería un mecanismo general de evasión y no dependería de las cepas.**

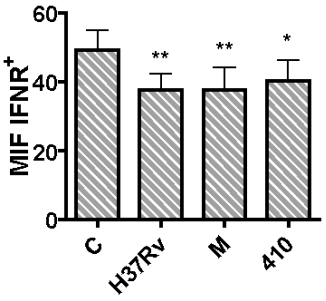



**Figura 4.3.1: Las cepas H37Rv, M y 410 inducen una *down*-regulación del receptor de IFN-γ en MΦ.** Expresión del receptor de IFN-γ (IFNR) en MΦ luego de18 horas de cultivo solos (C) o con H37Rv, M y 410 inactivadas por calor. C vs H37Rv/M/410: *p<0,05, **p<0,01. Relación 1MΦ:2*Mtb*. n=8.

## 4.3.2. Replicación intracelular

Debido a que el MΦ es capaz de controlar el crecimiento de micobacterias no patógenas, como BCG o la cepa avirulenta H37Ra, la virulencia e infecciosidad de distintos genotipos de *Mtb* ha sido asociada a la capacidad de la micobacteria para replicarse intracelularmente [86, 124, 125]. Asimismo, cuando M y 410 son cultivadas en medio líquido enriquecido para micobacterias, se ha observado que M tiene una fase *lag* (de latencia) mayor que 410, pero una vez iniciada la división celular M alcanza rápidamente la misma concentración bacilar que 410 (López B., comunicación personal). Teniendo en cuenta estas observaciones, nos preguntamos si diferencias en el crecimiento intracelular podrían explicar la diferente virulencia de estas dos cepas genéticamente relacionadas, M (epidemiológicamente exitosa) y 410 (no próspera) y, además, si el comportamiento de éstas era igual o diferente al observado en los medios enriquecidos. Para ello se realizaron infecciones *in vitro* en MΦ humanos con cultivos viables de *Mtb* a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 bacilos por MΦ. Se obtuvieron los lisados de MΦ infectados a los días 0, 2 y 5 de infección y se analizaron las unidades formadoras de colonias (UFC) en medio de cultivo sólido. Como se puede observar en la Figura 4.3.2, las unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas inmediatamente después de la infección de los MΦ fue ligeramente mayor para las cepas M y 410, aunque no se alcanzó significancia estadística. Las cepas M y H37Rv tuvieron una replicación

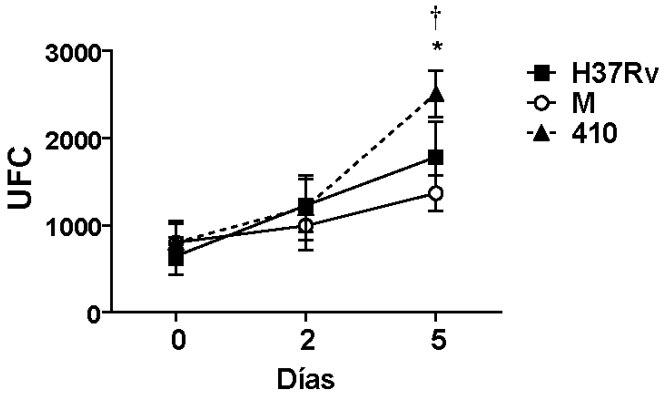



**Figura 4.3.2: El crecimiento intracelular de la cepa 410 es mayor a la observada en M.** Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml de lisado de MΦ) recuperadas de MΦ infectados con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 con las cepas H37Rv, M y 410 a los días 0, 2 y 5 post-infección. Si bien hubo crecimiento intracelular con las tres cepas, éste fue mayor con la cepa 410. 0 vs. 5 días para las tres cepas: *p<0,05. A los 5 días, 410 vs. M/H37Rv: †p<0,05. n=6.

intracelular similar en MΦ, mientras que el crecimiento fue significativamente mayor con la cepa 410 en el día 5 y se mantuvo a los 9 días de cultivo (datos no mostrados).

- **La cepa M tiene la capacidad de multiplicarse muy lentamente dentro del MΦ. Contrariamente, la cepa 410, a pesar de estar estrechamente relacionada con la M, crece rápidamente dentro del MΦ superando a H37Rv.**

## 4.3.3. Determinación de la carga bacilar en MΦ

Habiendo observado un mayor crecimiento intracelular con 410, de acuerdo al número de UFC recuperados, determinamos si el mismo se debía a una mayor capacidad de infección de esta cepa de su célula huésped, lo cual equivaldría a un inóculo inicial mayor.

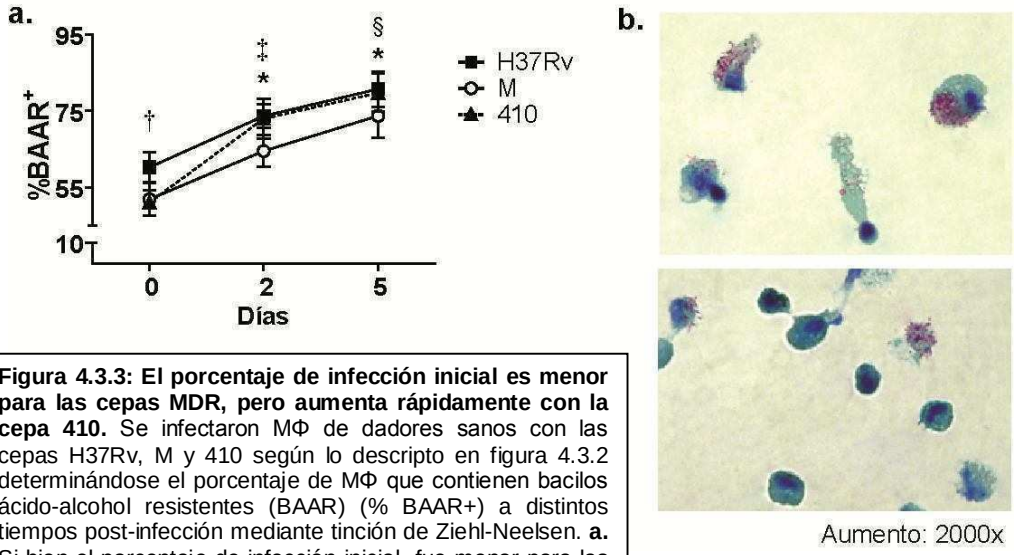
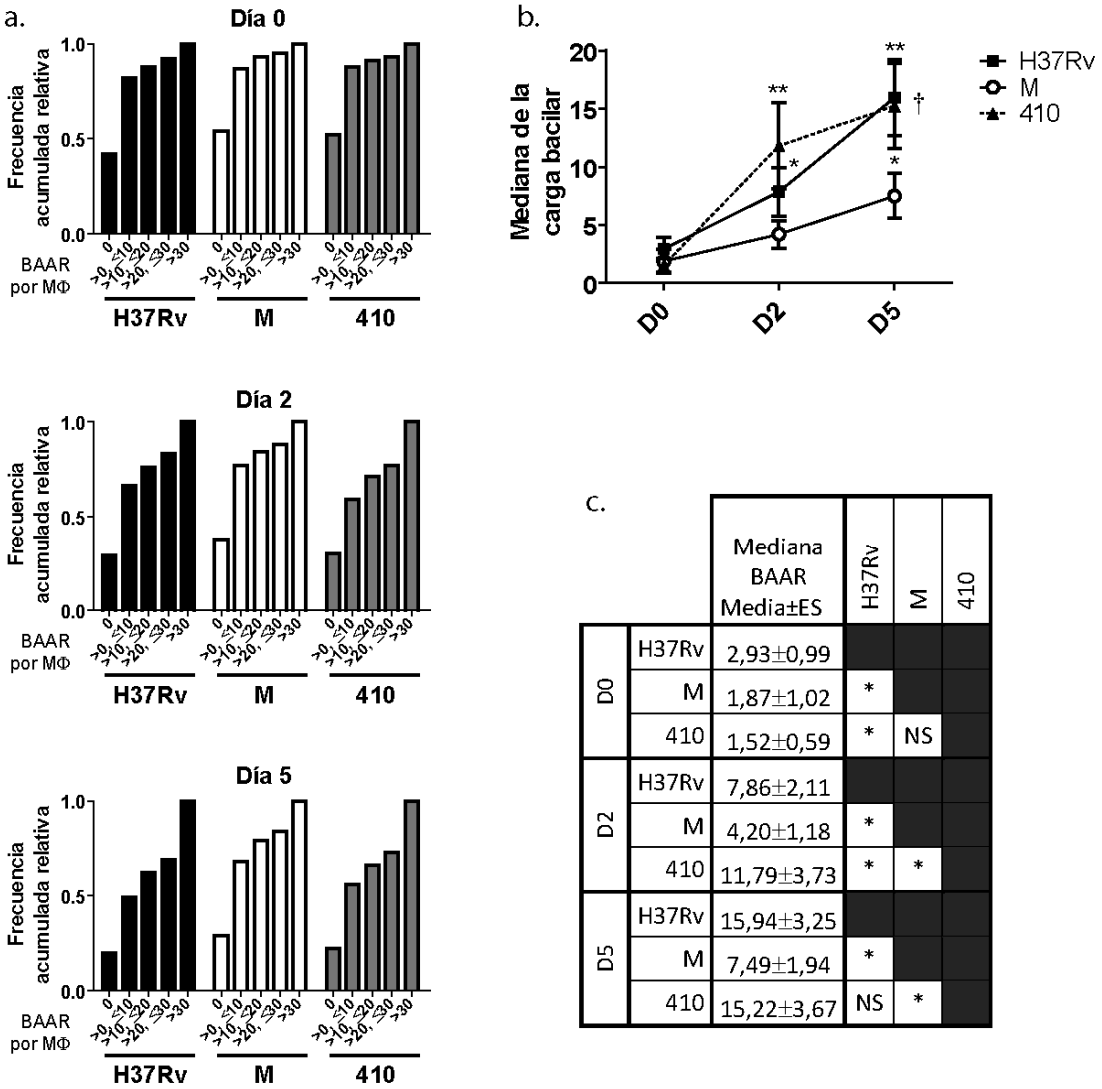



**Figura 4.3.3: El porcentaje de infección inicial es menor para las cepas MDR, pero aumenta rápidamente con la cepa 410.** Se infectaron MΦ de dadores sanos con las cepas H37Rv, M y 410 según lo descripto en figura 4.3.2 determinándose el porcentaje de MΦ que contienen bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (% BAAR+) a distintos tiempos post-infección mediante tinción de Ziehl-Neelsen. **a.** Si bien el porcentaje de infección inicial fue menor para las cepas MDR (Día 0, H37Rv vs M/410: † $p<0,05$), este valor aumentó con los días de cultivo (D0 vs. D5 para H37Rv/M/410: *$p<0,05$); alcanzando la cepa 410 niveles similares a H37Rv al día 2 post-infección (M vs. H37Rv/410: ‡$p<0,05$). El aumento del %BAAR+ fue menor para M (M vs. H37Rv/410: §$p<0,05$). **b.** Imágenes representativas de los preparados de MΦ conteniendo los BAAR intracelulares.

Para evaluar este punto, los MΦ infectados se despegaron de las placas incubando las mismas en frío; luego, una alícuota fue colocada en un portaobjetos y se realizaron tinciones de Ziehl-Neelsen, analizándose el número de MΦ infectados por microscopía óptica. En la Figura 4.3.3 se grafica el porcentaje de MΦ infectados (con BAAR en su interior Fig. 4.3.3b). Los datos obtenidos indican que la capacidad de infección de las cepas MDR luego de 5 h de incubación es ligeramente menor a la de la




| | | Mediana BAAR Media±ES | H37Rv | M | 410 |
|---|---|---|---|---|---|
| D0 | H37Rv | 2,93±0,99 | | | |
| | M | 1,87±1,02 | * | | |
| | 410 | 1,52±0,59 | * | NS | |
| D2 | H37Rv | 7,86±2,11 | | | |
| | M | 4,20±1,18 | * | | |
| | 410 | 11,79±3,73 | * | * | |
| D5 | H37Rv | 15,94±3,25 | | | |
| | M | 7,49±1,94 | * | | |
| | 410 | 15,22±3,67 | NS | * | |

**Figura 4.3.4: La mediana de la carga bacilar aumenta rápidamente con la cepa 410. a.** La mediana de la carga bacilar para los días 0, 2 y 5 post infección se calculó a partir de la frecuencia acumulada de MΦ separados en categorías según la cantidad de BAAR que contenían en su interior. La carga bacilar aumentó con los días de cultivo (Día 0 vs. Día 5 para H37Rv y 410: **p<0,01; para M: *p<0,05. Día 2 vs. Día 5 para H37Rv: †p<0,05) aunque de manera más pronunciada con la cepa 410 (Día 0 vs. Día 2 para 410: **p<0,01; para H37Rv:*p<0,05), la cual superó a la cepa H37Rv al segundo día de cultivo (**c**). La replicación intracelular de la cepa M fue significativamente más lenta (**b, c**). MOI=10. n=9

cepa H37Rv (Fig. 4.3.3a). Llamativamente, si bien el porcentaje de infección aumentó con los días con las tres cepas, la cepa 410 lo hizo más rápidamente alcanzando valores similares a H37Rv al día 2 post infección.

En los mismos preparados analizamos la carga bacilar de los MΦ. Para ello, se analizó la frecuencia de MΦ infectados y el número de BAAR presentes (Fig. 4.3.4a). A partir de estos valores se determinó la mediana de la carga bacilar para cada preparado y se compararon estos valores (Fig. 4.3.4b, c). A pesar de que el valor medio de bacilos por MΦ fue mayor para H37Rv al día 0 ($p<0,05$), la carga bacilar aumentó con mayor rapidez en los cultivos infectados con la cepa 410 (Día 2, H37Rv vs. 410: $p<0,05$).

◈ **Estos datos confirman que la cepa 410 se replica más rápidamente dentro del MΦ, a pesar de su menor capacidad inicial de infección.**

## 4.3.4. Evaluación de CK en MΦ infectados con *Mtb* viable

De los ensayos de infección descriptos en las secciones anteriores se conservaron los sobrenadantes de cultivo para la determinación de CK por el método de ELISA. Tanto H37Rv como las cepas MDR indujeron la secreción de TNF-α muy tempranamente (luego de las 4 h de infección), aunque la concentración fue mayor con la cepa 410 (Fig. 4.3.5a), y se mantuvo elevada por el resto del ensayo para las tres cepas estudiadas (datos no

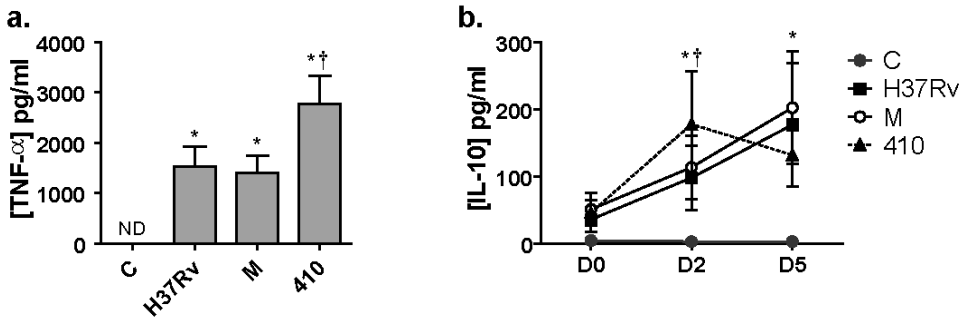



**Figura 4.3.5: La infección con cepa 410 induce rápidamente la secreción de TNF-α e IL-10.** Determinación de la concentración de las CK TNF-α e IL-10 por el método de ELISA en sobrenadantes de cultivo de MΦ infectados con las cepas H37Rv, M y 410. **a.** Si bien las tres cepas estudiadas inducen mayor secreción de TNF-α a las 4 horas de infección (Día 0, C vs. H37Rv/M/410: *$p<0.05$), ésta fue mayor para la cepa 410 (410 vs. H37Rv/M: †$p<0,05$). **b.** IL-10 fue inducida con las tres cepas a los 2 y 5 días post infección (C vs. H37Rv/M/410: *$p<0,05$), la concentración fue mayor para la cepa 410 a los 2 días (410 vs. H37Rv/M: †$p<0,05$). MOI=10. n=6

mostrados). Por otro lado, la inducción de IL-10 también alcanzó un máximo más rápidamente con la cepa 410 (Fig. 4.3.5b). Otra CK evaluada y que no pudo ser detectada en los sobrenadantes fue IL-12. Estos resultados indican que el perfil de producción de CK inducida por la bacteria viable difiere de la observada con la bacteria inactivada por calor.

- **La cepa 410 es una fuerte inductora de la producción temprana de TNFα e IL-10.**

## 4.3.5. Apoptosis de macrófagos inducida por *Mtb*

En los últimos años se ha postulado que la muerte del MΦ por apoptosis, a diferencia de la necrosis, sería favorable para el huésped. Sin embargo, *Mtb* ha desarrollado mecanismos para inhibir este proceso y evadir la respuesta inmune. El destino final del MΦ (supervivencia, apoptosis, necrosis u otro tipo de muerte) dependería del equilibrio entre las señales de muerte y de supervivencia inducidas por la bacteria. Por lo tanto, en esta sección investigamos si las cepas M y 410 eran capaces de inducir la muerte del MΦ y las vías que podrían estar involucradas.

### 4.3.5.a. Determinación de apoptosis en macrófagos

Primeramente evaluamos si H37Rv, M y 410 (cepas inactivadas con calor) inducían la muerte del MΦ en forma diferencial y lo comparamos con la cepa vacunal viable *M.bovis* BCG, conocida inductora de apoptosis de los MΦ. Se evaluó apoptosis por la técnica de anexina V-FITC (AV)/ioduro de propidio (IP) a las 5 y 18 h de estimulación a distintas relaciones de MΦ y *Mtb*. Esta técnica permite diferenciar las células apoptóticas tempranas (MΦ-$AV^+IP^-$) de las tardías/necróticas (MΦ-$IP^+$). Como se observa en la Figura 4.3.6a, la inducción de apoptosis fue dosis dependiente para las tres cepas empleadas. Ambas cepas, M y 410 indujeron menor apoptosis que H37Rv y BCG. La necrosis (MΦ-$IP^+$) fue observada tanto con H37Rv, M y BCG en las relaciones MΦ:*Mtb* de 1:10 a 1:50. En cambio, 410 indujo necrosis aún en relación 1:5. Estas diferencias no se observaron a las 18 h de estimulación (datos no mostrados).

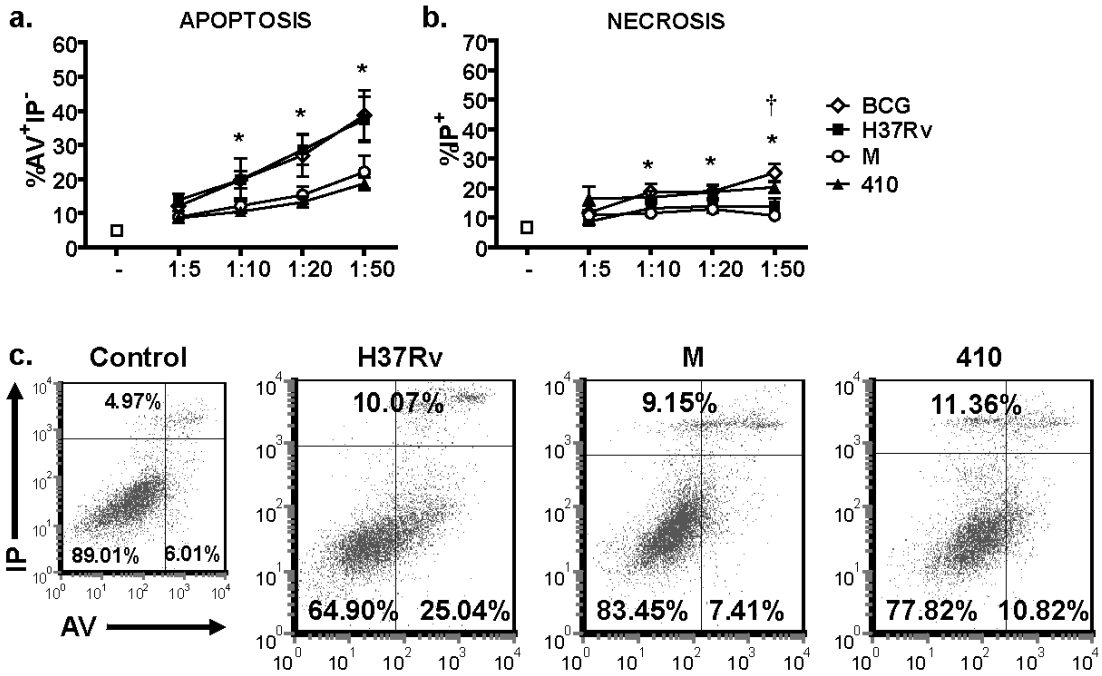



**Figura 4.3.6: Las cepas MDR inducen menor muerte por apoptosis en MΦ que la cepa H37Rv.** Inducción de muerte en MΦ por las cepas H37Rv, M, 410 inactivadas por calor. Se utilizó como control positivo BCG viable. Los MΦ fueron cultivados por 5 horas a distintas relaciones de bacilos. Se determinó la muerte celular por la técnica de anexina V (AV)/ioduro de propidio (IP) en citómetro de flujo. Las células AV+IP- fueron consideradas apoptóticas y las IP+, necróticas (**c**). **a.** Curvas de inducción de apoptosis (C vs H37Rv/M/410 para las relaciones 1:5 a 1:50: $p<0,05$). La cepa H37Rv indujo niveles de apoptosis similares a BCG, y significativamente mayores que las cepas M y 410 (H37Rv vs. M/410 y BCG vs. M/410: *$p<0,05$). **b.** Curvas de inducción de necrosis (C vs. H37Rv/M para las relaciones 1:10 a 1:50 y C vs. 410 para las relaciones 1:5 a 1:50: $p<0,05$). El porcentaje de células necróticas fue ligeramente mayor con la cepa 410 (410 vs. M: *$p<0,05$; 410 vs. H37Rv: †$p<0,05$). **c.** *Dot plots* representativos para la relación 1:20. n=8.

Estos resultados indican que M y 410 son pobres inductoras de apoptosis en los MΦ. Sin embargo, no nos permite explicar por qué H37Rv (descripta como una cepa virulenta capaz de inhibir la apoptosis [126]) induce los mismos niveles de apoptosis que BCG. Por lo tanto, nos preguntamos si la modificación de la estructura de la pared de *Mtb* durante la inactivación con calor de las cepas, podría ser la causante de la apoptosis diferencial. Para demostrar estas diferencias realizamos el mismo ensayo con cepas γ-irradiadas. Como se observa en la Figura 4.3.7, H37Rv indujo los mismos niveles

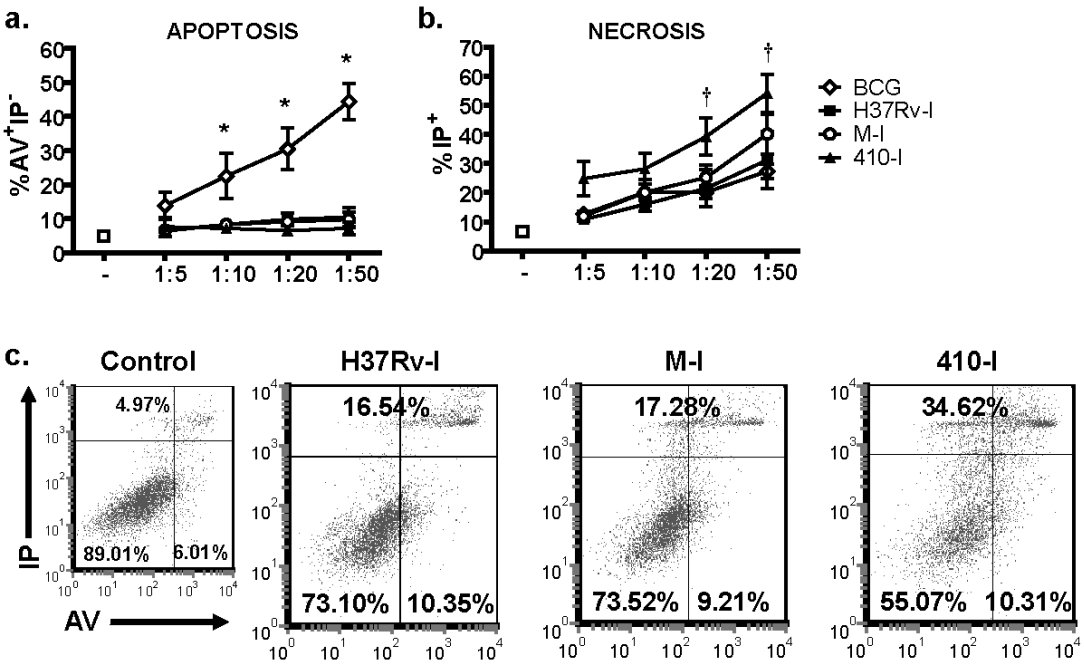



**Figura 4.3.7: La muerte inducida por de las cepas inactivadas por radiación γ es predominantemente necrótica, siendo más pronunciada con la cepa 410.** Inducción de muerte en MΦ por las cepas H37Rv, M, 410 inactivadas por radiación γ (-I). Se utilizó como control positivo BCG viable. Los MΦ fueron cultivados por 5 horas a distintas relaciones de bacilos. Se determinó la muerte celular por la técnica de anexina V (AV)/ioduro de propidio (IP). Las células AV+IP- fueron consideradas apoptóticas y las IP+, necróticas. **a.** Curvas de inducción de apoptosis (C vs H37Rv-I/M-I para las relaciones 1:10 a 1:50: p<0,05; C vs. BCG para las relaciones 1:5 a 1:50: p<0,05). Las cepas irradiadas indujeron poca exposición de la fosfatidil serina (BCG vs. H37Rv-I/M-I/410-I: *p<0,05). **b.** Curvas de inducción de necrosis (C vs. H37Rv-I/MI/410-I/BCG para las relaciones 1:5 a 1:50: p<0,05). Las cepas irradiadas indujeron muerte por necrosis de manera dosis dependiente, siendo 410-I la más potente (410-I vs. H37Rv-I/M-I: †p<0,05). **c.** *Dot plots re*presentativos para la relación 1:20. n=8.

de apoptosis que M y 410, permitiendo diferenciar las cepas virulentas de la vacunal. Además, se acentuó la capacidad de H37Rv, M y 410 para incrementar la necrosis (MΦ-$IP^+$). Este efecto fue particularmente pronunciado con la cepa 410 irradiada (410-I) que indujo altos niveles de necrosis de manera dosis dependiente. Estos resultados indican que durante el proceso de inactivación por calor la composición antigénica de *Mtb* se modifica, alterando su capacidad de inducir la muerte del MΦ.

- **Las cepas virulentas serían pobres inductoras de apoptosis, predominando el fenotipo necrótico cuando los MΦ son tratados con altas dosis de *Mtb*, siendo esta característica notablemente pronunciada en 410.**

Dado que la cascada de señalización de la apoptosis, independientemente de que sea a través de la vía intrínseca o extrínseca, culmina con la activación de caspasa-3, evaluamos la forma activa de la misma por citometría de flujo empleando las cepas inactivadas por calor. Para ello los MΦ fueron estimulados durante 5 h a una relación 1:20 con las cepas. De acuerdo a la Figura 4.3.8, las tres cepas indujeron la activación de esta caspasa efectora, sin embargo el % de MΦ-caspasa-3$^{+}$ fue menor con M y, en particular con 410. Estos datos corroboran lo observado con AV-IP, sugiriendo que 410 induciría muerte por necrosis del MΦ y M tendría un potencial menor para inducir apoptosis.

- **Este dato confirma que tanto M como 410 son pobres inductoras de apoptosis.**

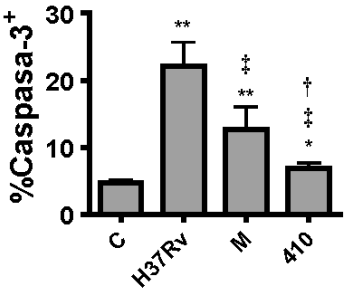



**Figura 4.3.8: Las cepas MDR inducen menor activación de la caspasa-3 que H37Rv.** Determinación intracelular por citometría de flujo de la forma activa de caspasa-3. MΦ fueron cultivados por 5 horas con las cepas H37Rv, M y 410 inactivadas por calor a una relación 1:20. Las cepas indujeron la activación de caspasa-3 (C vs. H37Rv/M: **p<0,01; C vs. 410: *p<0,05) pero el %MΦ caspasa-3+ fue menor con las cepas MDR (H37Rv vs. M/410: ‡p<0,01; M vs. 410: †p<0,05), n=10

### 4.3.5.b. Posibles mecanismos involucrados

H37Rv es la cepa en la que mejor se ha caracterizado la inhibición de la apoptosis del MΦ, y en la mayoría de los trabajos publicados se utilizó el bacilo viable [54, 99, 127]. Los resultados anteriores demuestran que cuando se emplean bacterias irradiadas no se observan diferencias entre H37Rv, M y 410 en la capacidad de inducir la apoptosis del MΦ. Por lo tanto, aprovechando la particularidad de que las cepas inactivadas por calor permiten diferenciarlas, nos preguntamos si M y 410 inducen una señal proapoptótica débil o emplean algún mecanismo inhibitorio de la apoptosis.

Es conocido que NFκB es un factor de transcripción asociado a la activación y supervivencia del MΦ, y se lo ha relacionado con la resistencia a la apoptosis en este tipo celular [102, 108, 128]. Con el fin de determinar si este factor de transcripción estaba asociado a la baja inducción de apoptosis por las cepas MDR, los MΦ fueron

preincubados con un inhibidor químico de NFκB, el pirrolidin ditiocarbamato (PDTC) [108], y luego pulsados con *Mtb* durante 4 h para determinar la apoptosis por AV/IP. Como se observa en la Figura 4.3.9, el agregado de PDTC tanto en ausencia de antígeno como en presencia de las cepas H37Rv o 410 no modificó el % de MΦ-$AV^+IP^-$. Sin embargo los MΦ pretratados con PDTC fueron más susceptibles a la muerte inducida por la cepa M, aunque no alcanzó los niveles inducidos por H37Rv. Este dato sugiere que tanto M como 410 inducen una señal proapoptótica débil.

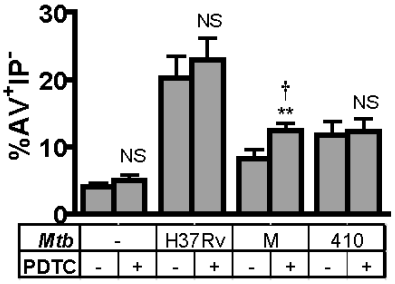



**Figura 4.3.9: Las cepas MDR inducen una señal proapoptótica débil.** Inducción de apoptosis en MΦ pretratados con el inhibidor de NFκB, PDTC. Los MΦ fueron incubados durante 1 hora con el inhibidor de NFκB, PDTC (50µM) previo a la estimulación con las cepas H37Rv, M y 410 durante 4 horas. La inhibición de NFκB aumentó la apoptosis inducida por M (M vs. PDTC+M: **p<0,01) aunque no llegó a igualar a H37Rv (H37Rv vs. PDTC+M: †p<0,05). La droga no afectó la apoptosis inducida por H37Rv ni 410. Relación 1MΦ:20*Mtb*. n=8

Paralelamente evaluamos si las cepas MDR podían interferir con la apoptosis inducida por H37Rv, hecho que nos permitiría inferir si utilizan mecanismos inhibitorios. Para ello realizamos un esquema de preincubación con M y 410 durante 1 h y luego

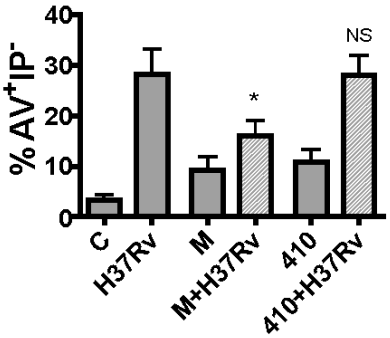



**Figura 4.3.10: La cepa M inhibe parciamente la muerte inducida por H37Rv.** Inducción de apoptosis en MΦ pretratados con las cepas MDR. Los MΦ fueron preincubados durante 1 hora con las cepas M o 410 y luego se agregó la cepa H37Rv durante 4 horas (1:20). La preincubación de los MΦ con la cepa M redujo significativamente el porcentaje de apoptosis inducida por H37Rv (H37Rv vs. M+H37Rv: *p<0,05), no siendo este el caso para la cepa 410 (H37Rv vs. 410+H37Rv: NS). n=6.

agregamos la cepa inductora de apoptosis, H37Rv. Como se observa en la Figura 4.3.10, la preincubación con la cepa M redujo parcialmente el porcentaje de apoptosis inducido por H37Rv, mientras que 410 no interfirió con la muerte de los MΦ inducida por la cepa de referencia.

- **En conjunto, estos resultados sugieren que la baja inducción de apoptosis observada con las cepas MDR se debería a una señalización proapoptótica débil sumada a un mecanismo inhibitorio en el caso de la cepa M.**

### 4.3.5.c. Evaluación de la vía intrínseca de apoptosis

La vía intrínseca de la apoptosis puede ser inducida por señales de estrés celular como daño en el ADN, y se inicia en la mitocondria al liberarse el citocromo c al citoplasma. Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 son las encargadas de mantener la integridad de la membrana mitocondrial impidiendo la liberación del citocromo c y la iniciación de la vía intrínseca (Fig. 2.3.7).

Habiendo observado los distintos niveles de apoptosis inducidos por las cepas H37Rv, M y 410, nos preguntamos si correlacionaba con la pérdida del potencial de

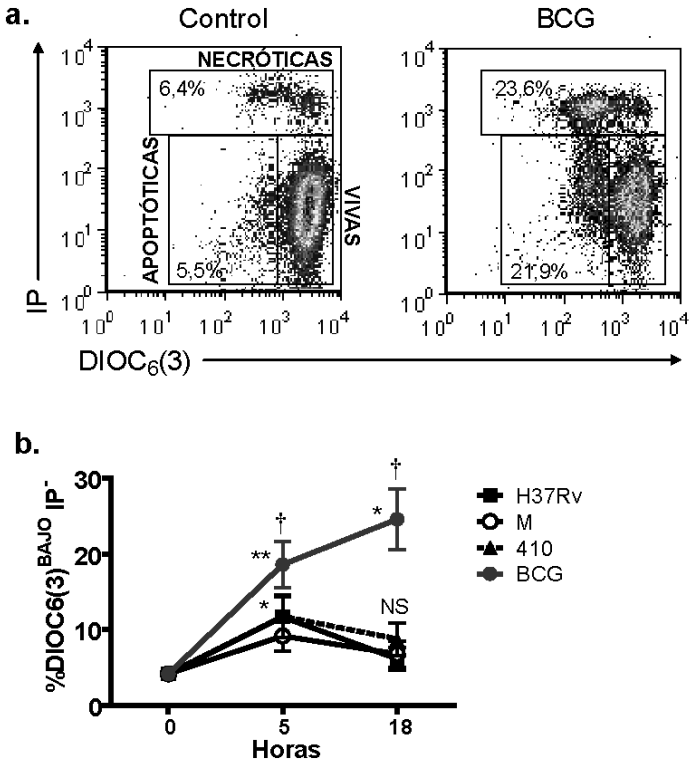



**Figura 4.3.11: Las cepas H37Rv, M y 410 inactivadas por calor inducen pérdida del potencial de membrana mitocondrial de manera semejante.** Evaluación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) por tinción con el colorante lipofílico $DIOC_6(3)$ e IP. Las células $IP^+$ fueron consideradas necróticas, mientras que las IP-$DIOC_6(3)$ALTO fueron consideradas viables y las IP-$DIOC_6(3)$BAJO aquellas que perdieron el ΔΨm (**a**). Los MΦ fueron incubados durante 5 y 18 horas con las cepas H37Rv, M o 410 inactivadas por calor (**b**). Se utilizó como control BCG viable. En los MΦ tratados con las tres cepas de *Mtb* se observaron niveles similares de pérdida de ΔΨm a las 5 h de estimulación (C vs.H37Rv/M/410: *p<0,05) los cuales recuperaron el nivel basal a las 18 h (C vs.H37Rv/M/410: NS). La pérdida de ΔΨm fue más pronunciada con BCG (C vs. BCG: **p<0,01, *p,0,05; BCG vs. H37Rv/M/410: †p<0,05). Relación 1MΦ :20*Mtb*. n=8.

membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), característica de la vía intrínseca de la apoptosis [129]. La inducción de esta vía se evaluó coloreando los MΦ con IP, para excluir las células necróticas ($IP^+$), simultáneamente con el colorante lipofílico $DIOC_6(3)$. Este último colorante tiñe con alta intensidad las células con mitocondrias viables ($IP^-$ $DIOC_6(3)^{ALTO}$), mientras que su intensidad disminuye en aquellas que perdieron el $\Delta\Psi_m$ ($IP^-$ $DIOC_6(3)^{BAJO}$, Fig. 4.3.11a). Como se observa en la Fig. 4.3.11b, las cepas de *Mtb* indujeron una pérdida del $\Delta\Psi_m$ menor y de manera transitoria (0h vs 18h: $p>0,05$), comparado con BCG. Este resultado nos sugiere que la vía activada por H37Rv inactivada por calor podría ser la extrínseca.

Luego, nos preguntamos si la baja inducción de la vía mitocondrial estaba relacionada con algún mecanismo inhibitorio utilizado por las cepas de *Mtb*. Teniendo en cuenta que la staurosporina (ST) es una droga que induce específicamente la vía mitocondrial (Fig. 2.3.7), evaluamos la capacidad de las cepas H37Rv, M y 410 de interferir con este estímulo proapoptótico. Para ello, preincubamos los MΦ con una dosis baja de *Mtb* para luego inducir la apoptosis con 1µM de ST. Si bien el tratamiento con las tres cepas redujo los niveles de apoptosis inducida por ST, este efecto fue más pronunciado con las cepas M y 410 (Fig. 4.3.12).

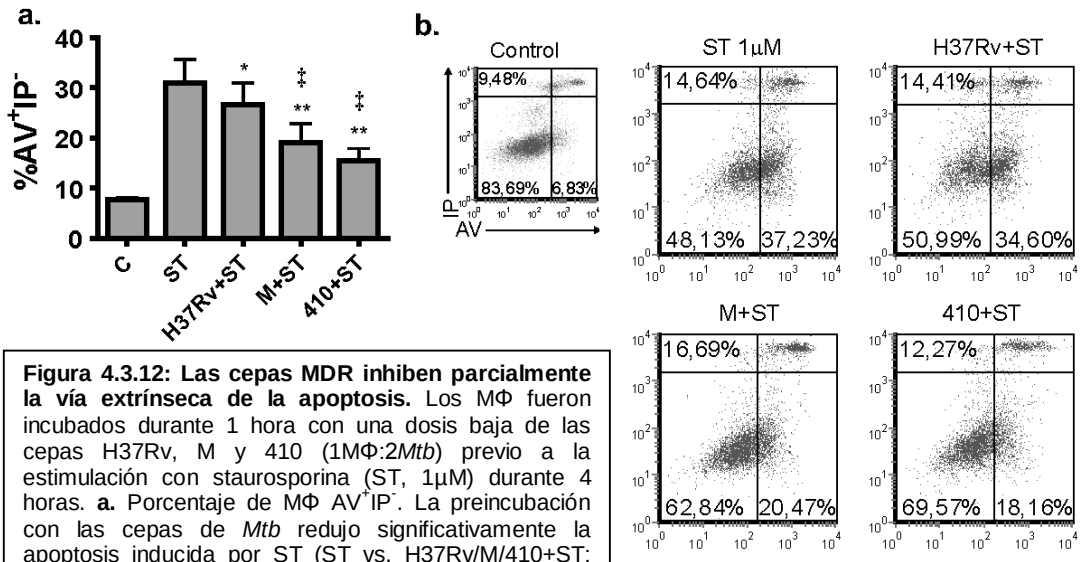



**Figura 4.3.12: Las cepas MDR inhiben parcialmente la vía extrínseca de la apoptosis.** Los MΦ fueron incubados durante 1 hora con una dosis baja de las cepas H37Rv, M y 410 (1MΦ:2*Mtb*) previo a la estimulación con staurosporina (ST, 1µM) durante 4 horas. **a.** Porcentaje de MΦ $AV^+IP^-$. La preincubación con las cepas de *Mtb* redujo significativamente la apoptosis inducida por ST (ST vs. H37Rv/M/410+ST: *$p<0,05$, **$p<0,01$) aunque en mayor grado con ambas cepas MDR (H37Rv+ST vs. M/410+ST: ‡$p<0,01$). **b.** *Dot plots* representativos de un mismo experimento. n=6.

Posteriormente evaluamos si la resistencia a la muerte inducida por ST estaba relacionada con la molécula antiapoptótica Bcl-2. Para ello, MΦ estimulados durante 18 h con las cepas a una relación 1MΦ:2*Mtb* fueron marcados intracelularmente y analizados por citometría de flujo para determinar la expresión de Bcl-2. Como se puede observar en la Figura 4.3.13, no se observaron diferencias significativas.

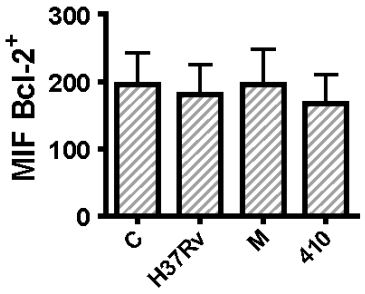



**Figura 4.3.13: La resistencia a la apoptosis inducida por ST no sería debido al aumento de Bcl-2.** Determinación intracelular por citometría de flujo de la expresión de Bcl-2. MΦ fueron cultivados por 18 horas con las cepas H37Rv, M y 410 inactivadas por calor a una relación 1MΦ:2*Mtb.* No se observaron diferencias significativas entre tratamientos. n=10

- **Las características antiapoptóticas de la cepa M podrían deberse en parte a la interferencia con la vía intrínseca, aunque queda por determinar el mecanismo que utiliza.**

- **La cepa 410 sólo pudo inhibir la apoptosis inducida por ST, resultado que junto con la baja pérdida del $\Delta\Psi_m$ observada, nos sugieren que H37Rv activa otra cascada de señalización que no involucra la vía intrínseca.**

### 4.3.5.d. Evaluación de la vía extrínseca de apoptosis

La vía extrínseca de la apoptosis involucra receptores de muerte de transmembrana pertenecientes a la superfamilia de receptores de TNF-α (TNFR) siendo las interacciones FasL/FasR y TNF-α/TNFR1 las mejor caracterizadas. Por lo tanto, evaluamos si las diferencias observadas en la inducción de apoptosis podrían deberse a la expresión diferencial de estos receptores en el MΦ.

Primeramente determinamos la expresión de TNFR1 (proapoptótico) y TNFR2 (activación de NFκB y supervivencia) en los MΦ estimulados con *Mtb*, no observándose diferencias tanto en la expresión de TNFR1 y/o $TNFR2^+$ (Fig. 4.3.14a) como en el

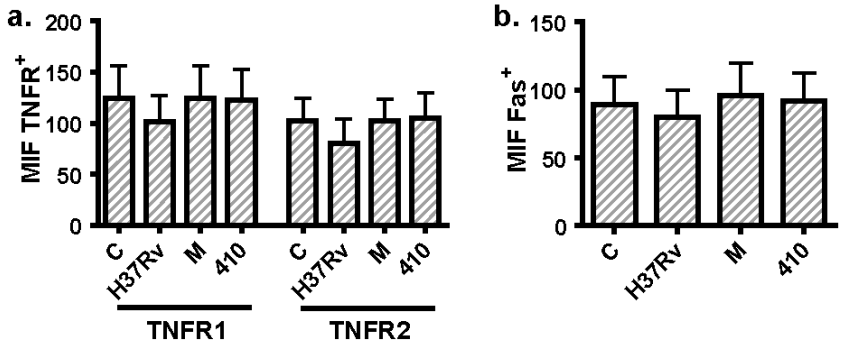



**Figura 4.3.14: Las cepas H37Rv, M y 410 no inducen la modulación de los receptores de muerte clásicos.** Expresión en superficie de receptores de la familia TNFR. MΦ fueron incubados durante 18h con las cepas H37Rv, M y 410 inactivadas por calor a una relación 1MΦ:2Mtb. No se observaron diferencias en la expresión de los receptores TNFR1, TNFR2 ni Fas. n=6

porcentaje de MΦ (datos no mostrados). Tampoco se observó modulación del FasR por las cepas (Fig. 4.3.14b).

◈ **La diferencia en apoptosis no puede ser explicada por expresión diferencial de éstos receptores inducidos por *Mtb*.**

Por otro lado, se ha propuesto que la inducción de muerte por las cepas proapoptóticas de *Mtb* estaría mediada por el TNF-α, el cual actuaría en forma autócrina

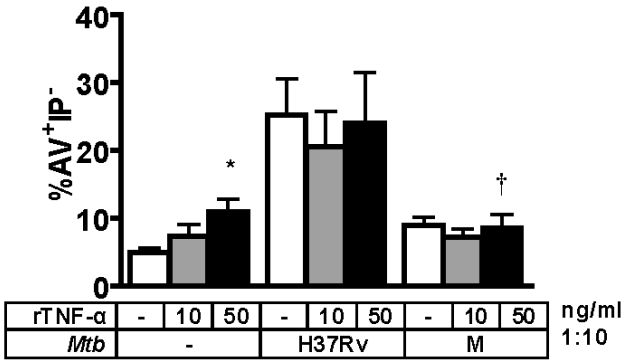



**Figura 4.3.15: La baja inducción de apoptosis por la cepa M no se debería a la falta de producción de TNF-α.** Inducción de apoptosis en MΦ con H37Rv y M en presencia de rTNF-α. Los MΦ fueron incubados durante 1 hora con las cepas H37Rv o M y luego se agregó rTNF-α en dos dosis diferentes (10 y 50 ng/ml) durante 4 horas. La CK recombinante indujo apoptosis en un bajo porcentaje de MΦ (C vs. rhTNF- α: *p<0,05), pero no aumentó la muerte inducida por las cepas de *Mtb*. El nivel de inducción de apoptosis por la cepa M se mantuvo bajo aun en presencia de 50ng/ml de rTNF-α (H37Rv vs. M+ rTNF-α: †p<0,05). 1MΦ: 20 *Mtb*. n=7

sobre los MΦ [130]. Dado que los MΦ estimulados con las cepas de *Mtb* no presentaron diferencias en la expresión de los TNFR pero M indujo bajos niveles de TNF-α (Fig. 4.1.2, 4.2.3), nos preguntamos si la baja apoptosis inducida por M podía ser revertida por el agregado exógeno de TNF-α. Para ello, los MΦ fueron estimulados durante 1 h con H37Rv o M y luego tratados con TNF-α recombinante (rTNF-α) durante las siguientes 4 h. Como se observa en la Fig. 4.3.15, el agregado exógeno de rTNF-α (50ng/ml) en ausencia de antígeno aumentó significativamente la apoptosis (MΦ-$AV^{+}IP^{-}$), sin embargo, no alteró la apoptosis inducida por H37Rv o M.

- **Estos resultados sugieren que el bajo nivel de TNF-α inducido por la cepa M no es causante de la falta de inducción de apoptosis del macrófago.**

# 5. DISCUSIÓN

# 5. DISCUSIÓN

## 5.1. Interacción de las cepas MDR con los monocitos y PBMC en pacientes S- y MDR-TB

### 5.1.1. La respuesta inmune frente a *Mtb* depende del *status* inmunológico del dador

La tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB) representa un gran desafío sanitario. Su tasa de mortalidad es muy alta debido a la complejidad del protocolo terapéutico y su baja efectividad comparada con el tratamiento de primera línea. Si bien la historia de tratamiento previo se asocia fuertemente con la MDR-TB [18], en regiones como nuestro país en los que cepas prósperas MDR se han propagado dando lugar a epidemias, este parámetro ya no es un buen indicador de multirresistencia a drogas (Ritacco V. comunicación personal). En Argentina, el tratamiento es diseñado en cada caso de acuerdo con el perfil de resistencias a drogas [18] (Tabla 2.4) y adecuados según aparezcan reacciones adversas, por lo cual la efectividad del mismo, medido como el tiempo requerido hasta lograr la baciloscopía negativa, es muy variable y suele ser prolongado (Sección 3.1; tabla 4.1). Además, si tenemos en cuenta que algunos genotipos de *Mtb* parecen ser más propensos a adquirir resistencias a drogas que otros [30], podemos comprender que los pacientes MDR-TB forman en realidad un grupo heterogéneo y con características diferentes a aquellos pacientes con TB sensible a drogas. Más aún, se ha propuesto que la respuesta inmune defectuosa de los pacientes MDR-TB estaría relacionada con la baja efectividad de la quimioterapia [131]. Poco se conoce de la respuesta inmune en estos pacientes, aunque se han reportado algunas diferencias en la inmunología de los MDR-TB con los pacientes S-TB que responden al tratamiento de primera línea [132-135].

Los pacientes MDR-TB incluidos en este trabajo presentaron en su mayoría daño pulmonar severo, y el tiempo requerido para la negativización del esputo fue mayor a 60 días en el 75% de los casos, registrándose un caso que se mantuvo bacilífero por más de dos años (Tabla 4.1). La gran variabilidad observada se debería a las dificultades que presenta el tratamiento, como el tiempo requerido hasta la obtención del patrón de

resistencias, disponibilidad de drogas eficientes y las complicaciones debidas a los efectos secundarios de las mismas. Más del 80% de los aislados provenientes de estos pacientes fueron resistentes a 3 o más drogas, verificándose el fenómeno de amplificación de la resistencia [25]. Paralelamente, más de un tercio de los casos de MDR evaluados en nuestra casuística habrían sido primarios, o sea, por contagio directo con una cepa MDR.

En primer lugar nos propusimos caracterizar los Mo de sangre periférica de los pacientes MDR-TB. La importancia de los Mo en la respuesta inmune radica en su capacidad migratoria, ya que son capaces de diferenciarse a MΦ en el sitio de infección luego de abandonar el torrente sanguíneo. Los Mo circulantes constituyen un grupo heterogéneo y se pueden discriminar distintos *subsets* de acuerdo a la expresión de CD16. Los Mo "proinflamatorios" $CD14^{+}CD16^{+}$ tendrían capacidad migratoria y función efectora distinta al subset mayoritario $CD16^{-}$ [116]. El aumento de Mo $CD16^{+}$ circulantes se ha observado en numerosas afecciones como el VIH/SIDA [111], síndrome urémico hemolítico (SUH) [113], esclerosis múltiple [114], pacientes recibiendo hemodiálisis [115], sepsis [112] y TB [136] entre otros. Debido a estas observaciones y a su mayor capacidad de producir TNF-α e IL-1β frente al LPS [120] se los llamó Mo proinflamatorios, aunque su rol en la inflamación continúa siendo materia de debate. Si bien se ha reportado que el tratamiento con glucocorticoides disminuye esta población [114], su aumento en sangre periférica de pacientes $VIH^{+}$ ha sido atribuido a la CK TGF-β conocida por su rol en la regulación negativa de la respuesta inmune [111]. Más aún, Ancuta y col. han descripto que Mo $CD16^{-}$ de dadores sanos pueden adquirir los fenotipos $CD14^{++}CD16^{+}$ y $CD14^{+}CD16^{++}$ al ser incubados con IL-10 y GM-CSF+IL-4+IL-10 respectivamente [117]. Recientemente, se ha propuesto en base a análisis de transcriptómica que los subsets $CD14^{++}CD16^{-}$, $CD14^{++}CD16^{+}$ y $CD14^{+}CD16^{++}$ son estadios de diferenciación secuenciales de los Mo [137]. Los pacientes MDR-TB estudiados tienen aumentado el *subset* $CD16^{+}$ de manera similar a los pacientes S-TB y no hemos encontrado asociación entre el %Mo-$CD16^{+}$ y el tiempo de negativización del esputo (Fig. 4.1.6a). La expresión de CK no pudo ser determinada de manera directa en los distintos *subsets* de Mo, debido a que la expresión de CD16 en cultivo decae rápidamente ([120] y datos no mostrados). Si bien se trata de una observación indirecta, es llamativo que en aquellos pacientes con mayor % Mo-$CD16^{+}$ circulantes la expresión de IL-1β fue menor (Fig. 4.1.5). Este resultado estaría en concordancia con el aumento de expresión de la hemooxigenasa I (HMOX I) en el subset $CD16^{+}$ [137], cuya expresión regularía negativamente la capacidad de producción de IL-1β del Mo frente al LPS [138]. Por otro lado, la correlación negativa entre la

inducción de IL-1β y el tiempo de negativización del esputo en los pacientes MDR-TB sugiere un rol protector de esta CK (Fig. 4.1.6c).

Numerosos artículos reportan que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes con TB tienen alterada su capacidad de producción de CK y respuesta proliferativa al ser estimulados *in vitro* con antígenos de *Mtb* [58, 121, 133, 139-141]. Nuestros resultados muestran que los Mo estimulados con *Mtb* tanto de los pacientes S-TB como de los MDR-TB tienen una menor expresión de TNF-α e IL-1β (Fig. 4.1.2 y .3). Los pacientes con TB tienen altos niveles de TNF-α sérico [141] y se ha observado que parte de esta CK se encuentra ocupando los receptores de TNF-α de los Mo circulantes [142], lo cual podría estar activando un mecanismo de retroalimentación negativa en estas células. Por otro lado, la modulación de estas CK proinflamatorias en los pacientes con TB ha sido relacionada con la producción de óxido nítrico (NO) [131, 141] y con la CK antiinflamatoria IL-10 [133], cuya producción se encuentra aumentada en las PBMC de sangre periférica de los pacientes S-TB [133, 139] y MDR-TB [134, 135]. Takashima y col. han reportado que los MΦ diferenciados a partir de Mo de pacientes TB también tienen menor capacidad de secreción de TNF-α, lo cual sugiere una alteración profunda en estas células que persiste aun fuera del contexto inflamatorio del paciente [143].

El aumento en la producción de IL-10 por los Mo podría explicar en parte la baja respuesta de CK inflamatorias en los pacientes S-TB pero no en los MDR-TB (Fig. 4.1.4c). Sin embargo, se debe tener en cuenta que existen otras fuentes de IL-10 como los Ly T convencionales, los cuales producen IL-10 tanto en los pacientes S-TB como MDR-TB [135], y otras CK antiinflamatorias como el TGF-β. Más aún, recientemente se han propuesto mecanismos regulatorios mediados por Ly T $CD25^{high}Foxp3^{+}$ especializados llamados Ly T regulatorios (Treg) [144]. La supresión de CK proinflamatorias sería específica para la respuesta a antígenos de *Mtb* ya que la estimulación con LPS induciría niveles de TNF-α similares en PBMC de pacientes y dadores sanos [133].

El IFN-γ es una de las CK centrales en la respuesta protectora contra la TB. Contrariamente a lo observado en los Ly [135], la producción de IFN-γ inducida por *Mtb* en los Mo fue mayor en los pacientes que en los dadores sanos, y se ha propuesto que la producción del mismo por células mieloides podría ser relevante en el inicio de la respuesta inmune [119]. Además, recientemente se ha descripto que las CD pueden producir IFN-γ en respuesta a la estimulación con BCG de manera TLR2 dependiente

[145]. Aunque la relevancia fisiológica del IFN-γ de origen mieloide continúa siendo controversial, la expresión de IFN-γ observada en los Mo de los pacientes es llamativa, ya que sus Ly se encuentran exhaustos por la persistente estimulación antigénica *in vivo* y su respuesta *in vitro* se encuentra deprimida [132, 134, 135].

IL-12 es una CK producida por Mo, MΦ y CD que estimula la producción de IFN-γ por los Ly polarizando la respuesta inmune hacia un perfil Th1. En términos generales, la capacidad de producción de IL-12 en los Mo de S-TB fue ligeramente mayor que en los N y MDR-TB. Un patrón similar en la producción de IL-12 fue reportado por Sharma y col. [131]. Previamente, nuestro grupo ha observado que independientemente de la cepa utilizada, la respuesta a *Mtb* de los Ly de pacientes S-TB y MDR-TB estaría desviada hacia un perfil Th2 puesto que, además de la baja producción de IFN-γ, presentaron una mayor producción de IL-4 que los N [135]. Este hecho no podría ser atribuido a la ausencia de IL-12 y probablemente se debería a la acción de Ly Treg, ya que su depleción revirtió el perfil de CK hacia Th1 [135]. Estas observaciones también explicarían en parte la baja respuesta linfoproliferativa observada en los pacientes S-TB (Fig. 4.1.9), aunque no se pueden descartar otros mecanismos como la muerte por apoptosis de los clones reactivos a antígenos de *Mtb* [146]. Sin embargo, nosotros no encontramos correlación entre la baja respuesta proliferativa y el recuento de Ly $CD4^+/mm^3$ en nuestro pacientes MDR-TB como se ha reportado (datos no mostrados) [132].

En conjunto, nuestros datos muestran que los pacientes tienen un patrón de producción de CK y capacidad linfoproliferativa alterados, probablemente debido al proceso inflamatorio crónico que los afecta. Si bien la respuesta en pacientes S-TB fue diferente a la de los MDR-TB en algunos aspectos estudiados, no hallamos un factor determinante para la discriminación entre ambos grupos.

Desde principios de la década del ’90 el Servicio de Micobacterias del Instituto ANLIS-Malbrán se realiza la genotipificación molecular de los aislados clínicos provenientes de pacientes con MDR-TB. Esta caracterización que aporta información epidemiológica muy valiosa no se realiza de rutina en los pacientes con TB sensible a drogas. Se ha reportado que ciertos genotipos de *Mtb* se asocian a una mayor infecciosidad [147] y virulencia [17], así como con las formas más severas de TB tanto en humanos [65] como en modelos animales [148, 149]. Nuestros datos muestran que los aislados pertenecientes a las familias LAM y Haarlem son los predominantes tanto en S-TB como en MDR-TB. La prevalencia de la cepa M continúa siendo importante, ya que

representó el 24% de los casos incluidos en nuestro trabajo. La baja representación del linaje T dentro de los casos MDR-TB es llamativa, ya que este genotipo constituye cerca de un tercio de los casos de S-TB [135].

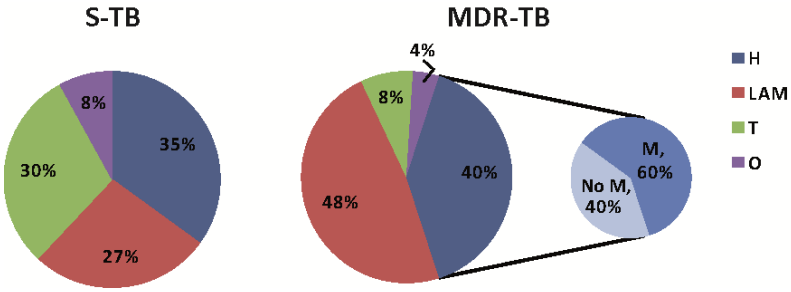



**Fig. 5.1:** Distribución de las familias de *Mtb* en S-TB y MDR-TB. H: familia Haarlem.
Geffner, 2009, *IAI* y Tabla 4.1

En el presente trabajo no encontramos diferencias significativas en el %Mo-CD16$^+$ ni en la expresión de CK proinflamatorias entre los pacientes infectados con cepas de las dos principales familias, Haarlem y LAM. Llamativamente, los dos únicos casos infectados con el genotipo T tuvieron un menor %Mo-CD16$^+$ y tiempo de negativización. Esta tendencia deberá ser confirmada con una mayor casuística, pero sugiere que dentro de esta familia, el costo en el *fitness* que implica la adquisición de resistencias podría ser mayor, lo cual se refleja en su baja representación en la población MDR.

### 5.1.2. La respuesta linfoproliferativa y de producción de CK en Mo es la resultante de la interacción del huésped con los distintos genotipos de *Mtb*

Inicialmente se consideró que las cepas MDR de *Mtb* serían menos virulentas/infecciosas ya que las sucesivas mutaciones de genes esenciales para la supervivencia del bacilo implicarían un costo en el *fitness* para el mismo (Sección 2.2.2). Es cada vez más evidente que este supuesto era erróneo ya que aún las cepas que han acumulado 4 o más resistencias a drogas han sido capaces de generar brotes [17]. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos que determinan el éxito o fracaso epidemiológico de un genotipo, como en el caso de las cepas evaluadas en este trabajo.

TNF-α es una de las CK fundamentales para una respuesta inmune protectora frente a *Mtb*. Ratones KO para TNF-α son altamente susceptibles a la infección aguda con *Mtb* [150, 151], y se ha observado que en aquellas personas infectadas latentemente con *Mtb* y que desarrollan artritis reumatoidea, la probabilidad de desarrollar una TB activa aumenta cuando se instaura el tratamiento con anti-TNF-α [152]. Las cepas M y 410 son menos inductoras de TNF-α en Mo, y este hecho se evidenció en los dadores sanos, demostrando que esta respuesta dependería tanto del genotipo de *Mtb* como de los factores asociados al huésped (Sección 5.1.1).

La relevancia de IL-1β, una CK de conocida función proinflamatoria, en la respuesta inmune frente a *Mtb* fue revalorizada recientemente. La conversión de IL-1β en su forma activa depende del procesamiento proteolítico mediado por la caspasa-1 que a su vez es activada por una plataforma de señalización conocida como inflamasoma. Sus subunidades con repeticiones ricas en leucinas (LRR; características de los TLR) son capaces de reconocer antígenos intracelulares que inducen la formación de este complejo multiproteico [118, 153]. Por otro lado, ratones KO para el receptor de IL-1β de tipo 1 (IL1R1) son altamente susceptibles a la infección por *Mtb*, y presentan una respuesta inflamatoria exacerbada, alta carga bacilar y ausencia de granulomas organizados en el pulmón. Estas observaciones sugieren un rol de IL-1β en la respuesta protectora contra *Mtb*. La “región de diferencia 1” (RD1) del genoma de *Mtb*, inicialmente descripta como una región ausente en BCG, contiene genes asociados a proteínas de secreción como el ESAT-6. Kurenuma y col. han reportado que mutantes de H37Rv con una región RD1 deficiente es incapaz de inducir la activación de la caspasa-1, y en consecuencia de IL-1β e IL-18 [154]. Sin embargo, la producción de TNF-α no se vio alterada, lo cual indica que la inducción de ambas CK involucraría estímulos antigénicos diferentes. Por otro lado, se ha reportado que IL-1β es también esencial para la polarización de la respuesta T hacia un perfil Th17 [155], al cual se le ha atribuido un rol protector en TB recientemente [56]. En este trabajo observamos que las cepas M y 410 tienen una cinética de expresión intracelular de IL-1β diferente a H37Rv en dadores sanos (Fig. 4.1.3). Si bien H37Rv indujo tempranamente un pico de expresión de IL-1β, ambas cepas MDR mantuvieron el %Mo-IL-1β$^{+}$ aún a las 18h post estimulación en dadores sanos. En los pacientes S-TB se observó un patrón similar, mientras que la expresión sostenida de IL-1β se vio exacerbada en los pacientes MDR-TB. Lo observado en N con M y 410 podría deberse a la falta de algún mecanismo de *feedback* negativo y/o inhibición en la liberación de esta CK al medio

extracelular. En conjunto, estos datos sugieren que M y 410 inducen una expresión de IL-1β sostenida la cual depende a su vez del huésped.

La alta susceptibilidad de los ratones IL1R1$^{-/-}$ a *Mtb* fue atribuida en parte a la falta de producción de IL-12p40 por MΦ [156]. Recientemente Dao y col. han observado que TDM aislado de un mutante de *Mtb* es capaz de inhibir la producción de IL-12p40 inducida por LPS en MΦ. Esta característica estaría asociada al gen *mmA4*, y el *knock out mmA4*$^{-/-}$ que carece de una metil transferasa involucrada en la síntesis de ácidos micólicos, presenta un fenotipo atenuado en el modelo de infección murino [85]. Es bien conocido el papel de IL-12 en la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1, y se ha propuesto que su inhibición podría ser un mecanismo de virulencia utilizado por *Mtb*. Si bien no observamos diferencias en la inducción de IL-10 e IFN-γ en Mo entre las cepas estudiadas, tanto en dadores sanos como en los pacientes MDR-TB, la cepa no próspera 410 fue capaz de inducir mayor %Mo-IL-12$^{+}$, sugiriendo que la pérdida de la habilidad de inhibir la producción de IL-12 podría estar relacionada con su baja virulencia.

A diferencia de los componentes innatos del sistema inmune, los Ly CD4 y CD8 reconocen antígenos proteicos y lipídicos específicos presentados en el contexto de MHCI, MHC II y CD1. El 90 % de las personas que tienen contacto con *Mtb* son capaces de contener la infección generando una respuesta inmune que mantiene al bacilo en estado latente a lo largo de la vida. La infección latente puede ser evidenciada en estos individuos asintomáticos por la prueba de tuberculina, reflejo de la memoria inmunológica frente a antígenos proteicos secretorios de *Mtb*. Nuestros resultados indican que la cepa M sería menos antigénica que H37Rv y 410 ya que en dadores sanos PPD$^{+}$ la respuesta linfoproliferativa fue menor. Estos resultados sugieren que podrían haber diferencias en la composición antigénica entre las cepas y/o en moléculas presentadoras de antígenos o coestimulatorias en los MΦ. En este sentido, la baja inducción de MHC II observada en MΦ tratados con M, puede explicar en parte la menor respuesta linfoproliferativa observada frente a esta cepa (Fig. 4.1.9). Sin embargo, es evidente que otros factores de la interacción Ly-CPA son importantes, ya que a pesar que la cepa 410 no *up*-reguló MHC-II e incluso disminuyó la expresión de MHC-I en MΦ, su capacidad para inducir proliferación fue mayor que la cepa M. Por otro lado, los resultados observados en pacientes, sugieren que la respuesta linfoproliferativa está determinada tanto por las características intrínsecas del genotipo de *Mtb* como del huésped.

En conjunto, nuestros resultados ponen de manifiesto que la respuesta inmune frente a *Mtb* sería el resultado de la interacción entre el genotipo de la cepa infectante así como de factores directamente ligados al huésped. Las diferencias entre cepas fueron más evidentes en dadores sanos debido a que su respuesta inmune no se encuentra impedida como lo es en los pacientes.

### 5.1.3. Interacción de las cepas MDR con el MΦ

Los MΦ son componentes prototípicos de la respuesta inmune innata. Durante la formación del granuloma tuberculoso, los neutrófilos serían los primeros en llegar al sitio de infección seguidos por los Mo [157]. Los MΦ se diferencian a partir de Mo circulantes que extravasan a los tejidos inflamados por la acción de mediadores solubles quimiotácticos y moléculas de adhesión expresados en los vasos sanguíneos [158]. Durante el proceso de diferenciación de Mo a MΦ se producen cambios fenotípicos como aumento del tamaño celular, cambios en la capacidad migratoria y fagocítica, disminución en la expresión del CD14, TLR2 y TLR4, entre otros. El receptor de manosa (MR) es un marcador de diferenciación a MΦ ya que se encuentra altamente expresado en estos pero está ausente en los Mo, mientras que otros receptores como el Dectin-1 son comunes a ambos tipos celulares [158]. El MΦ es el nicho preferido de *Mtb* y el crecimiento de las micobacterias intracelulares sería más eficiente en MΦ que en Mo [97].

El perfil de producción de CK en MΦ inducida por las cepas inactivadas por calor fue ligeramente distinta a la observada en Mo dadores sanos. Estas diferencias podrían deberse a los cambios en la función efectora y en los receptores de reconocimiento de micobacterias que tienen lugar durante el proceso de diferenciación. Sin embargo, la influencia de otros tipos celulares de respuesta aguda como las células NK y Ly γδT presentes en el cultivo de PBMC sobre los Mo no puede ser descartada.

La respuesta inducida por las tres cepas evaluadas en el MΦ, sumado a los resultados obtenidos en Mo, indican que existen diferencias antigénicas tanto entre la cepa de referencia H37Rv y los aislados clínicos MDR estudiados, así como entre M y 410, las cuales se discutirán a continuación.

## 5.2. Interacción de las cepas MDR con el sistema inmune y su relación con el éxito o fracaso epidemiológico

La principal diferencia entre las cepas M y 410 es su historia epidemiológica. A pesar de estar genéticamente relacionadas, M causó un extenso brote de MDR-TB y logró perpetuarse en la comunidad, mientras que el patrón de RFLP *IS6110* de la cepa 410 fue observado sólo dos veces en más de una década. Este aislado provino de una paciente de 38 años de sexo femenino, seronegativa para VIH, la cual fue diagnosticada como MDR-TB en el año 1992 en el hospital Cetrángolo de la Provincia de Buenos Aires. Fue atendida sucesivamente en el hospital Tornú, en donde le realizaron un tratamiento quirúrgico, y en el hospital Muñiz, ambos de la Ciudad de Buenos Aires. A pesar de su fidelidad al tratamiento la paciente fallece en el año 1999 a causa del severo daño pulmonar que la afectaba. La historia de esta paciente nos dice que este genotipo MDR no se transmitió a nuevos huéspedes a pesar de haber estado en contacto con la comunidad durante más de siete años. La baja prosperidad de la cepa 410 podría estar ligada a una mutación poco frecuente en el gen *rpoB*, el cual confiere la resistencia a RMP. Tanto M como 410 poseen la mutación en el gen *katG* ligada a la resistencia a INH observada con más frecuencia en los aislados resistentes a drogas (Ser315→Thr; nomenclatura para *E. coli*) [159]. La mutación más frecuente en el gen *rpoB* de los aislados clínicos resistentes a RMP es Ser531→Leu [160], hallada en la cepa M (V. Ritacco, comunicación personal), sin embargo, la cepa 410 tiene una mutación poco frecuente (His526→Leu). La baja representación de esta variante entre los aislados clínicos de MDR sugiere que dicha mutación podría implicar algún costo en su *fitness*, ya que este gen codifica para la ARN polimerasa. Cabe destacar que el crecimiento de 410 tanto en medio líquido como dentro del MΦ no está alterado, e incluso su replicación intracelular es mayor que la de M y H37Rv (Fig. 4.3.2), sugiriendo que la baja transmisibilidad de la cepa 410 se debería a su interacción con el sistema inmune, más que a una mutación deletérea que impide su replicación.

Algunos de los parámetros estudiados no permitieron discriminar la cepa próspera de la no próspera pero sí de la cepa de referencia H37Rv, como la inducción de TNF-α e IL-1β en Mo. Las dos cepas MDR estudiadas pertenecen al linaje Haarlem, mientras que H37Rv pertenece a la familia Tuscany. La familia Haarlem se ha asociado con una mayor capacidad de adquirir resistencia a drogas y generar brotes de MDR-TB, de manera similar a la familia Beijing [161, 162]. Si bien no se encontraron en esta familia mutaciones

puntuales en genes de reparación del ADN relacionados con una mayor tasa de mutación [163], otros autores han descripto que la familia Haarlem tiene un polimorfismo específico para el gen *mgtC* [164]. Dicho gen está relacionado con el crecimiento en condiciones de baja disponibilidad de $Mg^{2+}$ como lo es el fagosoma [165]. Las diferencias observadas entre las cepas MDR y H37Rv pueden deberse al *background* genético, más que a las mutaciones que puntualmente les confieren las resistencias a drogas. Lamentablemente, hasta el presente no se ha aislado la cepa pansensible a drogas que represente al genotipo ancestral que dio lugar a M y 410 para poder investigar la influencia de las mutaciones en los genes de resistencia. Estas cepas tienen otra gran diferencia con H37Rv, y es la presión de selección a la que han estado sometidas. H37Rv fue aislada por primera vez en 1905, en el Instituto Trudeau de EEUU [166] y es la cepa de referencia más utilizada en el mundo. Si bien la virulencia en animales se mantuvo constante a pesar de los sucesivos pasajes, se desconoce si continúa siendo patógena para el hombre. Teniendo en cuenta la complejidad de la interacción entre el sistema inmune y *Mtb*, sería razonable que existan diferencias entre H37Rv y los aislados clínicos que estuvieron sometidos a la presión de selección ejercida por el hombre (respuesta inmune, vacunación, antibióticos).

Si bien se han descripto numerosos mecanismos de escape de la respuesta inmune utilizados por *Mtb* [90, 122], poco se sabe de la relación entre estas características y el éxito o fracaso epidemiológico de un determinado genotipo. Nuestros resultados sugieren que algunos de estos mecanismos podrían estar compartidos por las cepas estudiadas, como la *down*-regulación del receptor de IFN-γ (Fig. 4.3.1). Este mecanismo de escape sería específico de las micobacterias patógenas y se ha observado que la baja expresión de IFNR en los Mo de pacientes puede ser revertida con el tratamiento [123].

Así mismo, nuestros resultados tuvieron variaciones asociadas a la utilización de cepas inactivadas por calor, γ-irradiadas y vivas. A pesar de esto, la cepa M siempre fue una baja inductora de TNF-α (Fig. 4.1.2, 4.2.3, 4.3.5), mientras que 410 sólo se diferenció de M cuando se enfrentó al MΦ con la bacteria viable. Más aún, observamos un patrón similar para IL-10. La información publicada en lo que respecta a la inducción de TNF-α y su relación con el genotipo de *Mtb* es contradictoria. En este contexto, algunos trabajos reportan que los aislados clínicos virulentos inducen mayor producción de TNF-α que H37Rv [167], otros comunican lo contrario [125, 148, 168, 169] y otros sostienen que

cepas de *Mtb* virulentas, atenuadas y micobacterias no patógenas inducen niveles similares de esta CK [126]. Sin embargo, dada la importancia de TNF-α en la respuesta protectora contra la TB la diferencia observada entre las cepas podría ser relevante.

Las diferencias entre las cepas también se pusieron de manifiesto en la inducción de muerte del MΦ, la cual estaría relacionada con la virulencia de *Mtb* (Sección 2.3.3). Si bien M indujo bajos niveles de apoptosis, la muerte desencadenada por 410 fue por necrosis del MΦ, característica que se pierde en parte al inactivar la bacteria por calor. La técnica de AV-IP no permite discriminar ente apoptosis tardía y necrosis, por lo que no podemos descartar que la muerte inducida por 410 γ-irradiada se trate de un proceso apoptótico clásico de muy rápida progresión. Si las células apoptóticas tempranas no son rápidamente fagocitadas, éstas pierden su integridad de membrana conduciendo a una necrosis secundaria, lo cual fisiológicamente puede llevar a una respuesta inflamatoria aunque inicialmente la muerte haya sido por apoptosis. Alternativamente, 410 podría ser inductora de la recientemente descripta vía independiente de caspasas (Fig. 2.3.6), la cual se caracteriza por una rápida pérdida de la integridad de membrana plasmática y del $\Delta\Psi_m$ [99, 129]. Si bien nosotros hemos observado que la activación de caspasa-3 por la cepa 410 inactivada por calor fue aún menor que para M, este dato, junto con la pérdida del $\Delta\Psi_m$, deberá ser corroborado con la bacteria γ-irradiada/viva para determinar fehacientemente el tipo de muerte inducido por 410. Se ha propuesto que la muerte por necrosis de la célula huésped sólo es inducida cuando la carga bacilar es alta (MOI=20), para lograr la citólisis y liberación al medio extracelular, luego de lo cual el bacilo podría infectar nuevas células o un nuevo huésped [99]. Así, la muerte por necrosis del MΦ sería ventajosa para *Mtb* frente a una alta carga bacilar, en cambio, a baja carga bacilar (MOI=5) el crecimiento bacteriano se vería impedido [170], probablemente debido a la pérdida de su nicho. Extrapolando estos resultados observados *in vitro* a la patología humana, lo mejor para el bacilo es inhibir la muerte del MΦ (tanto por apoptosis como por necrosis) en las etapas tempranas, e inducir la lisis celular en un estadio avanzado de la infección.

Una de las características distintivas de la cepa M fue su capacidad de inhibir en el MΦ la muerte por apoptosis. La baja inducción de muerte por esta cepa sería la resultante de una señal proapoptótica débil independiente de TNF-α sumada a un mecanismo inhibitorio, el cual sería específico para la apoptosis ya que M no fue capaz de interferir con la producción de TNF-α/IL-1β. Si bien ambas cepas, 410 y M, fueron capaces de

inhibir la vía intrínseca de la apoptosis de manera similar, sólo M interfirió con la muerte inducida por H37Rv. Por otro lado, H37Rv no fue capaz de inducir la pérdida de $\Delta\Psi_m$ a pesar de que la exposición de PS fue mayor. En conjunto, estos datos nos sugieren que la cepa de referencia podría estar activando la vía extrínseca. Además, la ausencia de la regulación de los receptores de muerte clásicos como TNFR y Fas, y la baja influencia del TNF-α sobre la apoptosis inducida por M nos sugieren que otros receptores estarían involucrados en dicho proceso. En la actualidad se conoce que los TLR también son capaces de inducir apoptosis a través de las moléculas adaptadoras MyD88 y TRIF/RIP que a su vez pueden reclutar a FADD activando a la caspasa-8 [171]. Se ha reportado que tanto la infección con H37Rv [172] como las lipoproteínas de 19KDa y 38KDa purificadas, podrían ser las iniciadoras de esta vía mediada por TLR2 [104, 105]. Recientemente se ha reportado que la apoptosis inducida por *Mtb* dependería de la vía TLR2/MyD88, y simultáneamente TLR4 transduciría señales que inhiben la necrosis del MΦ [172]. Paralelamente, se demostró que PG y LPS, ligandos clásicos de TLR2 y TLR4, inhiben la apoptosis inducida por *Mtb*. Si bien nosotros observamos que M es capaz de interferir con la señal proapoptótica inducida por H37Rv, queda por determinar si la interferencia con los TLR u otros receptores es el mecanismo involucrado en la resistencia a la muerte del MΦ inducida por M. Llamativamente, M no fue capaz de inhibir la expresión de TNF-α inducida por H37Rv, a pesar de que la expresión de esta CK también ha sido asociada con TLR2 y 4. La interferencia de la cepa M en la apoptosis y no en la expresión de TNF-α sobre H37Rv podría deberse a la participación de otros receptores que determinan los eventos de señalización que ocurren río abajo en la cascada de señalización inducida por TLR.

Paralelamente, distintas moléculas de la familia de Bcl-2 han sido involucradas en la inhibición de la vía intrínseca, como A1[173], Bcl-2 [174, 175], y Mcl-1 [176]. La interferencia de M y 410 con la vía intrínseca no pudo ser atribuida a una mayor expresión de Bcl-2, pero no podemos descartar la participación de otras moléculas de esta familia. Por otro lado, hemos observado previamente que los MΦ incubados con la cepa M son menos susceptibles a la citotoxicidad mediada por Ly T $CD8^+$ [135]. Si bien la citólisis mediada por Ly involucra mecanismos efectores diferentes a los estudiados en esta tesis (gránulos citotóxicos como perforina, granulisina y granzima B), es llamativo que la cepa M, y no la 410, también interfiera con este mecanismo de defensa que preserva la integridad del MΦ.

Los miembros del género *Mycobacterium* pueden ser clasificadas en dos grandes grupos según su tiempo de replicación, esto es, en micobacterias de crecimiento rápido y de crecimiento lento. Las micobacterias patógenas, incluyendo al complejo *Mtb*, pertenecen al segundo grupo, lo cual hizo suponer que existe una relación directa entre replicación y patogenicidad. En general se ha asociado la mayor virulencia de los aislados clínicos con un mayor crecimiento intracelular en modelos *in vitro*, especialmente para los miembros de la familia Beijing [124, 168, 177], el cual correlaciona con una mayor carga bacilar en los pulmones de ratones infectados con cepas de este linaje [40, 177]. Sin embargo, este no fue el caso para las cepas MDR estudiadas: M se replicó a una tasa semejante a H37Rv (quizás ligeramente menor) y el mayor crecimiento intracelular se observó con 410 (Fig. 4.3.2). Los tiempos de duplicación en medio líquido fueron de 24.4h para M, 17.6h para 410 y 18h para H37Rv, lo cual coincide parcialmente con la replicación intracelular. Sin embargo, el crecimiento de 410 se vio exacerbado dentro del MΦ y por el contrario, a pesar de la lenta replicación de M el número de bacilos viables recuperados no fue significativamente menor a H37Rv. Más aún, en el día 0, a pesar de que el porcentaje de infección y la carga bacilar determinados por la tinción de Ziehl-Neelsen fueron menores con las cepas MDR, no se observaron diferencias en las UFC recuperadas. Estas observaciones nos indican que efectivamente, el crecimiento intracelular neto resulta del balance entre la supervivencia de *Mtb* dentro del MΦ y la capacidad de replicación intrínseca de cada genotipo.

El mayor crecimiento intracelular observado con la cepa 410 es coherente con observaciones previas realizadas en ratones (B. López, datos no publicados). López y col. comunicaron que las cepas de la familia Beijing y H37Rv inducen el 100% de muerte en ratones a las 4 y 12 semanas post-inoculación respectivamente [40]. Utilizando el mismo modelo y condiciones experimentales similares, observaron que, a pesar de que la infección con la cepa 410 resulta en una mayor carga bacilar en los pulmones la sobrevida de los animales infectados tanto con M como con 410 fue mayor a 15 semanas. Además, los animales infectados con 410 presentaron una mayor inflamación intersticial y perivascular, mayor reacción de hipersensibilidad retardada, así como un mayor número de granulomas. En cambio, la infección con M indujo un mayor daño tisular (área neumónica) a los 60 días post infección, probablemente debido a diferencias en la inducción de la respuesta adaptativa. Cabe aclarar que el inóculo utilizado para infectar a estos ratones fue elevada ($2x10^5$~$10^6$ UFC vía intratraqueal). Si bien el modelo murino no refleja la patología humana con exactitud, se podría postular que, mientras M mantiene un

estado de quiescencia por tiempos más prolongados, induciendo una respuesta adaptativa defectuosa, la mayor inflamación inducida por 410 en las etapas tempranas contribuiría con su erradicación. Esta hipótesis sería coherente con la mayor inducción de TNF-α observada en los MΦ infectados con 410 (Fig. 4.3.5). Además, si tenemos en cuenta que las células necróticas son capaces de inducir inflamación [178], podemos especular que la respuesta observada en los ratones podría explicarse en parte a la necrosis del MΦ inducida por la cepa 410 γ-irradiada. Más aún, el porcentaje de infección de los MΦ fue aumentado a lo largo de los días, probablemente debido a la liberación de bacilos al medio extracelular que infectan nuevos MΦ. La necrosis inducida por la cepa 410 viable deberá ser determinada para saber su mayor capacidad de invasión se debe a este mecanismo. Cabe destacar que en los preparados teñidos con Ziehl-Neelsen y azul de metileno no se observó un número significativo de núcleos condensados que indiquen muerte por apoptosis (datos no mostrados).

En conjunto, los resultados obtenidos en la capacidad de replicación intracelular dentro del MΦ por las cepas Haarlem MDR, M y 410, se contraponen a lo observado con las cepas de la familia Beijing: la cepa no próspera 410, se multiplicó más rápidamente a pesar de no ser virulenta. Contrariamente, la replicación de la cepa virulenta M fue menor. Por lo tanto, el mayor crecimiento intracelular como único parámetro de virulencia no sería válido, ya que la estrategia de M sería opuesta a la de las cepas Beijing, es decir crecer lentamente dentro de su célula huésped. Este hecho implica que habría otros mecanismos de evasión que darían lugar al éxito de determinados genotipos de *Mtb*.

La respuesta temprana de los MΦ frente a *Mtb* dependería de un balance entre las señales transducidas por sus PRR: algunas estarían relacionadas con la activación de la respuesta proinflamatoria y micobactericida, mientras que otras tendrían un rol en la evasión de la respuesta inmune (Fig. 2.3.3). Tanto H37Rv como M y 410 indujeron un aumento transitorio de la expresión del MR, mientras que TLR2 y TLR4 sólo lo hicieron con H37Rv y M. Llamativamente, M indujo un mayor aumento en la expresión del receptor de activación Dectin-1 (Fig. 4.2.2). La relevancia de estos resultados está siendo evaluada estudiando la funcionalidad de estos receptores.

*Mtb* se caracteriza por tener una pared bacteriana compleja compuesta de lípidos y carbohidratos, algunos de ellos ausentes en otros taxones. A diferencia de otros patógenos, *Mtb* carece de factores de virulencia típicos como toxinas, y la patogenicidad dependería de una interacción compleja entre el huésped y la bacteria. Gran parte de las

funciones inmunomoduladoras fueron atribuidas a componentes de la pared bacteriana (Fig. 2.3.3 y 2.3.4), siendo estos en su mayoría de naturaleza lipídica o glicolipídica. Los antígenos proteicos que fueron caracterizados con más detalle son ESAT-6 y CFP-10, los cuales son secretados al medio extracelular a través del sistema de secreción de tipo VII formando un heterodímero [179].

En este trabajo de Tesis observamos diferencias entre la respuesta inducida por las bacterias inactivadas por calor, las γ-irradiadas y las vivas. La inactivación de los bacilos previene la secreción activa de ciertos antígenos, y se sabe que algunos mecanismos de evasión requieren de la bacteria viable, como la inhibición de la formación del fagolisosoma. Dicho mecanismo dependería de factores que requieren una transcripción/traducción continua o bien estaría regulado por genes que sólo se expresan dentro del fagosoma [88]. Así, en nuestro modelo, las cepas inactivadas indujeron un pico de producción temprano de TNF-α, mientras que los niveles se mantuvieron elevados con bacterias viables aún 5 días post-infección. Por otro lado, si bien la inactivación mediante irradiación ionizante preserva la estructura bacteriana, en los bacilos inactivados por calor la estructura de los antígenos proteicos estaría seriamente comprometida. Sin embargo, pudimos corroborar por citometría de flujo que el tamaño celular no estaba alterado, e incluso se conservaban estructuras de carbohidratos que pudieron ser reconocidas por lectinas solubles (Schierloh, observaciones no publicadas). El tratamiento con calor también podría haber alterado la disponibilidad y/o proporción de ciertos antígenos, dando lugar a las diferencias observadas.

En este contexto, el ManLAM es un glicolípido complejo presente en la pared de *Mtb* (Fig. 2.3.4) al que se le han atribuido varias funciones inmunomoduladoras que favorecen al patógeno, siendo la presencia de las manosas terminales de vital importancia. Los LAM de las especies no patogénicas de crecimiento rápido como *M. smegmatis* (PILAM) y *M. chelonae* (AraLAM) carecen del *cap* de manosas [80]. Tanto AraLAM como los precursores de los lipoarabinomananos, LM (lipomanano) y PIM (también presentes en la pared de *Mtb*) son fuertes inductores de CK proinflamatorias, QK y $NO^{-}$, mientras que ManLAM es capaz de interferir con numerosos mecanismos efectores. De este modo, se ha propuesto que la virulencia de una micobacteria estaría determinada por el balance LAM/LM [88]. En particular, ha sido descripto que ManLAM sería capaz de inhibir la respuesta apoptótica del MΦ, inhibiendo el aumento de $Ca^{2+}$ intracelular [180] e induciendo la fosforilación e inactivación del factor proapoptótico Bad

[181], mientras que el LM es un fuerte inductor de apoptosis [80]. Las diferencias observadas estarían determinadas por los receptores que reconocen estas estructuras: mientras ManLAM es reconocido por el MR, sus precursores se unirían al TLR2 (Fig. 2.3.3). Por lo tanto, es tentador especular que las diferencias observadas en el presente trabajo en la inducción/inhibición de la apoptosis se deberían en parte a estos antígenos glicolipídicos, ya que estos serían más estables a la inactivación por calor que las proteínas.

Las diferencias observadas entre las cepas estudiadas pueden deberse a variaciones en proporción y exposición de los antígenos relacionados hasta el momento con la virulencia de *Mtb*. Sin embargo, no se puede descartar que existan factores de virulencia específicos de las cepas Haarlem patogénicas. Barry y Kaplan han identificado en las cepas hipervirulentas de la familia Beijing un lípido de superficie ausente tanto en H37Rv como la cepa CDC1551 debido a una deleción de 7 pares de base en el *cluster* de genes *pks1-15* [182]. El producto de este gen es una policétido sintasa (PKS) que da lugar a la síntesis del glicolípido fenólico (PGL) a partir de DIM. Si bien la disrupción de este gen revirtió el fenotipo hipervirulento tanto en el modelo murino [182], como en un modelo de meningitis en conejo [149], la transfección del gen *pks1-15* en H37Rv no logró establecer el fenotipo hipervirulento [183]. Dicho dato recalca la importancia del *background* genético de un determinado aislado.

## 5.3. CONCLUSIONES FINALES

Esta tesis constituye el primer trabajo que, complementando las observaciones epidemiológicas, investiga la respuesta inmune innata inducida por una cepa MDR que generó el primer brote de gran magnitud de tuberculosis multirresistente a drogas en nuestro país. Hemos tratado de investigar si el éxito de la cepa M para perpetuarse en su nicho geográfico estaría ligado a su capacidad de evadir ciertos mecanismos de la respuesta inmune innata, y para ello la comparamos con la cepa no próspera 410. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la respuesta inmune frente a aislados clínicos MDR es diferente a la desencadenada por la cepa de laboratorio H37Rv. El éxito epidemiológico de la cepa M, en contraposición a la cepa 410, estaría ligado a su baja replicación e inducción de apoptosis, y a una menor respuesta inflamatoria inducida en su célula huésped. Este dato se opone a lo publicado con la familia Beijing. Además, demostramos que la respuesta de los Mo de controles sanos y pacientes es la resultante de la interacción de factores del huésped con las variaciones antigénicas propias del genotipo de *Mtb*.

Si bien estudios futuros son necesarios para comprender la relación exacta entre los parámetros medidos y el éxito o fracaso epidemiológico de los genotipos estudiados, nuestros resultados contribuyen a comprender que *Mtb* es una especie con considerable variabilidad genética, la cual fue desafiada en las últimas décadas por la alta presión de selección ejercida por la quimioterapia y la vacunación masiva con BCG. Nuestras observaciones son importantes para el futuro diseño racional de vacunas y métodos diagnósticos de base inmunológica, ya que la predominancia de genotipos asociados a regiones geográficas ha sido descripta muy recientemente y se desconoce la relevancia de este punto. El desarrollo de vacunas efectivas es de importancia vital, ya que la carrera entre *Mtb* y el desarrollo de nuevos antibióticos claramente está siendo ganada por este patógeno antiguo como la raza humana. El uso racional de las drogas antituberculosas y el compromiso de las autoridades sanitarias para frenar la aparición de nuevos genotipos resistentes serán las que determinen si tendremos que denominar el presente siglo como la “Era DR” o no.

"(...) human societal failures have potentiated the evolution of drug-resistant strains (...). Reinforced treatment and control programs for TB are vital. Our response to this challenge will reflect on whether we deserve the appellation "sapient" or whether anthropologists will need to find another designation for our species."

Iseman E. Evolution of drug-resistant tuberculosis: A tale of two species. *PNAS*. 1994

# 6. BIBLIOGRAFÍA

# 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Palmero, D., Cusmano, L., Bucci, Z., Romano, M., Ruano, S. and Waisman, J. Infectiousness and virulence of multidrug-resistant and drug susceptible tuberculosis in adult contacts. *Medicina (B Aires)* 2002; **62**:221-5

2. Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., Supply, P. and Vincent, V. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Path* 2005; **1**:e5

3. Wirth, T., et al. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Path* 2008; **4**:e1000160

4. Brosch, R., et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS* 2002; **99**:3684-3689

5. Hershberg, R., et al. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol* 2008; **6**:e311

6. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Palomino, J.C., Cardoso Leão, S. and Ritacco, V. 2007

7. Yong Kim, J., Shakow, A., Mate, K., Vanderwalker, C., Gupta, R. and Farmer, P. Limited good and limited vision: multidrug-resistant tuberculosis and global health policy. *Soc Sci Med* 2005; **61**:847-859

8. Vaccarezza, R.F. Historia de una idea. Contagiosidad de la tuberculosis. *Troquel*, 1978

9. Historia de la tuberculosis. Wikipedia, La enciclopedia libre. Fecha de consulta: Mayo del 2009, http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Historia_de_la_tuberculosis&oldid=26704479

10. Farmer, P. Social Inequalities and Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infect Dis* 1996; **2**:259-269

11. Kaufmann, S.H. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol* 2005; **26**:660-7

12. Vilchèze, C. and Jacobs, J., William R. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. *Annu Rev Microbiol* 2007; **61**:35-50

13. Morens, D.M. At the deathbed of consumptive art. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**:1353-8

14. Fox, W., Ellard, G.A. and Mitchison, D.A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; **3**:S231-79

15. Mitchison, D.A. The Diagnosis and Therapy of Tuberculosis During the Past 100 Years. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **171**:699-706

16. Frieden, T.R., Sterling, T., Pablos-Mendez, A., Kilburn, J.O., Cauthen, G.M. and Dooley, S.W. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993; **328**:521-6

17. Moss, A.R., et al. A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; **1**:115-121

18. World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. 2008;

19. Gandhi, N.R., et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006; **368**:1575-80

20. World Health Organization. WHO REPORT 2009. Global Tuberculosis Control. EPIDEMIOLOGY, STRATEGY, FINANCING. 2009;

21. Mathema, B., Kurepina, N.E., Bifani, P.J. and Kreiswirth, B.N. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**:658-85

22. Cohen, T., Colijn, C., Finklea, B., Wright, A., Zignol, M., Pym, A. and Murray, M. Are survey-based estimates of the burden of drug resistant TB too low? Insight from a simulation study. *PLoS One* 2008; **3**:e2363

23. Cohn, M.L., Oda, U., Kovitz, C. and Middlebrook, G. Studies on isoniazid and tubercle bacilli. I-III. The isolation of isoniazid-resistant mutants in vitro. *Am Rev Tuberc* 1954; **70**:465-75

24. Cohen, T. and Murray, M. Modeling epidemics of multidrug-resistant M. tuberculosis of heterogeneous fitness. *Nat Med* 2004; **10**:1117-21

25. Blower, S.M. and Chou, T. Modeling the emergence of the 'hot zones': tuberculosis and the amplification dynamics of drug resistance. *Nat Med* 2004; **10**:1111-1116

26. Farmer, P., et al. The dilemma of MDR-TB in the global era. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; **2**:869-876

27. Warner, D.F. and Mizrahi, V. Tuberculosis chemotherapy: the influence of bacillary stress and damage response pathways on drug efficacy. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**:558-70

28. Hett, E.C. and Rubin, E.J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; **72**:126-56, table of contents

29. Danilchanka, O., Mailaender, C. and Niederweis, M. Identification of a Novel Multidrug Efflux Pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:2503-2511

30. Abebe, F. and Bjune, G. The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccines: is there a link? *Clin Exp Immunol* 2006; **145**:389-397

31. Iseman, M.D. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**:2428-9

32. Bifani, P., et al. The evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: from a mono-rifampin-resistant cluster into increasingly multidrug-resistant variants in an HIV-seropositive population. *J Infect Dis* 2008; **198**:90-4

33. Farmer, P. Social scientists and the new tuberculosis. *Soc Sci Med* 1997; **44**:347-58

34. Umubyeyi, A., Shamputa, I.C., Rigouts, L., Dediste, A., Struelens, M. and Portaels, F. Evidence of 'amplifier effect' in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: report of three cases. *Int J Infect Dis* 2007; **11**:508-12

35. Sherman, D.R., Mdluli, K., Hickey, M.J., Arain, T.M., Morris, S.L., Barry, C.E., 3rd and Stover, C.K. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Science* 1996; **272**:1641-3

36. Palmero, D.J., Ritacco, V. and Waisman, J.L. Tuberculosis multi-resistente: epidemias nosocomiales. Benetucci, J. *En:* SIDA y enfermedades asociadas, 2da Edición, *ed Fundai*, Buenos Aires, 2001

37. Ritacco, V. and Reniero, A. Aplicación de las técnicas de ADN a la epidemiología de la tuberculosis. González Montaner, J. and Palmero, D.J. *En:* Tuberculosis multi-resistente, *Lab. Hoechst Marion Roussel*, Argentina, 1998

38. Gagneux, S., et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 2006; **103**:2869-2873

39. Murray, M. and Nardell, E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. *Bull WHO* 2002; **80**:477-82

40. López, B., et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003; **133**:30-7

41. Kaufmann, S.H. and Parida, S.K. Tuberculosis in Africa: learning from pathogenesis for biomarker identification. *Cell Host Microbe* 2008; **4**:219-28

42. Bossio, J.C., Arias, S., Landra, F., Garcilazo, D. and Veronesi, I.C., Ricardo. Notificación de casos de tuberculosis en la República Argentina. Período 1980-2006. *Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. Emilio Coni"*, Santa Fe, Argentina, 2007

43. Ritacco, V., et al. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *J Infect Dis* 1997; **176**:637-42

44. Poggio, G., Togneri, A., Reniero, A., Insúa, A., Guerra, R., Dinerstein, E., Kantor, I.N. and Ritacco, V. AIDS-related multidrug resistant tuberculosis "M" strain spreads within two hospitals in Buenos Aires suburbs. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; **1 (Suppl. 1)**:523

45. Alito, A., Morcillo, N., Scipioni, S., Dolmann, A., Romano, M.I., Cataldi, A. and van Soolingen, D. The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-

resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:788-91

46. Morcillo, N., Alito, A., Romano, M.I., Cataldi, A., Dolmann, A., Reniero, A. and de Kantor, I.N. *Multidrug resistant tuberculosis* outbreak in Buenos Aires. DNA fingerprinting analysis of isolates. *Medicina (B Aires)* 1996; **56**:45-7

47. Ritacco, V., Reiniero, A., Ambroggi, M., Barrera, L., López, B., Di Lonardo, M. and Kantor, I.N. Inter-hospital spread of multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *Tubercle Lung Dis* 1996; **77**:64

48. Aita, J., et al. Hospital transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rosario, Argentina. *Medicina (B Aires)* 1996; **56**:48-50

49. Haas, D.W., Milton, S., Kreiswirth, B.N., Brinsko, V.L., Bifani, P.J. and Schaffner, W. Nosocomial transmission of a drug-sensitive W-variant *Mycobacterium tuberculosis* strain among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Tennessee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; **19**:635-9

50. Algood, H.M., Chan, J. and Flynn, J.L. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; **14**:467-77

51. Stewart, G.R., Robertson, B.D. and Young, D.B. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 2003; **1**:97-105

52. Ulrichs, T. and Kaufmann, S.H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 2006; **208**:261-9

53. van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M. and Peters, P.J. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 2007; **129**:1287-98

54. Schaible, U.E., et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 2003; **9**:1039-46

55. Winau, F., et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 2006; **24**:105-17

56. Khader, S.A., et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 2007; **8**:369-77

57. Kaufmann, S.H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001; **1**:20-30

58. Dlugovitzky, D., Bay, M., Rateni, L., Fiorenza, G., Vietti, L., Farroni, M. and Bottasso, O. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol* 2000; **122**:343-349

59. Guyot-Revol, V., Innes, J.A., Hackforth, S., Hinks, T. and Lalvani, A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **173**:803-10

60. Martinez, F.O., Helming, L. and Gordon, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**:451-83

61. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; **449**:819-26

62. Kawai, T. and Akira, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005; **17**:338-44

63. Drennan, M.B., et al. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol* 2004; **164**:49-57

64. Abel, B., Thieblemont, N., Quesniaux, V.J., Brown, N., Mpagi, J., Miyake, K., Bihl, F. and Ryffel, B. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 2002; **169**:3155-62

65. Caws, M., et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2008; **4**:e1000034

66. Yim, J.J., Lee, H.W., Lee, H.S., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S. and Holland, S.M. The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans. *Genes Immun* 2006; **7**:150-5

67. Jo, E.-K., Yang, C.-S., Choi, C.H. and Harding, C.V. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol* 2007; **9**:1087-1098

68. Jo, E.K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr Opin Infect Dis* 2008; **21**:279-86

69. Jozefowski, S., Sobota, A. and Kwiatkowska, K. How *Mycobacterium tuberculosis* subverts host immune responses. *Bioessays* 2008; **30**:943-54

70. Pathak, S.K., et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol* 2007; **8**:610-8

71. Gandotra, S., Jang, S., Murray, P.J., Salgame, P. and Ehrt, S. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2007; **75**:5127-34

72. Yang, Y., Yin, C., Pandey, A., Abbott, D., Sassetti, C. and Kelliher, M.A. NOD2 pathway activation by MDP or *Mycobacterium tuberculosis* infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. *J Biol Chem* 2007; **282**:36223-9

73. Areschoug, T. and Gordon, S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib Microbiol* 2008; **15**:45-60

74. Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M. and Puzo, G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* 2001; **166**:7477-85

75. Kang, P.B., Azad, A.K., Torrelles, J.B., Kaufman, T.M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L.E. and Schlesinger, L.S. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* 2005; **202**:987-99

76. Tailleux, L., et al. DC-SIGN Is the Major *Mycobacterium tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells. *J Exp Med* 2003; **197**:121-127

77. Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Appelmelk, B. and van Kooyk, Y. Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *J Exp Med* 2003; **197**:7-17

78. Tailleux, L., et al. DC-SIGN Induction in Alveolar Macrophages Defines Privileged Target Host Cells for Mycobacteria in Patients with Tuberculosis. *PLoS Med* 2005; **2**:e381

79. VanderVen, B.C., Harder, J.D., Crick, D.C. and Belisle, J.T. Export-Mediated Assembly of Mycobacterial Glycoproteins Parallels Eukaryotic Pathways. *Science* 2005; **309**:941-943

80. Dao, D.N., Kremer, L., Guerardel, Y., Molano, A., Jacobs, W.R., Jr., Porcelli, S.A. and Briken, V. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* 2004; **72**:2067-74

81. Brown, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:33-43

82. Yadav, M. and Schorey, J.S. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 2006; **108**:3168-3175

83. Rothfuchs, A.G., Bafica, A., Feng, C.G., Egen, J.G., Williams, D.L., Brown, G.D. and Sher, A. Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol* 2007; **179**:3463-71

84. Flynn, J.L. and Chan, J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol* 2005; **13**:98-102

85. Dao, D.N., et al. Mycolic acid modification by the mmaA4 gene of M. tuberculosis modulates IL-12 production. *PLoS Pathog* 2008; **4**:e1000081

86. Silver, R.F., Li, Q. and Ellner, J.J. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infect Immun* 1998; **66**:1190-9

87. van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T.B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:697-709

88. Briken, V., Porcelli, S.A., Besra, G.S. and Kremer, L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 2004; **53**:391-403

89. Mendelson, M., Walters, S., Smith, I. and Kaplan, G. Strain-specific mycobacterial lipids and the stimulation of protective immunity to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2005; **85**:407-13

90. Smith, I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003; **16**:463-96

91. Sharma, M. and Rudel, T. Apoptosis resistance in Chlamydia-infected cells: a fate worse than death? *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; **55**:154-61

92. Zychlinsky, A. and Sansonetti, P. Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J Clin Invest* 1997; **100**:493-5

93. Faherty, C.S. and Maurelli, A.T. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends Microbiol* 2008; **16**:173-80

94. Briken, V. and Miller, J.L. Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by Mycobacterium tuberculosis. *Future Microbiol* 2008; **3**:415-22

95. Lee, J., Hartman, M. and Kornfeld, H. Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei Med J* 2009; **50**:1-11

96. Siegel, R.M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:308-17

97. Molloy, A., Laochumroonvorapong, P. and Kaplan, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med* 1994; **180**:1499-509

98. Arcila, M.L., Sanchez, M.D., Ortiz, B., Barrera, L.F., Garcia, L.F. and Rojas, M. Activation of apoptosis, but not necrosis, during *Mycobacterium tuberculosis* infection correlated with decreased bacterial growth: role of TNF-alpha, IL-10, caspases and phospholipase A2. *Cell Immunol* 2007; **249**:80-93

99. Lee, J., Remold, H.G., Ieong, M.H. and Kornfeld, H. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *J Immunol* 2006; **176**:4267-74

100. Keane, J., Balcewicz-Sablinska, M.K., Remold, H.G., Chupp, G.L., Meek, B.B., Fenton, M.J. and Kornfeld, H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997; **65**:298-304

101. Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., MacDonald, H.R. and Meylan, P.R. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998; **160**:5448-54

102. Loeuillet, C., Martinon, F., Perez, C., Munoz, M., Thome, M. and Meylan, P.R. *Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors. *J Immunol* 2006; **177**:6245-55

103. Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Weiss, D.S., Godowski, P. and Zychlinsky, A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* 2000; **19**:3325-36

104. Sánchez, A., Espinosa, P., Esparza, M.A., Colon, M., Bernal, G. and Mancilla, R. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa Lipoprotein is Apoptogenic for Human Monocyte-derived Macrophages. *Scand J Immunol* 2009; **69**:20-28

105. Ciaramella, A., et al. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. *J Infect Dis* 2004; **190**:1167-76

106. Klingler, K., Tchou-Wong, K.M., Brandli, O., Aston, C., Kim, R., Chi, C. and Rom, W.N. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 1997; **65**:5272-8

107. Placido, R., et al. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Pathology* 1997; **181**:31-38

108. Liu, H., Ma, Y., Pagliari, L.J., Perlman, H., Yu, C., Lin, A. and Pope, R.M. TNF-alpha-induced apoptosis of macrophages following inhibition of NF-kappa B: a central role for disruption of mitochondria. *J Immunol* 2004; **172**:1907-15

109. World Health Organization. Treatment of Tuberculosis: Guidelines for National Programmes. Third Edition. 2003;

110. Auffray, C., Sieweke, M.H. and Geissmann, F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**:669-92

111. Allen, J.B., Wong, H.L., Guyre, P.M., Simon, G.L. and Wahl, S.M. Association of circulating receptor Fc gamma RIII-positive monocytes in AIDS patients with elevated levels of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1991; **87**:1773-9

112. Blumenstein, M., Boekstegers, P., Fraunberger, P., Andreesen, R., Ziegler-Heitbrock, H.W. and Fingerle-Rowson, G. Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 1997; **8**:73-5

113. Fernandez, G.C., et al. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *J Leukoc Biol* 2005; **78**:853-61

114. Fingerle-Rowson, G., Angstwurm, M., Andreesen, R. and Ziegler-Heitbrock, H.W. Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 1998; **112**:501-6

115. Nockher, W.A. and Scherberich, J.E. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 1998; **66**:2782-90

116. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; **81**:584-592

117. Ancuta, P., Weiss, L. and Haeffner-Cavaillon, N. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol* 2000; **30**:1872-83

118. Mariathasan, S. and Monack, D.M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**:31-40

119. Bogdan, C. and Schleicher, U. Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy? *Trends Immunol* 2006; **27**:282-90

120. Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T. and Ziegler-Heitbrock, L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002; **168**:3536-42

121. Al-Attiyah, R., Mustafa, A.S., Abal, A.T., Madi, N.M. and Andersen, P. Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferon-gamma responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; **38**:249-56

122. Koul, A., Herget, T., Klebl, B. and Ullrich, A. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**:189-202

123. Singhal, A., Jaiswal, A., Arora, V.K. and Prasad, H.K. Modulation of gamma interferon receptor 1 by *Mycobacterium tuberculosis*: a potential immune response evasive mechanism. *Infect Immun* 2007; **75**:2500-10

124. Li, Q., Whalen, C.C., Albert, J.M., Larkin, R., Zukowski, L., Cave, M.D. and Silver, R.F. Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model. *Infect Immun* 2002; **70**:6489-93

125. Wong, K.C., et al. Molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their association with phenotypic virulence in human macrophages. *Clin Vaccine Immunol* 2007; **14**:1279-84

126. Keane, J., Remold, H.G. and Kornfeld, H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 2000; **164**:2016-20

127. Rojas, M., Olivier, M. and Garcia, L.F. Activation of JAK2/STAT1-alpha-dependent signaling events during *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis. *Cell Immunol* 2002; **217**:58-66

128. Ma, Y., Temkin, V., Liu, H. and Pope, R.M. NF-kappaB protects macrophages from lipopolysaccharide-induced cell death: the role of caspase 8 and receptor-interacting protein. *J Biol Chem* 2005; **280**:41827-34

129. Chen, M., Gan, H. and Remold, H.G. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant

mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J Immunol* 2006; **176**:3707-16

130. Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H. and Remold, H.G. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 1998; **161**:2636-41

131. Sharma, S., Sharma, M., Roy, S., Kumar, P. and Bose, M. *Mycobacterium tuberculosis* induces high production of nitric oxide in coordination with production of tumour necrosis factor-alpha in patients with fresh active tuberculosis but not in MDR tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 2004; **82**:377-82

132. McDyer, J.F., Hackley, M.N., Walsh, T.E., Cook, J.L. and Seder, R.A. Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4+ T cell counts have impaired Th1 responses. *J Immunol* 1997; **158**:492-500

133. Lee, J.S., et al. The production of tumour necrosis factor-alpha is decreased in peripheral blood mononuclear cells from multidrug-resistant tuberculosis patients following stimulation with the 30-kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2003; **132**:443-9

134. Lee, J.S., et al. Profiles of IFN-gamma and its regulatory cytokines (IL-12, IL-18 and IL-10) in peripheral blood mononuclear cells from patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2002; **128**:516-24

135. Geffner, L., et al. Patients with multidrug resistant tuberculosis display impaired Th1 response and enhanced regulatory T cells levels in response to M and Ra outbreak multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Infect Immun* 2009; **77**:5025-34

136. Vanham, G., et al. Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1996; **103**:30-4

137. Ancuta, P., Liu, K.-Y., Misra, V., Wacleche, V., Gosselin, A., Zhou, X. and Gabuzda, D. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics* 2009; **10**:403

138. Rushworth, S.A., MacEwan, D.J. and O'Connell, M.A. Lipopolysaccharide-Induced Expression of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 and Heme Oxygenase-1 Protects against Excessive Inflammatory Responses in Human Monocytes. *J Immunol* 2008; **181**:6730-6737

139. Song, C.H., et al. Depressed interleukin-12 (IL-12), but not IL-18, production in response to a 30- or 32-kilodalton mycobacterial antigen in patients with active pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2000; **68**:4477-84

140. Vankayalapati, R., Wizel, B., Weis, S.E., Klucar, P., Shams, H., Samten, B. and Barnes, P.F. Serum cytokine concentrations do not parallel *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2003; **36**:24-8

141. Wang, C.H., Lin, H.C., Liu, C.Y., Huang, K.H., Huang, T.T., Yu, C.T. and Kuo, H.P. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine secretion in peripheral blood monocytes from pulmonary tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; **5**:283-91

142. Cadranel, J., Philippe, C., Philippe, B., Milleron, B., Fouqueray, B., Mayaud, C. and Baud, L. Increased expression and occupancy of receptors for tumour necrosis factor on blood monocytes from tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 1993; **94**:51-6

143. Takashima, T., Ueta, C., Tsuyuguchi, I. and Kishimoto, S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 1990; **58**:3286-92

144. Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J., John, S. and Taams, L.S. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:19446-51

145. Fricke, I., Mitchell, D., Mittelstadt, J., Lehan, N., Heine, H., Goldmann, T., Bohle, A. and Brandau, S. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* 2006; **176**:5173-82

146. Hirsch, Christina S., et al. Apoptosis and T Cell Hyporesponsiveness in Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases* 1999; **179**:945-953

147. Valway, S.E., et al. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1998; **338**:633-9

148. Manca, C., et al. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 1999; **162**:6740-6

149. Tsenova, L., et al. Virulence of Selected *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in the Rabbit Model of Meningitis Is Dependent on Phenolic Glycolipid Produced by the Bacilli. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; **192**:98-106

150. Bean, A.G., Roach, D.R., Briscoe, H., France, M.P., Korner, H., Sedgwick, J.D. and Britton, W.J. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 1999; **162**:3504-11

151. Jacobs, M., Marino, M.W., Brown, N., Abel, B., Bekker, L.G., Quesniaux, V.J., Fick, L. and Ryffel, B. Correction of defective host response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-deficient mice by bone marrow transplantation. *Lab Invest* 2000; **80**:901-14

152. Keane, J. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)* 2005; **44**:714-20

153. Martinon, F. and Tschopp, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 2007; **14**:10-22

154. Kurenuma, T., et al. RD1 locus in *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages. *Infect Immun* 2009;

155. Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. Interleukins 1[beta] and 6 but not transforming growth factor-[beta] are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007; **8**:942-949

156. Fremond, C.M., et al. IL-1 Receptor-Mediated Signal Is an Essential Component of MyD88-Dependent Innate Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol* 2007; **179**:1178-1189

157. Ulrichs, T., et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 2004; **204**:217–228

158. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:23-35

159. Gagneux, S., Burgos, M., De Riemer, K., Enciso, A., Muñoz, S., Hopewell, P.C., Small, P. and Pym, A. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2006; **2**:e61

160. Williams, D.L., et al. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**:2380-2386

161. Marais, B.J., et al. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa. *J Clin Microbiol* 2006; **44**:3539-43

162. Mardassi, H., et al. Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**:957-61

163. Olano, J., et al. Mutations in DNA repair genes are associated with the Haarlem lineage of *Mycobacterium tuberculosis* independently of their antibiotic resistance. *Tuberculosis (Edinb)* 2007; **87**:502-8

164. Alix, E., Godreuil, S. and Blanc-Potard, A.B. Identification of a Haarlem genotype-specific single nucleotide polymorphism in the mgtC virulence gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**:2093-8

165. Buchmeier, N., Blanc-Potard, A., Ehrt, S., Piddington, D., Riley, L. and Groisman, E.A. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2000; **35**:1375-82

166. Kubica, G.P., Kim, T.H. and Dunbar, F.P. Designation of Strain H37Rv as the Neotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Syst Bacteriol* 1972; **22**:99-106

167. Park, J.S., Tamayo, M.H., Gonzalez-Juarrero, M., Orme, I.M. and Ordway, D.J. Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 2006; **79**:80-6

168. Theus, S.A., Cave, M.D., Eisenach, K., Walrath, J., Lee, H., Mackay, W., Whalen, C. and Silver, R.F. Differences in the growth of paired Ugandan isolates of *Mycobacterium tuberculosis* within human mononuclear phagocytes correlate with epidemiological evidence of strain virulence. *Infect Immun* 2006; **74**:6865-76

169. Sohn, H., Lee, K.S., Kim, S.Y., Shin, D.M., Shin, S.J., Jo, E.K., Park, J.K. and Kim, H.J. Induction of cell death in human macrophages by a highly virulent Korean Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* and the virulent strain H37Rv. *Scand J Immunol* 2009; **69**:43-50

170. Uchiyama, R., et al. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2007; **75**:2894-902

171. Salaun, B., Romero, P. and Lebecque, S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* 2007; **37**:3311-8

172. Sánchez, D., Rojas, M., Hernández, I., Radzioch, D., García, L.F. and Barrera, L.F. Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death *Cell Immunol* 2010; **260**:128-136

173. Kremer, L., Estaquier, J., Brandt, E., Ameisen, J.C. and Locht, C. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *Eur J Immunol* 1997; **27**:2450-6

174. Zhang, J., Jiang, R., Takayama, H. and Tanaka, Y. Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. *Microbiol Immunol* 2005; **49**:845-52

175. Mogga, S.J., Mustafa, T., Sviland, L. and Nilsen, R. Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol* 2002; **56**:383-91

176. Sly, L.M., Hingley-Wilson, S.M., Reiner, N.E. and McMaster, W.R. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* 2003; **170**:430-7

177. Barczak, Amy K., Domenech, P., Boshoff, Helena I M., Reed, Michael B., Manca, C., Kaplan, G. and Barry, Clifton E I. In Vivo Phenotypic Dominance in Mouse Mixed Infections with *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; **192**:600-606

178. Rock, K. and Kono, H. The inflammatory Response to Cell Death. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2008; **3**:99-126

179. Simeone, R., Bottai, D. and Brosch, R. ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* 2009; **12**:4-10

180. Rojas, M., Garcia, L.F., Nigou, J., Puzo, G. and Olivier, M. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis by altering Ca+2-dependent cell signaling. *J Infect Dis* 2000; **182**:240-51

181. Maiti, D., Bhattacharyya, A. and Basu, J. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2001; **276**:329-33

182. Reed, M.B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N., Kaplan, G. and Barry, C.E. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 2004; **431**:84-87

183. Sinsimer, D., et al. The Phenolic Glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* Differentially Modulates the Early Host Cytokine Response but Does Not in Itself Confer Hypervirulence. *Infect Immun* 2008; **76**:3027-3036